

1 **EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS E DE LEVEDURAS E ÓLEOS**

2 **ESSENCIAIS SOBRE MOTILIDADE DE *ESCHERICHIA COLI***

3 Natália da S. **MENDONÇA**¹; Maxwel A. **ABEGG**;

4 Universidade Federal do Amazonas – UFAM

5 Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET

6 ¹Bolsista FAPPEAM: Graduação em Farmácia

7 natalia.smendonca@hotmail.com; maxabegg@gmail.com

8

9 **Efeitos de extratos vegetais e de leveduras e óleos essenciais sobre motilidade de**
10 ***Escherichia coli***

11 **Resumo:**

12 Bactérias patogênicas multirresistentes estão se tornando cada vez mais
13 comuns e, devido à sua multiplicidade de mecanismos, são frequentemente resistentes a
14 muitos, se não todos os antibióticos atuais, fatores de virulência bacteriana ganham cada
15 vez mais atenção como uma abordagem potencial para novos antibióticos. Estudos
16 sobre os diferentes tipos de motilidade realizados por microrganismos geneticamente
17 bem caracterizadas como *E. coli* ajudam a aumentar a compreensão da patogênese de
18 doenças infecciosas bacterianas. Acredita-se que os extratos vegetais, de leveduras e
19 óleos essenciais podem atuar sobre fatores de virulência de patógenos e inibirem a
20 motilidade, o que terá grande importância no curso das doenças infecciosas bacterianas.
21 No presente trabalho, testou-se o efeito de extratos vegetais, de leveduras e óleo
22 essencial de azeitoneira roxa, em concentrações diferentes, sobre a motilidade por
23 *swarming* e *swimming* de diferentes cepas de *E. coli*, visando obter substâncias que
24 inibam a motilidade e como resultados observou-se que os extratos vegetais LSV e LSA
25 inibiram o deslocamento por *swarming* da maioria das cepas de *E. coli* utilizadas.
26 Obteve-se inibição total do deslocamento de RS 218, K12 MG1655, ECO 104 com a
27 mistura de LSV ao meio de cultivo semissólido (0,5% de ágar). O extrato de levedura S-
28 1231 inibiu o total deslocamento por *swarming* de *E. coli* ATCC 25922. Esses fatos
29 demonstram que os extratos utilizados podem representar uma potencial fonte de
30 moléculas inibidoras de motilidade microbiana.

31 **Palavras-Chave:** Motilidade; *E. coli*; extratos vegetais; extratos de leveduras;
32 antimicrobianos

33 ***Effects of plant and yeast extracts, and essential oils on motility Escherichia coli***

34 ***Abstract:***

35 *Multi-resistant pathogenic bacteria are becoming increasingly common, due to their*
36 *variety of mechanisms, are frequently resistant to many, if not all current antibiotics,*
37 *bacterial virulence factors are increasingly gaining attention as a potential new*
38 *approach to antibiotics. Studies on the different types of motility performed by*
39 *microorganisms genetically well characterized as E. coli help increase understanding*
40 *of the pathogenesis of bacterial infectious diseases. It is believed that plant extracts,*
41 *yeast and essential oils may act on virulence factors of pathogens and inhibiting the*
42 *motility, which will have great significance in the course of bacterial infectious*
43 *diseases. In this study, we tested the effect of plant extracts, yeast and essential oil*
44 *purple azeitoneira at different concentrations, on a swarming motility and swimming in*
45 *different strains of E. coli, to obtain substances which inhibit the motility and as results*
46 *revealed that the LSA and LSV plant extracts inhibited the displacement swarming of*
47 *most strains of E. coli used. Obtained total inhibition of the RS 218 displacement, K12*
48 *MG1655, ECO 104 with the mixture of LSV to the semi-solid culture medium (0.5%*
49 *agar). S-1231 Yeast extract inhibited the total displacement swarming of E. coli ATCC*
50 *25922 These facts demonstrate that the extracts used may represent a potential source*
51 *of microbial motility inhibitory molecules.*

52 ***Keywords:*** *Motility; E. coli; plant extracts; yeast extracts; antimicrobial*

53

54

55

56 1. INTRODUÇÃO

57 As bactérias competem ou cooperam em resposta a vários sinais para a
58 disponibilidade de nutrientes, oxigênio ideal e quando expostas a condições ambientais
59 adversas, como a falta de nutrientes, superfícies rígidas, calor extremo, e produtos
60 químicos perigosos no ambiente, podem coletivamente desenvolver estratégias
61 sofisticadas para adaptação e sobrevivência (Be'er *et al.* 2009; Roy *et al.* 2010).

62 Para coordenar esforços de cooperação, as bactérias desenvolveram métodos de
63 sinalização célula-célula, incluindo interações físicas diretas com a secreção de
64 materiais lubrificantes extracelulares, comunicação bioquímica através de moléculas
65 *quorum sensing* e sinalização quimiotática. Estes comportamentos complexos envolvem
66 a ativação de muitos genes e permitem a sobrevivência da colônia como um todo (Be'er
67 *et al.* 2009).

68 A motilidade é um dos processos celulares mais extensivamente estudados em
69 bactérias e a maior parte dos trabalhos focam em *swimming* em ambientes aquosos, mas
70 outros comportamentos de motilidade são observados quando as bactérias são
71 propagadas fora de um ambiente aquoso (Kim e Surette 2004).

