

ADELINE CONCEIÇÃO RODRIGUES

**ATIVIDADE DO EXTRATO FENÓLICO DE PITANGA SOBRE A FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Serratia liquefaciens***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R696a
2019
Rodrigues, Adeline Conceição, 1987-
Atividade do extrato fenólico de pitanga sobre a formação
de biofilmes por *Serratia liquefaciens* / Adeline Conceição
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2019.
xii, 51 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Nélio José de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2019.
Referências bibliográficas: f. 36-51.

1. *Serratia liquefaciens*. 2. Biofilmes. 3. Quorum sensing
(Microbiologia). 4. Pitanga. I. Andrade, Nélio José de, 1952-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

Bibliotecário(a) responsável: Juliana Ottoni da Silva Pereira CRB-6/1155

ADELINE CONCEIÇÃO RODRIGUES

**ATIVIDADE DO EXTRATO FENÓLICO DE PITANGA SOBRE A FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR *Serratia liquefaciens***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

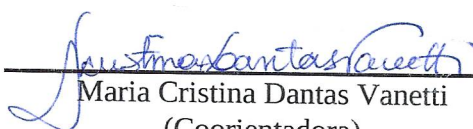
APROVADA: 17 de abril de 2019.



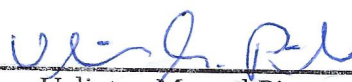
Érica Nascif Rufino Vieira



Felipe Alves de Almeida



Maria Cristina Dantas Vanetti
(Coorientadora)



Uelinton Manoel Pinto
(Coorientador)



Nélio José de Andrade
(Orientador)

*Ao esforço e dedicação de todos os dias trabalhados e a todos que me construíram
profissionalmente.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e força para conclusão desse trabalho.

À minha família.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e pela estrutura oferecida para realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Nélio José de Andrade, agradeço pela confiança, incentivo, pelos ensinamentos, atenção e pela autonomia que sempre me concedeu.

Aos meus coorientadores, Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti, Prof. Uelinton Manoel Pinto agradeço pela atenção, parceria, ensinamentos, disposição e exemplo profissional durante todo o curso.

Aos demais membros da banca, Prof^ª. Érica Nascif Rufino Vieira e Dr. Felipe Alves de Almeida pela disponibilidade de participação na banca e pelas valiosas contribuições para melhoria do trabalho.

Agradeço à Prof^ª. Neusa Mariko Aymoto Hassimotto, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade e Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) pela recepção e execução dos experimentos de análise cromatográficas desse trabalho.

Agradeço aos laboratórios de Corantes Naturais e Compostos Bioativos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e o Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade e Ciências Farmacêuticas da USP.

Agradeço aos companheiros de laboratório, Angie, Ana, Camila, Elisangela, Miriam, Paulo César e Rafaela que tornaram o trabalho mais agradável. Ao estagiário Alexandre pela importante ajuda nos experimentos.

Gratidão aos meus amigos, Driene, Jeferson, Kéllen, Marcela, Mariane e Anita's pela parceria e amor.

Agradeço ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia, Campus Ouro Preto pela maravilhosa experiência como professora e em especial ao Prof. Asdrubal Senra e Prof. Cristiano Trombini e aos demais professores e funcionários.

Agradeço às pessoas especiais que conheci no decorrer desses anos.

Minhas palavras não saberão expressar a minha eterna gratidão! Obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | ix |
| RESUMO | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO | 3 |
| 2.1 Biofilme..... | 3 |
| 2.2 Constituição e função dos exopolímeros (EPS) | 5 |
| 2.3 <i>Serratia</i> | 6 |
| 2.4 Nova estratégia de controle de biofilmes | 8 |
| 2.5 <i>Eugenia uniflora</i> L. | 10 |
| 4 METODOLOGIA | 13 |
| 4.1 Preparo do material vegetal | 13 |
| 4.2 Extração e purificação dos compostos fenólicos..... | 13 |
| 4.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais..... | 13 |
| 4.4 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos..... | 14 |
| 4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjo de diodo (CLAE-DAD)..... | 14 |
| 4.4.2 Cromatografia Líquida – Espectrometria de massa (LC-MS)..... | 14 |
| 4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e sub-MIC do EFP sobre <i>S.</i> <i>liquefaciens</i> L53 | 15 |
| 4.6 Efeito de sub-MIC do EFP sobre a multiplicação de <i>S. liquefaciens</i> L53 em caldo BHI | 15 |
| 4.7 Formação de biofilmes | 15 |
| 4.7.1 Formação e caracterização da composição do biofilme em microplacas de poliestireno na presença do EFP | 15 |

| | |
|--|----|
| 4.7.2 Avaliação dos biofilmes em cupons de poliestireno na presença do EFP..... | 17 |
| 4.8 Efeito combinado do EFP com antibióticos..... | 18 |
| 4.8.1 Avaliação do efeito combinado do EFP com antibióticos..... | 18 |
| 4.8.2 Efeito combinado do EFP com antibióticos..... | 19 |
| 4.9 Análise estatística..... | 19 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 20 |
| 5.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais..... | 20 |
| 5.2 Identificação dos compostos fenólicos..... | 20 |
| 5.3 Determinação da MIC e sub-MIC do EFP e das curvas de multiplicação de <i>S. liquefaciens</i> L53 na presença das sub-MIC do EFP..... | 22 |
| 5.4 Formação de biofilme na presença do EFP..... | 23 |
| 5.4.1 Quantificação e composição do biofilme de <i>S. liquefaciens</i> L53..... | 23 |
| 5.4.2 Composição do biofilme de <i>S. liquefaciens</i> L53 formado na presença de EFP em poliestireno..... | 26 |
| 5.4.3 Microscopia do biofilme de <i>S. liquefaciens</i> L53 formado na presença de concentrações sub-MIC do EFP..... | 29 |
| 5.4.4 Quantificação das células aderidas no poliestireno na presença do EFP e sua susceptibilidade a antimicrobianos..... | 31 |
| 5.5 Efeito combinado do EFP com antibióticos..... | 32 |
| 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA..... | 35 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Identificação de flavonoides por LC-ESI-MS/MS do EFP. | 21 |
| Tabela 2 - Conteúdo de flavonoides identificados no EFP. | 21 |
| Tabela 3 - Efeito de diferentes concentração do EFP sobre a proporção de polissacarídeos, proteínas e DNA no biofilme formado por <i>S. liquefaciens</i> L53 nos tempos de 7, 48 e 168 h. EFP= 0,8 e 1,0 mg AGE. 100 ⁻¹ de polpa de fruta. Controles = 39,4 µM de furanona e 100 µg.mL ⁻¹ de canamicina. | 27 |
| Tabela 4 - Quantificação das células aderidas de <i>S. liquefaciens</i> L53 no poliestireno após 48 h de cultivo na ausência e presença do EFP e furanona e sua susceptibilidade a 2000 mg.L ⁻¹ de dicloroisucianurato de sódio e a 100 µg.mL ⁻¹ de canamicina por 15 min. | 31 |
| Tabela 5 - Efeito combinado de 1,0 mg AGE.100 ⁻¹ de polpa do EFP com os antibióticos 30 µg.mL ⁻¹ de ampicilina, 10 µg.mL ⁻¹ de canamicina e 10 µg.mL ⁻¹ de gentamicina e furanona 39,4 µM..... | 32 |
| Tabela 6 - MIC do EFP, antibióticos e furanona individuais e combinados para cálculo da FICI. | 33 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EFP nos comprimentos de onda 270, 360 e 525 nm. Picos 1 e 2: elagitaninos; pico 3: miricetina pentosídeo; pico 4: ácido elágico; picos 5, 6, 7, 8 e 9: quercetinas; pico 10: cianidina3-*O*-glucosídeo (Tabela 1).21
- Figura 2** - Curva de multiplicação de *S. liquefaciens* L53 em caldo BHI na ausência e presença das concentrações sub-MIC de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta do EFP e furanona 39,4 µM a 30° C.23
- Figura 3** - Efeito de diferentes concentração do EFP sobre a formação de biofilme total por *S. liquefaciens* L53 em poliestireno nos tempos de 7, 48 e 168 h a 30 °C. EFP= 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta. Controles = 39,4 µM de furanona e 100 µg.mL⁻¹ de canamicina. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos no mesmo tempo (p < 0,05) e letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa entre o mesmo tratamento ao longo do tempo (p < 0,05).24
- Figura 4** - Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes de *S. liquefaciens* L53 formados por 48 h na ausência do EFP (A, D, G, J) e na presença de 1,0 mg AGE.100⁻¹ de polpa do EFP (B, E, H, K) e 39,4 µM de furanona (C, F, I, L). Biofilmes de *S. liquefaciens* L53 formados por 48 h e tratados por 15 min com 2000 mg.L⁻¹ de dicloroisocianurato de sódio (G, H, I) e por 15 min com 100 µg.mL⁻¹ canamicina (J, K, L), bem como não tratados (D, E, F). Células verdes fluorescentes são consideradas células vivas e células vermelhas são consideradas células mortas.30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------|--|
| AGE.L ⁻¹ | Ácido gálico equivalente por litro |
| AHL | Acil homoserina lactona |
| AOAC | <i>American of Official Analytical Chemists</i> |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DAD | Detector com arranjo de diodo |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| eDNA | Ácido desoxirribonucleico extracelular |
| EFP | Extrato fenólico de pitanga |
| EPS | Exopolímeros |
| ESI | <i>Electrospray ionization</i> |
| FICI | Índice de concentração inibitória fracional |
| L | Litro |
| LC-ESI-MS/MS | <i>Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| mg | Miligrama |
| mg AGE.100g ⁻¹ | Ácido gálico equivalente por 100 g |
| MIC | Concentração inibitória mínima |
| mL | Mililitro |
| nm | Nanômetro |
| mM | Nanomolar |
| PBS | Solução fosfato salina |
| SPE | Extração em fase sólida |
| Sub-MIC | Concentração sub-inibitória |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UFV | Universidade Federal de Viçosa |
| USP | Universidade de São Paulo |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |

RESUMO

RODRIGUES, Adeline Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019. **Atividade do extrato fenólico de pitanga sobre a formação de biofilmes por *Serratia liquefaciens***. Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Uelinton Manoel Pinto.

Biofilme é um conglomerado de células aderidas a uma superfície, envolvidas em uma matriz de exopolímeros (EPS). É resistente a antimicrobianos tornando difícil sua erradicação. Alternativas para o controle do biofilme estão sendo pesquisadas e os compostos naturais têm apresentado importantes resultados ao interferirem na comunicação pelo mecanismo de *quorum sensing*. Visando avaliar o efeito de concentrações sub-inibitórias (sub-MIC) do extrato fenólico de pitanga (*Eugenia uniflora* L.; EFP) sobre a formação de biofilme de *Serratia liquefaciens* L53. Pitangas foram coletadas, despulpadas e realizou-se a extração purificando os compostos fenólicos utilizando extração em fase sólida (mini-coluna C18). Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, identificados por análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por *Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric* (LC-ESI-MS/MS) e a concentração inibitória mínima (MIC) para *S. liquefaciens* L53. Foram determinadas as concentrações sub-MIC foram avaliadas sobre a formação de biofilme total e sobre os componentes da matriz do biofilme nos tempos de 7, 48 e 168 h. Foi avaliada a susceptibilidade do biofilme de 48 h formado na presença do EFP a agentes antimicrobianos e seu efeito combinado com os antibióticos ampicilina ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), canamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e getamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O EFP apresentou 231 mg de ácido gálico equivalente (AGE). 100 g^{-1} de polpa de compostos fenólicos totais e os flavonoides majoritários identificados foram elagitaninos e derivados glicosilados de quercetina. Em concentrações sub-MIC, o EFP diminuiu a formação do biofilme total e os componentes da matriz dos EPS, polissacarídeos, proteínas e DNA, nos tempos de 7 e 48 h e, em contrapartida, aumentou em 168 h. O EFP não alterou o número de células viáveis de *S. liquefaciens* L53 aderidas ao poliestireno no tempo de 48 h nem a susceptibilidade ao tratamento com 200 mg.L^{-1} de dicloroisocianurato e $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de canamicina comparados ao controle. O EFP, em uso combinado com os antibióticos, apresentou efeito antagônico com os mesmos. Nesse contexto, o uso de concentrações sub-MIC do EFP apresentou efeitos divergentes na formação do biofilme em função do tempo de análise, diminuindo o biofilme em menor tempo e aumentando em tempo maior de cultivo. O EFP não alterou a susceptibilidade do biofilme ao tratamento com

antimicrobianos comparado ao controle e atuou como antagonista com antibióticos. Sendo assim, a utilização do EFP é controversa, pois pode apresentar efeitos indesejáveis, aumentando o biofilme no tempo maior de contato, além de apresentar efeito antagônico com antibióticos.

ABSTRACT

RODRIGUES, Adeline Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2019. **Activity the phenolic extract of pitanga on the formation of biofilms of *Serratia liquefaciens***. Advisors: Nélio José de Andrade. Co-Advisor: Maria Cristina Dantas Vanetti and Uelinton Manoel Pinto.

Biofilm is a conglomerate of cells adhered to a surface, wrapped in a matrix of exopolymers (EPS). It is resistant to antimicrobials making it difficult to eradicate it. Alternatives for biofilm control are being investigated and natural compounds have shown important results by interfering in communication by the mechanism of quorum sensing. In order to evaluate the effect of subinhibitory concentrations (sub-MIC) of the phenolic extract of pitanga (*Eugenia uniflora* L., FEP) on the biofilm formation of *Serratia liquefaciens* L53. Pitangas were collected, pulped and extraction was carried out by purifying the phenolic compounds using solid phase extraction (mini C18 column). The total phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu reagent assay, as well as identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and by Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. liquefaciens* L53 was performed. The sub-MIC concentrations were evaluated on total biofilm formation and biofilm matrix components at 7, 48 and 168 h. The susceptibility of the 48 h biofilm formed in the presence of FEP to antimicrobial agents and their combined effect with the antibiotics ampicillin ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), kanamycin ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and getamycin ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The FEP showed 231 mg gallic acid per 100 g^{-1} pulp AGE. de polpa 17,133.1 per liter (AGE.L^{-1}) of total phenolic compounds and the identified major flavonoids were ellagitannins and glycosylated derivatives of quercetin. In sub-MIC, concentrations, the FEP decreased of the total biofilm formation and matrix components such as EPS, polysaccharides, proteins and DNA after 7 and 48 h cultivation and increased after 168 h. The FEP did not change the number of viable cells of *S. liquefaciens* L53 adhered to the polystyrene in the time of 48 h nor the susceptibility to treatment with 200 mg.L^{-1} of dichloroisocyanurate or 0.1 mg.mL^{-1} of kanamycin in comparison with the control. The EFP combined with antibiotics showed an antagonistic effect. In this context, the use of sub-MIC concentrations of EFP showed divergent effects on biofilm formation as a function of the time of cultivation, reducing biofilm in a shorter time and increasing in time of culture. The EFP did not alter the susceptibility of the biofilm to antimicrobial treatment compared to control and acted as an antagonist with antibiotics. Therefore, the use of EFP is controversial, as it may present

undesirable effects, increasing the biofilm in the longer time of contact, besides presenting an antagonistic effect with antibiotics.

1 INTRODUÇÃO

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas com produção de exopolímeros (EPS). É resistente a antimicrobianos representando um grande problema para sua erradicação. Na indústria de alimentos também pode comprometer a estrutura e funcionamento de equipamentos e tubulações levando a corrosão, entupimento e deficiência na troca e transferência de calor.

Em bactérias de importância para a indústria de alimentos como as do gênero *Serratia*, *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Salmonella*, algumas etapas da formação do biofilme podem ser reguladas por um mecanismo de comunicação conhecido como *quorum sensing*. Esse mecanismo é dependente da densidade celular e envolve a produção ou detecção de moléculas sinalizadoras e a ativação de genes específicos. Sob regulação do *quorum sensing*, bactérias alteram a expressão genica e modificam fenótipos como o biofilme, motilidade, conjugação, virulência, atividade de proteases e lipases, entre outros.

Bactérias pertencentes à espécie *S. liquefaciens* estão associadas à deterioração de alimentos, principalmente de fontes proteicas. *S. liquefaciens* L53 está dentro do grupo das bactérias proteolíticas predominantes isoladas de leite cru e secretam proteases altamente estáveis ao tratamento térmico, com importante atividade residual que podem levar a alterações do leite UHT.

Compostos naturais têm sido estudados na atuação da inibição do biofilme em concentrações sub-inibitórias, associados à interrupção do *quorum sensing*. Os compostos fenólicos têm se destacado e apresentaram atividade sobre a inibição do *quorum sensing* e sobre a formação de biofilmes em diversas bactérias. Além disso, proporcionaram aumento da susceptibilidade das células a ação de antibióticos.

Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) é uma fruta nativa do Brasil, pertencente à família das Mirtáceas e destaca-se pela relevante quantidade de compostos fenólicos. Esses compostos são caracterizados como compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal. São metabólitos secundários de plantas e estão presentes em frutos, folhas, flores, caules e cascas. As frutas e folhas de pitanga são associadas a propriedades terapêuticas e o fruto apresenta importante atividade antioxidante, antimicrobiana e, mais recentemente explorada, anti-*quorum sensing*.

Nesse contexto, o extrato fenólico de pitanga (EFP) poderia desempenhar atividade sobre a formação do biofilme em *S. liquefaciens*. Até o momento, nenhum trabalho foi divulgado sobre a interferência dos compostos fenólicos presentes em pitanga sobre a

formação de biofilme e este estudo objetivou avaliar o efeito do extrato fenólico de pitanga (EFP) em concentrações sub-inibitórias, sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* L53.

Considerando o potencial dos compostos fenólicos presentes em pitanga e a busca por alternativas de controle do biofilme o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato fenólico de pitanga (EFP) em concentrações sub-inibitórias mínimas (sub-MIC) sobre a formação de biofilmes por *S.liquefaciens* L53 bem como avaliar a sua susceptibilidade ao antibiótico canamicina e ao sanitizante dicloroisocianurato de sódio e o efeito combinado do EFP com os antibióticos ampicilina, canamicina e gentamicina.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Biofilme

Biofilme é definido como uma comunidade de micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica que se multiplicam e produzem EPS (O'TOOLE et al., 2000; DONLAN, 2002; ANDRADE, 2008; GRUPTA et al., 2016). Sob a forma de biofilme, os micro-organismos adquirem vantagens como a proteção ao meio ambiente proporcionada pelo EPS, disponibilidade de nutrientes, cooperatividade metabólica e aquisição de novas características genéticas pela transferência horizontal de genes (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Biofilme se forma em ambientes naturais, médicos e industriais. É resistente a antimicrobianos tornando difícil sua erradicação (LÓPEZ, et al., 2010). Na indústria de alimentos a maior resistência dos micro-organismos presentes no biofilme pode ocasionar perda na qualidade e segurança de produtos alimentícios e gerar grandes prejuízos econômicos (DONLAN, 2001). Além disso, pode comprometer equipamentos ao provocar bioincrustações e corrosão do metal, gerando uma redução da eficácia nos processos de transferência de calor e diminuição no fluxo em tubulações (VIDELA e CHARACKLIS, 1992; BEECH et al., 2005).

Numerosos fatores influenciam a formação e o desenvolvimento de biofilme, incluindo gêneros, espécies e estirpes bacterianas. Além dessas, outras variáveis como propriedades celulares características do substrato e intensidade do fluído também são fatores importantes para a sua formação, que ocorre em um processo gradual e dinâmico, seguindo algumas etapas. Essas etapas incluem a fixação reversível e fixação irreversível, desenvolvimento da arquitetura, maturação e dispersão de células planctônicas (DONLAN, 2002; O'TOOLE et al., 2000; GU e REN, 2014).

Na primeira fase de formação de biofilme, fixação reversível, ocorre adesão das células à superfície. Esse primeiro contato das células com a superfície pode ocorrer de forma ativa, proporcionado pela motilidade bacteriana ou pelo transporte direto das células em sua forma planctônica. Nessa etapa, algumas características celulares como a presença de fímbrias, proteínas, lipopolissacarídeos (LPS), EPS e flagelos irão desempenhar papel importante na fixação, proporcionando as interações hidrofóbicas entre a célula bacteriana e a superfície (DONLAN, 2002; SIMÕES et al., 2008). As ligações químicas entre as superfícies e bactérias nessa etapa são forças Van der Waals e ligações eletrostáticas, estando as bactérias fracamente ligadas à superfície, podendo o biofilme ser removido (ANDRADE, 2008; DUFOUR et al., 2012). As propriedades da superfície também apresentam características importantes no processo de fixação e adesão bacteriana para a formação de biofilme. Textura,

rugosidade, hidrofobicidade, carga superficial, pH, temperatura e composição nutricional para um pré-condicionamento da superfície são variáveis importantes nesse processo inicial de adesão (SREY et al., 2013).

Após a fixação inicial, as células aderidas iniciam a produção do EPS que promove a transição da fixação reversível para irreversível. A partir dessa etapa, as células bacterianas estão permanentemente ligadas e são difíceis de se dispersarem (GU e REN, 2014). A mudança da fase reversível para irreversível inclui mudança nas ligações fracas entre as bactérias e superfície para ligações mais fortes e permanentes na presença do EPS. Os tipos de ligações nessa fase podem ser do tipo dipolo, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou ligações hidrofóbicas. Após a fixação irreversível é necessária a aplicação de forças de cisalhamento ou quebra química das forças de fixação por enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes ou o uso de calor para a remoção do biofilme (ANDRADE, 2008; DUFOUR et al., 2012).

A formação do biofilme evolui e entra na fase de desenvolvimento da arquitetura, resultando em um acúmulo e multiplicação de micro-organismos e uma continuada produção do EPS que age fortalecendo a ligação entre as bactérias e estabilizando a colônia contra estresse ambiental (SREY et al., 2013).

O processo de desenvolvimento do biofilme passa para a etapa de maturação que implica na geração de uma arquitetura mais complexa (STOODLEY et al., 2002) e entra na fase de dispersão, última etapa no ciclo de formação. Nesta fase, as células revertem-se à forma planctônica, podendo causar nova colonização ou aderir à uma nova superfície, formando um novo biofilme (GU e REN, 2014; SOLANO et al., 2014). A dispersão de células do biofilme pode ocorrer como resultado de baixos níveis de nutrientes, pela comunicação *quorum sensing* ou pela própria ruptura de agregados do biofilme. Os possíveis mecanismos responsáveis não são bem compreendidos, mas envolvem perturbações externas, como cisalhamento, processos internos do biofilme e uma baixa hidrofobicidade superficial das células filhas recém-divididas (DONLAN, 2002).

O *quorum sensing*, conhecido como um mecanismo de comunicação bacteriana, (FUQUA et al., 1994) está envolvido na regulação das fases de formação do biofilme, principalmente na fase de maturação, regulando a densidade populacional, a produção do EPS, a motilidade e a produção de metabólitos secundários (ANNOUS et al., 2009; SKANDAMIS e NYCHAS, 2012; GU e REN, 2014). Esse mecanismo regula a formação de biofilmes em bactérias de grande importância para a indústria de alimentos como *Serratia* (LABBATE et al., 2004; RICE et al., 2005; MOROHOSHI et al., 2007), *Aeromonas*

hydrophila (JAHID et al., 2015), *Pseudomonas aeruginosa* (HENTZER et al., 2002), *Escherichia coli* (THAKUR et al., 2016) e *Salmonella* spp. (PROUTY et al., 2002; CAMPOS-GALVÃO, 2012; ALMEIDA et al., 2016).

2.2 Constituição e função dos exopolímeros (EPS)

A formação e manutenção do biofilme dependem da produção e da quantidade dos EPS produzidos pelas células planctônicas. Os EPS são definidos como um conglomerado de diferentes biopolímeros, formados por moléculas de alto peso molecular, secreções de microorganismos, produtos da lise celular e da hidrólise de macromoléculas. Esses componentes são incorporados a matriz, formando sua estrutura e arquitetura tridimensional (FLEMMING e WINGENDER, 2010; SHENG et al., 2010).

Os EPS são responsáveis pelo arranjo e integridade funcional do biofilme, além de serem os principais componentes que determinam as propriedades físico-químicas e biológicas do mesmo. Desempenham funções de adesão, agregação de células bacterianas, coesão, retenção de água, barreira protetora, atividade enzimática, fonte de nutrientes, troca de informação genética, dentre outras (SIMÕES et al., 2010).

A natureza química do EPS é diversificada sendo constituído por polissacarídeos, proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA), lipídios e substâncias húmicas (MORE et al., 2014). Dentre os componentes do EPS, os polissacarídeos representam maior fração, podendo corresponder até 90%. Os polissacarídeos do EPS podem ser encontrados sobre a forma ordenada ou desordenada, em cadeias longas e finas, lineares ou ramificados (FLEMMING e WINGENDE, 2010). A maioria é constituída por homopolímeros, como celulose, curdlano ou dextrano, ou heteropolímeros como o alginato, gelana ou xantana. Os polissacarídeos mais presentes em biofilmes são o alginato, a celulose e o poli-N-acetil-glucosamina (LEMBRE et al., 2012). Entre as funções atribuídas aos polissacarídeos na matriz do biofilme estão a adesão, morfologia das colônias, além da criação de arquiteturas distintas. São responsáveis também pela estabilidade, proteção e reservatório de nutrientes no biofilme (LIMOLI et al., 2015).

Outro componente do EPS são proteínas, podendo representar quantidades consideráveis do mesmo. Os componentes protéicos da matriz do biofilme incluem proteínas extracelulares segregadas, adesinas de superfície celular e subunidades protéicas de apêndices celulares como flagelos e pili. As proteínas desempenham diversas funções na formação e na dissolução do biofilme. Estão envolvidas na ligação das células a superfícies, estabilizando a matriz através de interações com componentes de exopolímeros e ácidos nucleicos,

desenvolvendo a arquitetura tridimensional e dissolvendo a matriz via degradação enzimática de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos proporcionando a utilização de nutrientes para o crescimento do biofilme (FONG e YILDIZ, 2015).

Além dos polissacarídeos e proteínas, o ácido desoxirribonucléico extracelular (eDNA) é um componente estrutural importante do EPS, porém presente em menores quantidades. Desempenha funções importantes como conector intercelular, favorece a adesão bacteriana, é responsável pela integridade estrutural e modulação do biofilme. Além disso, o eDNA é essencial para a formação da estrutura do biofilme em forma de cogumelos, sendo responsável também pela transferência horizontal de genes. O eDNA pode remover íons Mg^{2+} e Ca^{2+} da superfície bacteriana e proporcionar a ruptura da membrana e lise celular. Esse componente importante do biofilme pode ser gerado pelas bactérias durante seu crescimento, por uma excreção ativa de DNA, bem como pela lise de uma subpopulação de células bacterianas (OKSHEVSKY e MEYER, 2015).

2.3 *Serratia*

O gênero *Serratia* compreende bactérias na forma de bastonetes gram-negativos da família Enterobacteriaceae. Compreendem as espécies *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea* e *S. ureilytica*. Essas bactérias movimentam-se por flagelos peritríquios, são anaeróbias facultativas, quimiorganotróficas, com metabolismo respiratório e fermentativo (HOUDT et al., 2007).

Serratia são ubíquas e estão associadas a deterioração de alimentos, principalmente os de fontes protéicas (SÄDE e BJÖRKROTH, 2013; MACÉ et al., 2013; VAN et al., 2014; FOUGY et al., 2016). Este gênero encontra-se dentre os micro-organismos deterioradores psicrotóxicos mais abundantes no leite, sendo uma bactéria produtora de enzimas proteolíticas que podem manter o potencial de deterioração mesmo após o tratamento térmico (MACHADO et al., 2015). Além disso, é um patógeno oportunista responsável também por infecções hospitalares como septicemia, do trato urinário, do sistema nervoso central, da corrente sanguínea, infecções de feridas cirúrgicas, pneumonia e endocardites (HOUDT et al., 2007; SRINIVASAN et al., 2016).

Serratia utiliza o mecanismo de comunicação por *quorum sensing* para regular a expressão de fenótipos importantes como a formação de biofilmes e motilidade, além da produção de compostos como o antibiótico carbapenem, prodigiosina, pectatoliase, celulase, proteases, lipases, chitases, caseinase, nucleases e produção de biosurfactantes (HOUDT et

al., 2007). A comunicação por *quorum sensing* nessa bactéria é homóloga a descrita em outras bactérias gram-negativas, como para *Aliivibrio fischeri*, envolvendo as proteínas LuxI, LuxR e suas homólogas. A proteína LuxI e suas homólogas sintetizam as acil homoserina lactonas (AHLs), que catalisam a ligação amida entre o *S*-adenosilmetionina (SAM) e o grupamento acila (MORÉ et al., 1996). A proteína LuxR ou suas homólogas funcionam como receptores citoplasmáticos de AHLs (WATERS e BASSLER, 2005) e normalmente, são ativadores transcricionais (ZHU e WINANS, 1999; FUQUA e GREENBERG, 2002). As proteínas homólogas a LuxI e LuxR foram identificadas em *Serratia*, sendo elas SmaI e SmaR, respectivamente (THOMSON et al., 2000). As proteínas homólogas a SmaI em *Serratia* sintetizam AHL entre elas: *N*-butanoil-L-homoserinalactona (C4-AHL), *N*-hexanoil-L-homoserinalactona (C6-AHL), *N*-3-oxo-hexanoil-L-homoserinalactona (3-oxo-C6-AHL), *N*-heptanoil-L-homoserinalactona (C7-AHL), *N*-octanoil-L-homoserinalactona (C8-AHL) e 3-hydroxy-octanoil-L-homoserina lactona (3-OH-C8-AHL) (HOUDT et al., 2007). Além das AHLs, *Serratia* utiliza como molécula sinalizadora do *quorum sensing* o diéster de furanosil borato (AI-2) (LÁZARO-DÍEZ et al., 2015; SUN et al., 2015; TAKAYAMA e KATO, 2016). O AI-2 é um sinalizador utilizado tanto por bactérias gram-positivas quanto por gram-negativas para comunicação intra e interespecies. A combinação da utilização destes sinalizadores permite a bactéria fazer censo de sua densidade populacional e de outras espécies em um dado ambiente (WATERS e BASSLER, 2005).

Em *S. liquefaciens* MG1 a comunicação por *quorum sensing* também demonstrou ser crucial para o desenvolvimento normal do biofilme e diferenciação celular. A formação de biofilme em um mutante de *S. marcescens* MG1, incapaz de sintetizar C4-AHL e C6-AHL, resultou em um biofilme fino e não maduro com cadeias celulares diferenciadas. Os genes, *bsmA* e *bsmB* estiveram associados a formação e desenvolvimento do biofilme sob regulação do *quorum sensing*. Foi proposto que o gene *bsmA* codifica uma adesina, que controla o tamanho dos agregados celulares enquanto o produto do gene *bsmB* codifica um efector positivo de agregação bacteriana necessária para ativar a agregação (LABBATE et al., 2004). Além disso, o *quorum sensing* regulou a expressão do gene *swrA* envolvido na regulação de lipase e protease em *S. liquefaciens* MG1 (RIEDEL et al., 2000). A motilidade em *S. liquefaciens* também é regulada pelo *quorum sensing* (EBERL et al., 1996). Nesse trabalho, os autores constataram que a iniciação da diferenciação de células móveis envolve moléculas de sinalização *quorum sensing* e que o gene *swrI* é homólogo a família *luxI* sendo responsável pela síntese das moléculas sinalizadoras. Do mesmo modo, foi verificado que o gene *swrR* é homólogo ao *luxR* (EBERL et al., 1996).

S. liquefaciens L53 está dentre as bactérias psicrotróficas isoladas no leite cru por Machado et al. (2015). Essa bactéria secreta uma metaloprotease resistente ao calor codificada pelo gene *ser2* capaz de hidrolisar caseinato de sódio mesmo após um tratamento térmico de 8 min a 95 °C (MACHADO et al., 2016). A protease Ser2 secretada por *S. liquefaciens* L53 apresenta atividade em ampla faixa de pH variando de 5 a 10 e temperatura de 4 a 60 °C. Essa enzima pertence à família das peptidases M10 e requer Ca^{2+} , Zn^{2+} e pontes dissulfeto para sua estabilidade (BAGLINIÈRE et al., 2017a). Além disso, é capaz de hidrolisar três tipos de caseína sendo elas κ , β e α -caseína. Ser2 é altamente estável ao calor em leite desnatado, semidesnatado e integral a 140 °C e mostrou atividade residual após tratamentos térmicos comumente usados em indústrias de laticínios (BAGLINIÈRE et al., 2017b). Essa mesma enzima levou à desestabilização de leite UHT armazenado por 90 dias, com sedimentação e formação de agregados indicando ser resistente ao tratamento UHT e ser uma causa de desestabilização do leite UHT (BAGLINIÈRE et al., 2017c).

2.4 Nova estratégia de controle de biofilmes

Quando presentes sob a forma de biofilme, os micro-organismos se tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos. Essa maior resistência está associada a diversos fatores, como a fase de crescimento lento das células do biofilme que leva a mudanças fisiológicas que podem proporcionar um aumento na resistência (MAH e O'TOOLE, 2001). Outro fator importante é a proteção proporcionada pelas células mais expostas e pelo EPS que agem formando uma barreira física que impede ou diminui o contato dos agentes antimicrobianos com as células mais profundas (BRIDIER et al., 2011). Além disso, os EPS também são capazes de adsorver cátions, metais, toxinas e conferir proteção contra radiações ultravioleta, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação de células (BOARI et al., 2009).

