

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Camila Casagrande

**PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE
VIOLACEÍNA PRODUZIDA POR *Chromobacterium*
violaceum ATRAVÉS DE MÉTODOS
COLORIMÉTRICOS**

**Santa Maria, RS
2022**

Camila Casagrande

**PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE VIOLACEÍNA
PRODUZIDA POR *Chromobacterium violaceum* ATRAVÉS DE
MÉTODOS COLORIMÉTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS),
como requisito para a obtenção do título de **Mestre
em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna
Co-orientadora: Dr^a. Monica Voos

**Santa Maria, RS
2022**

Casagrande, Camila
Padronização da quantificação de violaceína produzida
por *Chromobacterium violaceum* através de métodos
colorimétricos / Camila Casagrande.- 2022.
44 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Monica Voos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. *Chromobacterium violaceum* 2. Violaceína 3. Quorum
sensing 4. Biofilme 5. Microorganismos I. Christ Vianna
Santos, Roberto II. Voos, Monica III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, CAMILA CASAGRANDE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Camila Casagrande

**PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE VIOLACEÍNA PRODUZIDA
POR *Chromobacterium violaceum* ATRAVÉS DE MÉTODOS
COLORIMÉTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

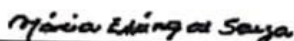
Aprovado em 09 de março de 2022:



Roberto Christ Vianna Santos, Dr.
(UFSM) (Presidente/ Orientador)



André Valle de Bairros, Dr. (UFSM)



Márcia Ebling de Souza, Dr^a.

Santa Maria, RS, 2022.

RESUMO

PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE VIOLACEÍNA PRODUZIDA POR *Chromobacterium violaceum* ATRAVÉS DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

AUTORA: Camila Casagrande

ORIENTADOR: Prof Dr. Roberto Christ Vianna Santos

A regulação *Quorum Sensing* (QS) está intimamente relacionada com o mecanismo de formação de biofilme em diversos microrganismos. Na espécie *Chromobacterium violaceum* (CV) é possível verificar esta regulação através da produção da violaceína, um pigmento de coloração violeta. O bloqueio da produção dessa proteína, tem sido utilizado como indicador da inibição do QS. Para demonstrar a inibição do QS não há necessidade de inviabilizar a bactéria, ou seja, não precisa haver a morte bacteriana. Entretanto, a quantificação de violaceína necessita de instrumentação laboratorial robusta e trabalhosa, além de exigir infraestrutura onerosa e recursos humanos especializados. Neste contexto, objetivamos avaliar a produção e inibição de violaceína, onde as leituras foram realizadas através do aplicativo Android Photometrix UVC acoplado a uma câmera endoscópica USB. Para avaliar o bloqueio da produção de violaceína, foi utilizado o ácido salicílico, um produto de origem natural, amplamente utilizado como analgésico, anti-inflamatório e antifebril. Também foram padronizadas as condições ideais de crescimento de *C. Violaceum* e a produção do pigmento. O microrganismo demonstrou melhor crescimento e produção de violaceína, quando cultivado em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24h a 37°C. Foram estabelecidas as concentrações inibitória (125 µg/ml) e bactericida (2000 µg/ml) mínima do ácido salicílico frente a CV. O ácido salicílico em concentrações sub-inibitórias foi capaz de inibir a produção de violaceína e os resultados do método tradicional de leitura foram comparados com as realizadas pelo aplicativo Android PhotoMetrix. Os resultados obtidos demonstram que não há diferença significativa, entre os métodos de leitura, indicando que essas tecnologias podem ser grandes aliadas nas pesquisas, podendo ser bastante utilizadas como método de triagem, favorecendo a descoberta de novas substâncias com potente atividade de inibição de QS e antibiofilmes.

Palavras-chave: Photometrix. Colorimetria. Bactéria. Violaceína. Ácido Salicílico.

ABSTRACT

STANDARDIZATION OF THE QUANTIFICATION OF VIOLACEIN PRODUCED BY *Chromobacterium violaceum* THROUGH COLORIMETRIC METHODS.

AUTHOR: Camila Casagrande

ADVISOR: Prof Dr. Roberto Christ Vianna Santos

The *Quorum Sensing* (QS) regulation is closely related to the biofilm formation mechanism in several microorganisms. In the *Chromobacterium violaceum* (CV) species it is possible to verify this regulation through the production of violacein, a violet colored pigment. The blocking of the production of this protein has been used as an indicator of QS inhibition. To demonstrate QS inhibition there is no need to disable the bacteria, that is, there is no need for bacterial death. However, quantification of violacein requires robust and laborious laboratory instrumentation, in addition to a demanding costly infrastructure and specialized human resources. In this context, we aimed to evaluate the production and inhibition of violacein, where the readings were performed through the Android application Photometrix UVC coupled to an endoscopic USB camera. To evaluate the blockage of violacein production, it was used salicylic acid, a product of natural origin, widely used as an analgesic, anti-inflammatory and antifebrile. The ideal conditions for *C. Violaceum* growth and pigment production were also standardized. The microorganism showed better growth and violacein production, when cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) culture medium for 24h at 37°C. The minimum inhibitory (125 µg/ml) and bactericidal (2000 µg/ml) concentrations of salicylic acid against CV were established. The salicylic acid at sub-inhibitory concentrations was able to inhibit violacein production and the results of the traditional method of reading were compared with those performed by the Android PhotoMetrix application. The results obtained demonstrate that there is no significant difference between the reading methods, indicating that these technologies can be great allies in research, and can be widely used as a screening method, favoring the discovery of new substances with potent QS inhibition activity and antibiofilms.