72 Motilidade por *swimming* é um modo de movimento bacteriano que é
73 alimentado por flagelos rotativos mas, ao contrário do *swarming* ocorre como células
74 individuais em movimento em ambientes líquidos (Kearns 2010; Patrick e Kearns
75 2011). *Swarming* é definido como uma atividade coordenada multicelular durante o
76 qual as células em *swarming* mantêm contato longitudinal umas com as outras.
77 Enquanto células individuais em *swarming* migram rapidamente para frente e para trás
78 em uma massa bacteriana em *swarming*, a colônia como um todo migra para fora
79 (Harshey e Matsuyama 1994). Há três requisitos básicos para a motilidade bacteriana

80 por *swarming*: (1) as células são móveis e possuem flagelos funcionais, (2) as células
81 estão em contato ou bastante próximas, e (3) as células estão em contato com outras
82 células móveis (Copeland e Weibel 2009). Em contraste com outros processos de
83 diferenciação em bactérias, o *swarming* não é uma resposta motivada pela falta de
84 nutrientes e varia significativamente dependendo do organismo e das condições
85 ambientais de crescimento (Senesi *et al.* 2002).

86 A motilidade por *swarming* tem uma série de características que a distinguem
87 do *swimming*. Primeiro, o *swarming* requer ou a secreção de agentes lubrificantes pela
88 bactéria ou a utilização de superfícies sólidas com tensão superficial inerentemente
89 reduzida. Em segundo lugar, células isoladas em superfícies são em grande parte não
90 móveis e o *swarming* rápido é facilitado pelo movimento coletivo de agrupamentos
91 dinâmicos de células. Finalmente, as células cultivadas em líquidos permanecem
92 imóveis no ponto de inoculação de superfície por um período experimental reprodutível
93 de tempo, chamado de "*swarming lag*", antes do início da expansão por *swarming*
94 (Patrick e Kearns 2011).

95 De acordo com Partridge e Harshey (2013), bactérias que fazem *swarming*
96 podem ser divididas em duas categorias: *swarmers* robustos, que pode deslocar-se
97 através de uma superfície de ágar sólido (1,5% de ágar e acima), e *swarmers*
98 temperadas, que podem fazer *swarming* somente em superfície de ágar semissólido (0,5
99 a 0,8% de ágar). *Swarmers* robustas incluem bactérias com flagelos polares, que
100 induzem flagelação peritríquia sobre a superfície de contato, tais como *Azospirillum*,
101 *Rhodospirillum* e espécies de *Vibrio*, assim como as espécies de *Proteus* com flagelos
102 peritríquios. Estas bactérias exibem uma morfologia celular em *swarming*,
103 hiperflagelada e hiperalongada, que é muito diferente de suas contrapartes de

104 crescimento em caldo (*swimming*). *Swarmers* temperadas incluem *E. coli*, *Bacillus*,
105 *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, e as espécies de *Yersinia* (Butler *et al.*
106 2009).

107 A bactéria Gram-negativa *E. coli* é em grande parte comensal e reside na
108 camada mucosa do cólon de mamíferos. No entanto, várias cepas têm atributos de
109 virulência que lhes dão a capacidade de causar diarreia, doenças urológicas ou
110 sistêmicas. *E. coli* patogênica tem sido classificada em diversos patótipos, cada qual
111 causando doenças com características distintas, e 6 patótipos, incluindo *E. coli*
112 enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxogênica (ETEC) e *E. coli* enteroagregativa
113 (EAEC), que estão associadas com doença intestinal (Jandhyala *et al.* 2013).

114 *E. coli* tem notável versatilidade metabólica e fisiológica, o que facilita a sua
115 sobrevivência e crescimento sob uma vasta gama de condições ambientais, é geralmente
116 um bastonete curto (2-4 µm de comprimento) com flagelos peritríquios que rodam para
117 permitir o movimento em ambientes líquidos (Harshey e Matsuyama 1994; Lee *et al.*
118 2011).

119 Harshey e Matsuyama (1994), verificaram que este microrganismo também é
120 capaz de uma resposta fisiológica, desencadeada por crescimento em certas superfícies
121 do ágar, o que permite que a bactéria realize motilidade por *swarming* como um grupo
122 coordenado para colonizar efetivamente a superfície de crescimento inteira. *E. coli*
123 também move-se por *swimming* em ambientes líquidos com ajuda de seis a oito flagelos
124 rotativos que são ancorados através dos órgãos em posições distribuídas aleatoriamente
125 no envelope celular (Barker *et al.* 2006).

126 Comunidades multicelulares bacterianas associadas à superfícies têm
127 vantagens sobre células individuais, tais como a proteção contra as condições

128 ambientais desfavoráveis, incluindo predação, a presença de agentes antimicrobianos e a
129 resposta imune do hospedeiro (Verstraeten *et al.* 2008; Be'er *et al.* 2013).

130 Bactérias patogênicas multirresistentes estão se tornando cada vez mais
131 comuns e, devido à sua multiplicidade de mecanismos, são frequentemente resistentes a
132 muitos, se não todos os antibióticos atuais (Tillotson e Theriault 2013).

133 Existe uma crescente demanda por novas estratégias para o controle de
134 biofilmes (comunidades de organismos sésseis que secretam uma matriz extracelular e
135 agregam-se como grupos multicelulares) (Kearns 2010) e outros mecanismos de
136 virulência de bactérias. Enquanto a maioria dos antibióticos visam principalmente inibir
137 o crescimento de células podendo resultar em resistência à droga bacteriana, os
138 inibidores de biofilme não afetam o crescimento celular e há menor possibilidade de
139 desenvolvimento de resistência, ajudando a combater as doenças infecciosas. Vários
140 inibidores de biofilme não tóxicos eficazes contra bactérias patogênicas foram
141 encontrados recentemente: D-aminoácidos, derivados do indol, furanonas, ácido
142 ursólico, dentre outros. Assim, a busca de substâncias bactericidas e bacteriostáticas não
143 tem gerado um número de antibióticos considerável nos últimos anos, tanto que várias
144 indústrias farmacêuticas não estão mais investindo na busca de antibióticos clássicos
145 (Lee *et al.* 2011; Lee *et al.* 2013).

146 Segundo Barczak e Hung (2009), os fatores de virulência bacteriana ganham
147 cada vez mais atenção como uma abordagem potencial para novos antibióticos.
148 Inibidores de pequenas moléculas de virulência mostraram que alteram o curso da
149 doença em modelos de infecção do organismo inteiro e recentemente avanços
150 importantes na área, incluem a identificação de novos alvos dentro de vias de
151 sinalização celular.