A diminuição da eficácia dos antimicrobianos, que ao entrar em contato com as moléculas orgânicas constituintes do biofilme, reagem com as mesmas, resultando na diminuição da concentração do seu princípio ativo, também contribui para um aumento da resistência em biofilmes (BRIDIER et al., 2011). Além disso, a presença de células mais resistentes e maior ocorrência de mutações e transferência horizontal de genes dentro do biofilme também proporcionam maior resistência às células planctônicas (DRIFFIELD et al., 2008; KAPLAN et al., 2011). Ainda, enzimas presentes na matriz também podem atuar na proteção do biofilme contra agentes antimicrobianos, neutralizando compostos que poderiam danificar células (STEWART et al., 2001; CIOFU et al., 2003; BRIDIER et al., 2011).

Uma estratégia muito estudada atualmente e que tem apresentado resultados promissores na redução de biofilmes bacterianos é a inibição do mecanismo de *quorum*

sensing (SRINIVASAN et al., 2016). O *quorum sensing* é conhecido como uma comunicação bacteriana que ocorre pela produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras, também denominadas auto-indutoras. Essas moléculas sinalizadoras podem ser classificadas em três grupos principais, sendo elas acil homoserina lactonas, autoindutor-2 (AI-2), também conhecidas como furanosil borato diéster e autoindutor 3 AI-3 (MOREIRA et al., 2010). Em função do sistema *quorum sensing*, as bactérias são capazes de coordenar diversas funções como a formação de biofilme, virulência, competência, esporulação, conjugação, produção de bacteriocinas, síntese de antibióticos, enzimas, bioluminescência, produção de pigmentos, entre outros (MARCH e BENTLEY, 2004; SKANDAMIS e NYCHAS, 2012; NAZZARO et al., 2013). Foi demonstrado que o *quorum sensing* regula a formação de biofilme em diversas bactérias. Esse sistema apresenta uma relação mútua direta com a produção do EPS em biofilmes (TANG et al., 2014; OKSHEVSKY e MEYER, 2015; TSENG et al., 2016).

Inibir a comunicação por *quorum sensing* resulta em bloquear a expressão do fenótipo que está sob regulação desse sistema, sem afetar a multiplicação microbiana e, dessa forma, diminuir o risco de desenvolvimento de resistência visto que, não exerce pressão de seleção para estirpes resistentes a drogas (PAN e REN, 2009; YEO e THAM, 2012; KALIA, 2012; BAI e RAI, 2011; NAZZARO et al., 2013; TAY e YEW, 2013).

A inibição do *quorum sensing* pode ocorrer por diferentes mecanismos incluindo a inibição da síntese, transporte ou secreção do sinalizador e da proteína receptora. Pode ocorrer também pela semelhança estrutural dos compostos inibitórios às moléculas sinalizadoras utilizadas no mecanismo de comunicação, interferindo com sua atividade normal (TEPLITSK et al., 2000; TRUCHADO et al., 2012; KALIA, 2012; NAZZARO et al., 2013).

Alguns compostos naturais apresentaram capacidade em diminuir a formação do biofilme, ao interferirem na comunicação pelo *quorum sensing* em diferentes bactérias (VIKRAM et al., 2010; GANIN et al., 2012; LOUGHLIN et al., 2013). Entre os compostos naturais, os fenólicos têm se destacado pelo seu potencial em inibir o *quorum sensing*. Compostos fenólicos como naringenina, pertencente ao grupo dos flavonoides, presente em frutas cítricas (VIKRAM et al., 2010), extratos fenólicos de *Rubus chamaemorus* e *Rubus idaeus* (frutos semelhantes a framboesas e amoras) (PRILHA et al., 2014) e compostos fenólicos isolados como ácido elágico, ácido tânico (HUBER et al., 2003), epigallocatequina galato (EGCG) (CASTILLO et al., 2014) bem como quercetina (GOPU et al., 2015a), cianidina (GOPU et al., 2016) atuaram inibindo a formação do biofilme por meio da inibição do *quorum sensing* em diversas bactérias. Além de diminuir a formação do

biofilme, esses compostos aumentaram a sensibilidade do biofilme a agentes antimicrobianos de forma sinérgica.

A atividade anti-*quorum sensing* de produtos naturais pode ser tão importante quanto o efeito antibacteriano e isso pode contribuir com o uso tradicional de antimicrobianos (ADONIZIO, et al., 2008; SULTANBAWA, 2011). A combinação desses inibidores com outros agentes antimicrobianos pode gerar efeitos sinérgicos sobre a inativação bacteriana (GIVSKOV, 2012) e pode ser uma proposta para uso combinado na redução e controle de biofilmes bacterianos.

2.5 *Eugenia uniflora* L.

O Brasil apresenta uma diversidade de espécies de frutas nativas que vem sendo estudadas e exploradas economicamente. A maioria dessas frutas fornecem nutrientes, sabores acentuados, elevados teores de fibras, minerais, água e compostos bioativos, contribuindo de maneira benéfica com a saúde da população (NEGRI et al., 2016).

Dentre as muitas espécies nativas existentes no Brasil, destaca-se *Eugenia uniflora* L., sendo essa, uma planta arbustiva pertencente a família das *Myrtaceae* de ocorrência natural no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai podendo também ser cultivada para ornamentação bem como árvore frutífera (AVILA et al., 2009).

A pitanga, quando madura, pode apresentar coloração que vai desde o laranja, vermelho a roxo escura. A diferença na cor dos frutos influencia no teor de compostos fenólicos presentes na mesma (HOFFMANN-RIBANI et al., 2009; BAGETTI et al., 2011; DENARDIN et al., 2015). A composição da pitanga se constitui de 88,3% de umidade, 10,2% de carboidratos, 3,2% de fibras, 0,9% de proteínas, 0,4% de cinzas, 0,2% de lipídeos e 18 mg de cálcio em 100 g de fruto (TACO, 2006). Essa fruta possui duas classes de compostos bioativos bem definidos sendo eles os flavonoides e os carotenoides. Apresentam também quantidades importantes de vitamina C, vitamina A e fósforo (BAGETTI et al., 2011).

Os flavonoides são compostos fenólicos originados do metabolismo secundário de plantas. São compostos fenólicos presentes em muitas espécies de plantas sendo considerados o grupo de constituinte mais importante do reino vegetal, estando presentes em folhas, flores, caules, cascas e frutos (KAHKONEN et al., 1999; CROZIER et al., 2009; HAMINIUK et al., 2012). Esses compostos são produzidos pelas plantas quando as mesmas são submetidas a diferentes situações de estresse e desempenham funções de proteção contra herbívoros, infecções microbianas, atração para polinizadores e animais semeadores, como agentes alelopáticos, proteção à radiação ultravioleta e como moléculas sinalizadoras na formação e

fixação de nitrogênio em nódulos radiculares (MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009; TIVERON et al., 2012; WAR et al., 2012).

Atribui-se aos compostos fenólicos importantes efeitos favoráveis ao organismo onde são bem estabelecidas funções biológicas como atividades antioxidante, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-malária, anti-oomiceto e antifebril. Também desempenham funções antimicrobianas e anti-*quorum sensing* (VIKRAM et al., 2010; PRILHA et al., 2014; HAMINIUK et al., 2012; CASTILLO et al., 2014; AKRAM et al., 2014; GOPU et al., 2015a; DEGHAN e SARRAFI, 2016). Associam-se a esses compostos, efeitos favoráveis em doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e doenças neurodegenerativas (NIERO e MACHADO-SANTELLI, 2013; RODRÍGUEZ-MORATÓ et al., 2015; LIN et al., 2016; ANANTHARAJU et al., 2016; FAHRIOĞLU et al., 2016; SHAILASREE et al., 2016; BASU e BHUYAN, 2017).

Os flavonoides identificados em pitanga incluem os flavonóis miricetina, kampferol e quercetina (HOFFMANN-RIBANI et al., 2009; BAGETTI et al., 2011; DENARDIN et al., 2015). Tais compostos estão classificados dentro do grupo de flavonóis, dos flavonoides presentes em alimentos. Os flavonóis são tipicamente encontrados na forma glicosilada, associados à porção de um açúcar que muitas vezes é glicose ou ramnose, mas podem estar associados também à galactose, arabinose, xilose e ao ácido glucurônico. O flavonóis mais comuns incluem kaempferol, quercetina, isoramnetina, e miricetina e são tipicamente encontrados como glicosídeos conjugados. Fontes de flavonóis incluem a cebola couve, alho-poró, brócolis e mirtilos, assim como o vinho tinto e o chá verde (ROSS e KASUM, 2002; DEL RIO et al., 2013).

O alto teor de compostos fenólicos presentes em pitanga reflete em seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante de extratos brutos metanólicos de pitanga roxa, vermelha e laranja demonstraram que a pitanga apresentou importante capacidade antioxidante (REYNERTSON et al., 2005; BAGETTI et al., 2011) e que é a fruta roxa, apresentou maior capacidade quando comparada às frutas de outras cores (REYNERTSON et al., 2005; BAGETTI et al., 2011). Além disso, quando testadas suas propriedades antimicrobianas apresentou atividade contra uma diversidade de bactérias. O extrato fenólico de pitanga atuou contra bactérias como como *S. aureus* (ZOLA et al., 2014; BORGES, 2016) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus* (ZOLA et al., 2014). Além dessas bactérias, apresentou inibição de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* (OLIVEIRA et al., 2010) Ao extrato fenólico de pitanga também foi atribuído atividade sobre

a inibição do *quorum sensing*, onde o extrato atuou inibindo a produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* (RODRIGUES et al., 2016).

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Higiene e Microbiologia de Alimentos e de Compostos Bioativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em parceria com o Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e com o Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade e Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 Preparo do material vegetal

Pitangas vermelhas maduras foram colhidas na região de Ouro Preto – MG localizada na latitude 20°23'08" sul, longitude 43°30'29" oeste e altitude média de 1 179 metros. As frutas foram coletadas de outubro a janeiro de 2016 e armazenadas a -20°C até atingirem a quantidade suficiente para extração da polpa. As frutas foram lavadas em água corrente, folhas e talos foram removidos e feita a sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 50 mg.L⁻¹ de cloro residual total, pH próximo a 9,5 por 15 min. Após sanitização, as sementes foram removidas manualmente e a polpa foi separada, homogeneizada em multiprocessador doméstico e congelada a -20 °C.

4.2 Extração e purificação dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos e purificados utilizando extração em fase sólida (SPE) conforme Bertoldi (2009) com modificações. As polpas de pitanga foram descongeladas e misturadas com solução de etanol: metanol: acetona 1:1:1 (v/v/v) seguida de filtração em papel Whatman n° 1. Posteriormente, os solventes foram evaporados em rota-vapor a 40 °C (Büchi, Suíça) e o extrato aquoso, chamado de extrato bruto, foi eluído em minicoluna C18 Sep-Pak Vac 35cc 10g 20 cm³ (Waters Corporation, Estados Unidos). Os compostos fenólicos adsorvidos na minicoluna foram eluídos com metanol e a fração aquosa não adsorvida foi descartada. O metanol foi completamente evaporado e o extrato foi concentrado em rota-vapor a 40 °C. Água destilada foi adicionada até volume conhecido para obter o extrato fenólico de pitanga (EFP).

4.3 Quantificação dos compostos fenólicos totais

A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada pelo ensaio do reagente Folin-Ciocalteu (SHAHIDI e NACZK, 1996). Uma alíquota de 0,6 mL do EFP foi diluída em 3,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10; v:v). Depois de 3 min de repouso na ausência de luz, foram adicionados 2,4 mL de solução saturada de Na₂CO₃ (7,5%;

m.v⁻¹). Após 2 h de repouso em ausência de luz a absorvância foi determinada a 760 nm por espectrofotometria de absorção (Kazuaki IL227, País). O teste foi feito em triplicata e o índice de compostos fenólicos totais foi determinado pela curva padrão de 0 a 200 mg.L⁻¹ de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de fruta (mg AGE.100 g⁻¹).

4.4 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjo de diodo (CLAE-DAD)

A identificação dos flavonoides foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo utilizado foi do modelo Infinity 1120 (Agilent), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. A coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL.min⁻¹ a 25 °C, e eluição com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5% em água e B: 0,5% ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% a 25 min, de 90% em 30 min, 50% em 32 min, 8% em 35 min, com um tempo de corrida total igual a 35 min. A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 370 e 525 nm. A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção, quando possível, e similaridade com espectro de absorção de padrões comerciais e os espectros contidos na biblioteca do próprio equipamento, previamente inseridos no método. Para a quantificação foram utilizados os padrões dos flavonoides cianidina, cianidina 3-glucosídeo, delphinidina, quercetina 3-glucosídeo, miricetina (Extrasynthese, Genay France) e quercetina (Sigma, Chemical Co., EUA Extrasynthese, Genay France) (HASSIMOTTO et al., 2008).

4.4.2 Cromatografia Líquida – Espectrometria de massa (LC-MS)

A identificação de flavonoides e demais compostos fenólicos foi conduzida por *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* (LC-MS) em aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) e interface de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electron Spray Ionization*). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE-DAD, conforme descrito no item 4.4.1. O ESI foi mantido em modo positivo para antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides. O detector de massas

foi programado para realizar *fullscan* entre *m/z* 100-1000. A energia de ionização foi de 3000-3500 V. Os compostos foram identificados pela comparação do espectro de massas obtidos e a comparação com o de padrões comerciais e/ou dados de literatura.

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e sub-MIC do EFP sobre *S. liquefaciens* L53

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada pelo método de diluição em ágar segundo Wiegand et al. (2008) com modificações. Uma população de 10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) de *S. liquefaciens* L53 isolado de leite cru (MACHADO et al., 2015) foram inoculadas em forma de microgotas de 5 µL em ágar cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) adicionado de 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 mg AGE. 100 g de polpa de fruta. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 h a 30 °C. A MIC foi determinada como a menor concentração do EFP em mg AGE. 100 g de polpa de fruta suficiente para inibir a multiplicação da bactéria e sub-MIC como a concentração inferior a MIC. A análise foi realizada em triplicata.

4.6 Efeito de sub-MIC do EFP sobre a multiplicação de *S. liquefaciens* L53 em caldo BHI

Após determinação da MIC e sub-MIC, foram feitas curvas de multiplicação de *S. liquefaciens* L53 com sub-MIC do EFP, 0,8 e 1,0mg AGE. 100 g de polpa de fruta, para avaliar se a concentração testada apresentaria algum efeito inibitório sobre a multiplicação microbiana em meio líquido. A curva de multiplicação foi feita em caldo BHI a 30 °C e em intervalos de tempo de 1 h até o tempo final de 11 h. Foi realizado o plaqueamento por microgotas em ágar BHI (MORTON, 2001). Após incubação a 30° C realizou-se a contagem e o cálculo de UFC.mL⁻¹.

4.7 Formação de biofilmes

4.7.1 Formação e caracterização da composição do biofilme em microplacas de poliestireno na presença do EFP

A formação do biofilme e a quantidade dos três principais componentes que constituem a matriz dos biofilmes polissacarídeos, proteínas e DNA foram avaliados em microplacas de poliestireno contendo 96 poços com concentrações sub-MIC do EFP determinadas previamente.

S. liquefaciens L53 foram cultivadas a 30 °C por 24 h e, em seguida, uma alíquota de 1 mL desta cultura foi centrifugada a 2940. g e lavada duas vezes com solução salina (0,85%). O centrifugado foi ressuscitado em caldo BHI e foram realizadas diluições seriadas para que a concentração final fosse aproximadamente 10⁶ UFC.mL⁻¹. Em seguida, uma alíquota de 20 µL deste inóculo padronizado foi adicionada em 180 µL de caldo BHI contidos em cada poço da microplaca de poliestireno de 96 poços. Em cada poço também foi adicionado EFP nas concentrações de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100 g de polpa de fruta, separadamente. O controle positivo consistiu em poços contendo caldo BHI com inóculo. Os controles negativos consistiram de poços contendo caldo BHI com inóculo mais 39,4 µM de 4-bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (Furanona; Sigma-Aldrich, Brasil) ou 0,1 mg.mL⁻¹ de canamicina (Sigma-Aldrich, Brasil). Os brancos consistiram em poço contendo caldo BHI e poço contendo caldo BHI adicionado do EFP ou furanona (39,4 µM) ou canamicina (0,1 mg.mL⁻¹). As microplacas foram incubadas a 30 °C por 7, 48 e 168 h, sendo o caldo BHI, o inóculo e o EFP ou furanona ou canamicina trocados a cada 24 h. Após cada tempo de incubação uma microplaca foi retirada para determinação do biofilme total e quantificação dos polissacarídeos, proteínas e DNA.