Keywords: Photometrix. Colorimetry. Bacterium. violacein. Salicylic acid.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Mistura de reagentes e corantes utilizados para a construção da curva de calibração..... | 27 |
| Tabela 2: Composição dos meios de cultura | 29 |
| Tabela 3. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do ácido salicílico frente a <i>C. violaceum</i> | 30 |
| Tabela 4: Parâmetros da regressão PSL | 33 |
| Tabela 5: Concordâncias entre os métodos espectrofotômetro e Photometrix | 34 |

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação mais aceita acerca da formação do biofilme. (1) Os microrganismos que nadam livremente. (2) Aderência ainda reversível a superfície. (3) Os microrganismos começam a se dividir e formam micro-colônias. (4) À medida que essas colônias crescem, elas secretam uma mistura complexa de carboidratos, proteínas e lipídios que encapsula os microrganismos. (5) Biofilme em sua maturidade com arquitetura complexa. (6)Rompimento do amontoado de células, liberando microrganismos que darão início a uma nova colonização, liberadas moléculas que causam lise celular e disseminação de matriz. Muitas células planctônicas são liberadas e podem encontrar um novo habitat 13

FIGURA 2- Resumo esquematizado das funções atribuídas ao *Quorum Sensing*14

FIGURA 3 - Modelo de QS em bactérias Gram-negativas. As AHLs (pentágonos vermelhos) são sintetizadas por proteínas tipo LuxI e detectadas por proteínas tipo LuxR. As proteínas LuxR, quando ligadas ao autoindutor, ligam-se ao promotor específico do DNA e ativam a transcrição de genes alvo (xyz). 15

FIGURA 4- Colônias características de *Chromobacterium violaceum* 16

FIGURA 5- Forma estrutural do ácido salicílico 18

FIGURA 6- Captura da tela do smartphone demonstrando as etapas da análise 20

MANUSCRITO

Figura 1- Cultivo de *C. violaceum* em diferentes meios de cultura LB (1A), BHI (1B) e MH(1C), nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação, com inoculos ajustados em escala de McFarland de 0,5 e 1. (***) indicam diferença estatística onde $p \leq 0,05$28

Figura 2- Gráficos demonstrando a inibição da violaceína frente ao ácido salicílico. (A) leitura em espectrofotômetro e (B) leitura no Photometrix. (***) indicam diferença estatística onde $p \leq 0,05$31

Figura 3- Perfil de absorção do corante e violaceína.....31

Figura 4- Histograma da intensidade da escala RGB.....32

Figura 5- Curvas de calibração (A) Espectrofotometro (B) Photometrix.....33

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2. OBJETIVOS..... | 10 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 10 |
| 2.1.1 Objetivos específicos | 10 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 3.1 BIOFILMES | 11 |
| 3.2 ETAPAS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME | 12 |
| 3.3 QS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME | 13 |
| 3.4 <i>C. violaceum</i> | 16 |
| 3.5 COMPOSTOS ANTI QS E O ÁCIDO SALICÍLICO..... | 17 |
| 3.6 PHOTOMETRIX E APLICATIVOS PARA QUANTIFICAÇÃO..... | 18 |
| 4. MANUSCRITO..... | 21 |
| 5. CONCLUSÃO GERAL..... | 38 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 41 |

APRESENTAÇÃO

Os itens **INTRODUÇÃO** e **REFERENCIAL TEÓRICO** apresentam uma detalhada revisão bibliográfica acerca dos temas abordados nesta dissertação. O presente trabalho originou um **MANUSCRITO**, que engloba os itens: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. O trabalho está formatado em conformidade com o periódico *Biuffoling*. Nos itens: **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** estão expostas as interpretações e comentários gerais a respeito dos assuntos tratados nesta dissertação. O item **REFERÊNCIAS** reporta-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e referencial teórico.

1. INTRODUÇÃO

O termo QS é entendido como um sistema de autoindução com a finalidade de controlar a multiplicação celular e regular diversas funções fisiológicas. Dessa forma, torna os microrganismos mais resistentes ao meio, pois participa da proteção contra agentes antimicrobianos, ação do sistema imune, proteção contra radiação visível dentre outros fatores. O QS está relacionado com a regulação do mecanismo de formação de biofilme em diversos microrganismos, incluindo *Chromobacterium violaceum* (CV) (ABUDOLEH; MAHASNEH, 2017; FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; OLIVEIRA, 2005).

Os biofilmes caracterizam-se por aglomerados de microrganismos recobertos por uma matriz extracelular coberta de polissacarídeos (EPS) que podem estar aderidos a uma superfície biótica ou abiótica. Essa matriz servirá como proteção para os microrganismos contra agentes físicos e químicos, como os fármacos. Dessa forma a sua resistência pode ser aumentada de 10 a 1000 vezes. Vários aspectos estão relacionados com a formação do biofilme, mas um dos principais processos é o *Quorum Sensing* (QS) (MICHELE MIGUEL et al., 2014).

A espécie *C. violaceum* (CV) é uma bactéria Gram-negativa, patógena oportunista, aeróbica facultativa que em regiões de clima quente é encontrada majoritariamente em solos e rios. Em CV é possível verificar a regulação do QS através da produção da violaceína que é um pigmento de coloração violeta (OLIVEIRA, 2005). O bloqueio da produção de violaceína tem sido utilizada como indicador anti-QS. Alguns estudos afirmam que para demonstrar a inibição do QS não há necessidade de inviabilizar a bactéria, ou seja, não precisa haver a morte bacteriana e sim a inibição da produção da cor violeta (BURT et al., 2014; CHOO; RUKAYADI; HWANG, 2006).

O bloqueio de QS e inibição da formação de biofilmes, são mecanismos complexos e ganham bastante atenção dos pesquisadores. Em diversos estudos, os produtos de origem natural destacam-se por possuírem potentes ações antibiofilme (BOLIGON et al., 2012; BOLIGON, 2013; PIANA et al., 2015; BEN YAKOUB et al., 2018; ALVES et al 2019). Nesta pesquisa utilizamos o ácido salicílico, um metabólito secundário, extraído das cascas da árvore do *Salgueiro*. Durante muito tempo foi amplamente utilizado como analgésico e anti-inflamatório e com conhecida atividade antimicrobiana (ABUDOLEH; MAHASNEH, 2017; KELLER; SURETTE, 2006).