152 Estudos sobre os diferentes tipos de motilidade realizados por microrganismos
153 geneticamente bem caracterizadas como *E. coli* ajudam a aumentar a compreensão da
154 patogênese de doenças infecciosas bacterianas, sabendo-se que, muitas doenças
155 infecciosas são causadas por *E. coli* (Harshey e Matsuyama 1994).

156 Na busca de substâncias para o controle de microrganismos patogênicos, as
157 plantas medicinais têm sido fontes de muitos medicamentos que são aplicados na
158 prática clínica, pois desenvolveram mecanismos de defesa avançados para a sua
159 sobrevivência nos ecossistemas, e, portanto, são fontes ricas de agentes antimicrobianos
160 e outros compostos farmacêuticos. Das 500 mil espécies de plantas encontradas em todo
161 o mundo, apenas 1% foi investigado fitoquimicamente, principalmente com relação à
162 atividade antimicrobiana. O uso de extratos, provenientes de produtos naturais, como
163 agentes antimicrobianos pode ser uma alternativa relevante, tendo em vista que os
164 mesmos apresentam uma baixa possibilidade de proporcionar resistência microbiana,
165 porque são misturas complexas fazendo com que adaptabilidade microbiana seja muito
166 difícil (Lee *et al.* 2013; Tintino *et al.* 2013).

167 De acordo com Faleiro (2011), a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e
168 seus componentes tem sido reconhecida por longo tempo. Óleos essenciais são feitos a
169 partir de uma mistura muito complexa de moléculas voláteis que são produzidos pelo
170 metabolismo secundário de plantas aromáticas e medicinais. O grande número de
171 estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais tem permitido o
172 reconhecimento científico destes compostos no controle de uma vasta gama de agentes
173 microbianos patogênicos.

174 As leveduras são geralmente encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais e
175 outros substratos contendo açúcares, mas também podem ser isoladas do ar, do solo, de

176 águas de lagos, rios e mares; da pele e do intestino de animais, incluindo associações
177 com insetos (Webster e Weber 2007). O Brasil possui uma biodiversidade rica, e pouco
178 é conhecido sobre metabólitos bioativos produzidos por microrganismos associados ao
179 solo (Vaz *et al.* 2009). Cerca de 60% dos medicamentos encontrados no mercado,
180 provém de produtos naturais, destes, 40% são derivados de fontes microbianas.
181 Leveduras estão entre as fontes de antimicrobianos atualmente exploradas (Singh e
182 MacDonald 2010).

183 Sabe-se que a motilidade por *swimming* e *swarming* influenciam positivamente
184 o desenvolvimento de biofilme de *E. coli* (Pratt e Kolter 1998; Beloin *et al.* 2008; Wood
185 2009). Alguns extratos de plantas que apresentam atividade anti-biofilme de EHEC,
186 reduzem a formação do biofilme, porém, sem matar as bactérias, o que indica que
187 podem serem utilizados como fontes de agentes anti-virulência e assim, diminuir a
188 resistência aos medicamentos (Lee *et al.* 2013).

189 Acredita-se que os extratos vegetais e de leveduras e óleos essenciais
190 podem atuar sobre fatores de virulência de patógenos e inibirem a motilidade, o que terá
191 grande importância no curso das doenças infecciosas bacterianas, pois, segundo Lee *et*
192 *al.* (2013), que até o momento, realizou um estudo extenso para identificar agentes
193 anti-biofilme nas plantas e fornecer dados completos sobre vários extratos vegetais, as
194 plantas são um importante recurso para os inibidores de biofilme e possuem
195 mecanismos de ação diversos. Além do mais, as mesmas têm desenvolvido estratégias
196 para inibir vários comportamentos multicelulares bacterianos sem apresentar efeitos
197 bactericidas e bacteriostáticos.

198

199 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

200 **2.1.Cepas bacterianas e condições de cultivo**

201 Foram testadas linhagens bacterianas de *E. coli*, particularmente: K12 MG1655
202 (cepa de referência, não patogênica, sequenciada), ECO 104 (cepa não-patogênica
203 isolada da cama de aves em granjas do RS pelo Dr. Benito Brito), *E. coli* ATCC 25922,
204 RS 218 (cepa de referência NMEC, patogênica, isolada de líquido cefalorraquidiano de
205 recém-nascido com meningite neo-natal), APEC 01 (cepa patogênica, sequenciada,
206 isolada nos EUA, cedida pela Dra. Lisa Nolan). As linhagens foram mantidas em meio
207 de cultura ágar nutriente a 4-8 °C e repicadas bimestralmente (Tintino *et al.* 2013).

208 **2.2.Extratos vegetais, extratos de leveduras e óleos essenciais**

209 No estudo foram utilizados extratos vegetais etanólicos de plantas da floresta
210 Amazônica, armazenados a -20 °C, no laboratório de Farmacognosia do Instituto de
211 Ciências Exatas e Tecnologia (ICET). Os extratos vegetais e o óleo essencial foram
212 cedidos pelos Professores Anderson Cavalcante Guimarães, Geone Maia Corrêa e
213 Renata Takeara – UFAM/ICET.

214 Os extratos vegetais utilizados foram: LSV (*Diploptropis purpurea*), LSA
215 (*Vatairea sericea*), LSP (*Bowdichia virgilioides* Kunth.), LOIT (*Mezilaurus itauba*),
216 BTS (*Tabebuia avellanadae*), LLG (*Nectandra rubra*), BEC (*Bertholletia excelsa*),
217 VAC (*Vitex agnus-castus*), fração fenólica, fração saponínica, EEFJ (extrato etanólico
218 das folhas de *Justícia*). O óleo essencial utilizado foi de azeitoneira roxa.