4.7.1.1 Determinação do biofilme total

Após os períodos de incubação o meio de cultura foi removido por inversão da microplaca sobre papel absorvente. As células aderidas foram coradas por 30 min com 200 µL de cristal violeta a 0,1% (p.v⁻¹) em água. Em seguida, o corante foi descartado e os poços das microplacas lavados, por três vezes consecutivas com 200 µL de água destilada. As microplacas foram secas em estufa a 40 °C por 15 min. O cristal violeta retido foi dissolvido em 200 µL de etanol (95%) e a absorbância medida a 590 nm (DO590nm) em leitor de microplacas (MultiskanGO 1510, Thermo Scientific, País) (CONWAY et al., 2012). O teste foi feito em sextuplicata com três repetições e o resultado expresso em média da DO590nm.

4.7.1.2 Quantificação de polissacarídeos, proteínas e DNA do biofilme

A quantidade dos três principais componentes que constituem a matriz dos biofilmes, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos foi realizada conforme Fredheim et al. (2009). Inicialmente, após os períodos de incubação o meio de cultura foi removido por inversão da microplaca sobre papel absorvente e os poços foram lavados três vezes com solução fosfato salina (PBS) pH 7,2.

Para quantificar os polissacarídeos, 40 mM de meta-periodato de sódio (NaIO₄; Sigma-Aldrich, Brasil) em água bidestilada foram adicionados em cada poço e mantido por 24 h a 30 °C. Este reagente é capaz de degradar as ligações β-1,6-polissacáridicas. Para quantificar as proteínas, foram adicionados aos poços 0,1 mg.mL⁻¹ de protease K (Sigma-Aldrich, Brasil) em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 com 100 mM de NaCl. Este reagente é capaz de degradar proteínas. Para quantificar DNA foram adicionados aos poços 0,5 mg.mL⁻¹ de DNase I (Sigma-Aldrich, Brasil) em 5 mM de MgCl₂. Após cada tratamento, as microplacas foram lavadas com PBS, coradas com cristal violeta 0,1 % (m.v⁻¹) e determinada a DO 590 nm em leitor de microplacas conforme descrito no item 4.7.1.1.

A proporção de polissacarídeos, proteínas e DNA do biofilme de *S. liquefaciens* L53 foi calculada em relação ao biofilme total do respectivo tratamento e expressa em porcentagem (%).

4.7.2 Avaliação dos biofilmes em cupons de poliestireno na presença do EFP

Biofilme de *S. liquefaciens* L53 também foi avaliado em cupons de poliestireno conforme descrito por Rasmussen et al. (2005), com modificações. Os cupons de poliestireno medindo 1,0 x 1,0 x 0,1 cm foram previamente higienizados com água e detergente líquido neutro. Após serem enxaguados em água destilada, os cupons foram transferidos para béquers contendo álcool 70% e deixados por 30 min em banho de ultrassom (BRANSON 1510, Ultrasonic QR500, País). Posteriormente, os cupons foram descontaminados por radiação ultravioleta de comprimento de onda 254 nm. A confirmação da descontaminação foi feita incubando um cupom em caldo BHI a 30 °C por 24 h e, posteriormente, foi verificada a ausência de turvação do meio.

Os cupons de poliestireno foram colocados em microplaca de 24 poços contendo caldo BHI juntamente com o inóculo padronizado de *S. liquefaciens* L53 a uma concentração final de 10⁶ UFC mL⁻¹, conforme descrito no item 4.7.1. Em cada poço também foi adicionado 1,0 mg AGE.L⁻¹ do EFP. Além disso, foram realizados os controles positivos, negativos e os brancos conforme descrito no item 4.7.1.

As microplacas foram incubadas a 30 °C por 48 h, sendo o caldo BHI, o inóculo e o EFP ou furanona ou canamicina trocados a cada 24 h. Após o tempo de incubação três cupons foram retirados para visualização do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser, quantificação das células aderidas e avaliação da susceptibilidade do biofilme formado na presença do EFP a antimicrobianos. O teste foi feito em triplicada e em três repetições.

4.7.2.1 Visualização do biofilme por microscopia confocal de varredura a laser

Após o período de incubação, os cupons foram removidos do meio de cultivo e lavados duas vezes por imersão em 0,2 M de solução fosfato salina (PBS) pH 7,2 esterilizada para remoção das células não aderidas (MARQUES, 2007). Posteriormente, os cupons foram incubados na ausência de luz por 15 min com uma mistura de 0,02 mg.mL⁻¹ de iodeto de propídeo (IP; Sigma-Aldrich, Brasil) e 0,002 mg.mL⁻¹ de isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma-Aldrich, Brasil) em PBS pH 7,2, preparada imediatamente antes do uso. Em seguida, os cupons foram lavados por imersão em PBS pH 7,2 e analisados em microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 META, Zeiss, Alemanha) utilizando o laser argônio com comprimento de onda de 458 e 514 nm. Utilizou o programa LSM Image Browser para análise das imagens.

4.7.2.2 Quantificação de células aderidas

Após o período de incubação os cupons foram removidos do meio de cultivo e lavados com PBS pH 7,2 e, em seguida, foram imersos em 10 mL de solução salina e submetidos por 10 min ao banho de ultrassom (BRANSON 1510, Ultrasonic QR500, País) para o desprendimento das células aderidas. Uma alíquota foi plaqueada em ágar BHI pela técnica de plaqueamento por microgotas (MORTON, 2001) e incubada a 30 °C por 16 h para quantificar as células aderidas. O teste foi feito em triplicata com três repetições.

4.7.2.3 Susceptibilidade do biofilme crescido na presença do EFP a antimicrobianos

Após a incubação por 48 h, os cupons foram enxaguados três vezes com PBS pH 7,2 e tratados com 200 mg.L⁻¹ do sanitizante dicloroisocianurato de sódio (NIPPOCLOR; CRT, Brasil) por 15 min e com 0,1 mg.mL⁻¹ canamicina (Sigma-Aldrich, Brasil) por 15 min, separadamente. Após o tempo de contato, os cupons tratados com dicloroisocianurato de sódio foram imersos no agente neutralizante tiosulfato de sódio (Sigma-Aldrich, Brasil) a 1% (m.v⁻¹) para a inativação do princípio ativo do sanitizante. Após os tratamentos com os antimicrobianos foram feitas quantificações de células viáveis conforme descrito no item 4.7.2.2.

4.8 Efeito combinado do EFP com antibióticos

4.8.1 Avaliação do efeito combinado do EFP com antibióticos

A avaliação do efeito combinado do EFP com os antibióticos canamicina, ampicilina e gentamicina contra *S. liquefaciens* L53 foi realizada em células sésseis. O teste foi feito em

microplacas de 24 poços contendo 1 mL de caldo BHI com o inóculo padronizado com, aproximadamente, 10^6 UFC.mL⁻¹ de *S. liquefaciens* L53, conforme descrito no item 4.7.1. Além disso, cada poço continha 1,0 mg AGE. 100 g de polpa de fruta do EFP, 30 µg.mL⁻¹ de ampicilina, 10 µg.mL⁻¹ de canamicina e 10 µg.mL⁻¹ de gentamicina, separadamente. As microplacas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Alíquotas foram retiradas e plaqueadas em ágar BHI conforme descrito no item 4.7.2.2. para determinar o número de células viáveis. Os controles consistiram em poços contendo caldo BHI e inóculo, poços contendo caldo BHI, inóculo e EFP e poços contendo caldo BHI, inóculo e os antibióticos ampicilina, canamicina e gentamicina nas concentrações utilizadas no teste (GUPU et al., 2015a).

4.8.2 Efeito combinado do EFP com antibióticos

Para o efeito combinado do EFP com os antibióticos foi realizado o teste da concentração inibitória fracionária e determinado o índice de concentração inibitória fracional (FICI). O teste consistiu na determinação da nova MIC do EFP e dos antibióticos testados em combinação. As concentrações dos antimicrobianos bem como o EFP escolhidas corresponderam a 1/2, 1/4, 1/6, e 1/8 da MIC ou 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 vezes a MIC. As diluições foram feitas diretamente na placa onde foram adicionada da população de 10^6 UFC.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h e após a incubação foram plaqueados e observado o crescimento. A MIC foi considerada quando não houve crescimento visível. A FICI foi determinada pela fórmula: $FICI = (MIC \text{ da droga A em combinação} / MIC \text{ da droga A}) + (MIC \text{ da droga B em combinação} / MIC \text{ da droga B})$. A FICI obtido foi interpretada em < 0,5, sinergismo; 0,5 a 0,75, sinergismo parcial; 0,76 a 1,0, efeito aditivo; > 1,0 a 4,0, indiferente e > 4,0, antagonismo (TIMURKAYNAK et al., 2006).

4.9 Análise estatística

A significância dos dados foi avaliada pelo teste ANOVA, empregando-se o teste de Tukey, utilizado o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (San Diego, California, Estados Unidos). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais

O EFP apresentou 231 mg AGE.100 g⁻¹ de polpa. De acordo com a quantidade de compostos fenólicos obtida neste trabalho, a pitanga pode ser classificada como uma fruta com médio conteúdo desses compostos pela classificação sugerida por Rufino et al. (2010). Segundo estes autores, as frutas podem ser classificadas em baixa quantidade de compostos fenólicos quando apresentam conteúdo menor que 100 mg AGE.100g⁻¹, média quantidade quando apresentam valores de 100 a 500 mg AGE.100 g⁻¹ e alta quantidade, quando os valores são maiores que 500 mg AGE.100 g⁻¹ em amostras a base de matéria fresca.

O valor médio de mg AGE.100 g⁻¹ encontrado nesse trabalho (231) é próximo aos valores apresentados em pitanga vermelha por Bagetti et al. (2011) e Jacques et al. (2009) que foram de 210 e 239,2 mg AGE.100 g⁻¹ respectivamente. Valores muito diferentes, como 433,84 mg AGE.100 g⁻¹ (DENARDIN et al., 2015) e inferiores a 95 mg AGE.100 g⁻¹ (ABE et al., 2012) também foram encontrados na literatura em pitanga vermelha. Essas variações na quantidade de compostos fenólicos em um mesmo alimento podem ocorrer por diversos fatores, localização geográfica, condições de cultivo, tipo de cultivar, sazonalidade, estágio de maturação, dentre outros (MACHADO et al., 2008; MODESTO, 2013; DENARDIM et al., 2015; SOUTO, 2017).

O importante conteúdo de compostos fenólicos observado pela pitanga confirmam seu potencial de utilização tornando-a uma fruta relevante para estudos, uma vez que estes compostos apresentam funções biológicas importante como atividade antioxidante (BAGETTI et al., 2011; BORGES, 2016) antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2010; ZOLA et al., 2014;) e anti-*quorum sensing* (RODRIGUES et al., 2016).

5.2 Identificação dos compostos fenólicos

O perfil dos compostos fenólicos presentes no EFP está apresentado na Figura 1, bem como a identificação destes compostos na Tabela 1 e a quantificação na Tabela 2.

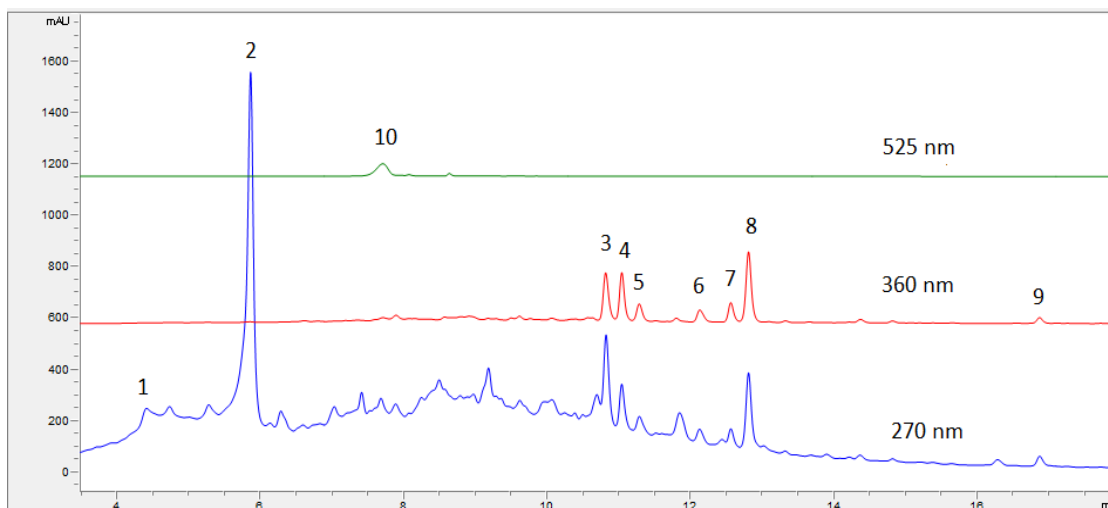


Figura 1 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EFP nos comprimentos de onda 270, 360e 525 nm. Picos 1 e 2: elagitaninos; pico 3: miricetina pentosídeo; pico 4: ácido elágico; picos 5, 6, 7, 8 e 9: quercetinas; pico 10: cianidina3-*O*-glucosídeo (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação de flavonoides por LC-ESI-MS/MS do EFP.

| Pico* | TR (min) | [M-H] (m/z) | MS2 | Composto |
|-------|-------------|------------------|---------------------|--|
| 1 | 4.2 | 783 ^a | 765/613/451/301/169 | Elagitanino 1 |
| | | 633 | 301/169 | Elagitanino 2 |
| 2 | 5.3 | 783 ^a | 765/613/451/301 | Elagitanino 3 |
| 3 | 9.8 | 463 | 316/271/151 | Miricetinapentosídeo |
| | | 301 | 257/245/229/145 | Ácido elágico ^b |
| 4 | 10.1 | 463 | 301/151 | Quercetinagalactosídeo |
| 5 | 10.4 | 463 | 301 | Quercetina3- <i>O</i> -glucosídeo ^b |
| 6 | 11.3 | 433 | 301 | Quercetinapentosídeo |
| 7 | 11.7 | 433 | 301/151 | Quercetinapentosídeo |
| 8 | 12.0 | 447 | 301/151 | Quercetinaramnosídeo |
| 9 | 16.5 | 599 | 301/151 | Quercetina glicosídeo |
| | | 609 | 463/301/151 | Quercetinaglicosilramnosídeo |
| 10 | 7.716 | 447 | 284/255/147 | Cianidina3- <i>O</i> -glucosídeo ^b |

*Picos identificados no cromatograma (Figura 1);

TR - tempo de retenção;

^a Dupla carga;

^b Identidade confirmada com padrão comercial.

Tabela 2 - Conteúdo de flavonoides identificados no EFP.

| Composto fenólico | % ^a | % ^b |
|-----------------------------------|----------------|----------------|
| Elagitaninos^c | | |
| Elagitanino 1/Elagitanino 2 | 13 | |
| Elagitanino 3 | 87 | |
| Total de elagitaninos | 100 | 42,5 |
| Ácido elágico | - | 6,2 |
| Flavonol^d | | |
| Miricetina pentosídeo | 17 | |
| Quercetina galactosídeo | 16 | |
| Quercetina3- <i>O</i> -glucosídeo | 6 | |
| Quercetina pentosídeo | 5 | |
| Quercetina pentosídeo | 7 | |

| | | |
|--|-----|------|
| Quercetina ramnosídeo | 25 | |
| Quercetina glicosídeo/ Quercetina glucosilramnosídeo | 23 | |
| Total de flavonol | 100 | 48,9 |
| Antocianina | | |
| Cianidina3- <i>O</i> -glucosídeo | - | 2,3 |
| Total de compostos fenólicos | - | 100 |

^a% dentro de cada classe;

^b% em relação ao total de fenólicos;

^cÁcido elágico equivalente;

^dQuercetina3-glucosídeo equivalente.

Os elagitaninos, representando 42% dos flavonóis do EFP, são compostos fenólicos solúveis em água, de alto peso molecular, que quando hidrolisados liberam o ácido elágico. Segundo Williner et al. (2003) e Landete (2011) essa classe de compostos apresenta atividades antioxidantes e efeitos antimutagênico e anticarcinogênico estando relacionados também efeitos prebióticos e anti-inflamatórios. Entre os flavonoides identificados no EFP a quercetina foi identificada como a maior representante (83%). Esse favonoide está classificado como flavonóis e de acordo com Bentz (2009) representa 60 a 75% da ingestão de flavonoides da dieta. Segundo alguns trabalhos, esse composto apresenta importante atividade bioativa, como capacidade antioxidante e prevenção de doenças como câncer, aterosclerose, inflamação crônica, diabetes e obesidade (HEIN et al., 2002; D'ANDREA, 2015; LESJAK et al., 2018). Além disso, também foram reportadas atividades antimicrobiana e anti-*quorum sensing* (GOPU et al., 2015a; OUYANG et al., 2016; JAISINGHANI, 2017).

