UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em ciencia dos alimentos

Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o *quorum sensing* bacteriano

Beatriz Ximena Valencia Quecan

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Uelinton Manoel Pinto, Ph.D.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em ciencia dos alimentos

Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o *quorum sensing* bacteriano.

Beatriz Ximena Valencia Quecan

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Uelinton Manoel Pinto, Ph.D.

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

São Paulo

2018

Beatriz Ximena Valencia Quecán

Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o *quorum sensing* bacteriano.

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.

orientador/presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

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

Quecan, Beatriz Ximena Valencia
Q3e Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o quorum sensing bacteriano / Beatriz Ximena Valencia Quecan. --
São Paulo, 2018.
55p.

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

1. Microbiologia de alimentos I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel, orientador.

576.163 CDD

AGRADECIMENTOS

Aveces miro al cielo, sonrio y pienso, "sé que fuiste tu Dios"

Cada uma das páginas deste trabalho é dedicada a Deus, quem me deu a oportunidade de desenvolver esta dissertação de mestrado e que sempre me deu força, cuidou de mim e me apoiou para não desistir, nem me desesperar no caminho.

Sei que faltariam milhares de páginas para poder expressar a felicidade que sinto neste momento, por ter alcançado uma etapa a mais no caminho da vida. Este mestrado chegou como um acaso da vida, mas me deixou cheia de ensinamentos, amigos, experiências e me permitiu ver uma força interior que não sabia que possuía.

Este triunfo também é dedicado a meus pais. Eles que sempre com seu amor têm me guiado pelo bom caminho e que sempre estão me apoiando nos momentos bons e ruins. Sem eles não seria a pessoa que sou hoje. Eles são a razão pela qual luto todos os dias e espero que Deus cuide deles sempre para continuar vivendo bons momentos juntos. Não foi fácil deixar, minha casa e meu país para trás. Sei que embora muitos sacrifícios tenham sido feitos, cada um deles valeu a pena.

Quero agradecer a meu Orientador o professor Uelinton Pinto; ele que com muita paciência e profissionalismo, soube me guiar pelo louco mundo do *Quorum Sensing*. Ele me deu a primeira chance que foi me aceitar como sua orientada e que sempre esteve disposto para me ajudar em cada uma das etapas deste projeto. Hoje, graças a ele, sou uma pessoa um pouco mais independente e autônoma. Ele me ensinou a ter uma boa ética no trabalho, a sempre questionar e ir além e sempre dar o melhor em tudo. Minha vida inteira serei agradecida a ele e espero que a vida nos dê muitas outras oportunidades de continuar trabalhando juntos.

Á professora Neuza e seu estudante Thiago Santos, por me ajudarem no preparo dos extratos e por sempre estarem dispostos a resolver minhas dúvidas.

Às professoras Bernadette e Mariza por me darem a oportunidade de entrar no laboratório.

Também quero agradecer a cada uma das pessoas que conheci durante estes dois anos maravilhosos. Minhas amigas maravilhosas as *flow girls*, a Giovanna, Thamires e Agustin, cada um de vocês me deu uma alegria neste tempo. Todas as viagens, as risadas, os momentos de

apoio quando cada uma tinha saudades dos nossos países, todos os bailes loucos que inventamos, as jornadas de estudo e os ensaios de qualificações. Cada dia de beleza e cada loucura, fizeram desta experiência o máximo. Eu, mais do que amigos, ganhei irmãos, e saibam que sempre vão ter uma porta aberta na minha casa e no meu coração.

Ao pessoal do laboratório, que sempre foi muito atento para me ajudar e me receberam com muito carinho. As amigas que ganhei Anita, Rubia, Milagros minha companheira de batalha no *Quorum Sensing* , Danielinho, Ana Clara, Sarita, Carlos, Andressa, Raquel e todos aqueles que me deram um sorriso durante os dias de trabalho. Á Katia por sua disposição sempre. A minha mãe brasileira Lucia que sempre me aconselhou, me deu muito carinho. Ela quem junto com o seu marido, o senhor Jair, sempre me adotaram como mais uma filha, me deram amor e me receberam muito bem no seu lar. Eles também serão bem-vindos na minha casa, no meu país, na minha vida e em todo lugar.

Quero agradecer a este maravilhoso país, Brasil. Este lugar sempre me abre as portas e me faz sentir em casa. Sou eternamente grata por todas as experiências que vivi aqui. São Paulo a cidade onde todo mundo pode ser quem deseja, cheia de lugares para conhecer e de experiências por viver. O lugar onde conheci o amor, a amizade, o respeito e a tolerância.

Por último e não menos importante a todas as instituições que financiaram meu projeto, CNPq, a universidade de São Paulo, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, FoRC e em geral a todos aqueles que acreditaram que este projeto poderia ser desenvolvido.

Para concluir, quero dizer que este mestrado foi uma das experiências mais gratificantes da minha vida. Sou muito feliz por ter aprendido tanto e por ter colaborado um pouquinho neste amplo mundo da pesquisa, e desejo profundamente continuar construindo conhecimento, continuar servindo a sociedade e o mais importante: tornar-me cada vez mais uma pessoa melhor.

Resumo

VALENCIA QUECAN, B. X. **Efeito de extratos orgânicos de variedades de cebola sobre o *quorum sensing* bacteriano.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Muitos genes bacterianos são regulados pelo mecanismo de comunicação denominado *quorum sensing* (QS). Neste sistema, moléculas sinalizadoras ativam um comportamento de grupo, conforme a densidade celular, permitindo o controle da expressão gênica. Estudos sugerem o potencial de compostos extraídos de plantas sobre o QS, a exemplo da quercetina, um flavonol presente em concentrações elevadas em algumas frutas e hortaliças. Este composto é o flavonoide majoritário presente em cebola (*Allium cepa*), mas não existem estudos que mostrem a atividade anti-QS de extratos orgânicos deste vegetal. Este trabalho avaliou o potencial antimicrobiano e anti-QS de extratos orgânicos de cebola branca e cebola roxa, assim como de alguns de seus componentes majoritários identificados, em fenótipos regulados pelo QS como a produção de violaceína em *Chrormobacterium violaceum* ATCC 12472, a motilidade tipo *swarming* e a formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *Serratia marcescens* MG1. Extratos de cebola branca e roxa foram obtidos por extração em fase sólida utilizando coluna de poliamida e seus compostos identificados e quantificados pelas técnicas de Cromatografia líquida- ionização por elétron spray-espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelas curvas de multiplicação de cada micro-organismo. O efeito dos compostos quercetina aglicona (inibidor do QS já relatado na literatura e encontrado no extrato de cebola roxa) e quercetina-3-*β*-D-glicosideo (um dos compostos majoritários encontrados em ambos extratos) sobre os micro-organismos utilizados neste estudo foi também avaliado. Foram obtidos três extratos: cebola branca em metanol (CB-MeOH), cebola branca em metanol amônia (CB-MeOH/NH4) e cebola roxa em metanol (CR-MeOH). Os compostos quercetina 3,4'-diglicosídeio, quercetina-4-glicosídeo, quercetina-3-*β*-D-glicosideo e quercetina aglicona foram os predominantes nos extratos das duas variedades de cebola. Cianidina-3-*O*-glicosideo também foi identificada no extrato de cebola roxa. A concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos foi igual ou superior a 125 µg/ml (p/v) de extrato seco. Não foi observada inibição significativa da produção de violaceína em *C. violaceum* pelos extratos orgânicos de cebola e nem pela quercetina-3-*β*-D-glicosideo, nas concentrações sub-inibitórias avaliadas. No entanto, a quercetina aglicona inibiu significativamente a produção de violaceína em todas as concentrações. A glicosilação da quercetina pode ter afetado sua atividade sobre a inibição da produção de violaceina, já que estudos mostram menor atividade biológica deste composto quando glicosilado. Para a motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PAO1 houve inibição significativa pelo extrato de cebola roxa, em todas as concentrações estudadas. Os demais extratos não apresentaram inibição contra este micro-organismo. Para *S. marcescens* MG1, foi observada inibição da motilidade *swarming* somente na concentração de 125 µg/ml de CB-MeOH/NH4. As análises de comparação entre os dois tipos de quercetina revelaram que, embora para as duas bactérias testadas os dois compostos apresentaram atividade inibitória sobre a motilidade tipo *swarming*, a quercetina-3-*β*-D-glicosideo foi menos eficiente que a quercetina aglicona na concentração de 125 µg/ml. A formação de biofilmes não foi influenciada pelos extratos e, inesperadamente, não se detectou inibição da formação de biofilmes por ambos tipos de quercetina avaliados. De forma geral, os extratos orgânicos de cebola mostraram pouco efeito

sobre os fenótipos controlados pelo *quorum sensing* e a glicosilação da quercetina provavelmente explica a baixa atividade antimicrobiana e anti-QS dos extratos.

Palavras-chave: *quorum sensing*; atividade antimicrobiana; cebola; *quorum quenching*; quercetina, compostos fenólicos.

Abstract

VALENCIA QUECAN, B. X. **Effect of organic extracts of onion varieties on bacterial quorum sensing.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Many bacterial genes are regulated by a communication mechanism called quorum sensing (QS). In this system, signaling molecules activate a group behavior according to cell density, allowing the control of gene expression. Studies suggest the inhibitory potential of compounds extracted from plants on the QS system, like quercetin, a flavonol present in high concentrations in some fruits and vegetables. This compound is the main flavonoid found in onion (*Allium cepa*); however, there are no studies showing the anti-QS activity of organic extracts of this plant. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and anti-QS potential of organic extracts of white and red onions, and their major components studied in QS-regulated phenotypes such as violacein production in *Chromobacterium violaceum*, swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Serratia marcescens* MG1.White and red onion extracts were obtained by solid phase extraction using a polyamide column and its compounds were identified and quantified by Liquid Chromatography - Electron Spray-Mass Spectrometry and high performance liquid chromatography coupled to diode array detector. O The antimicrobial activity was evaluated by growth curves of each microorganism. The effect of non-glycosylated quercetin (a QS inhibitor already reported in the literature and found in red onion extract) and quercetin-3-*β*-D-glycoside (one of the major compounds found in both extracts) on the microorganisms used in this study was also evaluated. Three extracts were obtained: white onion in methanol (CB-MeOH), white onion in methanol ammonia (CB-MeOH / NH4) and red onion in methanol (CR-MeOH). Our results showed that quercetin 3,4'-diglycoside, quercetin-4-glycoside, quercetin-3-*β*-D-glycoside and non-glycosylated quercetin were predominant in the extracts of the two onion varieties. Cyanidin-3-*O*-glycoside has also been identified in the purple onion extract. The minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts was equal or greater than 125 μg / ml (w / v) of dry extract. There was no significant inhibition of violacein production in *C. violaceum* by organic onion extracts or by quercetin-3-*β*-D-glycoside at the sub-inhibitory concentrations evaluated. However, non-glycosylated quercetin showed a significant inhibition of violacein production in all tested concentrations. The glycosylation of Quercetin could have altered its inhibition activity towards violacein production,

and in fact, some studies have shown less biological activity of some phenolic compounds when they have been glycosylated. For swarming motility in *P. aeruginosa* PAO1 there was significant inhibition by red onion extract, in all studied concentrations. The other extracts did not present inhibition against this microorganism. For *S. marcescens* MG1, inhibition of swarming motility was observed only at the concentration of 125 μg / ml of CB-MeOH / NH4. Comparative analyses between the two types of quercetin showed that, although for the two bacteria tested the two compounds showed inhibitory activity on swarming motility, quercetin-3-*β*-D-glycoside was less efficient than non-glycosylated quercetin in the concentration of 125 μg / ml. Biofilm formation was not influenced by the extracts and unexpectedly, both types of quercetin evaluated did not show inhibition towards biofilm formation. In general, organic onion extracts showed little effect on quorum sensing controlled phenotypes and glycosylation of quercetin probably explains the low antimicrobial and anti-QS activity of the extracts.

KEYWORDS: Quorum sensing, antimicrobial activity, onion, quorum quenching, quercetin, phenolic compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Espectro de massas de flavonoides de cebola branca e cebola roxa obtido por LC-ESI-MS/MS----------**21**

Tabela 2-Quantificação de flavonoides presente no extrato enriquecido em flavonoides de cebola roxa e cebola branca ----------**22**

Tabela 3-Concentração inibitória mínima dos extratos de cebola----------**23**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura geral das N-acyl homoserina lactonas e suas diferentes substituições produzidas por diferentes bactérias Gram-negativas----------**4**

Figura 2- Mecanismo de regulação da bioluminescência em *V. fischeri*----------**5**

Figura 3- Esqueleto básico de um flavonoide ----------**10**

Figura 4- Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 370 nm) de cebola roxa e cebola branca----------**20**

Figura 5-Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 525 nm) de cebola roxa----------**20**

Figura 6-Curvas de multiplicação para *C. violaceum* ATCC 12472 durante 24h de incubação a 30ºC----------**25**

Figura 7-Curvas de multiplicação para *P. aeruginosa* PAO1 durante 24h de incubação a 37ºC----------**27**

Figura 8-Curvas de multiplicação para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30ºC----------**28**

Figura 9-Efeito de diferentes compostos sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472----------**31**

Figura 10-Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1----------**33**

Figura 11-Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* MG1----------**34**

Figura 12-Comparação entre a quercetina aglicona e a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo e seu efeito na motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens* MG1 ----------**36**

Figura 13-Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA01----------**38**

Figura 14-Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S. marcescens* MG1----------**39**

Figura 15-Contagem de células aderidas à superfície (biofilme), obtido após 24h de incubação do micro-organismo *P. aeruginosa* PAO1 na presença dos diferentes tipos de quercetina----------**40**

LISTA DE SIGLAS

AHL- homoserina lactona acilada

AI-1- autoindutor tipo 1

AI-2- autoindutor tipo 2

AIP - peptídeos autoindutores

BHL- N-butanoyl homoserina lactona

CV026- estirpe mutante de *C. violaceum* biosensora de AHL

DMSO- dimetilsulfóxido

LB- caldo ou ágar Luria Bertani

LuxI- enzima produtora do AI-1

LuxR- Proteína receptora, ativador transcricional

OdDHL- oxo-dodecanoilhomoserina lactona

OHHL - N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-AHL)

PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona)

QS- *Quorum sensing*

UFC/biofilme- unidades formadoras de colônia por biofilme

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO 2

2.1 Objetivos específicos 2

3 REVISÃO DA LITERATURA 3

3.1 *Quorum sensing* 3

3.2 Inibição do *Quorum sensing* 7

3.2.1 Compostos fenólicos e sua importância como inibidores do sistema QS 9

3.3 A cebola *(Allium cepa)* e seus compostos fenólicos 12

4 MATERIAL E MÉTODOS 13

4.1 Estirpes bacterianas 13

4.2 Preparo do material vegetal 13

4.3 Extração e caracterização de compostos fenólicos 13

4.3.1 Extração de fase sólida 13

4.3.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (LC-ESI-MS/MS) 14

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) 15

4.4 Atividade antimicrobiana dos extratos 15

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) 15

4.5 Determinação *in vitro* da atividade anti-QS dos extratos de cebola 16

4.5.1 Teste Quantitativo da Inibição do QS em *C. violaceum* ATCC 12472 16

4.5.2 Efeito dos extratos de cebola sobre a motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens MG1* 16

4.5.3 Efeito dos extratos sobre a formação de biofilmes em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens MG1* 17

4.6 Analise estatística 18

5 RESULTADOS 18

5.1 Caracterização dos compostos fenólicos presentes nas amostras de cebolas 18

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e das curvas de crescimento microbiano na presença dos extratos 22

5.3 Resultados da determinação da atividade anti-QS dos extratos de cebola 29

5.3.1 Efeito sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 29

5.3.2 Efeito dos extratos sobre a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PA01 e *S. marcescens MG1* 32

5.3.3 Efeito dos extratos sobre a formação de biofilmes 36

6 CONCLUSÕES 42

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

8 APENDICES 58

1. INTRODUÇÃO

Até a década de 1990, acreditava-se que as bactérias apresentavam comportamento individual e de pouca complexidade e seriam incapazes de utilizar estratégias de comportamento em grupo. No entanto, este conceito mudou, uma vez que hoje se sabe que as bactérias também têm a capacidade de se comunicar umas com as outras, formar comunidades e apresentar um comportamento social complexo e sofisticado. Muitas bactérias utilizam sinais químicos para se comunicar e controlar suas atividades de uma forma dependente da densidade celular por um sistema conhecido como *quorum sensing* (QS) (Fuqua et al., 1994; Parsek e Greenberg, 2000; Papenfort e Bassler, 2016).

Processos como a expressão de fatores de virulência, transferência de plasmídeos conjugativos, formação de biofilmes, entre outros, são modulados pelo QS (Smith et al., 2004; Hawver et al., 2016; Papenfort e Bassler , 2016). Na área de microbiologia de alimentos o QS pode estar envolvido, direta ou indiretamente, na deterioração dos alimentos, devido a sua associação com a produção de enzimas proteolíticas, lipolíticas, quitinolíticas e pectinolíticas (Bai e Raí, 2011). Tais constatações aumentaram o interesse de pesquisadores pela busca de alternativas que interrompam o sistema, diminuindo os processos de deterioração e interferindo na virulência de patógenos (Ammor et al., 2008; Skandamis e Nychas, 2012).

O potencial apresentado pelas plantas é de grande relevância no controle da comunicação bacteriana. Extratos preparados de fontes alimentícias como alho, cenoura, camomila, broto de feijão, baunilha, soja, rabanete, entre outros, foram associados à produção de compostos com capacidade de interferir no sistema QS (Rasmussen et al., 2005; Szabo et al., 2010; Kalia, 2013). Dentre os estudos que buscam encontrar compostos com atividade inibitória sobre o QS, flavonoides como a quercetina têm sido testados. A quercetina é um flavonol que está geralmente presente em concentrações elevadas em algumas frutas e hortaliças, particularmente em cebola, sendo um dos flavonoides mais abundantes e comuns na dieta humana (Behling et al., 2008). A cebola é uma das hortaliças condimentares mais usadas no mundo como resultado de seu sabor e aroma, sendo usada como base para a fabricação de muitos produtos alimentícios processados.

Além disso, esta planta é conhecida pela ação terapêutica atribuída à presença de compostos orgânicos sulfurados, abundantes nos tecidos desse vegetal (Stajner e Varga, 2003).