219 Os extratos de leveduras utilizados (S-1231 e S-1332) foram obtidos no
220 laboratório de Micologia do ICET em projetos anteriores deste grupo de pesquisa.
221 Ambos os extratos foram obtidos de leveduras isoladas do solo bruto de Terra Preta
222 Antropogênica (TPA) na comunidade de Vila Amazônia, próxima a sede do município
223 de Parintins (S 02°29'2.5.41' W 056°29'10.33').

224 **2.3.Ensaio de motilidade**

225 **2.3.1. Ensaio de inibição de migração por *swarming***

226 Em um primeiro experimento, as cepas bacterianas RS 218, K12 MG1655, *E.*
227 *coli* ATCC 25922, APEC 01, ECO 104, foram cultivadas por aproximadamente 24
228 horas em 10 mL de caldo nutritivo suplementado com 1,0% de glicose, 0,5% de
229 peptona, 0,2% de extrato de levedura, sob agitação em agitador orbital (*shaker*) à
230 temperatura ambiente (Priya *et al.* 2013).

231 Utilizando os mesmos componentes do caldo acima, acrescido somente de
232 0,5% de ágar, preparou-se um meio semissólido (ágar de *swarming*). Vinte (20) mL
233 desse meio foram vertidos em placas de Petri, após alcançar a temperatura de
234 aproximadamente 50 °C. Posteriormente, deixou-se as placas abertas em capela de fluxo
235 laminar por 15 minutos, guardou-se as placas em recipientes limpos e fechados em
236 temperatura ambiente. Segundo Rashid *et al.* (2014) este procedimento é necessário
237 para remover gotas de água a partir da superfície do meio de ágar, evitando
238 deslocamento por *swimming*.

239 No dia seguinte inoculou-se 5 µL do cultivo em um disco de papel filtro com
240 aproximadamente 6 mm de diâmetro que estava depositado na superfície do meio
241 semissólido. Incubou-se em estufa à 37 °C e acompanhou-se o crescimento. Esperou-se
242 o cultivo crescer aproximadamente até a metade da placa para que 5 µL dos extratos
243 LSV 200 mg/mL, 10 mg/mL e LSA 10mg/mL fossem impregnados também em discos
244 de 6 mm, que após totalmente secos, foram depositados na superfície do ágar, à
245 aproximadamente 1 cm de distância do crescimento bacteriano. Incubou-se novamente à
246 37 °C a placa e observou-se o crescimento. Como controle utilizou-se etanol 70%

247 (Bottcher e Clardy 2014). Realizou-se o mesmo experimento com os seguintes extratos:
248 LSP 10 mg/mL, BTS 10 mg/mL, LLG 10 mg/mL, BEC 10 mg/mL, LOIT 10 mg/mL.

249 Em experimentos posteriores dissolveu-se 10 mg dos extratos secos do LSA,
250 LSV, VAC, fração fenólica, fração saponínica e EEFJ com 1 mL de dimetilsulfóxido -
251 DMSO (100%), agitando posteriormente em vortéx, obtendo-se extratos de
252 concentração 10 mg/mL. 500 µL desses extratos brutos obtidos foram misturados com
253 ágar acima sem diluição. Os 500 µL restantes foram diluídos com 500 µL de água
254 destilada, obtendo-se um extrato 5mg/mL. O DMSO foi usado como controle nas
255 mesmas concentrações. Para mistura dos extratos no meio de cultura, 10 mL do meio
256 semissólido foram vertidos em placa de Petri e deixou-se solidificar, acima desses 10
257 mL verteu-se mais 5 mL do mesmo meio misturado com 250 µl do extrato preparado,
258 lembrando de controlar a temperatura para que um meio muito quente não fosse vertido.
259 Fez-se o mesmo com o controle. Inoculou-se 10 µL de um cultivo fresco de K12
260 MG1655, *E. coli* ATCC 25922, RS 218 e ECO 104 no centro da placa de Petri,
261 incubou-se a 37 °C e acompanhou-se o crescimento (Priya *et al.* 2013).

262 O óleo essencial de azeitoneira roxa e os extratos de leveduras utilizados (S-
263 1231 e S-1332) foram adicionados ao ágar de *swarming* com temperatura de
264 aproximadamente 50 °C e posteriormente, 20 mL da mistura foram vertidos em placas
265 de Petri, as quais também foram armazenadas em recipientes limpos e fechados em
266 temperatura ambiente. Diferentes concentrações do óleo foram testadas (0,004%, 0,05%
267 e 0,1%). Os extratos de leveduras foram testados nas seguintes concentrações: 10
268 mg/mL e 5 mg/mL. DMSO foi adicionado nas placas controle nas mesmas
269 concentrações. No dia seguinte, inoculou-se 10 µL de cultivo fresco de K12 MG1655,

270 *E. coli* ATCC 25922, RS 218, APEC 01 e ECO 104 no centro da placa de Petri e
271 incubou-se a 37 °C por 24 horas, acompanhando o crescimento (Ahmad 2014).

272 **2.3.2 Ensaio de motilidade por *swimming***

273 Para motilidade por *swimming*, o mesmo meio foi utilizado, mudando somente
274 a concentração de ágar para 0,3%, visto que, o *swimming* é o movimento individual de
275 bactérias em meio líquido (Kearns 2010). Vinte (20) mL do meio em temperatura
276 adequada (50 °C), foram misturados com os extratos vegetais VAC, fração fenólica,
277 fração saponínica e EEFJ e de leveduras (S-1231 e S-1332) em diferentes concentrações
278 (10 mg/mL e 5 mg/mL).

279 Após 24 horas, 10 µL de culturas frescas de K12 MG1655, *E. coli* ATCC
280 25922, RS 218, APEC 01 e ECO 104 foram inoculadas no centro das placas de
281 motilidade. DMSO foi utilizado como controle nas mesmas concentrações. As placas
282 foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e observou-se o crescimento (Wojnicz *et al.*
283 2012).