Os compostos fenólicos identificados no EFP estão em acordo com os resultados de outros trabalhos. Entretanto, pode haver uma variação em função de fatores discutidos anteriormente. Souto (2017) evidenciou que a miricetina representa 60% do total de flavonoides da pitanga vermelha madura. Além disso, foram identificados derivados glicosilados de quercetina, miricetina e kaempferol, bem como elagitaninos. Outros autores também identificaram ácido gálico, quercitrina, isoquercitrina, cianidin3-glucoside e rutina na pitanga (KARWOWSKI, 2013; DENARDIN et al., 2015).

5.3 Determinação da MIC e sub-MIC do EFP e das curvas de multiplicação de *S. liquefaciens* L53 na presença das sub-MIC do EFP

A multiplicação de *S. liquefaciens* L53 foi avaliado na presença de concentrações de compostos fenólicos que variaram de 0,6 a 1,6 mg AGE. 100 g de polpa de pitanga, alterando 0,2 mg AGE. 100 g de polpa de pitanga para cada teste e determinou-se que a MIC correspondeu a 1,0 mg AGE.100⁻¹ de polpa. As concentrações sub-MIC escolhidas para serem trabalhadas nos testes posteriores corresponderam as concentrações previamente testadas que

equivalem 0,8 e 1,0 mg AGE. 100 g de polpa de pitanga. Ambas concentrações foram avaliadas sobre o efeito na multiplicação de *S. liquefaciens* L53.

Os resultados do efeito de concentrações sub-MIC do EFP sobre a multiplicação de *S. liquefaciens* L53 em caldo BHI durante 11 h de incubação estão mostrados na Figura 2. A multiplicação de *S. liquefaciens* L53 na presença das concentrações sub-MIC de de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta e furanona não diferiram estatisticamente do controle sem extrato ($p > 0,05$) (Figura 2). Desse modo, estas concentrações sub-MIC do EFP foram utilizadas nos ensaios de formação do biofilme.

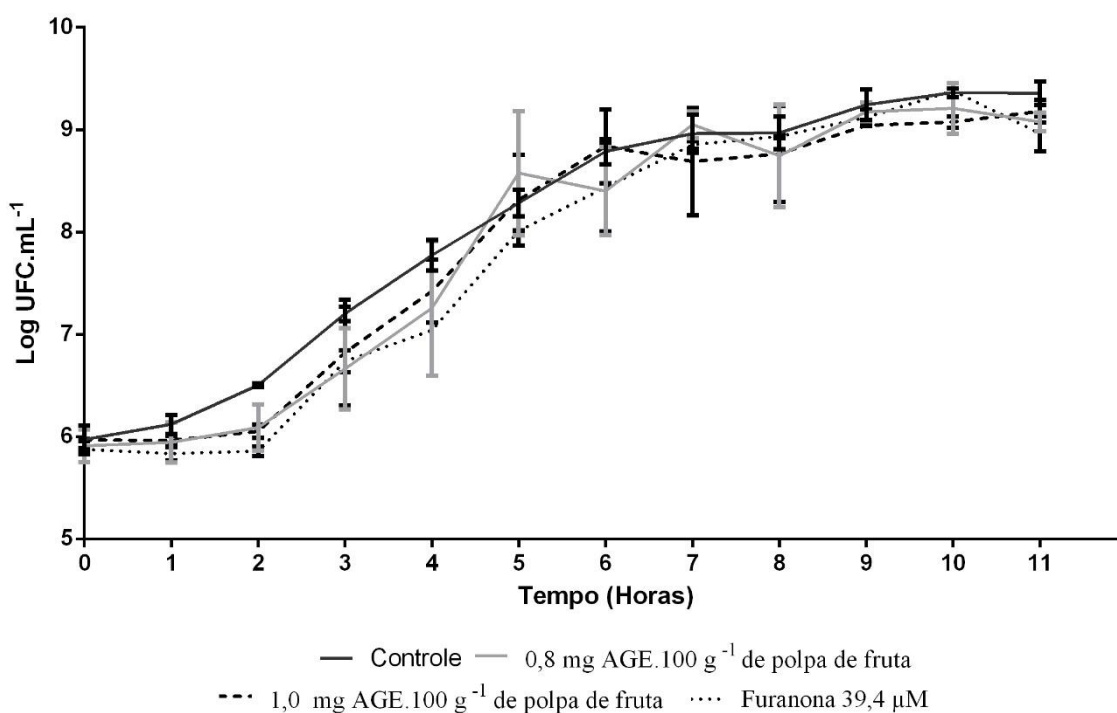


Figura 2 - Curva de multiplicação de *S. liquefaciens* L53 em caldo BHI na ausência e presença das concentrações sub-MIC de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta do EFP e furanona 39,4 µM a 30° C.

5.4 Formação de biofilme na presença do EFP

5.4.1 Quantificação e composição do biofilme de *S. liquefaciens* L53

A quantificação do biofilme total de *S. liquefaciens* L53 formado na presença do EFP em microplaca de poliestireno está apresentado na Figura 3.

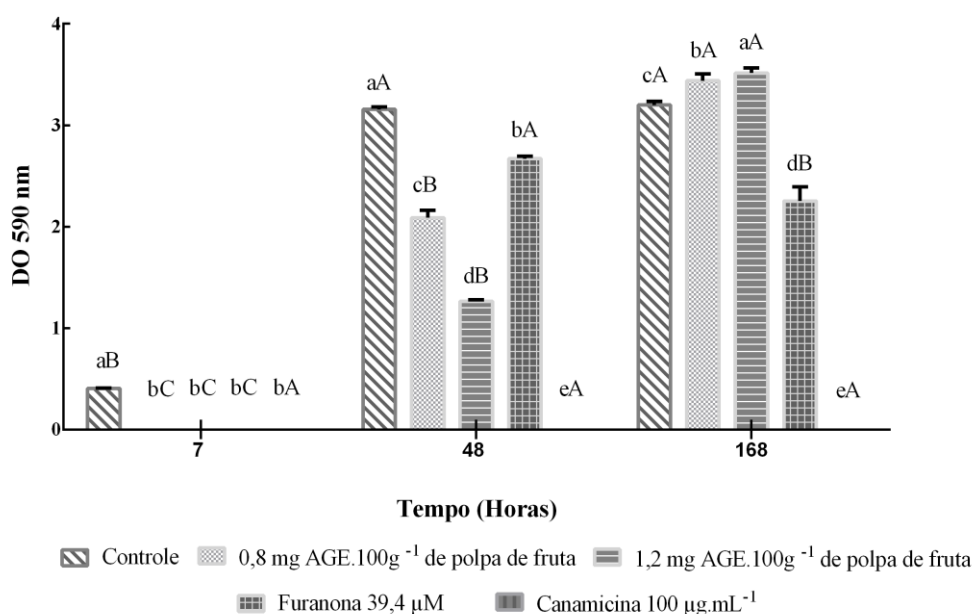


Figura 3 - Efeito de diferentes concentração do EFP sobre a formação de biofilme total por *S. liquefaciens* L53 em poliestireno nos tempos de 7, 48 e 168 h a 30 °C. EFP= 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta. Controles = 39,4 μM de furanona e 100 μg.mL⁻¹ de canamicina. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos no mesmo tempo ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa entre o mesmo tratamento ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Concentrações de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100 g de polpa de fruta do EFP inibiram completamente a adesão por *S. liquefaciens* L53 após 7 h de cultivo (Figura 3). Após 48 h, o EFP inibiu a formação do biofilme por *S. liquefaciens* L53 em 33,80 e 59,92% nas concentrações de 0,8 e 1,0 mg AGE. 100 g de polpa de fruta em comparação ao controle, respectivamente e foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 3). Além disso, estas concentrações sub-MIC do EFP apresentaram inibição do biofilme maior do que 39,4 μM da furanona ($p < 0,05$), a qual inibiu em 15,41% do biofilme (Figura 3). Por outro lado, a concentração do EFP 1,0 mg AGE.L⁻¹ aumentou em 10% a formação de biofilme após 168 h de cultivo ($p < 0,05$) (Figura 3). Canamicina, 100 μg.mL⁻¹, inibiu completamente o crescimento microbiano, logo a adesão e formação do biofilme nos tempos de 7, 48 e 168 h.

O resultado de diminuição do biofilme total observado nos tempos de 7 e 48 h por concentrações sub-MIC do EFP indica que esse composto apresenta atividade promissora na inibição do biofilme formado por *S. liquefaciens* L53. Estes resultados constatarem com outras pesquisas como a de Musthafa et al., 2010 no qual extratos de frutas como o abacaxi e sapoti diminuíram a formação de biofilme por *P. aeruginosa* em concentrações sub-MIC. Além dessas, o trabalho de Truchado et al. (2012) revelou que extratos de banana e laranja em

concentrações sub-MIC também diminuíram a formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae*. Em concordância com os trabalhos anteriores, Gopu et al. (2015b) Oliveira et al. (2016) demonstraram que concentrações sub-MIC do extrato de jambolão e morango silvestre inibiram a formação de biofilme de *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Chromobacterium violaceum* e *S. marcescens*.

Dentre os compostos fenólicos identificados no EFP nesse trabalho, as formas glicosiladas de quercetina e cianidina podem estar relacionados a inibição do biofilme por *S. liquefaciens* L53 (Tabelas 1 e 2; Figura 1). Gopu et al. (2015a) demonstraram que a quercetina em concentrações sub-MIC inibiu a formação de biofilme de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Y. enterocolitica* em 61, 72 e 80%, respectivamente. No trabalhos de Ouyang et al., 2016 a quercetina diminuiu a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em até 51%. Vikram et al. (2010) e Castillo et al. (2014) também evidenciaram a inibição da formação do biofilme de *K. pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Obesumbacterium proteus* e *Vibrio harveyi* por outros compostos fenólicos isolados como, ácidos *p*-cumárico e ácido gálico, epigallocatequina galato e rutina em concentrações sub-MIC. No entanto, Xiao et al., 2015 destaca que os compostos fenólicos presentes em alimentos ocorrem principalmente sob a forma glicosiladas e de acordo com Xiao et al., 2014 essa glicosilação pode alterar a atividade bioativa do composto, reduzindo ou aumentando a mesma (XIAO et al., 2014). Ficou demonstrado pelo trabalho de Quecan et al. (2018) que a atividade na inibição do *quorum sensing* pela quercetina foi diferente entre as suas formas aglicona e com a glicosilação sobre a produção de violaceína em *C. violaceum*.

A inibição do biofilme de *S. liquefaciens* L53 por concentrações sub-MIC do EFP sugere que esses compostos podem atuar por meio da interrupção do *quorum sensing*. Prilha et al., 2014 demonstraram que extratos de amora silvestre interromperam o *quorum sensing* em *Obesumbacterium proteus* resultando na inibição da formação do biofilme. Além desse, Gopu et al., 2015b e Ouyang et al., 2016 evidenciaram inibição do *quorum sensing* pelos extratos de *Syzygium cumini* (L.) e quercetina que resultaram na inibição do biofilme de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Y. enterocolitica*. Ficou demonstrado por Paczkowski et al., 2017 que os compostos fenólicos inibiram o *quorum sensing* pela ligação não competitiva dos compostos naturais aos receptores do *quorum sensing*. Os autores destacaram a existência de características na estrutura dos flavonoides que são essenciais para sua ligação a proteína receptora. Outro trabalho como o de Almeida et al. (2018) avaliou o acoplamento molecular de compostos naturais à proteína receptora do *quorum sensing*, proteína SdiA, de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 onde os resultados demonstraram que os compostos

fenólicos incluindo flavonoides e ácidos fenólicos foram capazes de ligar na proteína SdiA e atuar como os inibidores do *quorum sensing* nessa bactéria (ALMEIDA et al., 2018). Além desses Truchado et al., 2012 demonstraram que os compostos naturais atuaram inibindo o *quorum sensing* pela degradação dos sinalizadores utilizados nessa comunicação.

O aumento na quantidade do biofilme total pelo EFP observado no tempo de 168 h pode ser uma resposta adaptativa de *S. liquefaciens* L53, onde a exposição a um agente antimicrobiano natural, no caso o EFP em concentrações sub-MIC pode ter proporcionado um estresse a bactéria que respondeu com um aumento na produção de biofilme. Morán et al. (2014) demonstraram que compostos naturais como genisteína, ácido protocatecúico, extrato de cranberry, ácido p-hidroxibenzoico e resveratrol aumentaram a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. Em concordância ao observado nesse trabalho, Plyuta et al. (2013) e Corral-Lugo et al. (2016) evidenciaram que epicatequinas, vanilina, ácido gálico e ácido rosmarínico levaram a um aumento na formação de biofilme por *P. aeruginosa* PAO1. Além desses, Cho et al. (2013) testaram extratos metanólico de 522 plantas sob a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA14 e destes, 185 aumentaram a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA14 em mais de 50 %. Dos compostos isolados, nove flavonoides foram identificados entre eles a quercetina e kaempferol.

Os resultados do presente trabalho mostraram que o tempo é fator crucial e determinante para a formação de biofilme por *S. liquefaciens* L53, onde concentrações sub-MIC do EFP diminuiu o biofilme no tempo de 7 e 48 h e proporcionaram aumento do mesmo no tempo de 168 h. No trabalho de Mustafa et al. (2010) os autores testaram a formação do biofilme na presença de inibidores do *quorum sensing* no tempo de 12 h. Vikram et al. (2010) Truchado et al. (2012) e GOPU et al. (2015a, b) e Ouyang et al. (2016) avaliaram a interferência de inibidores do *quorum sensing* na formação de biofilme por 24 h e Prilha et al. (2014) realizou seu trabalho com inibidores do *quorum sensing* sob a formação do biofilme no tempo de 48 h. Já Castillo et al. (2014) testou inibidores do *quorum sensing* sob a formação do biofilme no tempo de 72 h. Uma atenção mais criteriosa em relação ao tempo de formação do biofilme deve ser considerada em testes via inibição do *quorum sensing*, pois podem ocorrer efeitos contrários e indesejáveis em um tempo maior de análise.

5.4.2 Composição do biofilme de *S. liquefaciens* L53 formado na presença de EFP em poliestireno

A composição do biofilme formado por *S. liquefaciens* L53 na ausência e presença de concentrações sub-MIC do EFP está apresentada na Tabela 3 e Figura 4. A Tabela 3 apresenta

os resultados em proporção ao biofilme total e a Figura 4 apresenta a composição do biofilme em DO 590 nm. A soma das porcentagens dos componentes do biofilme não totaliza 100% em relação ao biofilme total. Segundo Rivas et al. (2007), o uso da técnica de cristal violeta para quantificação de biofilmes pode subestimar valores. Deve-se considerar também que, além destes componentes, os biofilmes apresentam outras substâncias complexas e variadas e que interferem com a determinação da sua composição.

Tabela 3 - Efeito de diferentes concentração do EFP sobre a proporção de polissacarídeos, proteínas e DNA no biofilme formado por *S. liquefaciens* L53 nos tempos de 7, 48 e 168 h. EFP= 0,8 e 1,0 mg AGE. 100^{-1} de polpa de fruta. Controles = 39,4 μ M de furanona e 100 μ g.mL $^{-1}$ de canamicina.

| Tratamentos | Proporção dos componentes da matriz do biofilme (%) / Tempo (h) | | | | | | | | |
|--|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Polissacarídeos | | | Proteínas | | | DNA | | |
| | 7 | 48 | 168 | 7 | 48 | 168 | 7 | 48 | 168 |
| Controle | 97,6 ^{aA} | 96,9 ^{aA} | 95,5 ^{aA} | 21,2 ^{aA} | 33,2 ^{bA} | 39,8 ^{cA} | 6,55 ^{aA} | 47,4 ^{bA} | 23,3 ^{cA} |
| 0,8 mg AGE.L$^{-1}$ | 0,00 ^{aB} | 99,8 ^{bA} | 97,0 ^{bA} | 0,00 ^{aB} | 38,7 ^{bA} | 40,6 ^{bA} | 0,00 ^{aA} | 52,2 ^{bA} | 20,0 ^{cA} |
| 1,0 mg AGE.L$^{-1}$ | 0,00 ^{aB} | 99,7 ^{bA} | 98,1 ^{bA} | 0,00 ^{aB} | 38,0 ^{bA} | 39,9 ^{bA} | 0,00 ^{aA} | 54,0 ^{bA} | 24,8 ^{cA} |
| Furanona 39,4 μM | 0,00 ^{aB} | 99,3 ^{bA} | 95,2 ^{bA} | 0,00 ^{aB} | 34,7 ^{bA} | 36,8 ^{bA} | 0,00 ^{aA} | 56,2 ^{bA} | 23,7 ^{cA} |
| 100 μg.mL$^{-1}$ canamicina | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aA} | 0,00 ^{aB} | 0,00 ^{aB} |

Os valores na mesma coluna (entre os tratamentos no mesmo tempo), seguidos por letra maiúscula diferente, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Os valores na mesma linha (para o mesmo componente da matriz do biofilme ao longo do tempo) seguidos por letra minúscula diferente diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).