As folhas de cebola também contêm altos níveis de quercetina, a qual está associada a efeitos protetores na redução do risco de doenças cardiovasculares, como agente quimio-preventivo e antioxidante (Queiroz et al., 2009). A quercetina pode ser encontrada na parte comestível de vegetais do gênero *Allium*, incluindo alho-poró, cebolinha (*Allium fitulosum)* e alho em concentrçoes de aproximadamente 0,03 a 1g/kg. A concentração de quercetina pode variar dependendo da cor do bulbo e o tipo de cultivo, dentre outros aspectos. Porém, as cebolas coloridas vermelhas (*Allium cepa var. cepa)* e amarelas (*Allium cepa var. agregatum)* têm níveis mais elevados deste composto (Feng e Liu, 2011). Este trabalho visa avaliar o potencial *anti-QS* e antimicrobiano de variedades de cebola encontradas no comércio local. Os resultados obtidos forneceram novas informações relativas ao potencial inibitório sobre o mecanismo de comunicação em bactérias.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito dos extratos orgânicos de cebola roxa e cebola branca e seus constituintes majoritários sobre o sistema *QS*.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar os compostos fenólicos majoritários presentes nos extratos;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de cebola roxa e branca;
- Determinar a atividade anti-*quorum sensing* dos extratos, por meio de ensaios fenotípicos em bactérias modelo do sistema QS.

3 REVISÃO DA LITERATURA

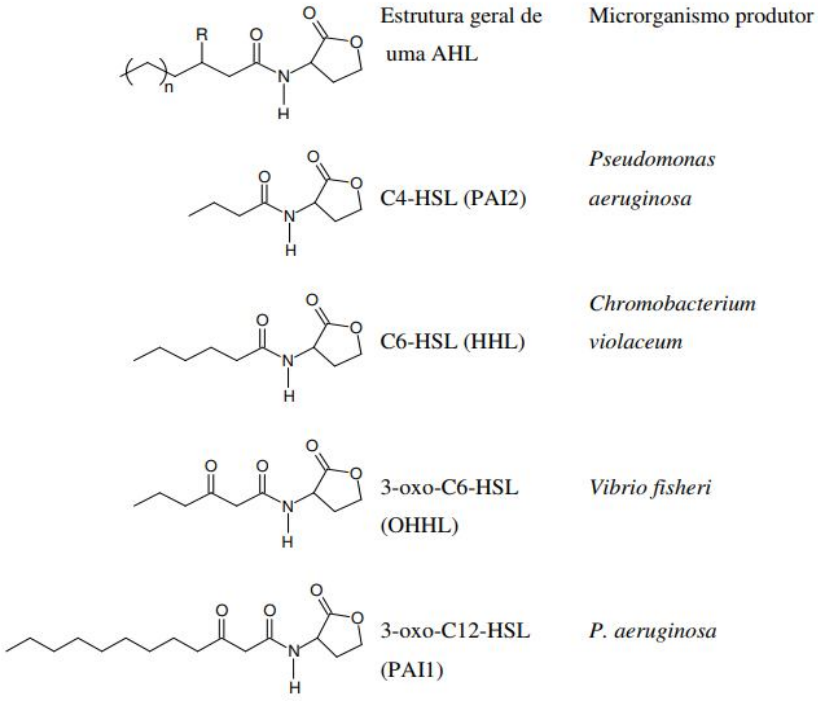
3.1 *Quorum sensing*

O *quorum sensing* (QS) é um processo de comunicação bacteriana que envolve a produção e detecção de moléculas de sinalização conhecidas como autoindutores, que também costumam ser referidos como feromônios bacterianos (Lazdunski et al., 2004). Essas moléculas se acumulam no meio em função da densidade populacional (Fuqua et al., 1994; Whitehead et al., 2001; Waters e Bassler 2005; Pinto et al., 2012). O tipo de molécula sinalizadora varia de acordo com o micro-organismo e os sistemas de comunicação empregados também podem ser distintos. Em bactérias Gram-negativas, a sinalização normalmente é mediada por moléculas de homoserina lactona aciladas ou AHLs também conhecidas como autoindutores-1 (AI-1). Outra molécula sinalizadora denominada de autoindutor-2 (AI-2) é conhecida por estar associada com o QS nos dois grupos bacterianos e funciona para comunicação intra e interespecífica (Miller e Bassler, 2001; Fuqua e Greenberg, 2002). A sinalização mediada por peptídeos de baixo peso molecular, conhecidos como peptídeos autoindutores – AIP (autoinducer peptides) também é dada em micro-organismos Gram-positivos. Também se conhece a existência de outras moléculas como quinolonas, dicetopiperazinas, indol hidroxicetonas, que podem atuar tanto em micro-organismos Gram positivos como Gram negativos (Waters e Bassler 2005; Platt e Fuqua 2010; Tsai e Winans 2010; Papenfort e Bassler, 2016), e moléculas como gama butyro-lactonas que podem atuar em actino-bactérias (Bai e Rai 2011; Roy, Adams e Bentley, 2011; Skandamis e Nychas 2012).

Um grande número de bactérias Gram-negativas usa as AHLs como moléculas sinalizadoras, que são compostas por uma cadeia de ácido graxo ligado a um anel lactona, por meio de uma ligação amida. A variação que existe entre as diferentes moléculas de AHL ocorre tanto pelo tamanho quanto pela composição dos ácidos graxos que variam de 4 a 18 carbonos e apresentam substituições na cadeia (Figura 1) (Whitehead et al., 2001; Lazdunski et al., 2004; La Sarre e Federle, 2013). Na década de 1970, o sistema QS (que ainda não havia recebido este nome) mediado por AHLs foi descoberto e descrito em duas espécies de bactérias marinhas bioluminescentes: *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi* (Nealson e Hastings 1979) (Figura 2). Nas

duas espécies, as enzimas responsáveis pela produção de luz são codificadas pelo operon estrutural *luxICDABEG*, e a emissão só ocorre a uma alta densidade celular, em resposta ao acúmulo dos autoindutores no meio (Miller e Bassler, 2001).

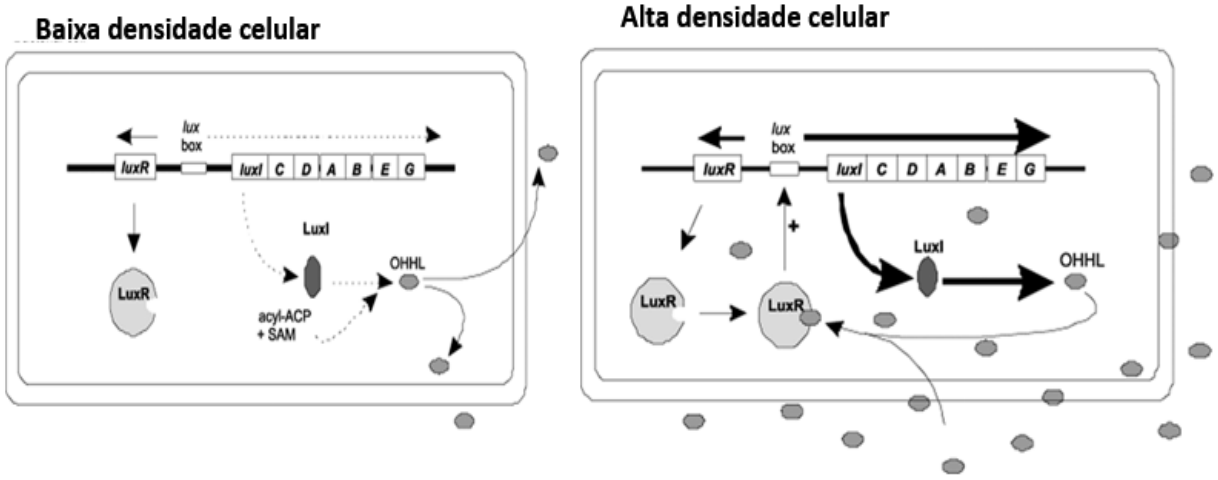
Figura 1- Estrutura geral das N-acyl homoserina lactonas e suas diferentes substituições de R: =O, - OH ou H produzidas por diferentes bactérias Gram-negativas. Fonte: (Pinto, 2005). "n" normalmente varia de 0 a 14 carbonos.



No caso da bactéria *Vibrio fischeri* (**Figura 2**) a comunicação é mediada pelo sinalizador N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (OHHL) que é produzido pela proteína sintase LuxI (Eberhard et al., 1981). Esta bactéria vive em associação simbiótica com uma diversidade de hospedeiros eucariontes, como por exemplo a lula *Euprymna scolopes* (Miller e Bassler, 2001). Neste caso, as moléculas de OHHL se difundem pela membrana celular bacteriana e se acumulam no órgão luminoso da lula. Quando a concentração atinge um limiar, o que coincide com alta densidade celular, a molécula sinalizadora é capaz de retornar à célula, se ligando à proteína receptora LuxR que, por sua vez, forma um dímero e ativa a transcrição dos genes responsáveis pela bioluminescência. Essa associação permite que a lula se camufle dos

predadores, já que a luz evita projetar uma sombra embaixo dela nas noites claras, quando a luz da lua e das estrelas penetra a água (Miller e Bassler, 2001; Fuqua e Greenberb, 2002).

Figura 2- Mecanismo de regulação da bioluminescência em *V. fischeri*. a) Em densidade celular baixa a transcrição dos genes para a bioluminescência (*luxICDABEG*) é insuficiente para a emissão de luz, como resultado do baixo nível do sinalizador OHHL. b) Ao atingir uma alta densidade celular, correspondente a uma concentração crítica de OHHL, a proteína LuxR é ativada e dirige a transcrição de *luxICDABEG*, permitindo a emissão de luz. Fonte: Whitehead et al. 2001.



Sistemas homólogos a LuxR/LuxI são encontrados em várias bactérias e promovem a regulação de diversos fenótipos, coordenando um comportamento de grupo que controla a expressão de fatores de virulência, enzimas extracelulares, formação de biofilmes, conjugação, produção de metabólitos secundários, simbiose, esporulação, síntese de antibióticos, evasão das defesas do hospedeiro, tolerância a estresse, motilidade, entre outros (Whitehead et al. 2001; Smith et al. 2004; Waters e Bassler 2005; Pinto et al., 2007; Skandamis e Nychas 2012; Bhardwaj et al., 2013). Muitos desses fenótipos têm grande influência na deterioração de alimentos tornando o produto indesejável ou inaceitável para o consumo. Conhece-se que a expressão de várias enzimas extracelulares microbianas como algumas proteolíticas, pectinolíticas, lipolíticas, entre outras, é modulada pelo sistema QS (Ammor et al., 2008). Por este motivo, pesquisadores têm buscado estratégias que possam interromper ou controlar esta comunicação célula-célula, usando compostos inibidores para interferir ou bloquear o sistema e assim melhorar a qualidade e segurança dos alimentos (Bai e Rai, 2011; Skandamis e Nychas, 2012).

Além de *V. fisheri* e *V. harveyi* existem outros micro-organismos modelo bastante estudados como, por exemplo: *Chromobacterium violaceum, Pseudomonas aeruginosa, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora* e *Serratia liquefaciens*. Estes micro-organismos são de grande interesse para o estudo do sistema QS já que possuem caraterísticas que são reguladas especificamente pelo sistema. Por exemplo, *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que infecta indivíduos imunocomprometidos e é conhecido por ser um dos micro-organismos com maior resistência a agentes antimicrobianos incluindo antibióticos, solventes orgânicos e detergentes (De Kievit e Iglewski, 2000). Esta bactéria representa um dos modelos para o estudo do QS mais importantes, já que utiliza o sistema para a regulação de diferentes fatores de virulência, os quais tem uma ampla importância na patogenicidade deste micro-organismo (De Kievit e Iglewski, 2000). *P. aeruginosa* possui pelo menos três sistemas QS: (a) LasI/LasR o qual sintetiza a molécula N-3-oxo-dodecanoyl homoserina lactona (OdDHL) que se liga ao ativador transcricional LasR, (b) RhII/RhIR que sisntetiza a N-butanoyl homoserina lactona (BHL) que se liga ao receptor RhIR (c) e o sistema PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolona) reconhecido pelo receptor PqsR. Estes sistemas de QS regulam a síntese de diferentes fatores de virulência, como a produção de piocyanina, ramnolipidos, elastases e a formação de biofilmes (De Kievit e Iglewski, 2000; Tashiro et al., 2013; O'Connor et al., 2012; Lee e Zhang, 2015; Rai e Venkatesh, 2015).

Outro micro-organismo bastante estudado é *C. violaceum*, uma bactéria Gram-negativa com uma ampla distribuição geográfica, que se desenvolve facilmente em solo e água. Possui um sistema QS tipo CviI/CviR (homólogos de LuxI/LuxR) usado para regular a produção de um pigmento púrpura insolúvel em água conhecido como violaceína, o qual é regulado por genes *vioD, vioC, vioB* e *vioA* através de um sistema QS mediado por AHL (Morohoshi et al., 2008). Além da estirpe selvagem, pesquisadores desenvolveram uma estirpe mutante incapaz de produzir AHL, a estirpe CV026, por meio de mutagênese via mini-T5 no gene *cviI*. Assim, para a produção de violaceína, existe a necessidade de adição exógena de AHL, permitindo que este mutante atue como uma ferramenta efetiva na detecção de moléculas sinalizadoras de *quorum* e na procura de inibidores do QS (Mcclean et al.,1997; Kalia, 2015).

Serratia marcescens é um patógeno emergente predominantemente envolvido em infecções do trato urinário, nosocomiais e infecções oculares. Além de causar infecções em

mamíferos, *S. marcescens* também é comumente encontrada em solos e pode se aderir com facilidade a tecidos vegetais (Labbate et al., 2007; Salini & Pandian, 2015). Esta espécie, conhecida por secretar uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas, apresenta motilidade do tipo *swimming* e *swarming*; esta última regulada por AHL através do controle dos genes flagelares *flhD-flhC* (Eberl, Molin, e Givskov, 1999b). Além disso, também se conhece sua capacidade como formadora de biofilme dependendo de um sistema QS funcional, o qual se acredita que tenha consequências importantes para a interação entre bactérias (Eberl, Molin, e Givskov, 1999; Labbate et al., 2007; Rasmussen et al., 2018).

3.2 Inibição do *Quorum sensing*

Com o surgimento de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos, as opções para o tratamento de infecções estão mais limitadas, justificando pesquisas por alternativas de inibição da multiplicação bacteriana e sua patogenicidade. Mecanismos como o *quorum quenching* (QQ), ou inibição do *quorum sensing*, estão sendo pesquisados como opção para substituir ou complementar o uso dos antibióticos tradicionais e para o controle de doenças (Kalia, 2013). Nestes casos, o objetivo não é matar o micro-organismo ou limitar a sua multiplicação, mas sim, evitar a expressão dos genes de virulência do patógeno **(**Clatworthy et al., 2007).

Existem várias maneiras de interferir com o QS como, por exemplo: inibir ou reduzir a síntese do autoindutor (inibindo os homólogos de LuxI); inativar o autoindutor com o uso de enzimas que o degradam como as lactonases e as acilases; utilizar moléculas com efeito antagônico aos autoindutores; e sequestrar o autoindutor com o uso de anticorpos (Clatworthy et al., 2007; Rasko e Sperandio 2010; LaSarre e Federle 2013; Kalia 2013; Hirakawa e Tomita 2013; Allen et al., 2014).

O uso de moléculas com efeito antagônico aos autoindutores é um mecanismo promissor. Acredita-se que estas moléculas sejam capazes de se ligar à proteína receptora do QS (homólogo de LuxR), e impedir a ativação do sistema. As furanonas halogenadas, produzidas pela alga *Dalisea pulchra*, foram umas das primeiras substâncias testadas que apresentaram esta atividade (Manefield et al., 2002). Vários trabalhos mostraram a interferência das furanonas com o sistema QS em bactérias, inclusive influenciando a formação de biofilmes e a expressão de fatores de

virulência (Givskov et al., 1996; Manefield et al., 1999; Rice et al., 1999; Manefield et al., 2002; Ren et al., 2002; Viana et al., 2009). No entanto, deve-se mencionar que as furanonas halogenadas são quimicamente reativas e não estáveis e podem ser muito tóxicas para serem usadas no tratamento de infecções bacterianas em seres humanos ou letais para alguns animais (Hentzer e Givskov, 2003; Rasch et al., 2004).

É por isso que autores como Rasmussen e colaboradores avaliaram diferentes alternativas de inibição do QS. Assim, o grupo avaliou o potencial de inibição do sistema QS por 53 compostos, divididos entre extratos de plantas ou ervas e compostos químicos sintéticos (Rasmussen et al., 2005). Dentre as substâncias avaliadas, a molécula 4-Nitro-piridina-N-oxido, e o extrato bruto de alho, mostraram especificidade contra genes de virulência regulados pelo QS em *P. aeruginosa*. Desde então, outros estudos revelaram que extratos preparados de plantas (inclusive algumas utilizadas na alimentação humana) mostraram efeito inibitório sobre o QS (Vikram et al., 2010; Jakobsen et al., 2012; Romero et al., 2012; Kalia 2013; Tolmacheva et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Rodrigues et al., 2016). Porém, a maioria dos estudos não avaliou o mecanismo de ação dos compostos e faltam dados sobre a especificidade de inibição do sistema QS (Quecán et al. 2018).

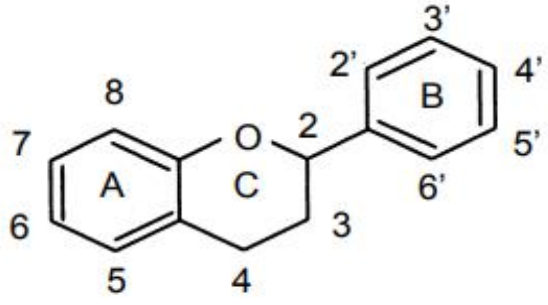
Defoirdt e colaboradores (2013) afirmaram que é essencial ter os controles adequados para confirmar se os compostos testados realmente são inibidores específicos do sistema QS. Muitos dos estudos sobre inibidores, tanto de fontes naturais como sintéticas, são baseados na inibição de fenótipos regulados pelo QS em cepas biosenssoras. Porém, é importante averiguar se o composto testado também apresenta efeito sobre o fenótipo repórter de forma independente do QS (Defoirdt et al., 2013). Os autores também demostram a importância de considerar a toxicidade dos compostos avaliados, já que embora existam estudos de inibição de QS que utilizam concentrações sub-inibitorias, estas podem apresentar efeitos não percebidos sobre a multiplicação dos micro-organismos e potencialmente levar a falsos inibidores (Defoirdt et al., 2013).

3.2.1 Compostos fenólicos e sua importância como inibidores do sistema QS

Os compostos fenólicos constituem um grupo diverso de substâncias químicas, consideradas metabólitos secundários de plantas, com diferentes estruturas químicas e atividades, os quais são importantes para a reprodução e crescimento das plantas, além de atuarem como protetores frente ao ataque de patógenos (Martinez-Flores et al., 2002). Também estão relacionados com a qualidade sensorial dos alimentos, pigmentação dos vegetais, adstringência de algumas frutas, entre outros (Rice, Miller e Paganga, 1997; Martínez-Flórez et al., 2002; Balasundram, Sundram e Samman, 2006). Os compostos fenólicos podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de anéis de fenol e do tipo de elementos que ligam esses anéis uns aos outros. As principais classes de compostos fenólicos são: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (Rodriguez, 2016).