284 **2.3.3 Análise estatística dos dados**

285 Não foi possível realizar a análise estatística dos dados, pois os ensaios não
286 foram realizados em triplicata devido à dificuldade para obtenção da quantidade
287 suficiente de extratos vegetais, de leveduras e óleos essenciais.

288

289 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

290 **3.1. Ensaio de inibição de migração por *swarming***

291 Dos extratos vegetais testados, o LSA e principalmente o LSV se mostraram
292 promissores como possíveis inibidores de deslocamento por *swarming* de diferentes
293 cepas de *E. coli*.

294 No primeiro experimento, utilizando os discos impregnados dos extratos
295 vegetais etanólicos fluidos de LSV 200mg/mL, 10mg/mL e LSA 10mg/mL, observou-
296 se qualitativamente a formação de halos no respectivo meio contendo as cepas que se
297 desejavam inibir o deslocamento. Os halos formados foram pouco visíveis, sendo um
298 pouco maiores nos meios contendo RS 218 e K12 MG1655 onde o LSV foi utilizado na
299 concentração de 200mg (Figura 1). O LSA 10 mg não induziu a formação de halos nos
300 meios, assim como os extratos LSP 10 mg/mL, BTS 10 mg/mL, LLG 10 mg/mL, BEC
301 10 mg/mL, LOIT 10 mg/mL.

302 A remoção do etanol nos experimentos posteriores evitou que sua atividade
303 antimicrobiana mascarasse as propriedades dos extratos vegetais (Michelin *et al.* 2005),
304 pois, utilizou-se extratos vegetais secos (LSV, LSA, VAC, fração fenólica, fração
305 saponínica e EEFJ) dissolvidos com DMSO 100%, nas concentrações de 10mg/mL e
306 5mg/mL.

307 O LSV 10mg/mL, inibiu o total deslocamento de RS 218 e K12 MG1655 nos
308 meios. Já o LSV 5mg/mL, inibiu todo o deslocamento de ECO 104 e novamente todo o
309 deslocamento de RS 218 (Figura 2). K12 MG1655 e *E. coli* ATCC 25922 no meio
310 contendo essa concentração de extrato deslocaram-se menos que 1 cm (Figura 3). O
311 LSA 10mg/mL inibiu o deslocamento de RS 218, pois esta cepa cresceu menos que 1
312 cm. Já o LSA 5 mg/mL inibiu parcialmente o deslocamento de RS 218, ECO 104, K12
313 MG1655, que cresceram aproximadamente 2 centímetros nessa concentração de extrato
314 (Figura 4).

315 As concentrações utilizadas dos extratos vegetais VAC, fração fenólica, fração
316 saponínica e EEFJ não inibiram o deslocamento por *swarming* das cepas de *E. coli*
317 utilizadas no presente projeto.

318 Nos meios controles, que não possuíam os inibidores (extratos vegetais, de
319 leveduras e óleo essencial), somente DMSO houve crescimento amplo das cepas
320 bacterianas (Figura 2C; 2F; 3C; 4C). Pôde-se observar nestes meios a rápida expansão
321 das bactérias por *swarming*, em tempo menor que 24 horas, visto que o *swarming* é uma
322 estratégia desenvolvida por microrganismos flagelados como a *E. coli* para assegurar a
323 sua rápida expansão no ambiente natural (Senesi *et al.* 2002), permitindo a rápida
324 colonização de um ambiente rico em nutrientes como o meio de cultura oferecido e
325 também de tecidos do hospedeiro (Verstraeten *et al.* 2008).

326 No experimento utilizando óleo essencial de azeitoneira roxa nas
327 concentrações de 0,004%, 0,05% e 0,1% como possível inibidor, houve amplo
328 crescimento das cepas bacterianas K12 MG1655, ECO 104, *E. coli* ATCC 25922, RS
329 218 e APEC 01 em todas as placas, ou seja não ocorreu inibição do deslocamento
330 nessas concentrações. Já no experimento utilizando extratos de leveduras, o extrato S-
331 1231 inibiu o deslocamento por *swarming* de *E. coli* ATCC 25922, pois não houve
332 crescimento em toda a placa desta cepa, a qual cresceu amplamente no meio contendo o
333 extrato S-1332.

334 K12 MG1655, ECO 104, RS 218 e APEC 01 cresceram amplamente em todas
335 placas contendo S-1231 e S-1332.

336 **3.2. Ensaio de motilidade por *swimming***

337 No experimento para avaliar a inibição da motilidade por *swimming* de cepas
338 de *E. coli* utilizando os extratos vegetais VAC, fração fenólica, fração saponínica e
339 EEFJ e de leveduras S-1231 e S-1332, observou-se um amplo e rápido crescimento das
340 cepas bacterianas em tempo menor que 24 horas, tanto nos meios controles, quanto nos
341 meios com os possíveis inibidores, ou seja, não ocorreu inibição da motilidade

342 utilizando os respectivos extratos nas concentrações de 10 mg/mL e 5 mg/mL. Não foi
343 possível realizar este ensaio utilizando óleo essencial, visto que, a quantidade
344 disponibilizada não foi suficiente.

345

346 **4. CONCLUSÃO**

347 Os resultados dos experimentos realizados demonstraram que os extratos
348 vegetais LSV e LSA inibiram a motilidade por *swarming* da maioria das cepas de *E.*
349 *coli* utilizadas. Já o extrato de levedura S-1231 inibiu a motilidade por *swarming* de *E.*
350 *coli* ATCC 25922. Sabe-se que os mecanismos de motilidade podem permitir que
351 espécies patogênicas migrem mais rapidamente e acabem aderindo e dispersando-se a
352 partir dos locais de infecção, por meio do *swarming* bactérias de diversas espécies
353 tornam-se resistentes a uma ampla gama de antibióticos, assim, a motilidade
354 desempenha um papel crucial na fisiologia bacteriana. Os resultados aqui obtidos
355 sugerem que extratos vegetais de plantas, extratos de leveduras, obtidos na Região
356 Amazônica, possam ser fonte de moléculas bioativas anti-motilidade, podendo ser fonte
357 potencial de drogas antimicrobianas ou aditivos de antimicrobianos, uma vez que novos
358 agentes antimicrobianos são claramente necessários, visto que as recentes abordagens
359 para a sua descoberta têm sido infrutíferas.