Para avaliar a produção e inibição da violaceína, a técnica mais utilizada é a quantificação da absorvância por espectrofotômetro Espectramax. Esse equipamento é bastante robusto, entretanto tem alto custo e exige alguns cuidados no momento das análises, como por exemplo, é importante não tocar na superfície ótica das cubetas, tendo em vista que qualquer marca de impressão digital, óleo da pele ou qualquer partícula, pode interferir nas leituras, além dos problemas em relação a possíveis variações na eletricidade, do peso e tamanho elevados.

Diante disso, neste estudo, padronizamos as condições ideais de produção de violaceína e avaliamos a inibição do QS pelo ácido salicílico comparando as leituras da absorvância realizadas em espectrofotômetro com um método portátil colorimétrico *software livre PhotoMetrix UVC versão 1.0.7* acoplado a uma câmera endoscópica. Esse aplicativo, permite uma análise colorimétrica, realizada através de uma foto capturada por uma câmera endoscópica acoplada a um *smartphone*. Tendo em vista que esses equipamentos são portáteis e de baixo custo, são bastante utilizados em pesquisas de campo. Neste contexto buscamos uma alternativa de análise de inibição de QS e que possa ser utilizada como uma rotina de triagem, de modo a classificar rapidamente potenciais substâncias com atividade anti-QS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar o crescimento de *C. violaceum* em diferentes meios de cultura e comparar métodos colorimétricos para a quantificação da violaceína, além de realizar testes de inibição utilizando o ácido salicílico.

2.1.1 Objetivos específicos

- Padronizar as condições ideais para a produção de violaceína por *C. violaceum*;
- Verificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido salicílico frente a *C. violaceum*;
- Verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do ácido salicílico frente a *C. violaceum*;
- Quantificar a inibição da violaceína pelo ácido salicílico através de espectrofotometria
- Avaliar a inibição da violaceína pelo ácido salicílico através do aplicativo Android PhotoMetrix;
- Comparar os resultados da inibição obtidos através do espectrofotômetro e Photometrix.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOFILMES

Microrganismos são formas de vida microscópicas que apresentam estruturas simples e se adaptam aos mais diferentes habitats, apresentando alta capacidade de desenvolver comportamentos complexos (BONEZ, 2014). Estes podem apresentar resistência intrínseca, que é expressa naturalmente por determinada espécie, ou adquirida, a qual pode resultar da mutação ou transmissão de genes. Através da resistência os microrganismos desenvolvem maneiras de “driblar” o mecanismo de ação dos fármacos, como a modificação do alvo dos antimicrobianos, impermeabilização da membrana plasmática por alteração na conformação dos canais de porinas, alteração de proteína de ligação da penicilina, super-expressão de bombas de efluxo, inativação enzimática do fármaco, além da capacidade de formar biofilme (AHMED et al., 2018).

O biofilme caracteriza-se por apresentar uma complexa estrutura de proteínas, polissacarídeos e DNA em uma matriz polimérica extracelular. É encontrado no sistema aquático natural, tecidos biológicos, dispositivos médicos, entre outros. No biofilme, devido a proximidade das células dos microrganismos, ocorre a troca de material genético e moléculas de sinalização, o QS, apresentando um caráter heterogêneo e cada comunidade de biofilme modulando sua arquitetura em resposta à estímulos no processo interno e externo (TACCONELLI et al., 2017). Microrganismos que vivem na forma de biofilme são frequentemente mil vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica, revelando que alguns mecanismos envolvidos na resistência do biofilme diferem dos mecanismos da resistência em microrganismos em sua forma planctônica (SINGH et al., 2017).

Alguns mecanismos que conferem a resistência multifatorial dentro do biofilme são, como por exemplo, o glicocálice, que favorece a adesão do biofilme à superfície; resistência mediada por enzimas, responsáveis por degradar metais pesados e compostos fenólicos e aromáticos; heterogeneidade no metabolismo e taxa de crescimento, onde microrganismos com baixa atividade metabólica não são atingidos pelos fármacos que conseguem adentrar o biofilme (BARBOSA et al., 2014; DE ALMEIDA VAUCHER et al., 2015). Texturas variadas de superfícies, condições adequadas como temperatura, pressão, pH, composição do meio e oxigênio também influenciam diretamente no crescimento e formação do biofilme (OLIVERO-VERBEL et al., 2014).

Os microrganismos formadores de biofilme possuem a capacidade de se aderir a toda e qualquer superfície, natural ou sintética representando um potencial fonte de contaminantes tanto para indústrias quanto para saúde pública. Em indústrias, acarreta no desgaste de tubulações e dificulta a limpeza de materiais. Já em relação à área da saúde pública, colonizam dispositivos médicos como cateteres e próteses que necessitam ser substituídos frequentemente a fim de evitar infecções e, mais comumente, se formam na estrutura dentária sendo um fator determinante para o aparecimento da cárie e doenças periodontais (BONEZ, 2014; HOEFLER et al., 2006; MARCINKIEWICZ; STRUS; PASICH, 2013; TOASSI; PETRY, 2002).

Há uma grande variedade de microrganismos capazes de formar biofilme, como fungos, filamentosos e leveduriformes, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de múltiplas espécies além de alguns parasitas. Os biofilmes mais relatados são *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans* (BONEZ, 2014).

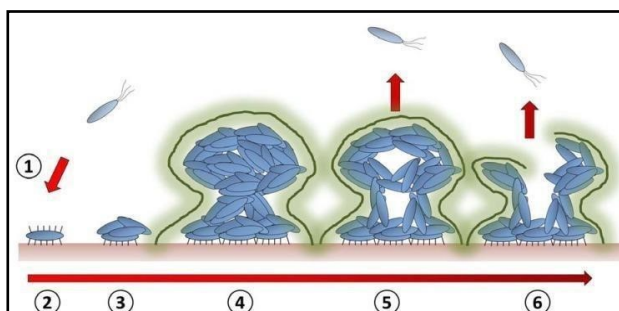
3.2 ETAPAS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

A formação do biofilme acontece em quatro estágios e tem como característica principal da primeira etapa a aproximação dos microrganismos a superfície celular, chamada de adesão. A adesão ocorre com auxílio de estruturas denominadas fímbrias e flagelos presentes na superfície celular que possuem função locomotora, conferindo a motilidade necessária para os microrganismos chegarem a base da estrutura do biofilme. Além disso, nas etapas iniciais de adesão, a comunicação entre os microrganismos denominada QS desempenha sua função sinalizadora. A adesão do biofilme acontece devido a vários tipos de forças que atuam entre a superfície inerte e a célula viva como forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (CARPENTIER; CERF, 1993).