Os flavonoides são uma classe importante de produtos naturais sendo metabólitos secundários de plantas com estrutura polifenólica, amplamente encontrada em frutas, vegetais e certas bebidas (Panche et al., 2016). Sua característica estrutural básica é o composto 2-fenil-benzo-α-pirano que consiste em dois anéis de benzeno (A e B) ligados através de um anel de pirano heterocíclico (C) (**Figura 3)** (Cushnie e Lamb, 2005). Estes podem ser subdivididos em diferentes subgrupos dependendo do carbono do anel C em que o anel B está ligado. Os flavonoides com o anel B ligado na posição 3 do anel C são chamados de isoflavonas. Aqueles em que o anel B está ligado na posição 4 são chamados de neoflavoides, enquanto aqueles em que o anel B está ligado na posição 2 podem subdividir-se em vários subgrupos com base nas características estruturais do anel C. Estes subgrupos são: flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas, antocianinas e chalconas (Arabbi et al., 2004; Panche et al., 2016) . Os flavonoides são cada vez mais pesquisados em virtude de suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, antioxidante, antitumoral citotóxica, entre outras (Cushnie e Lamb 2005; 2011; Silveira, 2012; Rodriguez, 2016).

Figura 3- Estrutura básica de um flavonoide com seus respectivos carbonos enumerados. Fonte: (Martínez-Flórez et al., 2002).



Além de todas as propriedades anteriormente mencionadas, os flavonoides também ganharam importância como inibidores potenciais do sistema QS. Um estudo de Vandeputte e colaboradores (2010) demostrou que o flavonoide catequina, encontrado no extrato de *Combretum albiflorum*, teve um efeito inibitório significativo sobre a produção de piocianina, elastase e a formação de biofilmes, bem como sobre a expressão dos genes moduladores do QS *lasI, lasR, rhlI,* e *rhlR* em *P. aeruginosa* PAO1 (Vandeputte et al., 2010).

Os mesmos pesquisadores também avaliaram diferentes flavonoides como luteolina, taxifolina, kaempferol, quercetina, naringenina, naringina, eriodictyol, entre outros, para determinar sua capacidade de interferência no sistema QS de *P. aeruginosa* PAO1 e C. *violaceum* CV026. O estudo demostrou que a naringenina reduziu drasticamente a produção das acyl-homoserina lactonas 3-oxo-C12-HSL e C4-HSL, e que os outros flavonoides como eriodictyol e taxifolina reduziram significativamente a produção de pyocyanina e elastase em *P. aeruginosa*, sem afetar o crescimento (Vandeputte et al., 2011).

O estudo de Paczkowski e colaboradores (2017) também demostrou que flavonoides como apigenina, baicaleína, quercetina, 7,8-dihidroxiflavona, 3,5,7-trihidroxiflavona e pinocembrina inibem a sinalização por QS por meio do antagonismo dos receptores de ligação LasR e RhlR ao autoindutor. As análises bioquímicas revelaram que os flavonoides funcionam de forma não competitiva para prevenir a ligação de LasR/RhlR ao DNA. A administração dos flavonoides a *P. aeruginosa* alterou a transcrição de promotores alvos controlados pelo QS e inibiu a produção de fatores de virulência (Paczkowski et al., 2017).

Entre os flavonoides, existe o grupo dos flavonóis que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, sendo os flavonoides com maior representatividade nos alimentos. Seu composto mais comum é a quercetina, um antioxidante geralmente encontrado em altas concentrações em alimentos como cebola (284-486 mg/ kg), couve (100 mg/ kg), vagem (32-45 mg/ kg), brócolis (30 mg/ kg), repolho (14 mg/ kg) e tomate (8mg/ kg) (Behling et al., 2008). Em um estudo realizado por Gopu e colaboradores (2015), foi testada a atividade inibitória de

quercetina sobre o QS usando a estirpe biosensora *C. violaceum* CV026 e a propriedade anti-biofilme contra patógenos de origem alimentar como *Bacillus spp., Pseudomonas spp., Salmonella spp., Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica.* Nas análises, a quercetina inibiu a produção de violaceína em todas as concentrações testadas e adicionalmente o composto permitiu uma redução significativa dos fenótipos regulados pelo QS, como a formação de biofilmes, produção de exopolissacarídeos, motilidade e produção de alginato.

Outro estudo mostrou o efeito da quercetina na formação de biofilmes e na produção de fatores de virulência de *P. aeruginosa* PAO1(Ouyang et al., 2016). Os autores observaram que, embora a quercetina não tenha um impacto no crescimento de PAO1, nas concentrações avaliadas, este composto inibiu significativamente a formação de biofilmes e a produção de fatores de virulência como a produção de piocianina, proteases e elastases. Também foi observado que a expressão dos genes *lasI, lasR, rhII* e *rhIR* foi significativamente reduzida em resposta a presença da quercetina (Ouyang et al., 2016).

3.3 A cebola *(Allium cepa)* e seus compostos fenólicos

Cebola é o nome popular da planta cujo nome científico é *Allium cepa* Lineu, que pertence à família das Liliaceas e a subfamília das Alioideas. Trata-se de um dos vegetais cultivados mais produzidos no mundo. Ela é utilizada tanto fresca como processada como ingrediente em muitos pratos (Cabrera e Salazar 2004). Seus bulbos são a principal parte comestível, com um sabor forte distintivo e odor pungente e são classificados com base na sua cor em amarelos, roxos e brancos e com base no seu sabor como doce e não doce (Kwak et al., 2017).

Sabe-se que este vegetal possui diferentes propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagênica, antiasmática, imunomoduladora e prebiótica (Fukushima et al., 1997; Stajner e Varga , 2003; Corzo-Martínez et al., 2007). Alguns estudos também demostram que este produto é eficaz na prevenção de doenças cardiovasculares, por causa de seus efeitos hipocolesterolêmicos, hipolipidêmicos, anti-hipertensivos, antidiabéticos, antitrombóticos e anti-hiperhomocisteinêmicos (Corzo-Martínez et al., 2007).

Este produto também possui um alto conteúdo de vitaminas B1 (tiamina) e B2 (riboflavina), potássio, enxofre, fósforo, magnésio, entre outros minerais (Mujica, 2012) e representa uma das maiores fontes de fito nutrientes como flavonoides, fructo-oligosacarideos, tiosulfatos e outros compostos sulfurados (Slimestad, Fossen e Vågen, 2007). Dois subgrupos de compostos do tipo flavonoide, os quais fazem parte do diverso grupo dos compostos fenólicos, predominam em cebolas: quercetinas e as antocianinas (Costa e Resende, 2007).

Portanto, os principais flavonoides encontrados em cebolas são quercetina, quercetina-4'-glicosídeo, quercetina-3,4'-diglicosídeo, quercetina-7,4-diglicosídeo, isorhamnetina, quercetina-3-glicosídeo e quercetina-5-glicosídeo (Lombard et al., 2005). Também foram identificadas antocianinas do tipo cianidina em cultivares de cebola roxa que conferem a coloração avermelhada ou roxa aos bulbos. As quantidades de quercetina nas cebolas variam de acordo com a cor e o tipo de bulbo, sendo distribuídos principalmente nas peles e anéis exteriores (Arabbi, Genovese, e Lajolo, 2004; Lombard et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Kwak et al., 2017). Devido à ampla variedade de compostos encontrados e as propriedades biológicas deste vegetal, é de grande importância seu estudo como possível inibidor do sistema QS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estirpes bacterianas

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (30 °C/24 h), *Serratia marcescens* MG1 (anteriormente conhecida como *Serratia liquefaciens*) (Labbate et al., 2007) (30°C/24h), e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (37°C /24 h) cultivadas em caldo ou ágar Luria Bertani-LB contendo peptona 1%, extrato de levedura 0.5%, cloreto de sódio 0.5% e ágar 1.2%.

4.2 Preparo do material vegetal

Amostras de 5 kg de cebola branca e roxa foram adquiridas no entreposto do CEAGESP-São Paulo. As amostras foram selecionadas, picadas e congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ºC, até o uso. Posteriormente, as amostras foram trituradas em almofariz de porcelana e guardadas à temperatura de -80 °C até análise.

4.3 Extração e caracterização de compostos fenólicos de cebola

Os extratos foram preparados no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Amostras de 20 g de cebola foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 ml de metanol 70%, ou metanol 70% acidificado com ácido acético 5% para a cebola roxa. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de Buchner, utilizando papel de filtro qualitativo de 80 g/m². O resíduo foi recuperado e o procedimento foi repetido mais duas vezes com 50 ml de metanol 70%. Os extratos obtidos foram agrupados e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor 120, Büchi, Flawil, Suíça) a uma temperatura de 40 °C, até a remoção do metanol para a etapa de separação em fase sólida, conforme Arabbi et al., (2004). As extrações foram feitas em duplicata.

4.3.1 Extração de fase sólida

As amostras livres de metanol foram aplicadas em uma coluna de 10 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany), preparada em seringa própria de 60 ml (HPLC Technology) e

pré-condicionada pela passagem de 100 ml de metanol e 100 ml de água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com 100 ml de água e a eluição dos flavonoides foi feita com 150 ml de metanol o qual gerou os primeiros extratos metanolicos de cebola branca e roxa, e 150 ml de metanol:amônio (95, 5:0,5 v/v) que originou o extrato amônico de cebola branca e que permitiu retirar qualquer composto que ainda estivesse aderido à coluna. Para a eluição dos flavonoides da cebola roxa foi utilizado 0,3% HCl em metanol. Os eluatos obtidos foram secos completamente em rotaevaporador a 40 °C, sob vácuo e ressuspendidos em 1 ml de metanol (extratos de cebola branca) e 2,5% ácido acético em metanol (extrato de cebola roxa) (grau HPLC). Estes extratos foram utilizados para identificação e quantificação dos flavonoides por LC-ESI MS/MS *(*Cromatografia líquida- ionização por eletron spray-espectrometria de massas*)* e CLAE-DAD (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo).

4.3.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (LC-ESI-MS/MS)

A identificação dos flavonoides foi conduzida no aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo íon *trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) (LC-MS, do inglês Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) e interface de ionização por electrospray (ESI, do inglês Electron Spray Ionization). A coluna utilizada foi a Prodigy 5 (ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 ml/min, 25 °C, e a eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5 % em água e B: acetonitrila adicionado de 0,5% ácido fórmico. 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 minutos, 8% em 35 minutos (tempo de corrida, 35 min). Após a passagem pelo DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 ml/min para a passagem no espectrômetro de massas. O ESI foi mantido em modo positivo. O detector de massas foi programado para realizar *full scan* entre *m/z* 100-1000. A energia de ionização para o modo positivo foi de 3.500 V. A identidade dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas obtido de padrões comerciais e/ou dados de literatura, espectro de absorção e ordem de eluição. Para

a confirmação da identidade, o tempo de retenção foi comparado com aquele de padrões comerciais, quando possível.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

A quantificação dos flavonoides foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi da marca Agilent (modelo Infinity 1120), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. As condições cromatográficas foram às mesmas descritas no item 4.3.2. A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 370 e 525 nm. Para a quantificação, todos os picos correspondentes a glicosídeos de quercetina foram quantificados utilizando curva de calibração da quercetina-3-*O*-glicosídeo, enquanto que todas as antocianinas foram quantificadas utilizando curva de calibração da cianidina-3-*O*-glicosídeo (Extasynthese, Genay, France).

4.4 Atividade antimicrobiana dos extratos

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima de cada extrato foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo, segundo a metodologia de Wiegand e colaboradores (2008), com modificações. Os extratos suspendidos em caldo LB foram testados nas concentrações de 125, 62 e 31 µg/ml em placas de 96 poços por meio de diluições seriadas para cada um dos extratos a partir da concentração maior, deixando um volume de 50 µl em cada poço. Então, as culturas de *C. violaceum* ATCC12472, *S. marcescens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 crescidas *overnight* em placas com ágar LB foram suspendidas em solução salina (0.85%) e ajustadas usando solução McFarland 0.5 para atingir uma concentração aproximada de 1,0 $x10^8$ UFC/ml. Posteriormente, cada cultivo foi diluído em caldo Luria Bertani (marca Sigma Aldrich) na proporção de 1:100 e colocou-se 50 µl desta diluição em cada poço, obtendo uma concentração bacteriana final aproximada de 5,0 x 10^5 UFC/ml nas concentrações finais indicadas por extrato. Os controles utilizados foram o cultivo da bactéria em caldo LB sem extratos, o caldo com cada um dos

extratos, em cada uma das concentrações testadas sem bactéria, e um controle com caldo (controle de esterilidade). Realizou-se um ensaio com seis réplicas de cada uma das concentrações e três repetições biológicas. Os testes de inibição do *QS* foram feitos com concentrações sub-MIC para garantir que os extratos não interferissem no crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano foi avaliado na densidade ótica OD_{595nm} determinada a cada três horas de cultivo, durante 24 horas, no leitor de microplacas Multiskan FC Thermo Scientific.

4.5 Determinação *in vitro* da atividade anti-QS dos extratos de cebola

4.5.1 Teste Quantitativo da Inibição do QS em *C. violaceum* ATCC 12472

O teste foi realizado conforme Tan e colaboradores (2012; 2013), com modificações. A cultura de *C. violaceum* ATCC foi crescida *overnight* e cultivada seguindo os mesmos parâmetros do item 4.4.1, diluída em caldo Luria Bertanii (LB) na proporção de 1:100 e colocou-se 50 µl desta diluição em cada poço, obtendo uma concentração bacteriana final aproximada de 5,0 x 10^5 UFC/ml para as concentrações de extrato testadas 31,2, 15,6 e 7,8 µg/ml, respectivamente. Uma placa de 96 poços contendo as amostras foi incubada a 30 ºC sob agitação de 120 rotações por minuto (rpm). Depois de 24 horas, a placa foi completamente seca a 60 °C e foram adicionados 100 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, mantendo a placa em agitação a 210 rpm por aproximadamente 12 horas. A absorbância de cada poço foi medida a 595 nm usando o leitor de microplacas Multiskan FC Thermo scientific. Foram feitos os controles de crescimento da bactéria, o controle do extrato e o controle do caldo LB puro. As análises foram feitas em seis réplicas para cada concentração e o ensaio foi repetido três vezes.

4.5.2 Efeito dos extratos de cebola sobre a motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens* MG1

A motilidade tipo *swarming* foi avaliada em ágar LB semi-sólido preparado com 0,5% de ágar, conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2016). Alíquotas dos extratos nas concentrações de 125, 62.5 e 31.2 µg/ml foram colocadas em placas de Petri estéreis de 49 x 9 mm e, em seguida, adicionou-se 10 mL de ágar LB fundido. As placas ficaram abertas por 10 minutos em câmara de fluxo laminar, até a solidificação do ágar. Em seguida, 2 µl da cultura de

bactéria crescida *overnight* foram inoculados em forma de ponto (*spot*) no centro do ágar. Uma vez que o inoculo secou (cerca de 20 minutos após a inoculação), as placas foram fechadas e incubadas por 24h/30 °C para *S. marcescens* e 24h/37 °C para *P. aeruginosa*. Os resultados da motilidade tipo *swarming* foram observados visualmente comparando o diâmetro de crescimento da bactéria com relação ao controle de crescimento, sem extrato. Como controle positivo para inibição da motilidade tipo *swarming* foi usado uma placa de ágar LB contendo furanona C-30 na concentração de 100 µM e o experimento foi repetido três vezes (Oliveira et al., 2016).

4.5.3 Efeito dos extratos sobre a formação de biofilmes em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens MG1*

A quantificação da formação de biofilme na presença dos extratos foi conduzida segundo o descrito por Borges e colaboradores (2012), com modificações. Placas de 96 poços foram condicionadas previamente com os extratos diluídos segundo o item 4.5.1. As culturas das bactérias crescidas *overnight* em ágar LB foram diluídas em caldo LB e ajustadas conforme solução Mcfarland 0.5 (aproximadamente 10^8 UFC/ml). Inoculou-se uma alíquota de 20 µl, completando um volume final de 200 µl contendo o caldo LB e os extratos nas diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 37 °C/24h para *P. aeruginosa* PAO1 e 30 °C/24h no caso de *S. marcescens* MG1. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados 3 vezes com 200 µl de água destilada estéril. As bactérias aderidas à superfície dos poços foram fixadas com 200 µl de metanol por 15 minutos, sendo o solvente descartado após esse período e as placas foram secas à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µl de uma solução de cristal violeta a 0.3% (p/v) em cada poço em temperatura ambiente por 5 minutos. O excesso de cristal violeta foi removido suavemente e lavado 5 vezes com água destilada estéril. O corante aderido às células foi extraído com 200 µl de ácido acético a 33% (v/v). A densidade ótica de cada poço foi medida a 595 nm usando o leitor de microplacas Multiskan FC Thermo Scientific. O ensaio foi realizado com seis réplicas de cada concentração e três repetições biológicas. Foram feitos os controles de crescimento sem extrato, caldo LB com extrato e caldo LB puro.

Para confirmar a produção de biofilme, foi realizado um teste adicional, segundo Minei e colaboradores (2008), com modificações. Placas de 96 poços crescidas *overnight* com um volume

final de 200 µl contendo o caldo LB e os compostos nas diferentes concentrações foram incubados a 37 °C/24h para *P. aeruginosa* PAO1. Após este período, as células planctónicas foram removidas com 200 µl de solução salina 0,85%, por três vezes. Então, as células aderidas (biofilme) foram removidas manualmente das paredes de cada um dos poços com uma haste de algodão esterilizada e humedecida levemente em solução salina 0,85%, até a remoção total do biofilme. Para estimar a adesão, cada uma das hastes foi transferida para tubos de 10 ml contendo solução salina 0,85% e homogeneizada em *vortex* durante um minuto. Em seguida, diluições seriadas até a 10^{-10} foram realizadas. Para a semeadura de cada uma das diluições foi utilizada a técnica de microgotas, na qual 20 µl de cada diluição foram colocados em forma de ponto em ágar LB. Este procedimento foi realizado em três repetições para cada uma das diluições e as placas foram incubadas até o aparecimento das microcolônias a 37°C. Após este período, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos como Log_{10} UFC por poço.

O efeito dos compostos quercetina aglicona (inibidor do QS já relatado na literatura e encontrado no extrato de cebola roxa) e quercetina-3-beta-D-glicosideo (um dos compostos majoritários encontrados em ambos extratos) sobre os micro-organismos utilizados neste estudo foi também avaliado.