No tempo de 7 h, apenas no controle foram quantificados os componentes do EPS uma vez que houve inibição total da formação do biofilme nos tratamentos com o EFP, furanona e canamicina nesse tempo (Tabela 3 e Figura 4).

As duas concentrações do EFP, 0,8 e 1,0 mg AGE.L $^{-1}$ alteraram significativamente a composição de polissacarídeos, proteínas e DNA do biofilme de *S. liquefaciens* L53 após 48 h de cultivo quando comparado com o controle ($p < 0,05$) (Figura 4). A maior concentração do EFP avaliada reduziu 58,74% o conteúdo de polissacarídeos, 69,41% de proteínas e 54,37% de DNA demonstrando diminuição significativa dos principais componente da matriz do biofilme de *S. liquefaciens* L53. A furanona também reduziu os três componentes da matriz do biofilme em relação ao controle, mas a redução foi estatisticamente menor que a pelo EFP. Estes resultados corroboram com a diminuição do biofilme total no mesmo tempo de cultivo. Já no tempo de 168 h observou um aumento na quantidade de polissacarídeos e proteínas no biofilme formado na presença do EFP corroborando com o aumento no biofilme total.

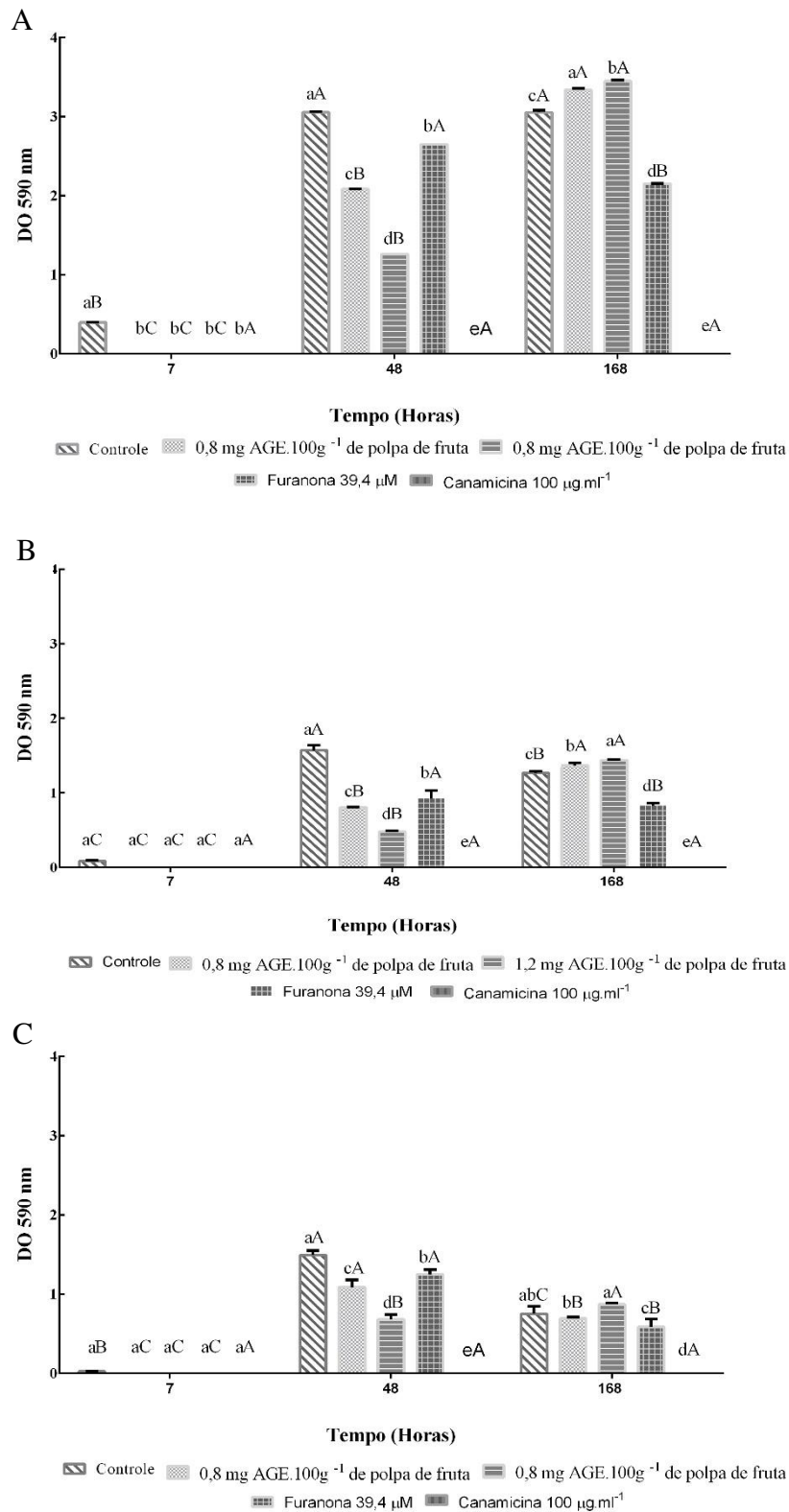


Figura 4 - - Efeito de diferentes concentração do EFP sobre a proporção de polissacarídeos (A), proteínas (B) e DNA (C) no biofilme formado por *S. liquefaciens* L53 por 7, 48 e 168 h. EFP= 0,8 e 1,0 mg AGE. 100⁻¹ de polpa de fruta. Controles = 39,4 μM de furanona e 100 μg.mL⁻¹ de canamicina. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p <

0,05) entre os tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre o mesmo tratamento ao longo do tempo.

Foi observada maior proporção de eDNA da matriz do biofilme formado por *S. liquefaciens* L53 no tempo de 48 h, comparado ao tempo de 7 e 168 h (Tabela 3) o que pode apresentar alguma relação com o aumento do biofilme total no tempo de 168 h. Okshevsky e Meyer, 2015 destacaram que o eDNA está presente em menores quantidades no EPS, mas constitui em componente extrutural importante. Kaplan (2012) demonstrou que a liberação de eDNA esteve relacionado ao aumento da formação do biofilme induzida por concentrações sub-MIC de antibióticos. Além desses, Marti et al. (2017) evidenciaram a relação entre aumento eDNA e aumento do biofilme.

Concentrações sub-MIC do EFP foi promissor na inibição dos componentes da matriz do biofilme no tempo de 48 h. Os resultados do trabalho de Abraham et al. (2011) corroboram com os observados pelo EFP nesse trabalho. Os autores demonstraram que o extrato metanólico das frutas de *Capparis spinosa*, rico em compostos fenólicos, diminuiu a produção do EPS em 46, 58, 66 e 67% em *P. aeruginosa* PAO1, *S. marcescens*, *E. coli* e *P. mirabilis* via inibição do *quorum sensing*, respectivamente. Em concordância com esses trabalhos, extrato antociânico de jambolão inibiu 68% da produção do EPS de biofilme de *K. pneumoniae*. A quercetina diminuiu em 79,9% do EPS de biofilme de *K. pneumoniae* e cianidina diminuiu cerca de 65, 75 e 80% do EPS de biofilme de *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* respectivamente atuando pela inibição do *quorum sensing* (GOPU et al., 2015a, GOPU et al., 2015b, GOPU et al., 2016).

5.4.3 Microscopia do biofilme de *S. liquefaciens* L53 formado na presença de concentrações sub-MIC do EFP

As imagens microscópicas dos biofilmes formados por *S. liquefaciens* L53 por 48 h feitas por microscopia confocal a laser podem ser visualizadas na Figura 4. O biofilme formado por *S. liquefaciens* L53 na ausência de EFP apresentou espessura de 21 μm (Figura 4A) e 12 μm na presença de 39,4 μM de furanona (Figura 4C), os quais foram mais espessos do que o biofilme formado na presença de 1,0 mg AGE.L^{-1} do EFP que foi de 6 μm (Figura 4B).

Os resultados das imagens microscópicas mostraram que a formação do biofilme foi menor quando o biofilme foi cultivado na presença do EFP (Figura 4B) comparado ao controle cultivado na ausência do EFP (Figura 4A) e furanona (Figura 4C) indicando que o

EFP diminuiu a formação do biofilme por *S. liquefaciens* L53. Os biofilmes de *S. liquefaciens* L53 formados por 48 h na ausência do EFP e na presença de 1,0 mg AGE.L⁻¹ do EFP e 39,4 μM de furanona apresentaram mais células vivas (Figuras 4D, 4E e 4F).

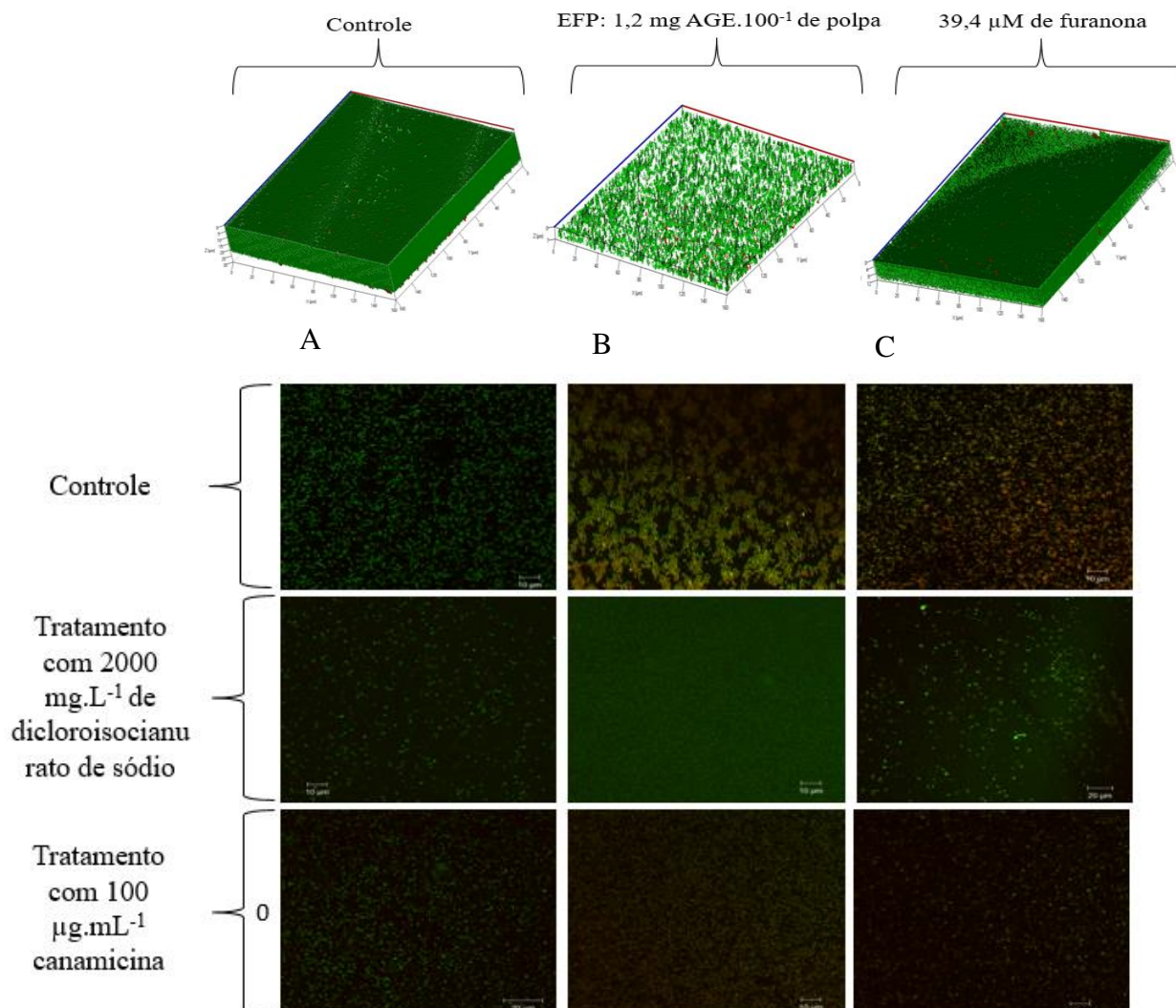


Figura 4 - Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos biofilmes de *S. liquefaciens* L53 formados por 48 h na ausência do EFP (A, D, G, J) e na presença de 1,0 mg AGE.100⁻¹ de polpa do EFP (B, E, H, K) e 39,4 μM de furanona (C, F, I, L). Biofilmes de *S. liquefaciens* L53 formados por 48 h e tratados por 15 min com 2000 mg.L⁻¹ de dicloroisocianurato de sódio (G, H, I) e por 15 min com 100 μg.mL⁻¹ canamicina (J, K, L), bem como não tratados (D, E, F). Células verdes fluorescentes são consideradas células vivas e células vermelhas são consideradas células mortas.

Após o tratamento com os sanitizantes dicloroisocianurato de sódio (Figuras 4G, 4H, 4I) e canamicina (Figuras 4J, 4K, 4L) foi possível observar redução no número de células aderidas ao biofilme, indicando que os sanitizantes testados removeram as células do biofilme. Pode-se observar que, após o tratamento com os antimicrobianos, o controle e furanona apresentaram células mortas (Figuras 4G, 4I, 4J e 4L). No entanto, no biofilme

formado na presença do EFP (Figuras 4H e 4K) não se observa células mortas em vermelho. É possível observar células mortas nas imagens do controle e furanona quando tratadas com os antimicrobianos, entretanto pela contagem das células viáveis houve redução no número de células no biofilme tanto no controle, na presença do EFP e furanona.

As imagens microscópicas confirmam os resultados apresentados anteriormente de diminuição significativa do biofilme total de *S. liquefaciens* L53 pelas concentrações sub-MIC de EFP. As imagens evidenciam diminuição importante no biofilme, corroborando com uma inibição significativa da quantidade de polissacarídeo do biofilme quando cultivado na presença do EFP por 48 h.

5.4.4 Quantificação das células aderidas no poliestireno na presença do EFP e sua susceptibilidade a antimicrobianos

A quantificação das células de *S. liquefaciens* L53 aderidas no poliestireno após 48 h de cultivo na ausência e presença de 1,0 mg AGE.L⁻¹ do EFP e de 39,4 µM de furanona está apresentado na Tabela 4. Os biofilmes formados nestas condições foram submetidos a tratamentos com 200 mg.L⁻¹ do sanitizante dicloroisucianurato de sódio e com 100 µg. mL⁻¹ do antibiótico canamicina por 15 min e, posteriormente, as células aderidas foram quantificadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantificação das células aderidas de *S. liquefaciens* L53 no poliestireno após 48 h de cultivo na ausência e presença do EFP e furanona e sua susceptibilidade a 2000 mg.L⁻¹ de dicloroisucianurato de sódio e a 100 µg.mL⁻¹ de canamicina por 15 min.

| | | Contagem inicial (logUFC.cm ⁻²) | Valores de log UFC.cm ⁻² após tratamento do biofilme formado com antimicrobianos | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|---|--|
| | | | Dicloroisucianurato de sódio (200 mg. L ⁻¹) ₁₎ | Canamicina (100 µg. mL ⁻¹) |
| Formação do biofilme no poliestireno | Controle | 7,1± 0,07 ^{aA} | 4,2 ± 0,30 ^{bA} | 6,6 ± 0,08 ^{aA} |
| | EFP (1,0 mg AGE.L ⁻¹) | 7,1± 0,04 ^{aA} | 4,4 ± 0,17 ^{bA} | 6,8 ± 0,15 ^{aA} |
| | Furanona (39,4 µM) | 7,1± 0,12 ^{aA} | 5,0 ± 0,69 ^{bA} | 6,3 ± 0,27 ^{aA} |

Os valores na mesma coluna, seguidos por letra maiúscula diferente, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey (p < 0,05). Os valores na mesma linha, seguidos por letra minúscula diferente diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade (p < 0,05).

O número de células viáveis aderidas de *S. liquefaciens* L53 no poliestireno quando cultivo na presença de 1,0 mg AGE.L⁻¹ do EFP e de 39,4 µM de furanona não foram estatisticamente diferentes do controle. O número de células viáveis dos biofilmes formados na ausência e presença do EFP e furanona e, posteriormente, tratados com 200 mg.L⁻¹ do

sanitizante dicloroisucianurato de sódio e $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ do antibiótico canamicina por 15 min não apresentam diferença estatística do $\log \text{UFC.cm}^{-2}$ ($p > 0,05$) (Tabela 4) entre os tratamentos e o controle. Esses resultados apontam que, apesar da importante diminuição no biofilme total e os componentes da matriz, essa diminuição não foi suficiente para alterar a susceptibilidade das células do biofilme comparado ao controle. Desse modo, o EFP testado em sub-MIC sob a formação do biofilme por *S. liquefaciens* L53 não proporcionou vantagens relacionadas à melhoria na susceptibilidade das células do biofilme ao tratamento com 200mg.L^{-1} de dicloroisucianurato de sódio e $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de canamicina por 15 min.