Com o acúmulo de nutrientes essenciais aos microrganismos, as células primárias se reproduzem e dão origem a pequenas colônias, que tem a capacidade de atrair e agregar outros microrganismos, denominados secundários, que se aderem aos primários estabelecendo o biofilme. Nesta fase, o biofilme torna-se irreversível se não ocorrer uma remoção mecânica ou química (BONEZ, 2014; MICHELE MIGUEL et al., 2014).

Após a fase irreversível, acontece um aumento na densidade populacional e componentes extracelulares gerados nessa estrutura são depositados, iniciando a maturação do complexo formado, caracterizando-se por sua viscoelasticidade e aspecto gelatinoso. Com o amadurecimento do biofilme a massa que se formou pode se desprender e liberar os microrganismos que irão migrar e colonizar outras superfícies, processo esse que ocorre repetidamente e de forma bastante acelerada, colaborando para a disseminação dos microrganismos. As etapas que resultam no biofilme formado podem ser visualizadas na figura 1 (CARPENTIER; CERF, 1993; BONEZ, 2014).

FIGURA 1- Representação mais aceita acerca da formação do biofilme. (1) Os microrganismos que nadam livremente. (2) Aderência ainda reversível a superfície. (3) Os microrganismos começam a se dividir e formam micro-colônias. (4) À medida que essas colônias crescem, elas secretam uma mistura complexa de carboidratos, proteínas e lipídios que encapsulam os microrganismos. (5) Biofilme em sua maturidade com arquitetura complexa. (6) Rompimento do amontoado de células, liberando microrganismos que darão início a uma nova colonização, liberadas moléculas que causam lise celular e disseminação de matriz. Muitas células planctônicas são liberadas e podem encontrar um novo habitat.



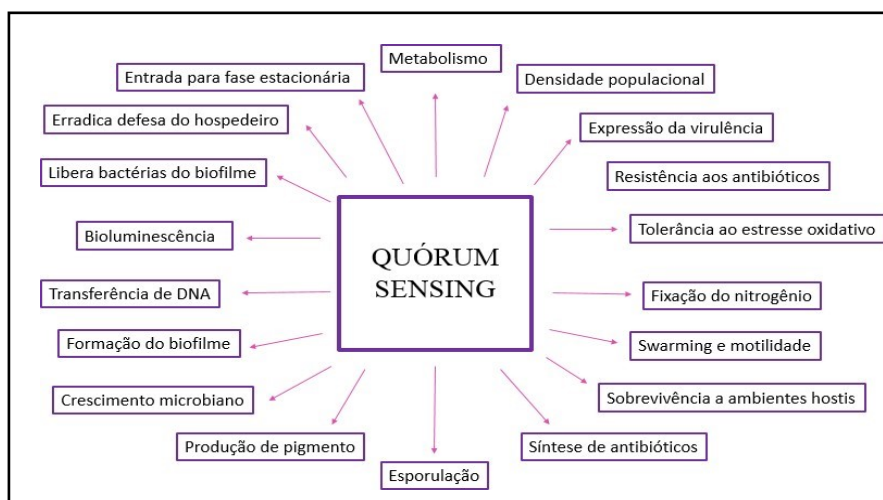
FONTE: Adaptado de GARNETT & MATTHEWS, 2012).

3.3 QS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME

A comunicação entre os microrganismos formadores de biofilme é denominada QS. O QS é a sinalização utilizada para trocar informações entre as células microbianas e é expressa quando uma determinada densidade populacional de microrganismos é atingida. Essa comunicação é mediada por moléculas sinalizadoras que possuem fluxo constante de entrada e saída na célula (KELLER; SURETTE, 2006; WILLIAMS et al., 2007). QS regula diversas

funções fisiológicas, as quais incluem, virulência, capacidade de locomoção, esporulação, formação de biofilme, luminescência, dentre outras como pode-se observar na figura 3.

FIGURA 2- Resumo esquematizado das funções atribuídas ao *Quorum Sensing*



FONTE: Adaptado de BHARDWAJ et al, (2013).

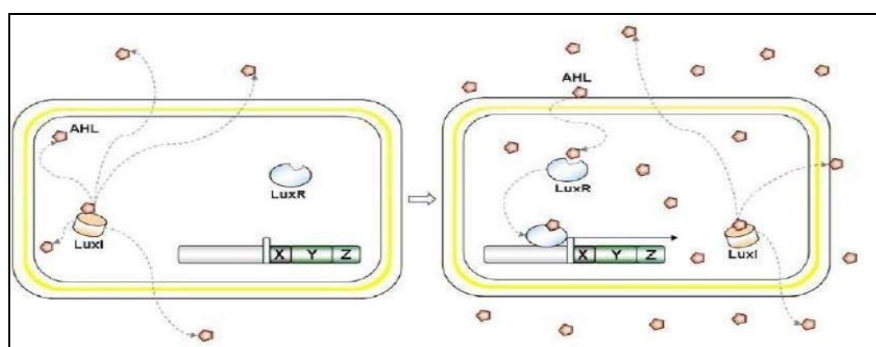
Bactérias Gram-negativas se comunicam por meio das lactonas homoserina aciladas (AHLs) e as Gram-positivas utilizam oligopeptídeos, substâncias essas que se difundem livremente através da membrana celular para o meio extracelular (OLIVERO-VERBEL et al., 2014). Desse modo, são descritas quatro categorias principais de mecanismos:

- 1) Derivados de ácidos graxos, denominados autoindutores-1 (AI-1), tendo como principal representante as (AHLs), utilizadas pelas Gram-negativas;
- 2) Furanosil borato diéster, autoindutor-2 (AI-2), gerado para comunicação intraespécie e interespécie por Gram-positivas e Gram-negativas;
- 3) Autoindutor-3 (AI-3), que possuem estrutura semelhante às catecolaminas, porém ainda não descrita, proveniente de algumas bactérias Gram-negativas;
- 4) Peptídeos de baixo peso molecular ou oligopeptídeos utilizados por bactérias Gram-negativas na comunicação interespécie das Gram-negativas (ALMEIDA; BRASIL, 2014; SOLA, 2012).