4.6 Analise estatística

Todos os experimentos foram realizados em no mínimo três repetições. Os dados representam as medias das repetições e suas diferenças com relação aos controles. Todas as amostras foram analisadas utilizando a análise de variância ANOVA a um fator com $p \leq 0.05$ e o teste de Turkey posterior para determinar as diferenças dos tratamentos com relação aos controles.

5 RESULTADOS E DISCUSSAO

5.1 Caracterização dos compostos fenólicos presentes nas amostras de cebolas

Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de flavonoides das cebolas branca e roxa estão apresentados nas **Figuras 4** e **5** e sua respectiva identificação detalhada na **Tabela 1.** O

flavonol majoritário encontrado nas duas variedades de cebola foi a quercetina 4´-*O*-glicosídeo, apresentando íon molecular ($[M+H]^+$) a *m/z* 465 e fragmento MS2 característico da quercetina (*m/z* 303 ($[M+H]^+$-162) com perda neutra correspondente a uma hexose (162). O segundo flavonol majoritário encontrado foi identificado como quercetina 3,4´-*O*-diglicosídeo, apresentando íon molecular $[M+H]^+$ a *m/z* 627 e fragmentos MS2 a *m/z* 465 ($[M+H]^+$-162) e a *m/z* 303 (*m/z* 465-162) correspondentes a quercetina. Na cebola roxa, além dos derivados de quercetina, apresentou-se como antocianina majoritária a cianidina 3-*O*-glicosídeo, responsável pela pigmentação roxa, apresentando íon molecular $[M]^+$ a *m/z* 449 e fragmento MS2 característico (m/z 287, $[M]^+$-162).

As concentrações de flavonoides dos extratos de cebola branca e roxa estão apresentadas na **Tabela 2**. No extrato metanólico de cebola branca a quercetina-3,4´-diglicosídeo e a quercetina 4´-*O*-glicosídeo corresponderam a 37% e 52% do total de flavonoides, respectivamente. Por outro lado, no extrato da cebola roxa, os principais flavonoides foram quercetina 4´-*O*-glicosídeo e quercetina aglicona, representando 57% e 20% do total de flavonoides. O extrato amônico de cebola branca foi composto somente de quercetina 4´-*O*-glicosídeo.

Figura 4- Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 370 nm) de cebola roxa e cebola branca. (A) Cebola roxa, (B) cebola branca, (C) padrão quercetina-3-*O*-glicosídeo. Picos identificados: Pico 1- quercetina-3,4´-*O*-diglicosídeo; pico 2-isoramnetin 3,4´-diglicosídeo, pico 3- quercetina-3-*O*-glicosídeo; pico 4- quercetina-4´-*O*-glicosídeo; pico 5-isohaminetina, pico 6- desconhecido; pico 7- quercetina. Identificação apresentada na **Tabela 1**.

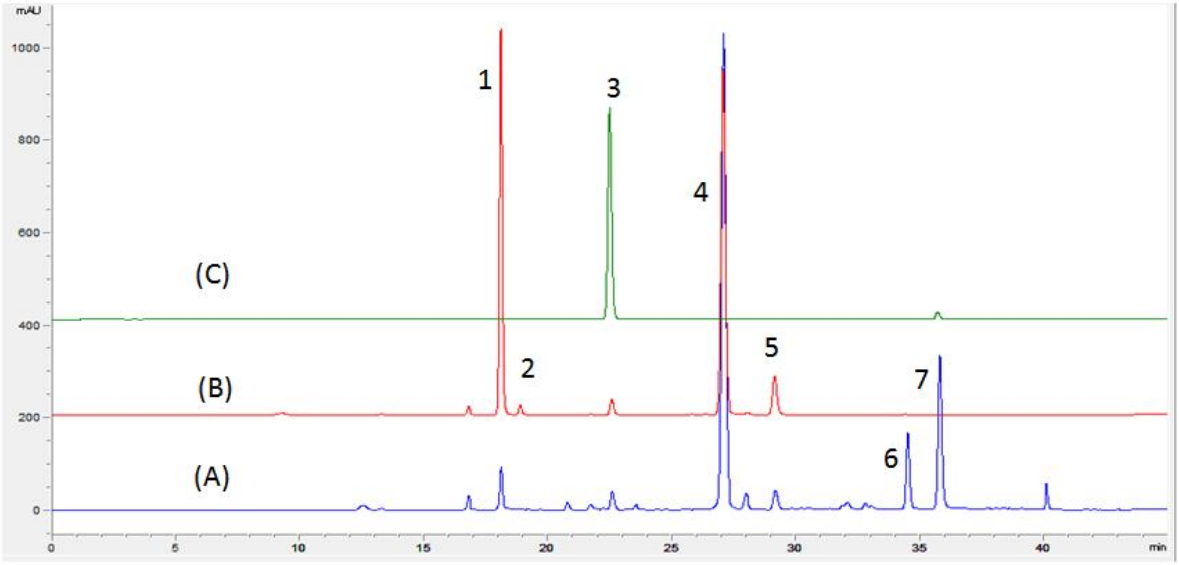


Figura 5- Cromatograma obtido por CLAE-DAD (λ 525 nm) de cebola roxa. (A) Cebola roxa, (B) padrão cianidina-3-*O*-glicosídeo. Picos identificados: Pico 8- cianidina-3-*O*-glicosídeo. Identificação apresentada na **Tabela 1.**

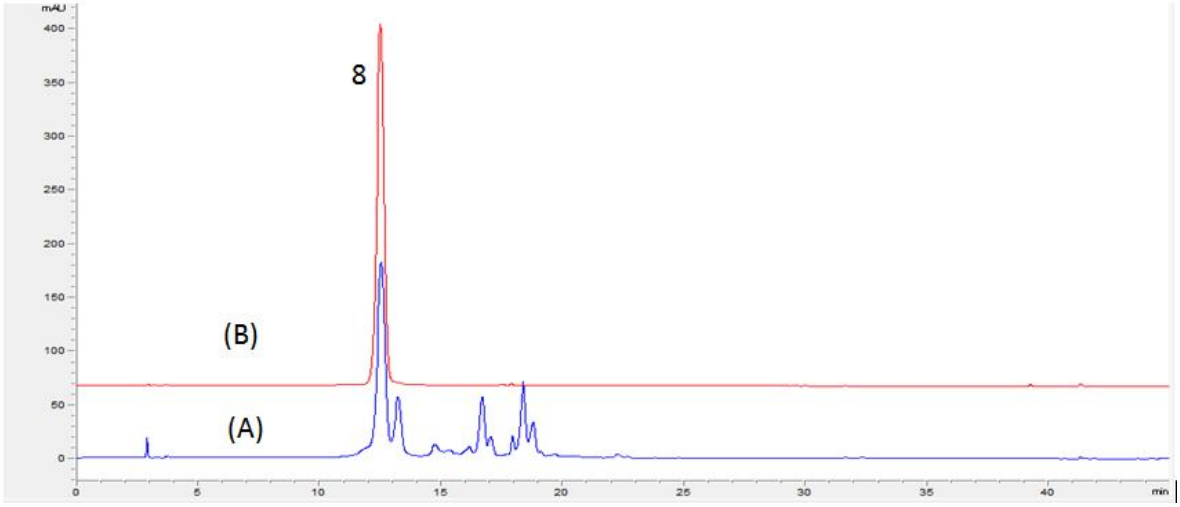


Tabela 1- Espectro de massas de flavonoides de cebola branca e cebola roxa obtido por LC-ESI-MS/MS.

Pico	TR (min)	Ion molecular (*m/z*)	MS2 (*m/z*)	Identidade	Cebola roxa	Cebola Branca
1	18.1	627	465/303	Quercetina 3,4-diglicosídeo	√	√
2	19.0	641	479/317	Isoraminetina 3,4´-diglicosídeo		√
3	22.7	465	303	Quercetina 3-glicosídeo*	√	√
4	27	465	303	Quercetina 4´-glicosídeo	√	√
5	29.5	479	317	Isorhaminetina 4-glicosídeo	√	√
6	34.4	507	303	Quercetina glicosídeo	√	
7	35.2	303	257/229/165/137	Quercetina aglicona*	√	
8	11.9	449	287	Cianidina-3-*O*-glicosídeo	√	

*identidade confirmada com padrão comercial. Modo positivo. TR, tempo de retenção.

Estudos, como os desenvolvidos por Slimestad e colaboradores (2007), revelam que em cultivares de cebola os flavonoides derivados de quercetina são os mais encontrados, principalmente os glicosilados, os quais possuem açúcares ligados nas posições 4, 3 ou 7 das agliconas. A quercetina 4'-glicosídeo e a quercetina 3,4'-diglicosídeo são os flavonois majoritários da cebola e os compostos derivados de kaempferol e isorhamnetina foram identificados como flavonoides minoritários (Slimestad et al., 2007; Lee et al., 2011; Perez-Gregorio et al., 2010). Outro estudo de Arabbi e colaboradores (2004) também demostrou que são encontradas quantidades significativas de quercetina aglicona em concentrações de 48-56 mg /100 g de peso fresco em cebolas brancas e quantidades de 38-94 mg /100 g peso fresco em cebolas roxas. Além disso, eles relatam que a antocianina cianidina também foi encontrada em variedades de cebola roxa contribuindo com 9,2% dos flavonoides totais (Arabbi et al., 2004)

Tabela 2. Quantificação de flavonoides presente no extrato de cebola roxa e cebola branca.

Flavonol	Cebola roxa-MeOH	Cebola branca-MeOH	Cebola branca-MeOH NH4
Quercetina 3,4´-diglicosídeo	0,68±0,001	**7,84±0,080**	nd
Isoraminetina 3,4´-diglicosídeo	Nd	0,19±0,001	nd
Quercetina 3-glicosídeo	0,35±0,001	0,41±0,001	nd
Quercetina 4´-glicosídeo	**10,54±0,02**	**11,03±0,010**	**1,47±0,005**
Isoraminetina 4-glicosídeo	0,50±0,001	1,26±0,008	nd
Quercetina glicosídeo	1,44±0,004	nd	nd
Quercetina aglicona	**3,74±0,050**	nd	nd
Total de flavonol	17,27	20,73	1,47
Antocianidina			
Cianidina-3-*O*-glicosídeo	**1,16±0,007**		

Nd, não detectado. Valores expressos em equivalente de quercetina 3-*O*-glicosídeo (mg/100 mg de extrato seco)**. Em negrito, os compostos majoritários identificados.**

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e das curvas de crescimento microbiano na presença dos extratos

Os resultados das MICs dos extratos de cebola branca e roxa avaliados sobre *C. violaceum* ATCC 12472, *P. aeruginosa* PAO1 e *S. marcescens* MG1, são apresentados na **Tabela 3**. Adicionalmente, são mostrados os resultados do efeito dos extratos de cebola branca e roxa sobre a cinética de crescimento de cada uma das bactérias testadas durante 24 h, por meio das curvas de multiplicação (**Figura 6, 7 e 8).** É possível observar que a MIC dos três extratos foi igual ou superior a 125 µg/ml (p/v) de extrato seco para todos os micro-organismos avaliados. Para os experimentos de inibição do sistema QS foram utilizadas aquelas concentrações sub-MIC que não afetaram o crescimento microbiano, conforme avaliado nas curvas de multiplicação.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos extratos de cebola.

Micro-organismo	**MIC (µg/ml)**		
	CB-MeOH	CB-MeOH NH4	CR-MeOH
***C. violaceum* ATCC 12472**	>125	125	125
***P. aeruginosa* PAO1**	>125	>125	>125
***S. marcescens* MG1**	>125	>125	125

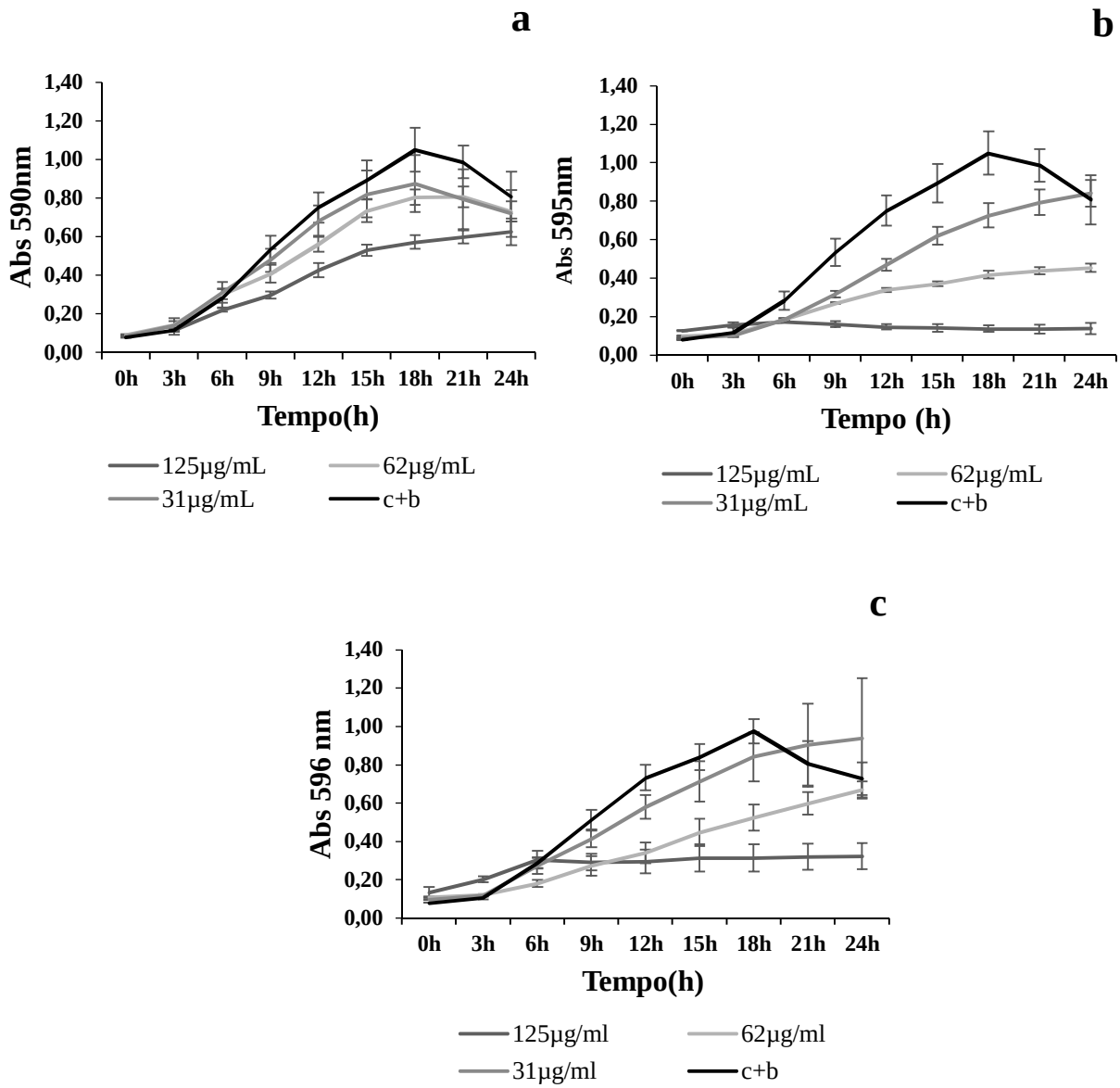
(CB-MeOH) cebola branca em metanol
(CB-MeOH/NH4) cebola branca em metanol amônia
(CR-MeOH) cebola roxa em metanol

O experimento determinou o comportamento de cada uma das bactérias estudadas e verificou a possível toxicidade de cada um dos extratos. Na **Figura 6** para *C. violaceum* ATCC 12472, tanto o extrato metanólico de cebola roxa quanto o extrato amônico de cebola branca apresentaram efeito inibitório na concentração de 125 µg/ml, caracterizando-se como a MIC destes extratos. A multiplicação da bactéria também foi levemente afetada em relação ao controle para os dois tipos de extrato de cebola na concentração de 62 µg/ml, caracterizando uma inibição parcial do crescimento (**Figura 6**). Por este motivo, nos experimentos de inibição do *QS,* foram utilizadas concentrações menores que 62 µg/ml para evitar efeitos tóxicos.

O estudo de Al-Yousef e colaboradores (2017) avaliou a fração de acetato de etila da casca de cebola e seu composto majoritário quercetina 4′-*O*-*β*-D glicopiranosideo como um possível inibidor do QS em *C. violaceum* CV12472 e *P. aeruginosa* PAO1. A concentração inibitória encontrada para *C. violaceum* ATCC 12472 foi de 500 µg/ml pelo qual, concentrações menores foram utilizadas para os testes de inibição (Al-Yousef et al., 2017).

Gopu e colaboradores (2015) avaliaram a quercetina aglicona como composto anti QS. No estudo, a MIC do composto foi de 120 µg/ml para *C. violaceum* CV026, ressaltando que este composto foi identificado como um dos compostos fenólicos majoritários presentes no extrato de cebola roxa do presente estudo.

Figura 6- Curvas de multiplicação para *C. violaceum* ATCC 12472 durante 24h de incubação a 30ºC (a) Extrato metanólico de cebola branca, (b) Extrato amônico de cebola branca, (c) Extrato metanólico de cebola roxa. c+b: controle de crescimento.



Para *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 7)** constatou-se que o comportamento da bactéria durante sua multiplicação, na presença dos extratos, foi similar ao controle. Em *P. aeruginosa* PAO1 somente o extrato amônico de cebola branca provocou um atraso na curva de crescimento até entrar na fase exponencial, já que esta só começou depois de 9h de incubação na concentração de 125 µg/ml, enquanto no controle se iniciou a partir das 3h. Assim, a MIC foi maior que 125 µg/ml, a maior concentração testada, já que em nenhum dos casos houve inibição

total do crescimento durante o período avaliado de 24h. Estes resultados se relacionam com aqueles encontrados por Adonizio e colaboradores (2008), os quais determinaram o efeito de extratos aquosos das plantas *Conocarpus erectus, Chamaesyce hypericifolia, Callistemon viminalis, Bucida buceras, Tetrazygia bicolor,* e *Quercus virginiana,* sobre o crescimento de *P. aeruginosa* PAO1, durante 24h. Os resultados mostraram que os extratos tiveram um efeito pouco significativo no crescimento de *P. aeruginosa* PAO1. A fase estacionaria foi atingida em todas as amostras depois de 8h de incubação, mas a densidade celular final não foi afetada significativamente (Adonizio, Kong, e Mathee, 2008).

Em *S. marcescens MG1* (**Figura 8)** a presença dos três tipos de extratos, em todas as concentrações testadas, não afetou o crescimento do micro-organismo, revelando um comportamento similar ao controle.

Figura 7- Curvas de multiplicação para *P. aeruginosa* PA01 durante 24h de incubação a 37ºC. (a) Extrato metanólico de cebola branca, (b) Extrato amônico de cebola branca, (c) Extrato metanólico de cebola roxa. . c+b: controle de crescimento.