É importante destacar que o número de células do biofilme não esteve correlacionado com o biofilme total determinada pelo método de coloração pelo cristal violeta, capaz de corar moléculas carregadas negativamente como a matriz do biofilme, células mortas e vivas (LI et al., 2003; PEETERS et al., 2008; XU et al., 2016). A redução observada esteve relacionada a diminuição nos componentes da matriz do biofilme polissacarídeos, proteínas e DNA (Figura 4).

5.5 Efeito combinado do EFP com antibióticos

Os resultados do teste do efeito combinado do EFP com antibióticos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Efeito combinado de $1,0 \text{mg AGE.100}^{-1}$ de polpa do EFP com os antibióticos $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e furanona $39,4 \mu\text{M}$.

| Compostos | MIC | Compostos | Crescimento ($\log \text{UFC.ml}^{-1}$) | | |
|-------------|------------------------------|--|---|---|--|
| | | | Composto sozinho | Composto combinado com $1,0 \text{mg AGE.L}^{-1}$.100 g de polpa | Composto combinado com furanona ($39,4 \mu\text{M}$) |
| EFP | $90,41 \text{mg AGE.L}^{-1}$ | | 5 | - | Inibiu completamente |
| Furanona | $295,5 \mu\text{M}$ | Furanona ($39,4 \mu\text{M}$) | 10 | Inibiu completamente | - |
| Ampicilina | $39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ | Ampicilina ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) | 9,07 | 8,87 | 8,03 |
| Canamicina | $31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ | Canamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) | 4 | 10 | Inibiu completamente |
| Gentamicina | $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ | Gentamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) | Inibiu completamente | 8,94 | Inibiu completamente |

O efeito combinado dos antibióticos canamicina e gentamicina com o EFP resultou em aumento no log UFC.ml⁻¹ comparados ao antibiótico individualizado (Tabela 5). Já o efeito combinado dos antibióticos com furanona resultou em diminuição do log UFC.ml⁻¹ para canamicina e gentamicina (Tabela 5).

Tabela 6 - MIC do EFP, antibióticos e furanona individuais e combinados para cálculo da FICI.

| EFP e antibiótico | MIC | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------|-----------------------------------|----------|------------|
| | Individuais | Compostos combinados com EFP | | | Compostos combinados com Furanona | | |
| | | Compostos | EFP | FICI | Compostos | Furanona | FICI |
| EFP | 90,41 mg AGE.L ⁻¹ | - | - | - | 22,6 mg AGE.L⁻¹ | 2,46 µM | 0,3 |
| Furanona | 295,5 µM | - | - | - | - | - | - |
| Ampicilina | 39 µg.mL ⁻¹ | 234 µg.mL ⁻¹ | 452,05 mg AGE.L ⁻¹ | 11 | 2,43 | 295,5 µM | 1,06 |
| Canamicina | 31 µg.mL ⁻¹ | 155 µg.mL ⁻¹ | 452,05 mg AGE.L ⁻¹ | 10 | 7,75 | 2,46 µM | 0,3 |
| Gentamicina | 7 µg.mL ⁻¹ | 28 µg.mL ⁻¹ | 452,05 mg AGE.L ⁻¹ | 9 | 3,5 | 2,46 µM | 0,1 |

FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracional;

Interpretação da FICI: < 0,5, sinergia; 0,5 a 0,75, sinergia parcial; 0,76 a 1,0, efeito aditivo; > 1,0 a 4,0, indiferença e > 4,0, antagonismo.

Pela classificação do FICI, o EFP apresentou atividade antagônica com os antibióticos testados ampicilina, canamicina e gentamicina. Já furanona apresentou efeito sinérgico com o EFP e os antibióticos canamicina e gentamicina (Tabela 6).

Os efeitos antagônicos observados no presente trabalho indicam que a sub-MIC do EFP não apresentaram efeitos sobre o aumento da susceptibilidade das células aos antibióticos testados, comparados ao controle. Contrariamente, a utilização combinada de concentrações sub-MIC do EFP com antibióticos apresentou efeito antagônico com os antibióticos testados. Veras et al. (2011) demonstraram que isoquercetina apresentou antagonismo. Ademais, Cruz et al. (2014) evidenciaram atividade antagônica do extrato hidroalcolico de cebola aos antibióticos amicacina e gentamicina em *E. coli* e *S. aureus*. Em concordância, Gonçalves (2014) observaram efeito antagônico do extrato hidroalcolico das folhas de *E. uniflora* L. com os antibióticos amoxicilina, ampicilina, gentamicina tetraciclina e vancomicina.

A atividade antagônica do EFP com antibióticos observada nesse trabalho pode estar relacionada às propriedades antioxidantes dos mesmos, como foi colocado por Veras et al. (2011) Souza et al. (2014) e Cruz et al. (2015) que associaram os resultados de antagonismo obtidos às propriedades antioxidantes e quelantes dos compostos fenólicos que atuam se

ligando aos antibióticos e impedindo sua ação. Ainda de acordo com Secoli (2001) e Granowitz e Brown (2008), o antagonismo pode ocorrer por quelação mútua dos compostos e, ainda segundo Mandalari et al. (2007), essa interação pode ser devido a mecanismo de competição por locais específicos, ou a inibição da absorção do antibiótico pelas células bacterianas ou a interação direta entre os compostos que desencadearia mudanças estruturais que resultam na redução da atividade.

O efeito sinérgico obtido pela furanona com o EFP e os antibióticos canamicina e gentamicina indicaram que a interrupção do sistema *quorum sensing* em *S. liquefaciens* L53 proporcionou as células maior susceptibilidade aos antimicrobianos. Gupu et al., (2015a) evidenciaram que concentrações sub-MIC de quercetina resultaram em aumento na sensibilidade de bactérias como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*. Além desses, Gopu et al., 2015b evidenciaram aumento na sensibilidade a eritromicina tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, gentamicina e ampicilina e Deepika et al., 2018 demonstraram que rutina em concentrações sub-inibitórias aumentou a sensibilidade ao antibiótico gentamicina. Apesar do efeito combinado de inibidores do *quorum sensing* e antibióticos ser uma estratégia promissora pelo seu efeito sinérgico, essa interação deve ser investigada, pois sub-MIC de compostos naturais podem apresentar respostas indesejadas pelo EFP como observadas nesse trabalho.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

O EPS foi eficaz na redução do biofilme de *S. liquefaciens* L53 no período de 48 h e promoveu redução de polissacarídeos e proteínas, principais componentes da matriz exopolimérica. Entretanto no tempo de 168 h apresentou efeito contrário, aumentando os mesmos. Apesar de apresentar redução no biofilme total, o EFP não alterou o número de células aderidas ao biofilme bem como não alterou sua susceptibilidade a tratamentos com o sanitizante dicloroisocianurato de sódio e o antibiótico canamicina. Além disso, quando testado em combinação com antibióticos obteve efeito antagônico com os mesmos indicando que a sua utilização pode não ser vantajosa.

A busca por compostos naturais com capacidade em controlar o biofilme, atuando em concentrações sub-MIC é uma alternativa que está sendo muito pesquisada, pois oferece alternativas no controle do biofilme sem proporcionar riscos de aumento na resistência. Entretanto essa avaliação deve ser detalhada, pois os compostos naturais podem proporcionar uma resposta contrária a esperada, aumentando a formação do biofilme de poderem atuar de forma antagônica com antibióticos, apresentando resultados indesejáveis.

Além dos fenótipos de *S. liquefaciens* averiguados nesse trabalho, o EFP também pode ser testado sob outros que também apresentam grande impacto para a indústria de alimentos como por exemplo proteases, lipases e motilidade. Além disso pode-se testar também a atuação de tais compostos sob fatores de virulência e sua capacidade antimicrobiana e antifúngica. Também pode averiguar a ação do extrato em diferentes bactérias incluindo deterioradoras e patogênicas. É importante enfatizar que o estudo com frutos nacionais valoriza o potencial desses alimentos, elucidam as funções bioativas dos mesmos aumentando as informações científicas de tais além de proporcionarem alternativas para possíveis controles microbiológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg. **Journal Sciences Food Agriculture**, v. 92, n. 8, p.1679-1687, 2012.

ABRAHAM, S. V. P. I.; PALANI, A.; RAMASWAMY, B. R.; SHUNMUGIAH, K. P.; ARUMUGAM, V. R. Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 8, p. 658-668, 2011.

ADONIZIO, A.; KONG, K.; MATHEE, K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52. n. 1, p. 198–203, 2008.

AKRAM, M.; HAMID, A.; KHALIL, A.; GHAFFAR, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A.; ALI, M.; NAVEED, A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 313-319, 2014.

ALMEIDA, F. A.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; PINTO, U. M.; MANTOVANI, H. C.; OLIVEIRA, L. L.; VANETTI, M. C. D. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis in anaerobic conditions. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 3, p. 475-486, 2017.

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**, v. 121, p. 369-388, 2018.

ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, P. C.; VIMALAMBIKE, M. G. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.

ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos. **São Paulo: Varela**. v. 400, 2008.

ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L. Scientific status summary: quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. R24-R37, 2009.

AVILA, A. L. D.; SILVA A. M. D.; BRIÃO M. M. F., POLETO, I.; BLUME, E. AVILA, Maturação fisiológica e coleta de sementes de *Eugenia uniflora* L. (pitanga), Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 1, p. 6-68, 2009.

BAGETTI, M.; FACCOI, E. M. P.; PICCOLOI, J.; HIRSCHI, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C. N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physico chemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora*L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 147-154, 2011.

BAGLINIÈRE, F.; SALGADO, R. L.; SALGADO, C. A.; VANETTI, M. C. D. Biochemical characterization of an extracellular heat- stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Raw Milk. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 4, p. 952-959, 2017a.

BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; CARVALHO, A. F.; VANETTI, M. C. D. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 38-45, 2017b.

BAGLINIÈRE, F.; TANGUY, G.; SALGADO, R. L.; JARDIN, J.; ROUSSEAU, F.; ROBERT, B.; HAREL-OGER, M.; VANETTI, M. C. D.; GAUCHERON, F. Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. **Food Chemistry**, v. 229, p. 104-110, 2017c.

BAI, A.; V. RAI. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.10, n. 3, p.184-194, 2011.

BANDONI, A. L.; MENDIONDO, M. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Survey of argentine medicinal plants—folklore and phytochemical—screening. II. **Economic Botany**, v. 30, n. 2, p. 161-185, 1976.

BASLI, A.; SOULET, S.; CHAHER, N.; MÉRILLON, J. M.; CHIBANE, M.; MONTI, J. P.; RICHARD, T. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

BASU, A.; BHUYAN, D. J. Phenolic compounds potential health benefits and toxicity. In: **Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Production Waste**. CRC Press, p. 27-59, 2017.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. A.; HIRAOKA, K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 157-168, 2005.

BENTZ, A. B. A Review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability. **Journal of Young Investigators**, 2017.

BERTOLDI, M.C. **Antioxidant capacity, anticancer effects and absorption of mango (*Mangifera indica* L.) polyphenols *in vitro***. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. [S.l.]. 2009.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. Ø.; BURMØLLE, M.; HENTZER, M.; HAAGENSEN, J. A.; HOUGEN, H. P.; CALUM, H.; MADSEN, K. G.; MOSER, C.; MOLIN, S.; HØIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 373-383, 2005.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BORGES, K. C.; BEZERRA, M. D. F.; ROCHA, M. P.; SILVA, E. S. D.; FUJITA, A.; GENOVESE, A.; CORREIA, R. P. Freshand spray dried pitanga (*Eugenia uniflora*) and jambolan (*Syzygium cumini*) pulps are natural sources of bioactive compounds with functional attributes. **Journal of Probiotics & Health**, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2016.

BOUYAHYA, A.; DAKKA, N.; ET-TOUYS, A.; ABRINI, J.; BAKRI, Y. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 729-743, 2017.

BRASIL. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 set. 1988.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1017-1032, 2011.

CALABRESE, E. J. Preconditioning is hormesis part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 265-275, 2015.

CAMPOS-GALVÃO, M. E. M. **Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella entérica* sorovar Enteritidis**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 78p., 2012.

CASTILLO, S.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S. 2(5H)-Furanone, epigallocatechin gallate, and a citric-based disinfectant disturb quorum-sensing activity and reduce motility and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 1, p. 89-95, 2015.

CHAVASCO, J. M.; FELIPHE, P. E.; MUNIZ, B. H., CERDEIRA; C. D., LEANDRO, F. D.; COELHO, L. F. L.; SILVA, J. J.; CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. T. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13-20, 2014.

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**, v. 61, n. 29, p. 7120-7126, 2013.

CIOFU, O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. **APMIS. Supplementum**, n. 116, p. 1-47, 2002.

CONWAY, B.A.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678-5685, 2012.

CORNFORTH, D. M.; FOSTER, K. R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 285, 2013.

CORRAL-LUGO, A.; DADDAOUA, A.; ORTEGA, A.; ESPINOSA-URGEL, M.; KRELL, T. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. **Science Signaling**, v. 9, n. 409, p. ra1-ra1, 2016.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

CRUZ, A. J.; BRITO, I. P.; SOBRAL, M. A.; SOUSA, A. T.; ALVES, E. F.; ANDREZA, R. D. S.; FERREIRA, S. S.; COSTA, R. O.; FIGUEREDO, F. G.; GUEDES, T. T.; MACÊDO, R. O.; RIBEIRO, T. R. G.; LEANDRO, L. MG.; OLIVEIRA, C. D. M.; TINTINO S. R.; COSTA, M. S.; AQUINO, P. E. A. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. **Ciencias de la Salud**, v. 14, n. 2, p. 191-200, 2016.

D'ANDREA, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DEEPIKA, M. S.; THANGAM, R.; SAKTHIDHASAN, P.; ARUN, S.; SIVASUBRAMANIAN, S.; THIRUMURUGAN, R. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Food Control**, v. 90, p. 282-294, 2018.

DEHGHAN, H.; SARRAFI, Y.; SALEHI, P. Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 1, p. 179-188, 2016.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387-398, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DRIFFIELD, K.; MILLER, K.; BOSTOCK, M.; O'NEILL, A. J.; CHOPRA I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1053-1056, 2008.

DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, n. 1, p. 2-16, 2010.

EBERL, L.; WINSON, M. K.; STERNBERG, C.; STEWART, G. S.; CHRISTIANSEN, G.; CHHABRA, S. R.; BYCROFT, B.; WILLIAMS, P.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.

- Involvement of N- acyl- l- homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 127-136, 1996.
- FAHRIOĞLU, U.; DODURGA, Y.; ELMAS, L.; SEÇME, M. Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells in vitro. **Gene**, v. 576, n. 1, p. 476-482, 2016.
- FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 54-66, 2014.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661-681, 2012.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.
- FONG, J. N.; YILDIZ, F. H. Biofilm matrix proteins. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p. 1-26, 2015.
- FOUGY, L.; DESMONTS, M. H.; COEURET, G.; FASSEL, C.; HAMON, E.; HÉZARD, B.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.; CHAILLOU, S. Reducing salt in raw pork sausages increases spoilage and correlates with reduced bacterial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3928-3939, 2016.
- FREDHEIM, E. G. A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J. E. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1172-1180, 2009.
- FRIEDRICZEWSKI, A. B.; GANDRA, E. Á.; CERESER, N. D.; MOREIRA, L. M.; TIMM, C. D. Biofilm formation by coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolated from mozzarella cheese elaborated with buffalo milk and its effect on sensitivity to sanitizers. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 6, 2018.
- FUQUA, C.; GREENBERG, P. E. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 685-695, 2002.
- FUQUA, W.C.; WINANS C. W.; GREENBERG E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**. v. 176, n. 2, p. 269-75, 1994.
- GANIN, H.; RAYO, J.; AMARA, N.; LEVY, N. Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit bacterial quorum sensing. **Medicinal Chemistry Communication**, v.4, n. 1, p.175-179, 2012.
- GONÇALVES, C. L. **Bacteriostasia, citotoxicidade, atividade antioxidante e sinergismo com antibacterianos comerciais de plantas bioativas com indicativo medicinal**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.
- GONZALEZ, J. E.; KESHAVA, N. D. Messing with bacterial quorum sensing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 4, p. 859-875, 2006.