Dentre os distintos mecanismos, se tem conhecimento definido acerca de 3 classes que regulam o biofilme: AHLs (autoindutor tipo 1), oligopeptídeos e a classe LuxS/autoindutor-2 (AI-2) (KELLER; SURETTE, 2006; SOLA, 2012), sendo as AHLs com

melhor caracterização. Os componentes centrais dos sistemas QS são as proteínas LuxI e LuxR. A família LuxI sintetiza moléculas de N-acil-homoserina lactonas (AHLs) denominadas AI-1 que se acumulam no ambiente proporcionalmente ao tamanho da população celular microbiana e se ligam à proteína LuxR que é responsável por ativar a transcrição de genes alvo. O QS é um mecanismo bastante estudado, tendo como exemplos o papel substancial que exercem sobre a regulação da expressão de violaceína em *C. violaceum* e no mecanismo de bioluminescência em *Vibrio fischeri*, bactéria marinha que emite luz (OLIVERO-VERBEL et al., 2014; PINTON et al., 2010; SOLA, 2012). A figura 4 demonstra esquematicamente como ocorre a liberação e atuação dessas moléculas

FIGURA 3 - Modelo de QS em bactérias Gram-negativas. As AHLs (pentágonos vermelhos) são sintetizadas por proteínas tipo LuxI e detectadas por proteínas tipo LuxR. As proteínas LuxR, quando ligadas ao autoindutor, ligam-se ao promotor específico do DNA e ativam a transcrição de genes alvo (xyz).



FONTE: Adaptado de VIANA, E. S.,(2006).

Nesse contexto, a estrutura dos biofilmes permite uma maior proximidade entre as células microbianas e, por conseguinte, favorece a troca de sinais intracelulares e extracelulares por meio das moléculas auto indutoras que se acumulam no microambiente do biofilme. Dessa forma, sugere-se que através da atenuação do sistema de comunicação entre as bactérias, possa ocorrer a diminuição da virulência dos microrganismos. Visto que o QS é um importante via coordenadora dessa expressão gênica em patógenos humanos e sua inibição pode ter aplicabilidade no controle biológico de infecções bacterianas que dependam desse sistema de comunicação.

3.4 *C. violaceum*

Descrita pela primeira vez por Boisbaudran (1882) como uma coloração violeta formada sobre a farinha, CV é classificada como uma bactéria não fastidiosa e saprófita. É um Gram-negativo, aeróbio facultativo, patógeno oportunista em homens e animais, podendo causar lesões na pele e abscessos hepáticos, bem como sepse. É encontrada em amostras de solos e águas de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. Pertence à família Neisseriaceae, podendo se apresentar em forma de bastonetes curtos (ou coco-bacilos), móvel por possuir um único flagelo (BOISBAUDRAN, 1882; OLIVEIRA, 2005).

Sendo uma bactéria importante no ambiente, foi escolhido pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente sequenciado (BOISBAUDRAN, 1882; OLIVEIRA, 2005). Esta bactéria está relacionada ao biofilme por meio do QS, onde CV regula a expressão da violaceína, nome conferido ao pigmento proteico de cor púrpura que caracteriza suas colônias que podem ser visualizadas na figura 4.

Figura 4- Colônias características de *C. violaceum*.



Fonte: Arquivo pessoal

Existem evidências de que a produção da violaceína é ativada na presença de moléculas de N-acil homoserina lactonas acetiladas (AHLs). AHLs pertencem às famílias LuxR e LuxI, mais especificamente pela N-hexanoil-Lhomoserina lactona (HHL), tornando o QS o único mecanismo regulador gênico até agora conhecido capaz de interferir na síntese desse pigmento. Dessa forma, a violaceína atua como sinalizadora da comunicação entre bactérias, fato este, essencial na formação dos biofilmes. Além disso, a violaceína possui

também perfil antimicrobiano e antiviral, que vem sendo amplamente estudado por ser de grande interesse para fins terapêuticos (OLIVEIRA, 2005).

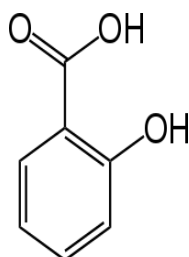
3.5 SUBSTÂNCIAS ANTI QS E O ÁCIDO SALICÍLICO

A resistência bacteriana está intimamente relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos, o que torna esses compostos frequentemente ineficazes frente ao tratamento de infecções e conseqüentemente do biofilme. Assim, estratégias que evitem a adesão e acumulação dos microrganismos vêm sendo estudadas (BONEZ, 2014; MARCINKIEWICZ; STRUS; PASICH, 2013).

Dada a importância do QS durante a patogênese bacteriana, tem se buscado substâncias denominadas anti-QS que podem atuar de várias maneiras, como pela destruição das enzimas sinalizadoras, pela síntese de anticorpos para essas moléculas ou via agentes que interrompem o QS. (OLIVERO-VERBEL et al., 2014). As furanonas halogenadas, produzidas pela macroalga marinha *Delisea pulchra*, foram as primeiras substâncias anti-QS identificadas. Podem ser encontradas substâncias anti-QS de origem vegetal como oroidina, ácido ursólico, naringenina, metil eugenol e extratos de alho, frutas comestíveis e ácido salicílico que tiveram ação frente a formação de biofilme (BONEZ, 2014; CHOO; RUKAYADI; HWANG, 2006).