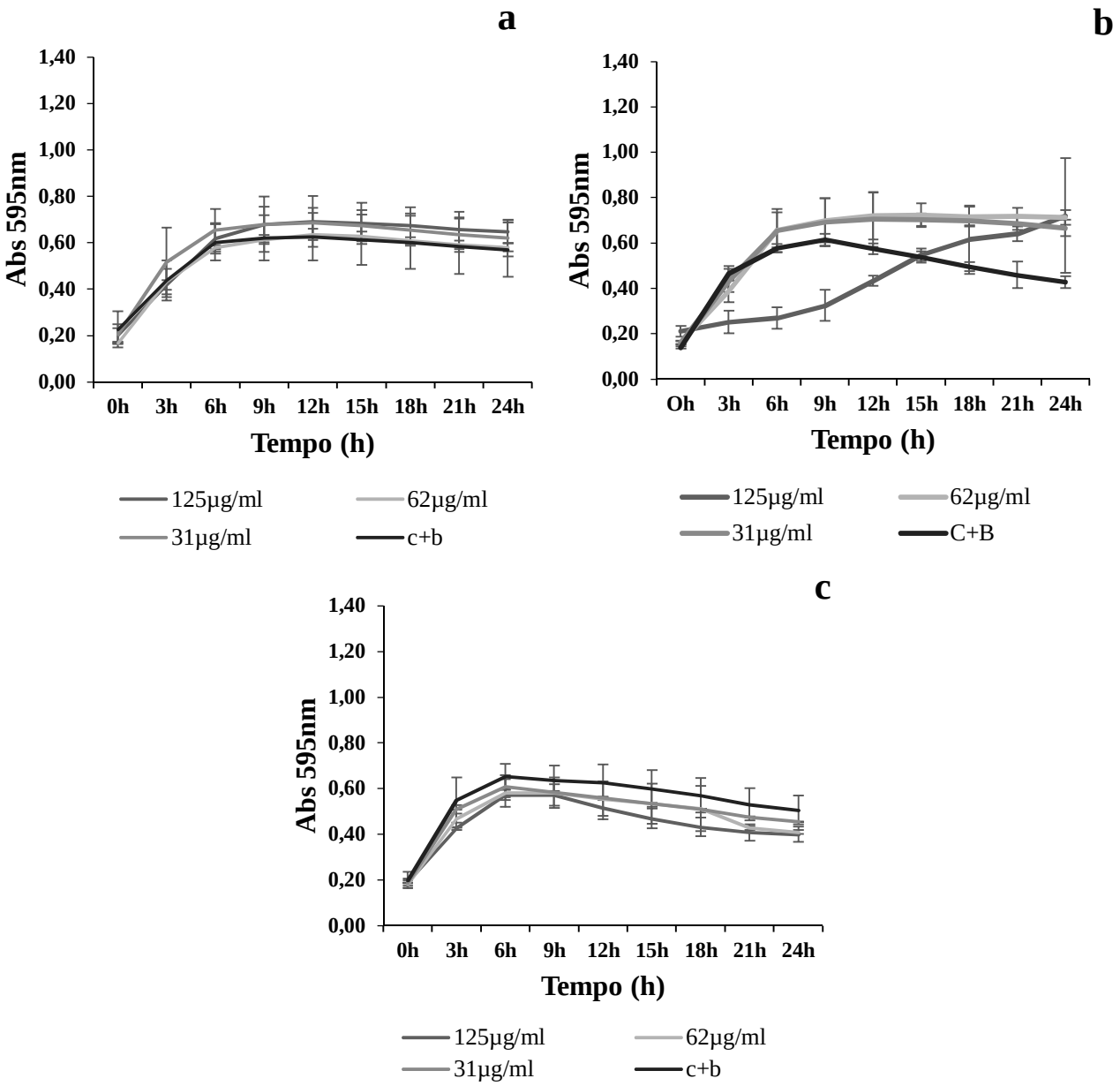
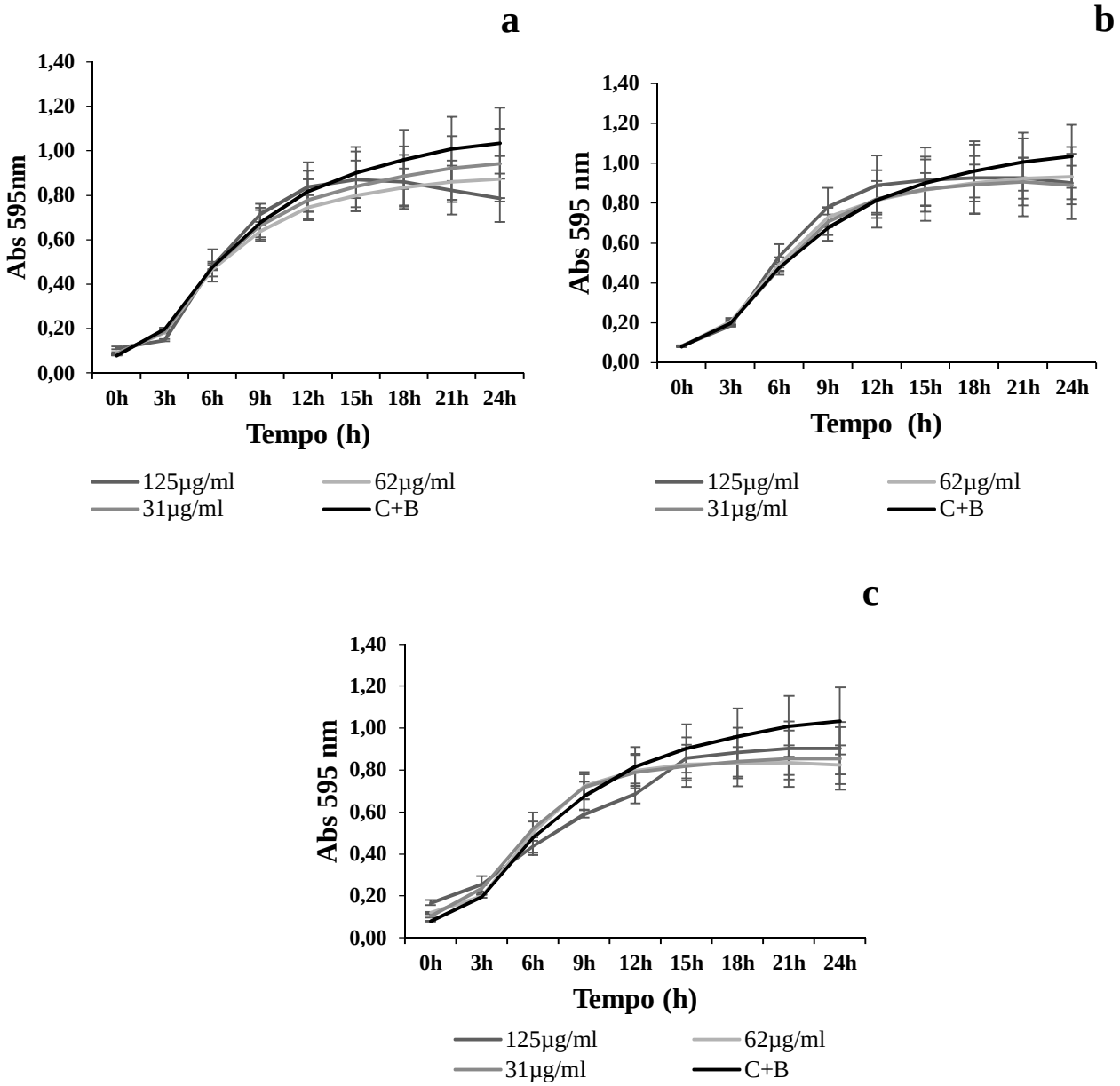


Figura 8- Curvas de multiplicação para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30ºC. (a) extrato metanólico de cebola branca, (b) Extrato amônico de cebola branca, (c) extrato metanólico de cebola roxa. . c+b: controle de crescimento.



O efeito da quercetina aglicona e quercetina 3-*β*-D-glicosídeo sobre os micro-organismos utilizados neste estudo foi também avaliado por meio de curvas de crescimento. Estes compostos foram escolhidos, já que o primeiro deles foi encontrado na literatura como inibidor potencial do QS em diferentes bactérias Gram negativas e foi também um dos compostos encontrados no extrato metanólico de cebola roxa, em uma quantidade considerável. Já a quercetina com diferentes glicosilações foi determinada por meio das análises de compostos fenólicos totais como o composto majoritário presente nos dois tipos de cebola. A MIC para os dois compostos estudados foi maior que 125 µg/ml nos três micro-organismos avaliados e houve inibição parcial do crescimento apenas na concentração de 125 µg/ml para *C. violaceum* ATCC 12472.

5.3 Atividade anti-QS dos extratos de cebola

5.3.1 Efeito na produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472

A **Figura 9 (1a, 1b e 1c)** apresenta o efeito dos extratos de cebola branca e roxa sobre a produção de violaceina. Observou-se que houve uma tendência de diminuição da produção de violaceína pela presença dos extratos metanólicos de cebola roxa e branca em comparação ao controle do cultivo da bactéria sem a presença dos extratos. No entanto, esta diminuição não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). É importante ressaltar que as concentrações utilizadas neste estudo não apresentaram toxicidade sobre a bactéria e que a falta de inibição da produção de violaceína, nestas condições, implica ausência de interferência significativa sobre o sistema QS de *C. violaceum.*

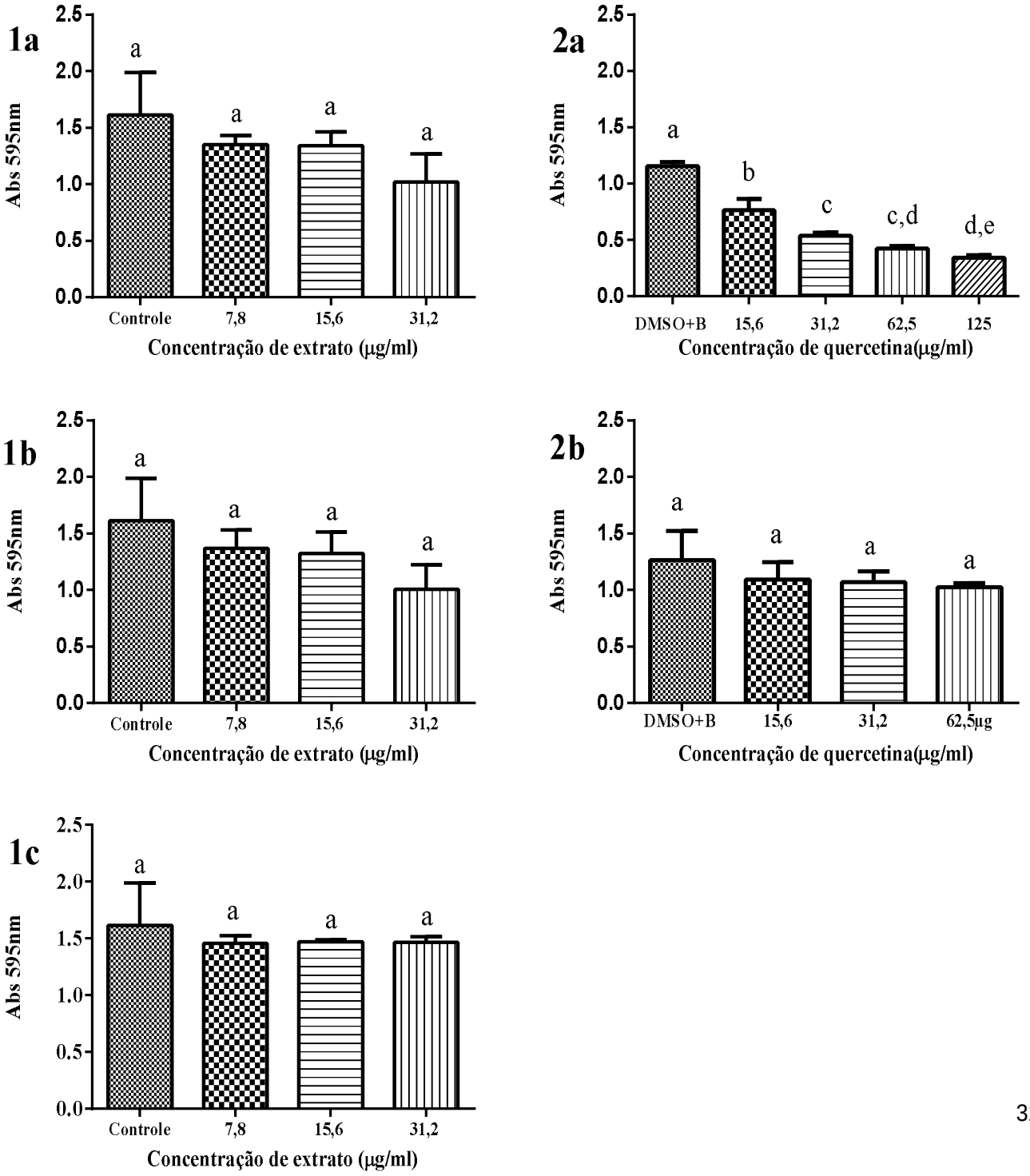
Estes resultados contrastam com outras pesquisas como a realizada por Oliveira e colaboradores (2016) na qual o extrato fenólico de *Rubus rosaefolius* inibiu significativamente a produção de violaceina em todas as concentrações testadas, chegando a diminuir até 88.6% a produção do pigmento, um desempenho melhor que o controle positivo com furanona-C30, conhecido como um inibidor do QS em diferentes bactérias. O mesmo grupo também encontrou que o extrato enriquecido em compostos fenólicos de *Malpighia emarginata* (Acerola) inibiu significativamente a produção de violaceína em todas as concentrações sub-MIC avaliadas, com eficácia similar ao controle (Oliveira et al., 2017).

O trabalho de Rodrigues e colaboradores (2016) revelou que o extrato fenólico de *E. brasiliensis* também apresentou inibição significativa da produção de violaceina em *C. violaceum* em todas as concentrações de extrato testadas, sendo a melhor inibição na concentração de 119.94 mg GAE/L^{-1} , com efeito mais potente que o controle com furanona (Rodrigues et al., 2016).

Como a quercetina aglicona e a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo foram moléculas identificadas nos extratos e que, pela literatura, apresentam potencial de inibição do QS, o efeito dos extratos de cebola foi comparado ao efeito destes dois tipos de quercetina **(Figura 9 - 2a, 2b)**. Para a quercetina aglicona, constata-se que houve uma inibição significativa ($p < 0,05$) da produção do pigmento em todas as concentrações testadas, sendo que a inibição foi dependente da concentração. Estes resultados são comparados com aqueles encontrados por Gopu e colaboradores (2015), os quais reportaram que com o aumento da concentração de quercetina aglicona, a produção de violaceina era inibida em até 83.23% na concentração de 80 µg/ml.

Por outro lado, a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo não inibiu significativamente a produção do pigmento, possivelmente explicando a baixa atividade anti-QS dos extratos que tinham este composto como um dos majoritários, além de outros tipos de quercetina com glicosilações em outras posições da molécula. Este resultado indica que a glicosilação da molécula, ou até mesmo outros tipos de mudanças na estrutura desta, poderia alterar a atividade antimicrobiana e anti-QS de um composto fenólico. De fato, esta hipótese se apoia em diferentes pesquisas que relatam que alguns flavonoides inibem o QS, mas que existem características da estrutura da flavona essenciais para a inibição (Xiao, Chen, e Cao, 2014; Paczkowski et al., 2017; Xiao, 2017).

Figura 9- 1. Efeito de diferentes compostos sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 (1a) extrato metanólico de cebola roxa; (1b) extrato metanólico de cebola branca; (1c) extrato amônico de cebola branca. **2**. Efeito da quercetina aglicona (2a) e da quercetina 3-β-D-glicosídeo (2b) sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472. Controle=controle crescimento bacteriano; DMSO+B= controle dimetil sulfóxido com bactéria; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).



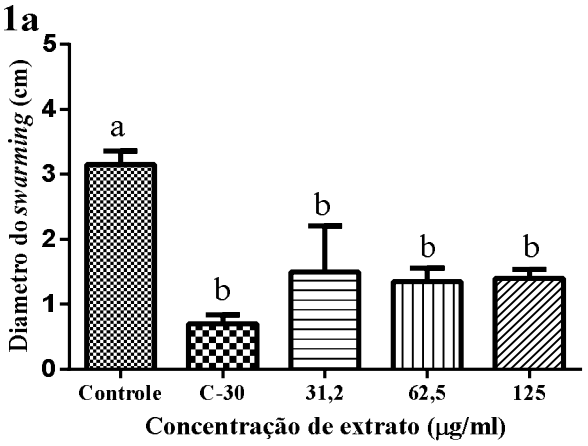
5.3.2 Efeito dos extratos sobre a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PA01 e *S. marcescens MG1*

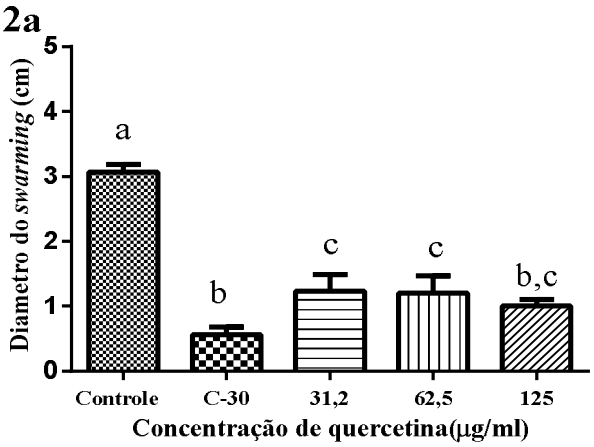
A expressão de alguns fatores de virulência e a formação de biofilmes está associada à motilidade. Portanto, interferências neste fenótipo podem afetar a patogenicidade dos micro-organismos (Al-Yousef et al., 2017). Constatou-se que o extrato metanólico de cebola roxa reduziu significativamente ($p < 0,05$) a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1, **Figura 10 (1a, 1b, 1c)** em todas as concentrações testadas, e o controle com furanona C-30 na concentração de 100 µM demostrou a melhor inibição do fenótipo, o que corrobora com pesquisas anteriores (Manefield et al., 2002; Wu et al., 2004;). Os outros extratos avaliados não apresentaram inibição ($p \geq 0,05$) desse fenótipo.