360

361 **5. AGRADECIMENTOS**

362 Ao Prof. Dr. Maxwel Adriano Abegg ao apoio, confiança e orientação no
363 desenvolvimento deste trabalho. Aos professores Anderson Cavalcante Guimarães,
364 Renata Takeara e Geone Maia Corrêa – UFAM/ICET pelo fornecimento do óleo
365 essencial e extratos vegetais utilizados. Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia

366 (ICET) pela infraestrutura, ambiente proporcionado e a Fundação de Amparo à Pesquisa
367 do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa concedida.

368

369 **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

370

371 Ahmad, A.; Viljoen, A.M.; Chenia, H.Y. 2014. The impact of plant volatiles
372 on bacterial quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology* 60:8-19.

373 Baker, M.D.; Wolanin, P.M.; Stock, J.B. 2006. Signal transduction in bacterial
374 chemotaxis. *Bioessays*, 28: 9–22.

375 Barczak, A.K.; Hung, D.T. 2009. Productive steps toward an antimicrobial
376 targeting virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 12:490-496.

377 Be'er, A.; Strain, S.K.; Hernández, R.A.; Ben-Jacob, E.; Florin, E.-L. 2013.
378 Periodic reversals in *Paenibacillus dendritiformis* swarming. *Journal of Bacteriology*,
379 195:2709- 2717.

380 Be'er, A.; Zhang, H.P.; Florin, E.-L.; Payne, S.M.; Ben-Jacob, E.; Swinney,
381 H.L. 2009. Deadly competition between sibling bacterial colonies. *Proc. Natl. Acad.*
382 *Sci. USA*, 106:428-433.

383 Beloin, C.; Roux, A.; Ghigo, J.M. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top*
384 *Microbiol Immunol.*, 322:249-289.

385 Bottcher, T.; Clardy, J. 2014. A chimeric siderophore halts *swarming* *Vibrio*.
386 *Wiley Oline Library*. 53:3510-3513.

387 Butler, M.T.; Wang, Q.; Harshey, R. M. 2009. Cell density and mobility
388 protect *swarming* bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:3776-81.

389 Copeland, M.F.; Weibel, D.B. 2009. Bacterial *swarming*: a model system for
390 studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*, 5:1174-1187.

391 Faleiro, M.L. 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. In:
392 Méndez-Vilas, A. Science against microbial pathogens: communicating current research
393 and technological advances. IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering,
394 Portugal, p.1143- 1156.

395 Harshey, R.M.; Matsuyama, T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli*
396 and *Salmonella typhimurium*: Surface-induced differentiation into hyperflagellate
397 *swarmer* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8631-8635.

398 Jandhyala, D.M.; Vanguri, V.; Boll, E.J.; Lai, Y.; McCormick, B.A.; Leong,
399 J.M. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 – An emerging pathogen
400 with enhanced virulence. *Infect Dis. Clin. N. Am.*, 27:631-649.

401 Kearns, D.B. 2010. A field guide to bacterial *swarming* motility. *Nature*
402 *Reviews – Microbiology*, 8:634-644.

403 Kim, W.; Surette, M.G. 2004. Metabolic differentiation in actively *swarming*
404 *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 54:702-714.

405 Lee, J.-H.; Cho, H. Seob.; Joo, S. W.; Regmi, S.C.; Kim, J.-A.; Ryu, C.-M.;
406 Ryu, S. Y.; Cho, M.H.; Lee, J. 2013. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit
407 biofilm formation and *swarming* of *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling*, 29:1189-
408 1203.

409 Lee, J.-H.; Regmi, S.C.; Kim, J.-A.; Cho, M.H.; Yun, H.; Lee, C.-S.; Lee, J.
410 2011. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 - Biofilm formation
411 and ameliorates colon inflammation in rats. *Infection and Immunity*, 79:4819-4827.

412 Michelin, D.C.; Moreschi, P.E.; Lima, A.C.; Nascimento, G.G.F.; Paganelli,
413 M.O.; Chaud, M.V. 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.
414 *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15:316-320.

415 Partridge, J.D.; Harshey, R.M. 2013. *Swarming*: Flexible roaming plans.
416 *Journal of Bacteriology*, 195: 909-918.

417 Patrick, J.E.; Kearns, D.B. 2011. *Swarming* motility and the control of master
418 regulators of flagellar biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 83:14-23.

419 Pratt, L. A.; Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm
420 formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.*,
421 30:285-293.

422 Priya, K.; Yin, W.F.; Chan, K.G. 2013. Anti-*quorum sensing* activity of the
423 traditional chinese herb, *Phyllanthus amarus*. *Sensors*, 13:14558-14569.

424 Rashid, M.; Wadud, A.; Chouduri, A.U. 2014. Potent Inhibition of *swarming*
425 growth in Uropathogenic *Proteus* Bacteria by Ethanolic extracts of *Emblica officinalis*
426 fruit and *Tamarindus indica* Bark. *International Research Journal of Biological*
427 *Sciences*, 3:57-64.

428 Roy, M.K.; Banerjee, P.; Sengupta, T.K.; Dattagupta, S. 2010. Glucose
429 induced fractal colony pattern of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Theoretical Biology*,
430 265:389-395.

431 Senesi, S.; Celandroni, F.; Salvetti, S.; Beecher, D.J.; Wong, A.C.L.; Ghelardi,
432 E. 2002. *Swarming* motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY*
433 mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148:1785–1794.