Descoberto pelo médico grego Hipócrates o ácido salicílico é encontrado nas plantas do gênero *Salix*, popularmente conhecida como Salgueiro, sendo utilizado como analgésico, anti- inflamatório e antifebril desde 400 a.C. Em 1828 o seu princípio ativo, salicina, foi isolado a partir da casca do salgueiro pelo farmacêutico francês Henri Leroux e o químico italiano Raffaele Piria e nomeado em 1899 quando foi industrializado (DALGLEISH et al., 2007). É caracterizado por ser um Beta-Hidroxiácido (β -Hidroxiácido), com propriedades queratolíticas (esfoliantes) e antimicrobianas, atuando na defesa contra diversos patógenos. Possui fórmula molecular $C_7H_6O_3$ (Figura 5) e massa molar de 138,12 g/mol, apresenta-se como um pó cristalino branco, sem odor, com baixa solubilidade em água (1g/460 ml) e completamente solúvel em solventes polares, como o éter (KUMAR, 2014).

FIGURA 5- Forma *estrutural do ácido salicílico*



FONTE: PubChem, (2018)

3.6 PHOTOMETRIX E APLICATIVOS PARA QUANTIFICAÇÃO

A realização da quantificação da produção do pigmento violeta é condicionada ao espectrofotômetro, onde há a necessidade da utilização de um padrão de violaceína para a comparação dos testes, caso contrário, este equipamento fornece somente os valores de absorbância, não sendo possível a sua quantificação. Em função disso, muitos trabalhos realizam a sua “quantificação” expressando em resultado em absorbância (W. HU, T. CHEN, Q. SHI, AND X. LOU, 2010; W. ZHAO, Y. SUN, L. DAI,; 2010; LANE et al, 2010). O padrão de violaceína é escasso e custoso, o que o torna um fator limitante para as análises, além de o ser espectrofotômetro é um equipamento robusto. Tendo e vista a dificuldade laboral e a baixa portabilidade. Nesse contexto, com o desenvolvimento industrial e a demanda por métodos rápidos, baratos e principalmente portáteis, fez surgir novos *hardwares* e *softwares* que podem ser utilizados em vários campos da pesquisa. Como um dos principais exemplos de grande interesse está o desenvolvimento de *smartphones* com rápida capacidade de processamento (GALLEGOS et al, 2013; HOSSAIS et al, 2015; STEMPLE et al, 2014).

Devido a toda tecnologia disponível nesses dispositivos, várias pesquisas, foram realizadas relacionando os a utilização desses aplicativos e equipamentos comumente utilizados. Alguns estudos compararam equipamentos complexos com o desempenho do aplicativo. Lee e colaboradores (2014) e Wei e colaboradores (2013) realizaram este contraponto frente a microscópio óptico, microscópio de fluorescência e espectrômetro respectivamente. Outros equipamentos também foram contrastados com a eficácia dos dispositivos, como por exemplo, medidor de turbidez, medidor de pulsação sanguínea, sensor de interferência, sensor de pH e outros tipos diferentes de sistemas de biodeteção por imagem.

(REMER,2015; HUSSAIN, K. AHAMAD, P. NATH, 2016; D. BUENO, R. MUÑOZ, and J. L. MARTY, 2016; MEI, et al ,2016;CEVENINI et al, 2016).

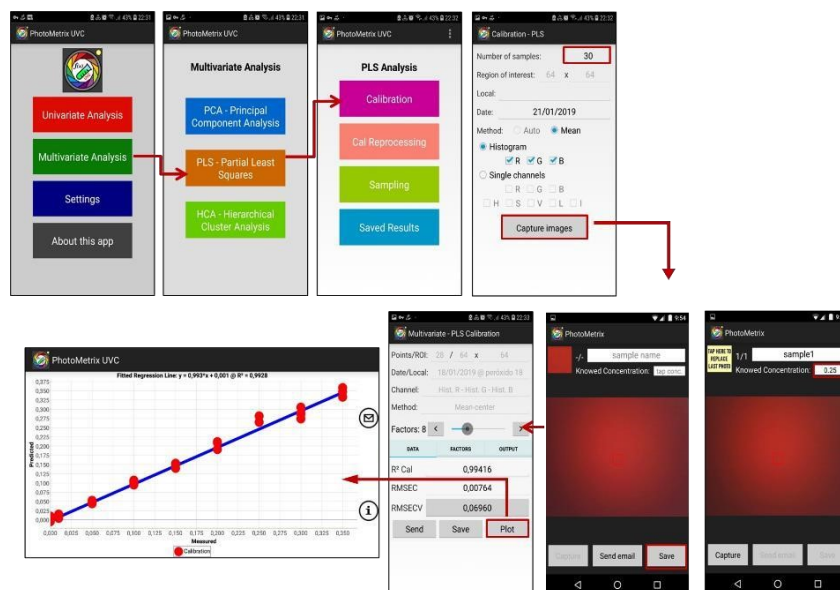
O uso de imagem digital, requer duas etapas indispensáveis: a aquisição e a digitalização (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999). A aquisição ocorre por meio de dispositivos eletrônicos, como câmeras fotográficas ou atualmente um *smartphone*. Esses dispositivos captam uma cena real tridimensional e a convertem em uma imagem analógica. Essa conversão é realizada por um sensor (CCD2 - *Charge Coupled Device* ou CMOS – *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*). Mas para que essa imagem possa ser processada no computador ou *smartphone*, a mesma deve ser digitalizada, onde cada ponto é denominado de pixel. Cada localização do pixel na imagem contém apenas um único valor numérico que representa o nível de sinal naquele ponto, sendo que esses níveis de cores podem variar de 0 a

255 (SOLOMON;BRECKON, 2011).