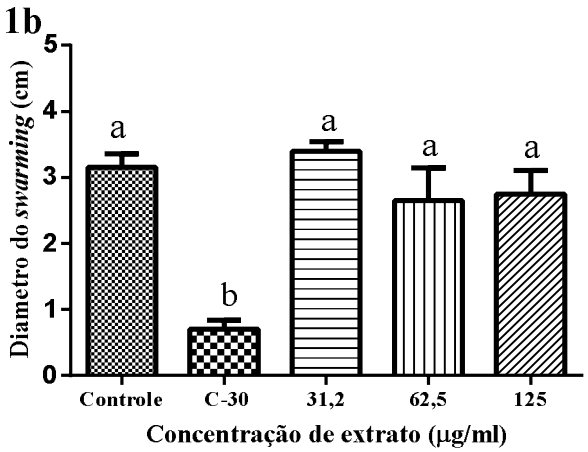
Já para *S. marcescens* MG1 **Figura 11 (1a, 1b, 1c)**, foi observada inibição da motilidade *swarming* só na concentração de 125 µg/ml do extrato amônico de cebola branca. Os outros extratos não apresentaram inibição. Estes resultados tem relação com aqueles obtidos por Husain e colaboradores (2015) nos quais se mostrou que o óleo essencial da planta *Mentha piperita* inibiu a motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PA01. Vatem e colaboradores (2007) também avaliaram o efeito de concentrações sub-letais de fitoquímicos de extratos de frutas, ervas e especiarias comuns, demostrando que estes diminuíram a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1 de forma eficaz em aproximadamente 50% (Vatem et al., 2007). Este comportamento também foi reproduzido em outras bactérias, a exemplo do estudo de Oliveira e colaboradores (2016) que demostrou que o extrato fenólico de morango silvestre inibiu a motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* e *A. hydrophila*, duas bactérias encontradas em produtos refrigerados, além de inibir a produção do pigmento vermelho prodigiosina de *S. marcencens*, regulado pelo QS (Oliveira et al., 2016).

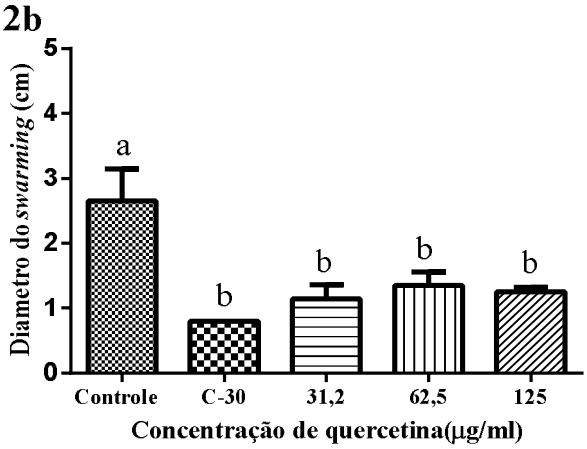
Além dos testes com os extratos de cebola, também foi observado que os ensaios tanto com quercetina aglicona quanto com a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo, nos dois micro-organismos avaliados, diminuíram significativamente a motilidade *swarming* em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$) **Figura 10 (2a, 2b) Figura 11 (2a, 2b).**

Figura 10- 1. Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1 (1a) extrato metanólico de cebola roxa; (1b) extrato metanólico de cebola branca; (1c) extrato amônico de cebola branca. **2** Efeito da quercetina aglicona (2a) e da quercetina 3-β-D-glicosídeo (2b) . Controle=controle crescimento bacteriano; C-30= controle furanona halogenada C-30 com bacteria; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).









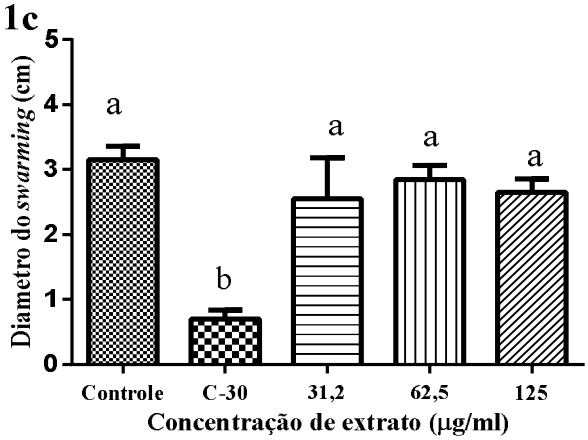
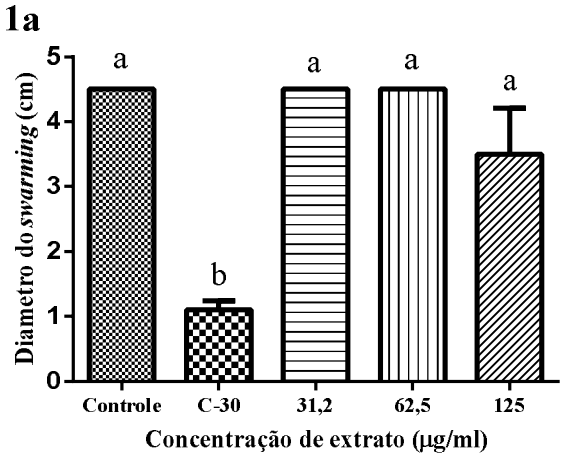
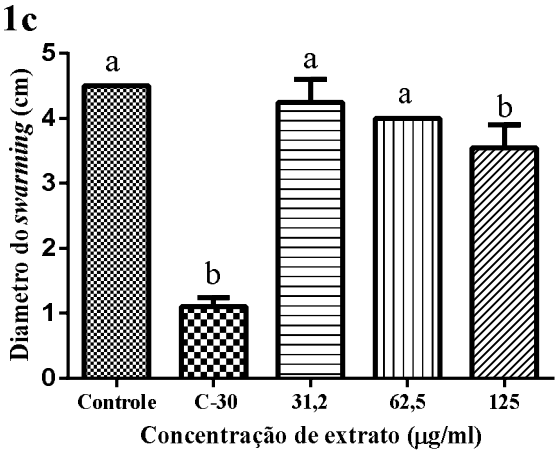
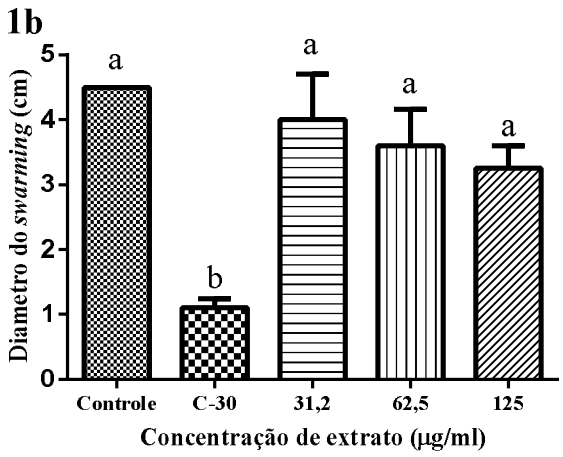
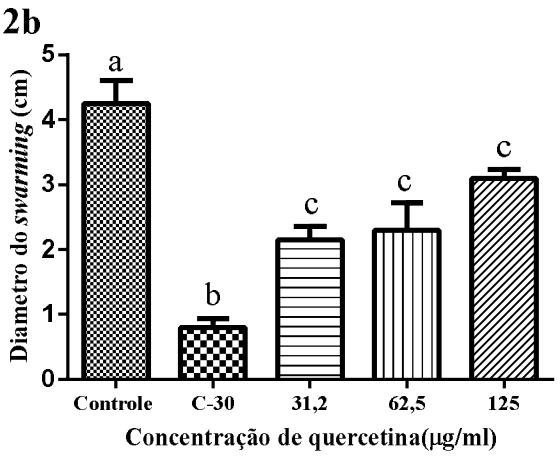


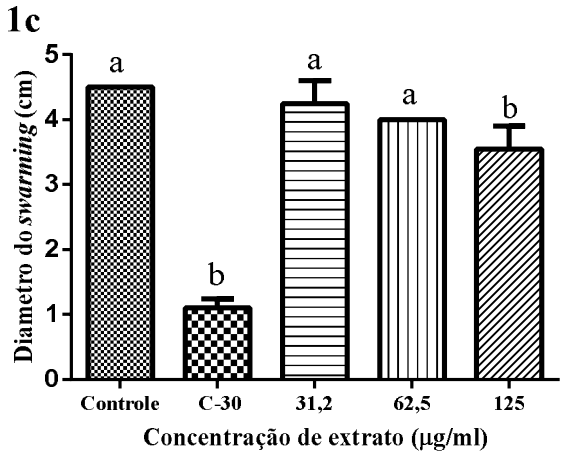
Figura 11- 1. Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* MG1 (1a) extrato metanólico de cebola roxa; (1b) extrato metanólico de cebola branca; (1c) extrato amônico de cebola branca. 2 Efeito da quercetina aglicona (2a) e da quercetina 3-β-D-glicosídeo; (2b) . Controle=controle crescimento bacteriano; C-30= controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).







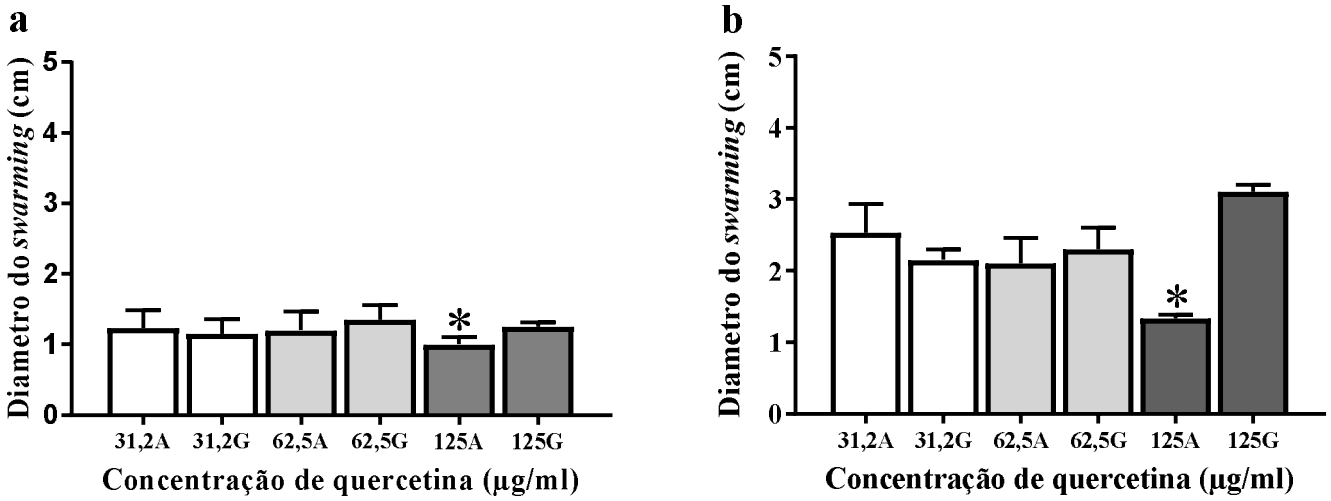




É de grande importância destacar que não existem estudos disponíveis na literatura que tenham avaliado o efeito de extratos de cebola roxa ou cebola branca, sobre os fenótipos testados neste trabalho. Rasmussen e colaboradores (2005) elaboraram bibliotecas tanto de extratos de plantas e ervas como de compostos químicos puros, para avaliar quais destes possuíam atividade anti-QS, através de um sistema de seleção de inibidores de QS chamado de QSIS do tipo A e B. O primeiro contém um gene que codifica uma proteína letal, controlado por um promotor regulado por QS. Assim, a bactéria não consegue crescer na presença de moléculas de AHL, a menos que um inibidor de QS não tóxico esteja presente em uma concentração suficientemente alta para inibir o sistema. O segundo emprega um gene de resistência a um antibiótico o qual possui um repressor controlado por um promotor regulado por QS. Assim, a presença de um inibidor permite o crescimento da bactéria, como consequência da regulação negativa do repressor. Entre os extratos avaliados se encontrava o da cebola do tipo primavera e a cebola marrom. No entanto, os testes realizados demostraram que os dois tipos de cebola não apresentavam atividade anti-QS nos sistemas desenvolvidos pelo grupo (Rasmussen et al., 2005). A ausência de inibição neste sistema pode estar relacionada à concentração e identidade dos compostos extraídos naquele estudo, uma vez que o método de extração foi diferente do presente trabalho, assim como dos próprios sistemas utilizados na detecção da atividade anti-QS.

Os ensaios com quercetina aglicona e quercetina 3-*β*-D-glicosídeo revelaram diminuição significativa da motilidade tipo *swarming* em ambas bactérias ($p < 0,05$) (**Figura 10 e 11)**. Nos ensaios de produção de violaceína, era evidente que a quercetina aglicona apresentava melhor atividade inibitória que a quercetina glicosilada. Portanto, decidiu-se realizar uma análise comparativa entre os dois tipos de quercetina para avaliar qual dos dois compostos se mostrava mais eficaz na inibição da motilidade. As análises de comparação entre os dois tipos de quercetina (**Figura 12)** revelaram que, embora para as duas bactérias testadas, os dois compostos apresentaram atividade inibitória, a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo foi menos eficiente que a quercetina aglicona, na concentração de 125 µg/ml, na inibição da motilidade tipo *swarming*. É possível que a baixa atividade dos extratos esteja relacionada à estrutura da quercetina, uma vez que a glicosilação pode influenciar a atividade antimicrobiana e anti-QS.

Figura 12- Comparação entre a quercetina aglicona (A) e a quercetina 3-*β*-D-glicosídeo (B) e seu efeito sobre a motilidade tipo *swarming* em *P. aeruginosa* PAO1 (a) e *S. marcescens MG1* (b). * denota diferença significativa ($p<0.05$).



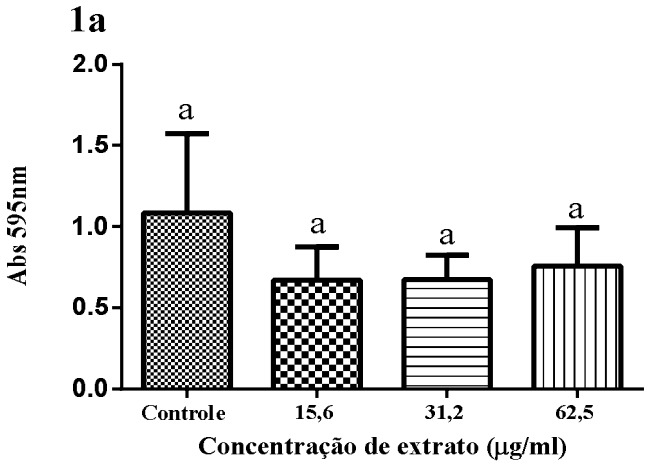
Al-Yousef e colaboradores (2017) mostraram que em concentrações entre 50–400 µg/ml da fração de acetato de etila da casca de cebola a motilidade de *P. aeruginosa* PAO1 e *C. violaceum* CV12472 foi reduzida consideravelmente (22-61%), sendo o composto responsável pela inibição identificado como quercetina 4´-*O*-*β*-D Glicopiranosídeo. É importante ressaltar que este composto não foi identificado nos extratos de cebola avaliados no presente trabalho e o método de extração utilizado por Al-Yousef et al (2017) apresentou diferenças, já que a extração foi realizada com acetona 70% e água destilada. A partir desta, o extrato foi fraccionado, utilizando diferentes solventes (Al-Yousef et al., 2017).

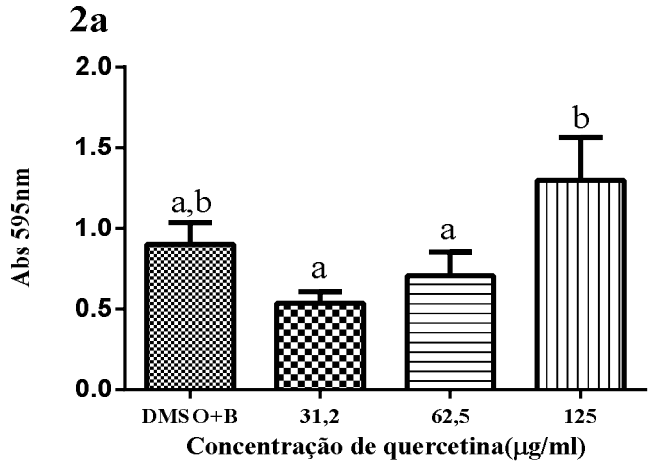
5.3.3 Efeito dos extratos sobre a formação de biofilmes

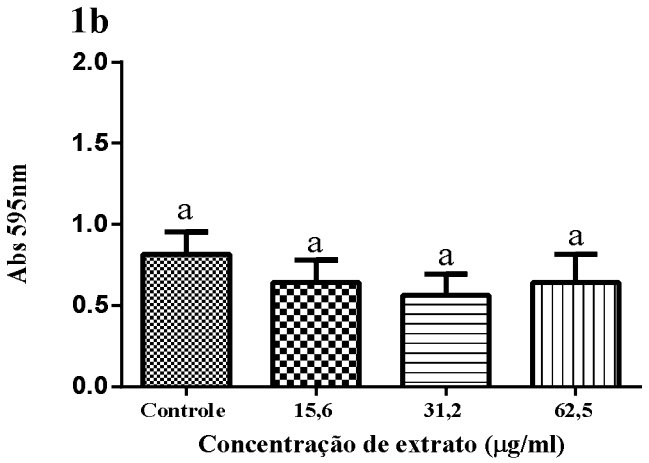
Os biofilmes são comunidades microbianas aderidas a superfícies, encobertos em uma matriz polimérica aderente (Hentzer et al., 2002), e a comunicação por QS desempenha um papel importante na maturação destes agregados celulares (Morohoshi et al., 2007; Hammer e Bassler, 2003). Os experimentos para avaliar a inibição da produção de biofilme de *P. aeruginosa* PA01 e *S. marcescens MG1* demostraram que nas concentrações de extrato testadas, a produção de

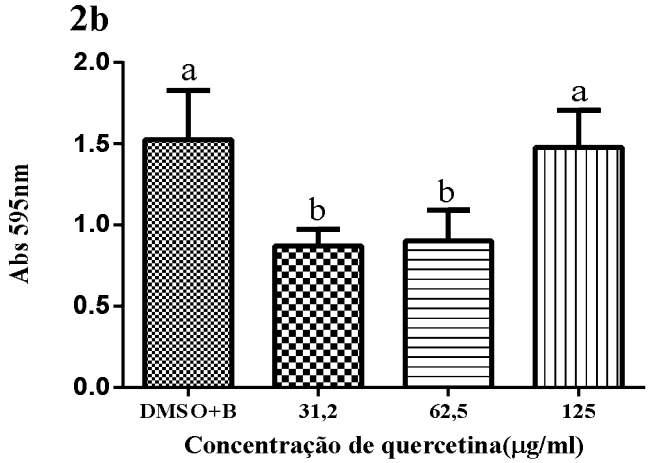
biofilme não foi inibida ($p \geq 0,05$) por nenhum dos extratos **Figura 13 (1a, 1b, 1c)** e **Figura 14 (1a, 1b, 1c)**. Adicionalmente, os testes com quercetina aglicona e quercetina-3-beta-D-glicosideo em *P. aeruginosa* PAO1 mostraram uma leve tendência de inibição do fenótipo em algumas concentrações. Entretanto constatou-se um aumento da produção do biofilme na maior concentração avaliada de quercetina aglicona e de quercetina-3-beta-D-glicosideo **Figura 13 (2a, 2b)**. Como este resultado contraria os dados da literatura, foi utilizada a técnica descrita no item 4.5.3, na qual se realiza a contagem de células viáveis aderidas. Porém, os resultados destas contagens não revelaram, de forma consistente, uma indução da formação de biofilmes (**Figura 15**) e nem uma possível inibição. O resultado da contagem na presença de quercetina glicosilada, na concentração de 62 µg/ml, mostra uma indução da formação de biofilme (**Figura 15**). Porém, tal indução não apresenta significado biológico relevante, já que, embora seja estatisticamente significativa, o número de UFC da contagem é muito próximo das demais.