434 Singh, B.K.; MacDonald, C.A. 2010. Drug discovery from uncultivable
435 microorganisms. *Drug Discov. Today*, 15: 792-799.

436 Tillotson, G.S.; Theriault, N. 2013. New and alternative approaches to tackling
437 antibiotic resistance. *F1000Prime Reports*, 5:51.

438 Tintino, S.R.; Cunha, F.A.B. da; Santos, K.K.A. dos; Guedes, G.M. de M.;
439 Souza, C.E.S.; Matias, E.F.F.; Morais-Braga, M.F.B.; Andrade, J.C.; Costa, J.G.M. da;
440 Freitas, M.A.de; Coutinho, H.D.M. 2013. Atividade moduladora de extratos etanólicos
441 e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. *Revista*
442 *Brasileira de Biociências*, 11:157-162.

443 Vaz, A.B.M.; Mota, R.C.; Bomfim, M.R.Q.; Vieira, M.L.A.; Zani, C.L.; Rosa,
444 C.A.; Rosa, L.H. 2009. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with
445 Orchidaceae in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, 55: 1381–1391.

446 Verstraeten, N.; Braeken, K.; Debkumari, B.; Fauvart, M.; Fransaer, J.;
447 Vermant, J.; Michiels, J. Living on a surface: *swarming* and biofilm formation. *Elsevier*,
448 2008. 496p.

449 Webster, J.; Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to fungi*. Third edition.
450 Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2007. 875 p.

451 Wojnicz, D.; Kucharska, A. Z.; Sokol-Letowska, A.; Kicia, M.; Tichaezek-
452 Goska, D. 2012. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and
453 biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urol Res*, 40:683-697.

454 Wood, T.K. 2009. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition
455 from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol.*, 11:1-15.

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

7. FIGURAS

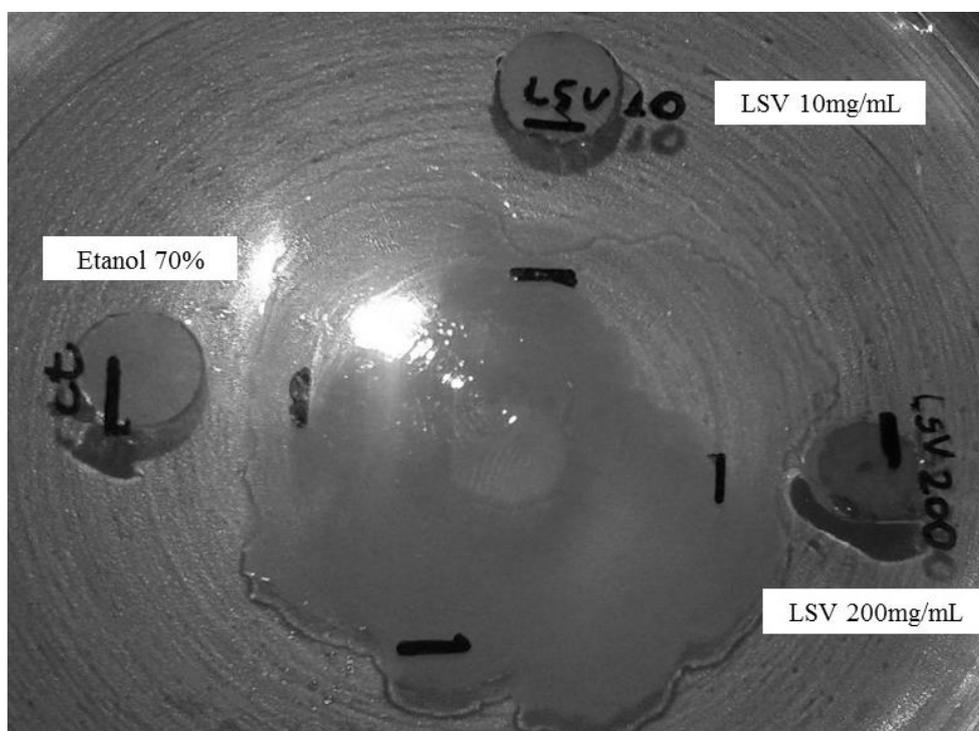


Figura 1. Halos formados no meio contendo a cepa RS 21, utilizando LSV 200mg/mL, LSV 10 mg/mL e etanol 70% como controle.