Em um sistema RGB (do inglês *Red, Blue and Green*), um pixel pode ser considerado um vetor, composto por três imagens monocromáticas, em que os componentes representam as intensidades de vermelho (R), verde (G) e azul (B). Utilizando informações simples das imagens, como os valores de cores baseadas no sistema RGB, consegue-se obter resultados analíticos similares àqueles adquiridos com instrumentação analítica, caracterizando esta estratégia em uma alternativa de menor custo para a realização de determinadas medidas instrumentais, como classificação de amostras baseadas em medidas colorimétricas (ASKIM; MAHMOUDI; SUSLICK, 2013).

Na literatura são reportados trabalhos que utilizam aplicativos independentes em que a determinação das imagens pode ser realizada sem controle de luminosidade e em condições ambientes, dessa forma facilitando a execução dos testes devido ao *smartphone* ser portátil e de fácil uso. Nesse sentido, cabe destacar a utilização do PhotoMetrix Pro e UVC, que são *softwares* livres utilizados em *smartphone* (HELFER,2017; HELFER,2018; BÖCK, F.C. et al, 2018). O Photometrix UVC é equipado com algumas ferramentas de análise como por exemplo, a análise multivariada (dentre elas, mínimos quadrados parciais, PLS) que tem como função construir um modelo matemático a partir de dados multivariados, para prever de forma rápida, propriedades de interesse das amostras, como parâmetros físicos ou químicos específicos. Na figura 6 está representado o esquema das etapas de funcionamento do aplicativo.

Figura 6: Capturas da tela do smartphone demonstrando as etapas da análise.



FONTE: arquivo pessoal

É um método de calibração multivariada de 1ª ordem em que as variáveis dependentes e as independentes são transformadas em variáveis latentes e, em seguida, correlacionadas entre si. O processo de calibração multivariada consiste basicamente em três fases: calibração, validação e previsão. O aplicativo photometrix já é utilizado em diversos estudos nos quais o objetivo é quantificar uma amostra que possui coloração. Dentre estes estudos pode-se encontrar dosagens de ferro em suplementação vitamínico, flúor, ph e cloro em água, determinação de fosfato em fertilizantes, determinação in situ de H_2O_2 durante os processos de fenton, foto- fenton, análise e classificação textural do solo, avaliação da estabilidade de microcápsulas de betalainas extraídas da pitaya vermelha, dentre outros (HELPER,2017; BAUMANN et al, 2019; SOUZA et al, 2019; SILVA 2018, MORAIS et al, 2017; KRIGGER, 2019).

Assim, o desenvolvimento de métodos capazes de suprir necessidades analíticas pode ser considerado um desafio, portanto neste estudo, além de padronizar, otimizar e reduzir as etapas da quantificação da produção da violaceína, inibir esse processo utilizando o ácido salicílico, fármaco amplamente conhecido como padrão para controle do QS, inovamos ao trazer um método analítico alternativo, o aplicativo Android PhotoMetrix UVC versão gratuita para Android, como forma de avaliar quantitativamente as amostras, propondo também o uso de câmera endoscópica USB e processamento de dados para tal finalidade

4. MANUSCRITO

Determinação da inibição de *Quorum Sensing* através de smartphone usando uma câmera endoscópica.

Camilla Casagrande^a, Monica Voos^b, Camilla Filippi dos Santos Alves^a, Camila Marina Verdi^a,
Juliano Barin^b e Roberto Christ Vianna Santos^a.

^a Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade federal de Santa Maria (UFSM),
Santa Maria, Brasil.

^b Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brazil.

Resumo

O QS está intimamente relacionado com a regulação do mecanismo de formação de biofilmes em diversos microrganismos. O bloqueio da produção de violaceína em *C. violaceum* tem sido utilizada como indicador da inibição do QS. Entretanto a quantificação da violaceína continua sendo um desafio, pois é realizada através de, equipamentos e insumos de alto custo. Diante disso, neste estudo, avaliamos a produção e inibição de violaceína através da comparação do método tradicional de leitura espectrofotométrica comparado com o aplicativo Android Photometrix UVC acoplado a câmera endoscópica USB. Assim, foi padronizado o crescimento de *C. violaceum* em diferentes meios de cultura e tempos de incubação. Foi avaliada a inibição do pigmento frente ao ácido salicílico. Os resultados obtidos demonstraram que *C. Violaceum* tem uma melhor produção de violaceína, quando cultivada em caldo BHI por 24 horas. Foi estabelecido uma concentração inibitória mínima do pigmento (125 µg/ml) e uma concentração bactericida mínima (2000 µg/ml). O ácido salicílico foi capaz de inibir a produção de violaceína, mesmo quando testado em concentrações sub-inibitórias. As leituras realizadas com o aplicativo quando comparadas com o método tradicional, não apresentaram diferença significativas, indicando que esta tecnologia pode ser uma grande aliada nas pesquisas que envolvem inibição de QS e biofilmes.

Palavras chave: biofilme, métodos colorimétricos, violaceína e Smartphone

Abstract

The QS is closely related to the regulation of the biofilm formation mechanism in several microorganisms. The blockade of violacein production in *C. violaceum* has been used as an indicator of QS inhibition. However, the quantification of violacein remains a challenge, as it is performed through high-cost equipment and supplies. Therefore, in this study, we evaluated the production and inhibition of violacein by comparing the traditional method of spectrophotometric Reading compared with the Android application Photometrix UVC coupled to a USB endoscopic camera. Thus, the growth of *C. violaceum* was standardized in different culture mediums and incubation times. The pigment inhibition against salicylic acid was evaluated. The results obtained showed that *C. Violaceum* has a better production of violacein when cultivated in BHI broth for 24 hours. A minimum inhibitory pigment concentration (125 $\mu\text{g/ml}$) and a minimum bactericidal concentration (2000 $\mu\text{g/ml}$) were established. Salicylic acid was able to inhibit violacein production, even when tested at sub-inhibitory concentrations. The readings performed with the application when compared to the traditional method, showed no significant difference, indicating that this technology can be a great ally in research involving QS inhibition and biofilms.