- GOPU, V.; MEENA, C. K.; SHETTY, P. H. Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: in-vitro and in-silico evidence. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0134684, 2015a.
- GOPU, V.; KOTHANDAPANI, S.; SHETTY, P. H. Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyan in malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 79, p. 61-69, 2015b.
- GOPU, V.; SHETTY, P. H. Cyanidin inhibits quorum signalling pathway of a food borne opportunistic pathogen. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 968-976, 2016.
- GRAM, L.; NYS, R.; MAXIMILIEN, R.; GIVSKOV, M.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S. Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* on swarming motility of *Proteus mirabilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4284-4287, 1996.
- GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, n. 2, p. 421-442, 2008.
- GU, H.; REN, D. Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. **Industrial Chemistry and Chemical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 20-33, 2014.
- GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.
- HAMINIUK, C. W.; MACIEL, G. M.; PLATA- OVIEDO, M. S.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits—an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n.10, p. 2023-2044, 2012.
- HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 198-207, 2008.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HENTZER, M.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; HEYDORN, A.; ANDERSEN, J. B.; PARSEK, M. R.; RICE, S. A.; EBERL, L.; MOLIN, S.; HØIBY, N.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. HENTZER, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 87-102, 2002.
- HOFFMANN-RIBANI, R; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2009.
- HOUDT, V. R; GIVSKOV, M; MICHIELS, C. W. Quorum sensing in *Serratia*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 407-424, 2007.

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 58, n. 11-12, p. 879-884, 2003.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; ZAMBIAZI, R. C. Scientific note: bioactive compounds in small fruits cultivated in the southern region of Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1/4, p. 123-127, 2009.

JAHID, I. K.; MIZAN, M. F.; HÁ, A. J.; HÁ, S. D. Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. **Food Microbiology**, v. 4, p. 142–151, 2015.

JAISINGHANI, R. N. Antibacterial properties of quercetin. **Microbiology Research**, v. 8, n. 1, p. 13-14; 2017.

JAKOBSEN, T. H.; VAN GENNIP, M.; PHIPPS, R. K.; SHANMUGHAM, M. S.; CHRISTENSEN, L. D.; ALHEDE, M.; SKINDERSOE, M. E.; RASMUSSEN, T. B.; FRIEDRICH, K.; UTHE, F.; JENSEN, P. Ø.; MOSER, C.; NIELSEN, K. F.; EBERL, L.; LARSEN, T. O. L.; TANNER, D.; HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOVA, M. Ajoene, a sulfur rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2314–2325, 2012.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KALIA, V.C. Quorum sensing inhibitors: an overview. **Biotechnology Advances**. v. 31, p. 224-245, 2012.

KAPLAN, J. B.; IZANO, E. A.; GOPAL, P.; KARWACKI, M. T.; KIM, S.; BOSE, J. L.; BAYLES, K. W.; HORSWILL, A. R. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **MBio**, v. 3, n. 4, p. e00198-12, 2012.

KAPLAN, J. B.; IZANO, E. A.; GOPAL, P.; KARWACKI, M. T.; KIM, S.; BOSE, J. L.; BAYLES, K. W.; HORSWILL, A. R. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **MBio**, v. 3, n. 4, p. 1-8, 2012.

KARWOWSKI, M. S. **Estudo da estabilidade, comportamento reológico e dos compostos fenólicos de frutas da mata atlântica Curitiba. 2012. 99f.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KAY, C. D.; PEREIRA-CARO, G.; LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 155-180, 2017.

KOH, C.; SAM, C.; YIN, W.; TAN, L. Y.; KRISHNAN, T.; CHONG, Y. M.; CHAN, K. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6217-6228, 2013.

- KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423, 2010.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.
- KUMARI, H.; BALASUBRAMANIAN, D.; ZINCKE, D.; MATHEE, K. Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on β -lactam and non- β -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt 4, p. 544, 2014.
- LABBATE, M.; QUECK, S. Y.; KOH, K. S., RICE, S. A.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 692-698, 2004.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v.44, p. 1150-1160, 2011.
- LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. Cross- resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress- inducers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 201-208, 2004.
- LÁZARO-DÍEZ , M.; ACOSTA, F.; REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; OCAMPO-SOSA, A.; OCEJO-VINYALS, J. G.; BRAVO, J.; EL AAMRI, F.; ESCUELA, O.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; RAMOS-VIVAS, J. Whole-genome sequence of *Serratia liquefaciens* HUMV-21, a cytotoxic, quorum-sensing, and biofilm-producing clinical isolate. **Genome Announc**, v.3, n. 3, p. 00533-15, 2015.
- LEMBRE, P.; LORENTZ, C.; DI MARTINO, P. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. **The Complex World of Polysaccharides**. InTech, 2012.
- LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAĆ, D.; MAJKIĆ, T.; BEKVALAC, K.; ORČIĆ, D.; MIMICA-DUKIĆ, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.
- LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 353-362, 2003.
- LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1-30, 2015.
- LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, H. LIN. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 2016.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 7, p. 1-12, 2010.

LOUGHLIN, C. T. O.; MILLER, L.; SIRYAPORN, A.; DRESCHERA, K.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 2013.

MACÉ, S.; JOFFRAUD, J. J.; CARDINAL, M.; MALCHEVA, M.; CORNET, J., LALANNE, V.; CHEVALIER, F.; SÉROT, H.; PILET, M.; DOUSSET, X. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmosalar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 227-238, 2013.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. D. Flavonoides e seu potencial terapêutico. 2008. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, MG, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MACHADO, S. G.; HEYNDRICKX, M.; DE BLOCK, J.; DEVREESE, B.; VANDENBERGHE, I.; VANETTI, M. C. D.; VAN COILLIE, E. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 65-71, 2016.

MACHADO, S. G.; SILVA, F. L.; BAZZOLLI, D.; HEYNDRICKX, M.; COSTA, P. M. D. A.; VANETTI, M. C. D. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in coldraw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842-M1849, 2015.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANDALARI, G.; BENNETT, R. N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C. B.; GASSON, M. L.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a by product of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056 - 2064, 2007.

MANEFIELD, M., HARRIS, L.; RICE, S. A.; NYS, R.; KJELLEBERG, S. MANEFIELD, Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2079-2084, 2000.

MARCH, J. C.; BENTLEY, W. E. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARTI, S.; PUIG, C.; MERLOS, A.; VIÑAS, M.; DE JONGE M. I.; LIÑARES, J.; ARDANUY, C.; LANGEREIS, J. D. Bacterial lysis through interference with peptidoglycan synthesis increases biofilm formation by hontypeable *Haemophilus influenzae*. **MspHere**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2017.

MIGUES, I.; BAENAS, N.; GIRONÉS-VILAPLANA, A.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H.; MORENO, D. Phenolic profiling and antioxidant capacity of *Eugenia uniflora* L.(Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations. **Foods**, v. 7, n. 5, p. 1 – 12, 2018.

MODESTO, J. H. **Produtividade, sazonalidade e análises tecnológicas de frutos de cultivares de mangueira em condições subtropicais**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdades de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013.

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**, v. 30, n. 10, p. 1175-1182, 2014.

MORÉ, M. I.; FINGER, L. D.; STRYKER, J. L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A., WINANS, S. C. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1655-1658, 1996.

MORE, T. T.; YADAV, J. S. S.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1-25, 2014.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. Qsec mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 914-926, 2010.

MOROHOSHI, T.; SHIONO, T.; TAKIDOUCHI, K.; KATO, M.; KATO, N.; KATO, J.; IKEDA, T. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6339-6344, 2007.

MORTON, R. D. Aerobic Plate Count. In: Downes FP, Ito K, editors. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, D.C.: APHA; 2001. p. 63-67.

MUSTHAFA, K.S.; RAVI, A.V.; ANNAPOORANI, A.; PACKIAVATHY, I.S.; PANDIAN, S.K. Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the N-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 333-339, 2010.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Quorum sensing and phytochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 6, p. 12607-12619, 2013.

NEGRI, T. C.; BERNI, P.; BRAZACA, Solange. Valor nutricional de frutas nativas e exóticas do Brasil. **Biosaúde**, v. 18, n. 2, p. 82-96, 2016.

NIERO, E. L. O; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 1, p. 31, 2013.

- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews**, v. 54, n.1, p. 49-79, 2000.
- OBERBAUM, M.; GROPP, C. Update on hormesis and its relation to homeopathy. **Homeopathy**, v. 104, n. 4, p. 227-233, 2015.
- OKSHEVSKY, M.; MEYER, R. L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 341-352, 2015.
- OLIVEIRA, B. D. Á.; RODRIGUES, A. C.; CARDOSO, B. M. I.; RAMOS, A. L. C. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; CUNHA, L. R.; PINTO, U. M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59-66, 2016.
- OLIVEIRA, C. B.; Soares, D. G. D. S.; Paulo, M. D. Q.; Padilha, W. W. N. Atividade Antimicrobiana in vitro da *Eugenia uniflora* L.(Pitanga) sobre bactérias cariogênicas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 12, n. 3, p. 239-250, 2010.
- OUYANG, J.; SUN, F.; FENG, W.; SUN, Y.; QIU, X.; XIONG, L.; LIU, Y.; CHEN, Y. K. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 966-974, 2016.
- PACZKOWSKI, J. E.; MUKHERJEE, S.; MCCREADY, A. R.; CONG, J. P.; AQUINO, C. J.; KIM, H.; HENKE, B. R.; SMITH, C. D.; BASSLER, B. L. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 1-30, 2017.
- PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 19, p. 1581-1601, 2009.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 17, p. 1-15, 2016.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-165, 2008.
- PLYUTA, V.; ZAITSEVA, J.; LOBAKOVA, E.; ZAGOSKINA, N.; KUZNETSOV, A.; KHMEL, I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Apmis**, v. 121, n. 11, p. 1073-1081, 2013.
- PRILHA, O.; VIRKAJARVI, V.; JUVONEN, R.; ALAKURTTI, S.; PIRTTIMAA, M.; STORGARDS, E. Quorum sensing signalling and biofilm formation of brewery-derived bacteria, and inhibition of signalling by natural compounds. **Current Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 617-627, 2014.
- PROUTY, A. M.; SCHWESINGER, W. H.; GUNN, J. S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2640-2649, 2002.

- QUECAN, B.X. V. **Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o quorum sensing bacteriano**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- RANIERI, M. R. M.; WHITCHURCH, C. B.; BURROWS, L. L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 164-169, 2018.
- RASMUSSEN, T. B.; BJARNSHOLT, T.; SKINDERSOE, M. E.; HENTZER, M.; KRISTOFFERSEN, P.; KÖTE, M.; NIELSEN, J.; LEO EBERL, L.; GIVSKOV, M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1799-1814, 2005.
- REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.
- 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**, v. 187, n. 10, p. 3477-3485, 2005.
- RIEDEL, K.; OHNESORG, T.; KROGFELT, K. A.; HANSEN, T. S.; OMORI, K.; GIVSKOV, M.; EBERL, L. N-Acyl-L-Homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1805-1809, 2001.
- RIVAS, L.; DYKES, G.A.; FEGAN, N. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 44-51, 2007.
- RODRIGUES, A. C.; ZOLA, F. G.; ÁVILA OLIVEIRA, B. D.; SACRAMENTO, N. T. B.; DA 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**, v. 81, n. 10, p. M2538-M2544, 2016.
- RODRIGUEZ-MORATO, J.; XICOTA, L.; FITO, M.; FARRE, M.; DIERSSEN, M.; DE LA TORRE, R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4655-4680, 2015.
- ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.
- RUFINO, M. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.
- RUMJANEK, N.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 34-49, 2004.
- SÄDE, E.; MURROS, A.; BJÖRKROTH, J. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 252-258, 2013.

- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.
- SECOLI, R. S. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 25, n. 1, p. 28-34, 2001.
- SHAHIDI, F. Z.; NACZK, M. Food pHenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Food Chemistry**, v. 3, n. 159, p. 418-482, 1996.
- SHAILASREE, S.; VENKATARAMANA, M.; NIRANJANA, S. R.; PRAKASH, H. S. Cytotoxic effect of p-coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 119-130, 2015.
- SHENG, G.; YU, H.; LI, X. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.
- SIMOES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.
- SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Quorum sensing in the context of food microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5473-82, 2012.
- SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014.
- SOUTO, M. M. **Caracterização de compostos bioativos de três variedades de pitanga (*Eugenia Uniflora* L.)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SOUZA, D. O.; RELISON TINTINO, S.; GOMES FIGUEREDO, F.; BORGES, M. C. M.; BEZERRA MORAIS BRAGA; M. F., FELIPE, B.; COSTA, G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M.R. Antibacterial and modulatory activity of *Cecropia pachystachya* Trécul on the action of aminoglycosides. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 3, p. 121-132, 2014.
- SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572- 585, 2013.
- SRINIVASAN, R.; DEVI, K. R.; KANNAPPAN, A.; PANDIAN, S. K.; RAVI, A. V. *Piper betle* and its bioactive metabolite phytol mitigates quorum sensing mediated virulence factors and biofilm of nosocomial pathogen *Serratia marcescens* in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 592-603, 2016.
- STEWART, P. S.; ROE, F.; RAYNER, J.; ELKINS, J. G.; LEWANDOWSKI, Z.; OCHSNER, U. A.; HASSETT, D. J. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into

Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 836-838, 2000.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

SULTANBAWA, Y. Plant antimicrobials in food applications: Minireview. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. p. 1084- 1093, 2011.

SUN, S. J.; LIU, Y. C.; SUN, J.; ZHU, H. The dependence of quorum sensing in *Serratia marcescens* JG on the transcription of luxS gene. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 5, p. 715-721, 2015.

TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - NEPA/UNICAMP – Versão II - 2º Ed. Campinas- SP: NEPA/UNICAMP, p. 113, 2006.

TAKAYAMA, Y.; KATO, N. In vitro analysis of essential binding sites on the promoter of the *Serratia marcescens* spn operon with the quorum sensing receptor SpnR. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 11, p. 2513-2517, 2016.

TAY, S. B.; YEW, W. S. Development of quorum based anti-virulence therapeutics targeting gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n. 8, p. 16570–16599, 2013.

TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J. B.; BAUER, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial n-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 13, n. 6, p. 637-648, 2000.

THAKUR, P.; CHAWLA, R.; TANWAR, A.; CHAKOTIYA, A. S.; NARULA, A., GOEL, R.; ARORA, R.; SHARMA, R. K. Attenuation of adhesion, quorum sensing and biofilm mediated virulence of carbapenem resistant *Escherichia coli* by selected natural plant products. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 76-85, 2016.

THOMAS, V. C.; HIROMASA, Y.; HARMS, N.; THURLOW, L.; TOMICH, J.; HANCOCK, L. E. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 1022-1036, 2009.

THOMSON, N. R.; CROW, M. A.; MCGOWAN, S. J.; COX, A.; SALMOND, G. P. C. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 539-556, 2000.

TIMURKAYNAK, F.; CAN, F.; AZAP, Ö. K.; DEMIRBILEK, M.; ARSLAN, H.; KARAMAN, S. Ö. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 224-228, 2006.

TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ALENCAR, S. M. Activity of brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943-8957, 2012.

TRUCHADO, P.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; GIL, M. L.; TOMÁS-BABERÀN, F. A.; ALLENDE, A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1337-1344, 2012.

TSENG, B. S.; MAJERCZYK, C. D.; DA SILVA, D. P.; CHANDLER, J. R.; GREENBERG, E. P.; PARSEK, M. R. Quorum sensing influences *Burkholderia thailandensis* biofilm development and matrix production. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2643-2650, 2016.

VAN, H. R.; VAN, L. D.; IZQUIERDO, J. A.; AERTSEN, A.; MASSCHELEIN, J.; LAVIGNE, R.; MICHIELS, C. W.; TAGHAVI, S. Genome sequence of *Serratia plymuthica* RVH1, isolated from a raw vegetable-processing line. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p. e00021-14, 2014.

VERAS, H. N.; DOS SANTOS, I. J.; DOS SANTOS, A. C.; FERNANDES, C. N.; MATIAS, E. F.; LEITE, G. D. O.; SOUZA, H. H. F.; COSTA J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin in vitro. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 9, n. 1/2., p. 25-30 2011.

VIDELA, H. A.; CHARACKLIS, W. G. Biofouling and microbially influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 29, n. 3-4, p. 195-212, 1992.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL, B. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 515-527, 2010.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n.10, p. 1306-1320, 2012.

WATERS, C.M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319-346, 2005.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140-146, 2008.

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**, v. 3, n. 2, p.163-175, 2008.

WILLIAMSON, G.; KAY, C. D.; CROZIER, A. The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 5, p. 1054-1112, 2018.

WILLINER, M. R.; PIROVANI, M. E.; GÜEMES, D. R. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 8, p. 842-845, 2003.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1874-1905, 2017.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. WITHDRAWN: Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology Advances**, p.1-21, 2014.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B.; LI, L.; DENG, Y. Crystal violet and XTT assays on *C aureus* biofilm quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016.

YANG, Q.; DEFOIRDT, T. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, 960-968, p. 2014.

YEO, S. S.; THAM, F. Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. **Malaysian Journal of Microbiology**. v. 8, n. 1, p.11-20, 2012.

ZHU, J.; WINANS, S. C. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 4832–4837, 1999.

ZOLA, F. G. **Atividades antioxidante e antimicrobiana de polifenóis de grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e pitanga (*Eugenia uniflora*L).** Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.