Figura 13- Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA01 (1a) extrato metanólico de cebola roxa; (1b) extrato metanólico de cebola branca; (1c) extrato amônico de cebola branca. 2 Efeito da quercetina aglicona (2a) e da quercetina 3-β-D-glicosídeo (2b). Controle=controle crescimento bacteriano; DMSO+B= controle dimetil sulfóxido com bactéria; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).









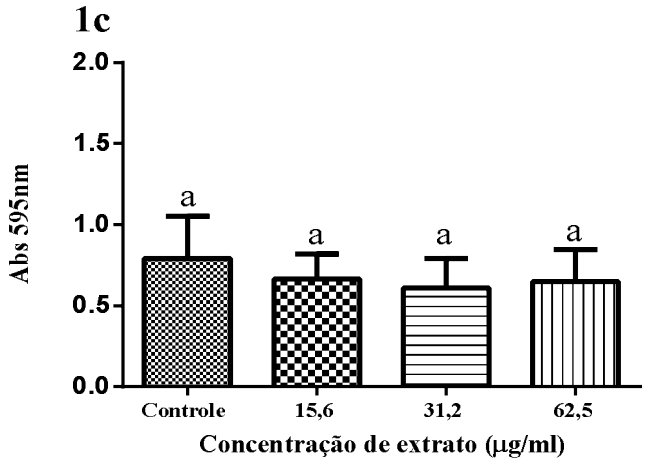


Figura 14- Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S. marcescens* MG1 (1a) extrato metanólico de cebola roxa; (1b) extrato metanólico de cebola branca; (1c) extrato amônico de cebola branca. 2 Efeito da quercetina aglicona (2a) e da quercetina 3-β-D-glicosídeo; (2b). Controle=controle crescimento bacteriano; DMSO+B= controle dimetil sulfóxido com bactéria; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).

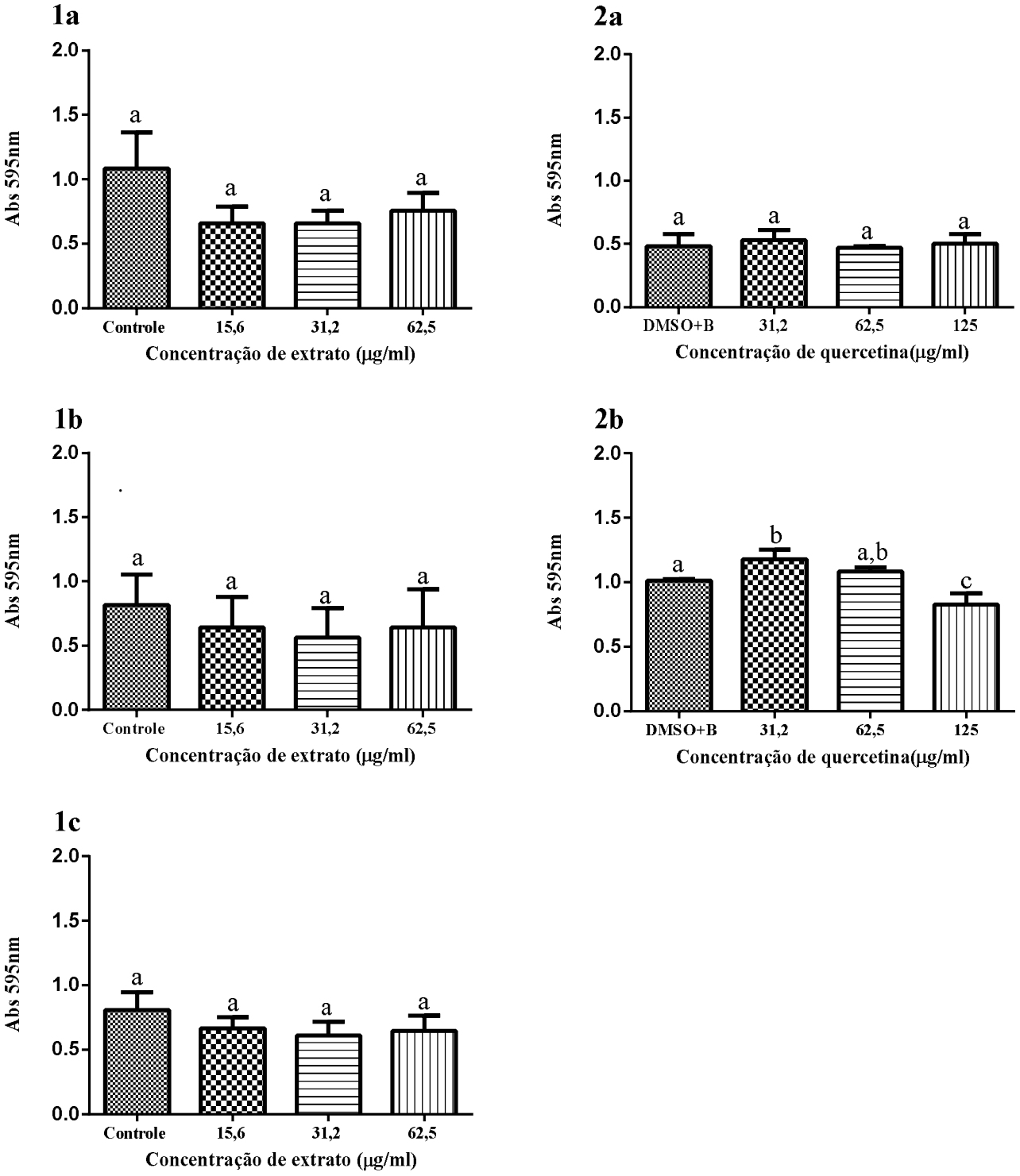
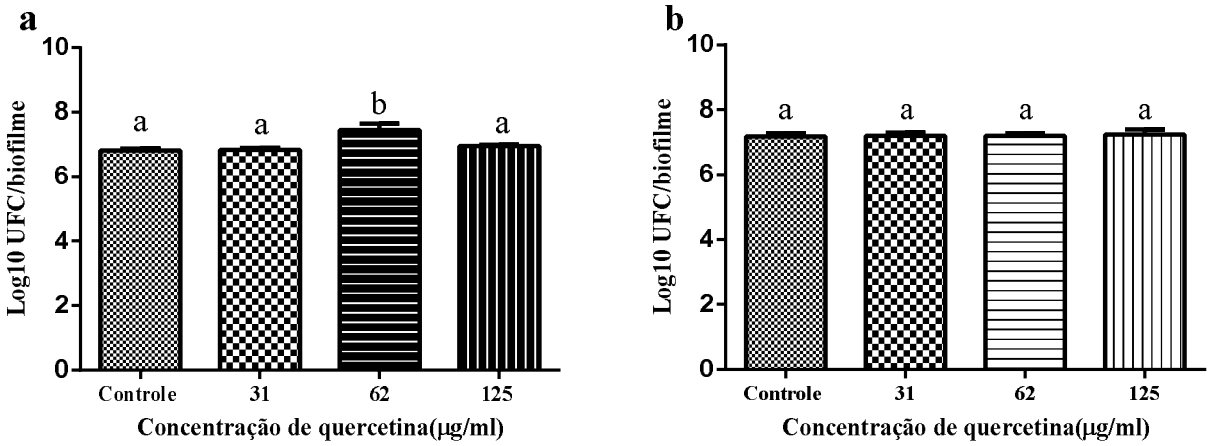


Figura 15 - Contagem de células aderidas à superfície (biofilme), obtida após 24h de incubação de *P. aeruginosa* PAO1 na presença de (a) quercetina aglicona; (b) queretina-3-beta-D-glicosideo. Controle=controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente ($p<0.05$).



Os resultados obtidos com os extratos e quercetina foram contraditórios com aqueles encontrados na literatura. O estudo de Al-Yousef e colaboradores (2017) avaliou a fração de acetato de etila da casca de cebola e seu composto majoritário quercetina 4-O-β-D glicopiranosídeo, como um possível inibidor da produção de biofilme em *P. aeruginosa.* As concentrações utilizadas por estes autores foram sub-MICs e os resultados mostraram inibição de até 64% da formação de biofilme. É de importância ressaltar que no estudo de Al-Yousef, o composto maioritário encontrado foi a quercetina 4-O-β-D glicopiranosídeo, a qual na sua estrutura possui uma molécula de açúcar ligada ao carbono 4 do anel B da estrutura da flavona, enquanto o composto glicosilado majoritário presente nos extratos de cebola avaliados na presente pesquisa, possui um açúcar ligada ao carbono 3 do anel C, levando em consideração que estas mudanças estruturais interferem na efetividade do composto como inibidor.

Um estudo de Ouyang e colaboradores avaliou o efeito da quercetina aglicona como inibidor do QS em *P. aeruginosa* PA01. Para avaliar o efeito do composto sobre a formação de biofilme, foi utilizado o mesmo método do cristal violeta em microplaca de 96 poços, testando concentrações de quercetina de 8, 16, 32 e 64 µg/ml. Os resultados mostraram que a quercetina

aglicona inibiu a produção de biofilme em todas as concentrações testadas, e que na concentração de 16 µg/ml o efeito inibitório foi semelhante ao efeito da azitromicina AZM (32 µg/ml), um antibiótico usado em tratamentos clínicos (Ouyang et al., 2016). No entanto, os resultados não apresentaram consistência, uma vez que embora se observasse uma redução estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas, na medida em que a concentração de quercetina aumentava não havia uma tendência de inibição da produção de biofilme e, pelo contrário, existia um aumento, dificultando a interpretação dos resultados e uma possível comparação com os dados obtidos na presente pesquisa.

Paczkowski e colaboradores (2017) demostraram que diferentes flavonoides, entre estes a quercetina aglicona, podiam inibir especificamente o sistema QS, por meio do antagonismo dos autoindutores frente aos reguladores de transcrição LasR e RhlR em *P. aeruginosa* PA01. As análises da relação estrutura-atividade demonstraram que a presença de dois grupos hidroxilas no anel A da flavona, um na posição 7 do anel e pelo menos um em qualquer outra posição, são necessários para uma potente inibição dos receptores LasR/RhlR. Além disso, os autores demostraram que os anéis B e C podem acomodar muitas substituições, com exceção dos grupos metila no anel B, os quais não são tolerados, já que eliminam a atividade inibitória. As análises bioquímicas revelaram que os flavonoides funcionam de forma não competitiva para prevenir a ligação dos receptores ao DNA, alterando a transcrição de promotores alvos controlados pelo QS e suprimindo a produção de fatores de virulência (Paczkowski et al., 2017). Entretanto, o estudo só avaliou compostos não glicosilados, permanecendo a questão se estas modificações funcionariam para compostos que possuem substituições de açúcares ligadas a qualquer dos anéis do flavonoide.

Os resultados do presente estudo demostraram, de forma geral, que a quercetina aglicona teve melhor atividade inibitória que a quercetina glicosilada, a forma do composto presente em maior concentração nos dois tipos de cebola estudado. Os resultados dos ensaios biológicos confirmaram que a estrutura da molécula interfere na atividade anti-QS. Esses dados permitem explicar a baixa atividade dos extratos, já que as moléculas majoritárias presentes correspondem a compostos glicosilados. Também é possível compreender a tendência de inibição com relação

ao extrato amônico de cebola roxa, já que embora tivesse uma alta quantidade de compostos glicosilados na quantificação total de compostos fenólicos presentes, também se encontrava uma fração de quercetina aglicona, a qual pelos dados anteriores e pelo presente trabalho confirmou-se como um inibidor do QS em bactérias Gram-negativas.

Esta hipótese é corroborada pelos estudos de Xiao e colaboradores (2014, 2017) que demostram que a glicosilação geralmente reduz a bioatividade dos flavonoides. Este fenômeno já foi observado para diferentes propriedades incluindo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. Tal fato é devido à afinidade de ligação às proteínas que diminui devido ao tamanho maior da molécula, a sua polaridade e estrutura, permitindo entender o comportamento dos extratos, já que ao apresentar uma molécula maior, a afinidade às proteínas receptoras poderia se tornar mais reduzida e assim, diminuir o potencial anti-QS dos mesmos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu determinar o efeito dos extratos orgânicos de cebola roxa e cebola branca e seus constituintes majoritários sobre o sistema *QS*. Foram identificados os compostos quercetina 3,4'-diglicosídeio, quercetina-3-glicosídeo e isoramnetina como os compostos predominantes nas duas cebolas. Cyanidina-3-*O*-glicosideo e quercetina aglicona também foram identificados no extrato de cebola roxa. A MIC dos extratos foi igual ou superior a 125 µg/ml (p/v) de extrato seco para todos os micro-organismos avaliados. Os extratos orgânicos de cebola mostraram pouco ou nenhum efeito sobre os fenótipos controlados pelo *QS*. Porém, os ensaios com os dois tipos de quercetina avaliados demostraram que a quercetina aglicona possui um melhor efeito inibitório frente a alguns dos fenótipos estudados, em comparação com a quercetina glicosilada. Estes resultados sugerem que a estrutura da molécula interfere na atividade antimicrobiana e anti-QS, explicando a baixa atividade dos extratos, já que as moléculas maioritárias presentes nesses correspondem a compostos fenólicos glicosilados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONIZIO, A.; KONG, K.F.; MATHEE, K. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), p 198–203. 2008 http://doi.org/10.1128/AAC.00612-07

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

AL-YOUSEF, H. M.; AHMED, A. F.; AL-SHABIB, N. A.; LAEEQ, S., KHAN, R. A.; REHMAN, M. T.; HUSAIN, F. M. Onion Peel Ethylacetate Fraction and Its Derived Constituent Quercetin 4′-O-*β*-D Glucopyranoside Attenuates Quorum Sensing Regulated Virulence and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*. 8, p 1675. 2017 http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01675

AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G.J. E. Insights into the Role of Quorum Sensing in Food Spoilage. *Journal of Food Protection*, 71(7), p 1510–1525. 2008 https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1510

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(5), p 1124–1131. 2004 https://doi.org/10.1021/jf0499525

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

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; & SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203. 2006 https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042

BEHLING, E. ; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. D. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15(3), p 285-292. 2008

BHARDWAJ, A.K.; VINOTHKUMAR, K; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 8(1): p. 68-83. 2013 https://doi.org/10.2174/1574891X11308010012

BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.;SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*. 28(7), p 755-767. 2012 https://doi: 10.1080/08927014.2012.706751

BURT S,A.; OJO FAKUNLE V,T.; WOERTMAN J.; VELDHUIZEN E,J. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *C. violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One*. 1(9): p 93414. 2014 https://doi: 10.1371/journal.pone.0093414

CHEN, F.; GAO, Y.; CHEN, X.; YU, Z.; LI, X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences*, 14(9), p.17477-17500. 2013 https://doi:10.3390/ijms140917477

CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*. (3) 9: p. 541-548. 2007 https://doi:10.1038/nchembio.2007.24

CORZO MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL , M. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*. 18(12),p 609–625. 2000 https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011

COSTA, N.D; RESENDE, G.M. Cultivo da Cebola no Nordeste. EMBRAPA Semi-árido Sistemas de Produção versão eletrônica, 3. Disponível: https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/quimica.htm. 2007. Acesso em: 5 maio. 2016.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, p 343–356. 2005 https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, *38*(2), p 99-107. 2011 https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and immunity*. 68(9), p 4839-4849. 2000 https://doi: 10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000

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

EBERHARD, A., BURLINGAME, A. L., EBERHARD, C., KENYON, G. L., NEALSON, K. H., e OPPENHEIMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. 20(9), 2444-2449. 1981 https://doi.org/10.1021/bi00512a013

EBERL, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M . Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology*. 181(6), 1703–1712 . 1999

FENG, X.; LIU, W. Variation of quercetin content in different tissues of welsh onion *(Allium fistulosum L*). *African Journal of Agricultural Research*, 6(26), p 5675-5679. 2011 https://doi.org/10.5897/AJAR10.1141

FUKUSHIMA, S.; TAKADA, N.; HORI, T.; WANIBUCHI, H. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*. 27: 100-105. 1997 https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(1997)27+<100::AID-JCB16>3.0.CO;2-R

FUQUA, C.; E.P. GREENBERG. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3(9): p. 685-95. 2002 https://doi.org/10.1038/nrm907

FUQUA, W.C.; WINANS S.C.; GREENBERG E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxRLuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriolology*. 176(2): p. 269-75. 1994 https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994

GIVSKOV, M.; DE NYS, R.; MANEFIELD, M.; GRAM, L.; MAXIMILIEN, R.; EBERL, L.; KJELLEBERG, S. Eujkaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotuc signalling. *Journal of Bacteriolology* ,*178*(22), 6618–6622. 1996 https://doi.org/10.1128/JB.178.22.6618-6622.1996

GOPU, V.; MEENA, C. K.; SHETTY, P. H. Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: in-vitro and in-silico evidence. *PloS one*, 10 (8). 2015 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684

HASSIMOTTO, N.M.A. Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora silvestre (Morus sp.). Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, 2005.