468

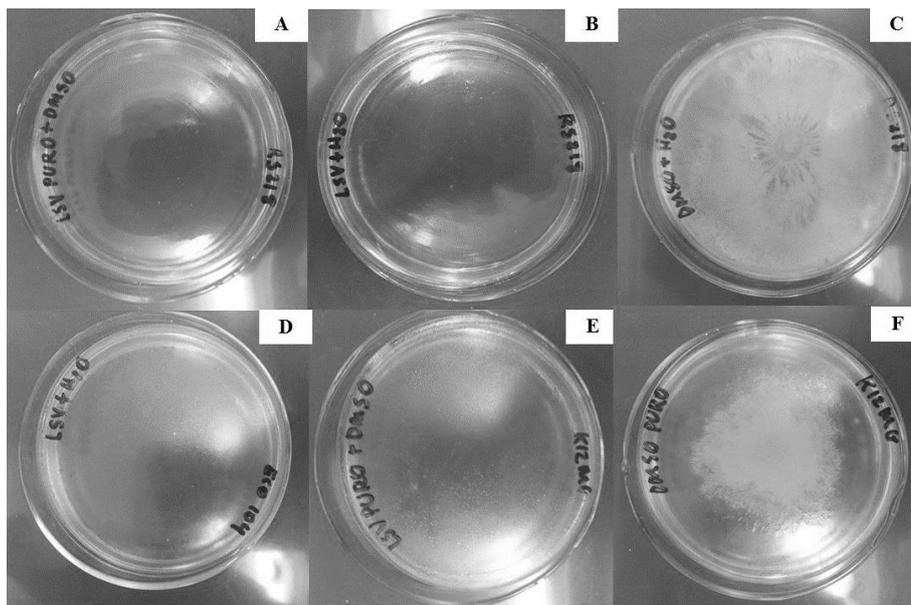


Figura 2. (A) Inibição total do deslocamento por *swarming* de RS 218 com a mistura de LSV (10 mg/mL) ao meio semissólido; (B) Inibição total do deslocamento por *swarming* de RS 218 com a mistura de LSV (5 mg/mL) ao meio semissólido; (C) Placa controle com DMSO 100%, diluído com 500 μ L de água, sem a adição de extratos ao meio, amplo deslocamento por *swarming* de RS 218; (D) Inibição total do deslocamento por *swarming* de ECO 104 com adição de LSV (5 mg/mL) ao meio semissólido; (E) Inibição total do deslocamento por *swarming* de K12 MG1655 com a mistura de LSV (10 mg/mL) ao meio semissólido; (F) Placa controle com DMSO 100%, sem a adição de extratos ao meio, deslocamento por *swarming* de K12 MG1655.

469

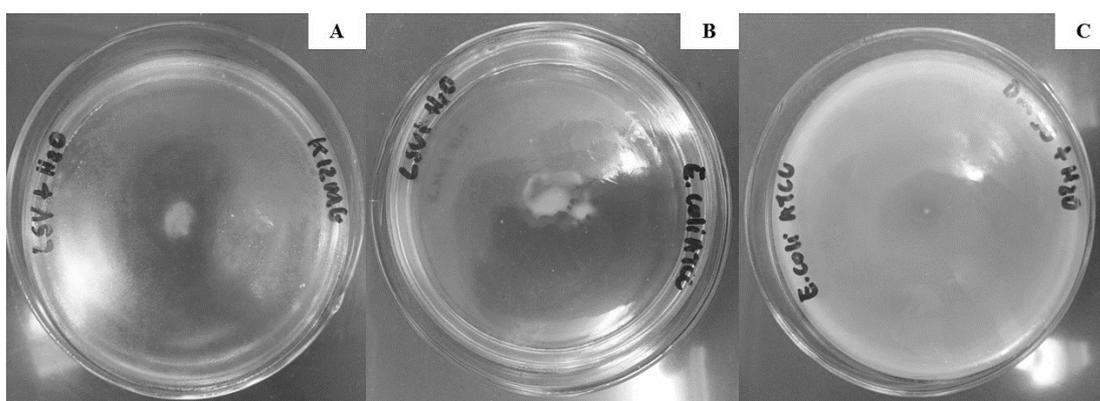


Figura 3. (A) Inibição do deslocamento por *swarming* de K12 MG1655 com a mistura de LSV (5 mg/mL) ao meio semissólido; (B) Inibição do deslocamento por *swarming* de *E. coli* ATCC 25922 com adição LSV (5 mg/mL) ao meio semissólido; (C) Placa controle com DMSO 100%, diluído com

500 μ L de água, sem a adição de extratos ao meio, deslocamento amplo por *swarming* de *E. coli* ATCC 25922.

470

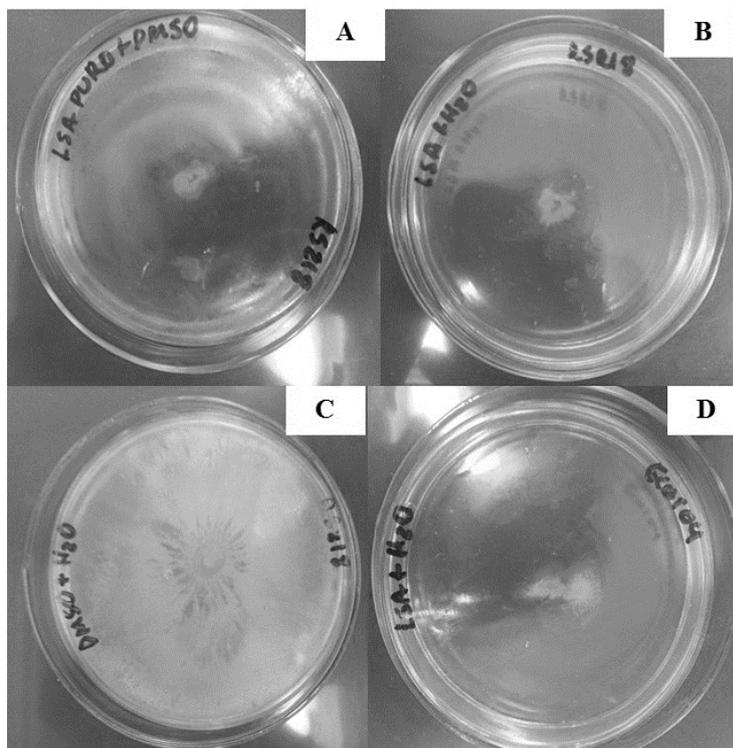


Figura 4. (A) Inibição do deslocamento por *swarming* de RS 218 com a mistura de LSA (10 mg/mL) ao meio semissólido; (B) Inibição do deslocamento por *swarming* de RS 218 com a mistura de LSA (5 mg/mL) ao meio semissólido; (C) Placa controle com DMSO 100%, diluído com 500 μ L de água, sem a adição de extratos ao meio, deslocamento amplo por *swarming* de RS 218; (D) Inibição do deslocamento por *swarming* de ECO 104 com a mistura de LSA (5 mg/mL) ao meio semissólido.

471

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

	Descrição	Ago 201 4	Set	Out	Nov	Dez	Jan 201 5	Fev	Ma r	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Ensaio de inibição de		X	X	X	X	X	X					

	migração por <i>swarming</i>												
3	Ensaio de motilidade por <i>swimming</i>				X	X	X	X	X				
4	Análise estatística dos dados								X	X	X	X	
5	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

472