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; NG, W. L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing system FEMS *Microbiology Reviews*, 40(5), p 738–752. 2016 https://doi.org/10.1093/femsre/fuw014

HE, Z.; WANG, Q.; HU, Y.; LIANG, J.; JIANG, Y.; MA, R.; HUANG, Z. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by Streptococcus mutans and its luxS mutant strain. *International journal of antimicrobial agents*, *40*(1), 30-35. 2012 https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.016

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*. 112(9), p 1300–1307. 2003 https://doi.org/10.1172/JCI200320074

HENTZER, M.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; HEYDORN, A.; ANDERSEN, J. B.; PARSEK, M. R.; KJELLEBERG, S. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 148(1), 87-102. 2002 https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-87

HIRAKAWA, H.; TOMITA. H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 4: p. 1-14. 2013 https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00114

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

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

KALIA, V. C. Quorum sensing vs quorum quenching: A battle with no end in sight. *Springer*, 1–391. 2. 2015 https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

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

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

KWAK, J. H.; SEO, J. M.; KIM, N. H.; ARASU, M. V.; KIM, S.; YOON, M. K.; KIM, S. J. Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa L*) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(6), 1387–1391. 2017 https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.014

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

LABBATE, M.; QUECK, S. Y.; KOH, K. S.; RICE, S. A.; GIVSKOV, M. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology*, *186*(3), 692-698. 2004 https://doi.org/10.1128/JB.186.3.692-698.2004

LABBATE, M.; ZHU, H., THUNG, L.; BANDARA, R.; LARSEN, M. R.; WILLCOX, M. D; KJELLEBERG, S. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *Journal of bacteriology*, 189(7), 2702-2711. 2007 https://doi.org/10.1128/JB.01582-06

LAZDUNSKI, A.M.; VENTRE, I.; STURGIS, J.N. Regulatory Circuits and communication in Gram negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2: p. 581-592. 2004 https://doi.org/10.1038/nrmicro924

LEE K. A.; KIM K. T.; NAH S. Y.; CHUNG M. S.; CHO S. W.; PAIK H. D. Antimicrobial and antioxidative effects of onion peel extracted by the subcritical water. *Food science and biotechnology*. 20:543–548. 2011 https://doi.org/10.1007/s10068-011-0076-8

LEE, J.; & ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*; 6(1), 26-41. 2015 https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x

LOMBARD, K.; PEFFLEY, E.; GEOFFRIAU, E.; THOMPSON, L.; HERRING, A. Quercetin in onion (*Allium cepa L.*) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(6), 571–581. 2005 https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.03.02

MANEFIELD, M.; DE NYS, R.; KUMAR, N.; READ, R.; GIVSKOV, M.; STEINBERG, P.; & KJELLEBERG, S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, *145*(2), 283–291. 1999 https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-283

MANEFIELD, M.; RASMUSSEN, T. B.; HENZTER, M.; ANDERSEN, J. B.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, *148*(4), 1119-1127. 2002 https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1119

MANEFIELD, M; TURNER S.L. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* 148:3762–64. 2002 https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-3762

MARTINEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, v. 17, n. 6, p. 271-278. 2002

MCCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chrornobacteriurn violaceurn*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology*, 143(1 997), 3703–3711. 1997 https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703

MILLER, M.;BASSLER, B. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 55 (1) p. 165-199. 2001 https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165

MINEI . C.; GOMES. B.; RATTI, R.; D'ANGELIS, C. E. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Influence of Peroxyacetic Acid and Nisin and Coculture with *Enterococcus faecium* on Listeria monocytogenes Biofilm Formation. *Journal of Food Protection*. 71(3).p. 634-638. 2008 https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.3.634

MOROHOSHI, T.; KATO, M.; FUKAMACHI, K.; KATO, N.; IKEDA, T. N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *Microbiology Letters*. 279(1), p 124–130. 2008 https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x

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*. 73(20), p 6339-6344. 2007 https://doi.org/10.1128/AEM.00593-07

MUJICA PONS X.; Ajo, Cebolla, Miel y Limón. Ediciones Lea S.A. Buenos Aires. 2012.

MUSTHAFA, K. S.; RAVI A. V.; ANNAPOORANI, A.; PACKIAVATHY, I. S. V.; 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*, 56(4), p 333–339. 2010 https://doi.org/10.1159/000320185

O'CONNOR J. R. ; KUWADA N.J.; HUANGYUTITHAM V. Surface sensing and lateral subcellular localization of *WspA*, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Molecular Microbiology*. 86:720–9. 2012 https://doi.org/10.1111/mmi.12013

OLIVEIRA, B. D. A.; RODRIGUES, A. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; PINTO, U. M. Microbial control and quorum sensing inhibition by phenolic compounds of acerola (*Malpighia emarginata*). *International Food Research Journal*. 24(5), p 2228–2237.

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

OUYANG, J., SUN, F.; FENG, W.; SUN, Y.; QIU, X.; XIONG, L.; CHEN, Y. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*.. *Journal of applied microbiology*. *120*(4),p 966-974. 2016 https://doi.org/10.1111/jam.13073

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

PACZKOWSKI, J. E.; MUKHERJEE, S.; MCCREADY, A. R.; CONG, J. P.; AQUINO, C. J.; KIM, H.; BASSLER, B. L. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. *292*(10), p 4064-4076. 2017 https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. *2*(6). 2016 https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. 2016 https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8789-8793. 2000 https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8789

PÉREZ-GREGORIO R.M.; GONZÁLEZ-BARREIRO C.; RIALOTERO R.; SIMAL-GÁNDARA J. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. *Food Control*.22: 2052–2058. 2011 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.028

PINTO U. M.; DE SOUZA VIANA, E.; MARTINS, M. L.; & VANETTI M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*; 18(10); 1322–1327. 2007 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.005

PINTO, U.M.; PAPPAS, K.M.; WINANS, S.C. The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nature Reviews Microbiology*. 10: p. 755-765. 2012 https://doi.org/10.1038/nrmicro2882.

PINTO; U. M. *Quorum sensing* em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite. Tese (Mestrado em microbiologia agrícola) Universidade Federal de Viçosa. 2005

PLATT, T.G.; FUQUA C; What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends Microbiology*. 18(9): p. 383-7. 2010 https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.05.003

QUECÁN B.X.V.; RIVERA M.L.C.; PINTO U.M. Bioactive Phytochemicals Targeting Microbial Activities Mediated by Quorum Sensing. In *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors* (pp. 397-416). Springer, Singapore.2018 https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_19

QUEIROZ, Y. S.; BASTOS, D. H. M.; SAMPAIO, G. R.; SOARES, R. A. M.; ISHIMOTO, E. Y.; TORRES, E. A. F. S. Influência dos aditivos alimentares na atividade antioxidante in vitro de produtos de alho. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 17(3); 287-293. 2009

RAI, N.; RAI, R.; VENKATESH, K. V. Quorum sensing in competence and sporulation. In Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight .*Springer*. p. 61-64. 2015

RASCH, M.; BUCH, C.; AUSTIN, B.; SLIERENDRECHT, W. J.; EKMANN, K. S.; LARSEN, J. L.;GRAM L. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynichus mykiss, Walbaum*). *Systematic and Applied Microbiology*. 27(3); 350–359. 2004 https://doi.org/10.1078/0723-2020-00268

RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategy to combact bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9: p.117-128. 2010. https://doi.org/10.1038/nrd3013

RASMUSSEN, T. B.; MANEFIELD, M.; ANDERSEN, J. B.; EBERL, L.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*. 1229(146); 54–3237. 2018 https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3237

RASMUSSEN, T.; BJARNSHOLT T.; SKINDERSO, M.; HENTZER, M.; KRISTOFFERSEN, P.; KÖTE, M.; NIELSEN, N.; EBERL, L.; GIVSKOV, M. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System; the QSI Selector. *Journal of Bacteriology*. 187 (5); p. 1799-1814. 2005 https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005

REKHA, P.D; VASAVI, H.S; VIPIN, C; SAPTAMI, K; ARUN, A.B . A medicinal herb *Cassia alata* attenuates quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*. 64(3):231-238. 2017 https://doi.org/10.1111/lam.12710

REN, D.; SIMS J.J.; WOOD, T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone.*Letters in Applied Microbiology.* 34(4): p. 293-9. 2002 https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01087.x

RICE, S. A.; GIVSKOV, M.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* . 1(1); 23-31. 1999

RICE-EVANS, C., MILLER, N., & PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science, 2*(4), 152–159.1997 https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2

RODRIGUES, A. C.; OLIVEIRA, B. D.; SILVA, E. R. D.; SACRAMENTO, N. T. B.; BERTOLDI, M. C.; PINTO; U. M. Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). *Food Science and Technology* 36(2): 337-343. 2016 http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.0089

ROMERO, M.; ACUÑA, L.; OTERO, A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent patents on biotechnology*. 6(1); 2-12. 2012 https://doi.org/10.2174/187220812799789208

ROY, V.; ADAMS, B. L.; BENTLEY, W. E. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and microbial technology*. 49(2); 113-123. 2011 https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.001

SALINI, R.; PANDIAN, S.K. Interference of quorum sensing in urinary pathogen *Serratia marcescens* by *Anethum graveolens*. *FEMS Pathogens and Disease*.73(6). 2015 https://doi.org/10.1093/femspd/ftv038

SILVEIRA; S. M. D. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. 2012

SKANDAMIS, P.N; NYCHAS G.J. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Applied Environmental Microbiology*. 78(16): p. 5473 82. 2012 https://doi.org/10.1128/AEM.00468-12

SLIMESTAD R.; FOSSEN T.; VÅGEN I. M. Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(25), p 10067-10080. 2017 https://doi.org/10.1021/jf0712503

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of food protection*. 67(5); 1053-1070. 2004 https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.1053

STAJNER, D.; VARGA, I.S. An evaluation of the antioxidant abilities of Allium species. *Acta Biologica Szegediensis*. 47: 103-106.2003

SZABÓ, M. Á.; VARGA, G. Z.; HOHMANN, J.; SCHELZ, Z.; SZEGEDI E.; AMARAL, L.; MOLNÁR, J. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy research*. 24(5); 782-786. 2010 https://doi.org/10.1002/ptr.3010

TAN, L.Y.; YIN, W.F.; CHAN, K.G. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon*-natural food sources with anti-quorum sensing properties. *Sensors (Basel)*. 13(3) p. 3975-85. 2013 https://doi.org/10.3390/s130303975.

TASHIRO, Y.; YAWATA, Y.; TOYOFUKU, M.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and environments*. 28(1); 13-24. 2013 https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12167

TOLMACHEVA, A.A.; ROGOZHIN, E.A.; DERYABIN, D.G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants. *Acta Pharmaceutica*. 64 p. 173-18. 2014 https://doi.org/10.2478/acph-2014-0019

TRUCHADO, P.; LARROSA, M.; CASTRO-IBÁÑEZ, I.; ALLENDE, A. Plant food extracts and phytochemicals: their role as quorum sensing inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*.43(2):189-20. 2015 https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.009

TSAI, C.S.; WINANS, S.C. LuxR-type quorum-sensing regulators that are detached from common scents. *Molecular Microbiology*. 77(5): p. 1072-82. 2010 https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07279.x

VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; JAZIRI, M. EL; BAUCHER, M. Identification of catechin as one of the flavonoids from *combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(1); 243–253. 2010 https://doi.org/10.1128/AEM.01059-09

VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RASAMIRAVAKA, T.; STÉVIGNY, C.; DUEZ, P.; RAJAONSON, S.; EL JAZIRI, M. The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*.157(7). p 2120–2132. 2011 https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0

Vattem, D.A.; Mihalik, K.; Crixell, S.H.; McLean, R.J.C . Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia* 78(4):302-310. 2007 https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.009

VIAN, M. A.; MAINGONNAT, J. F.; CHEMAT, F. Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography*. 1216 (45); 7700-7707. 2009 https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.044

VIANA, E.; MARTINO CAMPOS, M. E.; REIS PONCE, A.; CUQUETTO, M.; HILARIUS.; DANTAS, V.M. C. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. *Biological Research*. 42(4) p. 427-36. 2009 https://doi.org//S0716-97602009000400004

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL, B.S. Suppression of bacterial cell–cell signalling; biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of applied microbiology*. 109(2); 515 527. 2010 https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x

WATERS, C.M.; BASSLER B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Reviews Cell Developmental Biology*. 21 p. 319-46. 2005 https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J.; SALMOND, G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 25(4), p365-404. 2001 https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x

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

WU, H.; SONG, Z.; HENTZER, M.; ANDERSEN, J. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(6), 1054-1061. 2004 https://doi.org/10.1093/jac/dkh223

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance?. *Critical reviews in food science and nutrition*; 57(9); 1874-1905. 2017 https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. (N.D.) Flavonoid glycosylation and biological benefits. *Biotechnology Advances.* 2014 https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.05.004

8 APENDICES

Apendice A. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) da quercetina aglicona e da queretina-3-beta-D-glicosideo.

	Quercetina aglicona	**Quercetina glicosilada**
***C.violaceum* ATCC 12472**	>125	>125
P.aeruginosa PAO1	>125	>125
S.marcescens MG1	>125	>125

Apendice B.

Figura 1. Curva de multiplicação para o micro-organismo *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 durante 24h de incubação. (a) Quercetina aglicona; (b) quercetina-3-beta-D-glicosideo.

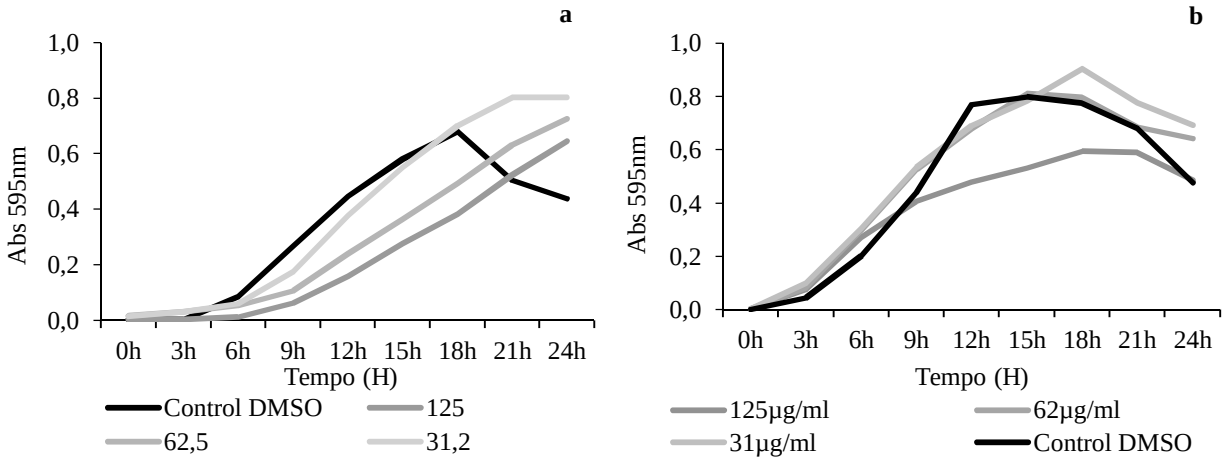


Figura 2. Curvas de multiplicação para o micro-organismo *P. aeruginosa* PAO1 durante 24h de incubação. (a) Quercetina aglicona; (b) quercetina-3-beta-D-glicosideo.

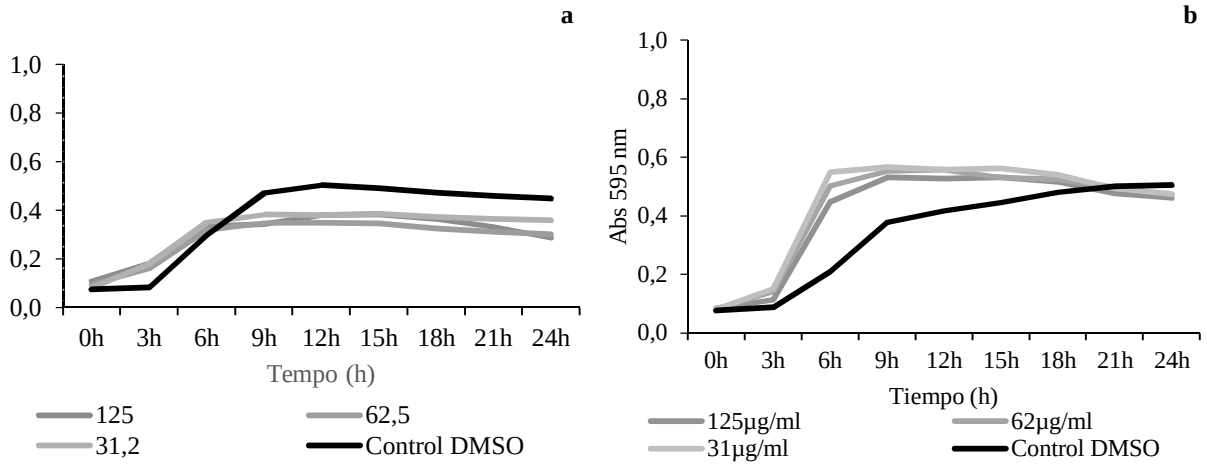
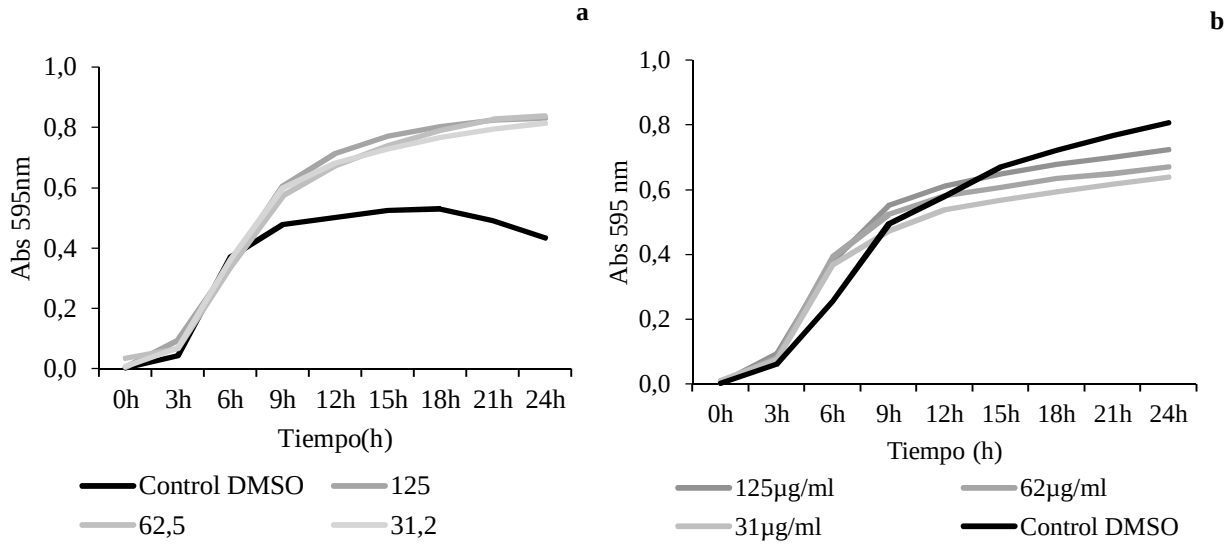



Figura 3. Curvas de multiplicação para o micro-organismo *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação. (a) Quercetina aglicona; (b) quercetina-3-beta-D-glicosideo.