Keywords: biofilm, colorimetric methods, violacein and Smartphone

1 Introdução

O *Quorum Sensing* (QS) é um conhecido processo de comunicação entre os microrganismos formadores de biofilme. Trata-se de um sistema de autoindução com o objetivo de regular a multiplicação celular e diversas funções fisiológicas microbianas. A sinalização do QS é um mecanismo bastante estudado, tendo como exemplos o papel substancial que exercem sobre a regulação da expressão gênica do pigmento violaceína em *C. violaceum* (Remis et al. 2010; Nadal Jimenez et al. 2012).

A espécie *Chromobacterium violaceum* (CV) é uma bactéria Gram-negativa, patógena oportunista, aeróbica facultativa que em regiões de clima quente é encontrada majoritariamente em solos e rios. Em CV é possível verificar a regulação do QS através da produção da violaceína, que é um pigmento de coloração violeta (Oliveira 2005). O bloqueio da produção de violaceína tem sido utilizada como indicador da inibição do QS. Alguns estudos afirmam que para demonstrar esta atividade, não há necessidade de inviabilizar a bactéria, ou seja, não precisa haver a morte bacteriana e sim a ausência da coloração violeta (Choo et al. 2006; Burt et al. 2014).

Comumente, a avaliação da produção e inibição da violaceína é realizada a leitura de absorbância da cor em espectrofotômetro, como principal metodologia de quantificação do pigmento. A espectrofotometria consiste em um método bastante robusto, entretanto, não é um método portátil, necessita de recursos humanos especializados e requer a utilização de padrões que possuem custo de R\$ 3.300,00 cada mg. Diante disso, neste estudo comparamos, pela primeira vez, a técnica tradicional de quantificação de violaceína, com um método portátil colorimétrico, o *software livre PhotoMetrix UVC* versão 1.0.7 acoplado a uma câmera endoscópica.

2 Materiais e métodos

2.1 Microrganismo e controle positivo utilizado

Foi utilizada para o estudo a cepa padrão de *C. violaceum* (ATCC 12472) e como controle positivo de inibição utilizamos o ácido salicílico obtido comercialmente através da

empresa ALPHA QUÍMICA[®] e solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração máxima de 20%.

2.2 Preparação do inóculo

C. violaceum (ATCC 12472) foi cultivada em ágar Base Sangue (Sigma-Aldrich[□]) e incubada por 72 horas a 36°C em estufa bacteriológica.

2.3 Padronização da produção da violaceína

Este teste teve como objetivo avaliar se há diferença entre os meios de cultura em relação ao crescimento de *C. violaceum* e conseqüentemente a produção de violaceína. A produção do pigmento violeta foi quantificada em 3 diferentes meios de cultura, sendo eles *Brain Heart Infusion* (BHI), *Müller Hinton Broth* (MH) e *Luria Bertani Broth* (LB) na escala 0,5 (que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL) e 1 de MacFarland, equivalente a 3×10^8 UFC/ mL. Cada tubo conteve 2 mL de *C. violaceum* inoculado em caldo padronizado por leitura em espectrofotômetro e 1 mL de solução salina, obtendo-se um volume final de 3 mL. Os tubos foram incubados a 36°C durante 24, 48 e 72 horas e a cada período realizou-se a quantificação da produção da violaceína, retirando-se alíquotas de 200 µL, após centrifugação e adição de SDS 10% seguido de butanol. As amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda previamente estudado (585 nm). Os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e em três dias diferentes, seguindo o protocolo estabelecido por Burt e colaboradores (2014) como padrão para esse experimento.

2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de Ácido Salicílico

O teste de suscetibilidade ao ácido salicílico foi realizado através do Método de Microdiluição em Caldo (*Clinical and Laboratory Standards Institute* 2019, com pequenas modificações). Em cada poço foram adicionados 100 µL de meio BHI e posteriormente na primeira coluna 100 µL do composto, realizando diluições seriadas obtendo concentrações que variam de 2 mg mL⁻¹ a 0,00390 mg mL⁻¹. Posteriormente, adicionou-se 15 µL da suspensão bacteriana padronizada. Além disso, os controles para o meio e para a bactéria, bem como um controle com o DMSO foi realizado para cada concentração do composto. As placas foram incubadas por 24 horas a 36°C. Após, determinou-se a CIM como a ausência da coloração violeta produzida por CV e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) como a menor concentração que inibe o crescimento microbiano visível. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3) e em dias diferentes.

2.5 Ensaio de inibição do Quorum sensing

A inibição do QS foi realizada com base no protocolo descrito por Burt e colaboradores (2014), com algumas modificações. Para tal, realizou-se a quantificação de violaceína. 1 mL da concentração sub-inibitória foi adicionado a porções de 2 mL de BHI inoculado de *C. violaceum* (ajustado para D.O 600 nm) e incubado por 24h a 36°C. Cada amostra incubada a 24 horas foi centrifugada durante 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante descartado. A partir do extrato de violaceína, o sedimento foi ressuspensão em 150 µL de BHI, ao qual adicionou-se 150 µL de SDS a 10% para lise bacteriana. Após 5 minutos a temperatura ambiente, adicionou-se 675 µL de uma solução de N-butanol saturado com água, agitou-se com o auxílio de vórtex para dissolver a violaceína presente no meio e após centrifugou-se durante 5 minutos a 13000 rpm, respectivamente. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a D.O. foi medida em espectrofotômetro a 585 nm em de placas de 96 poços. O branco da leitura (BHI estéril) foi subtraída das medições. O ensaio foi realizado três vezes em três dias diferentes.

2.6 Determinação do inibidor de Quorum sensing (violaceína) por Photometrix

Em todas as análises colorimétricas, as imagens digitais foram obtidas por meio de uma câmera endoscópica (SmartCam, modelo Intelligent Endoscope, 7 mm, e resolução de 640 x 480 pixels) conectada a um *Smartphone* (modelo Nexus 5, LG, EUA) via conexão USB. A câmera USB foi posicionada lateralmente dentro da câmara contendo uma lâmpada LED branca para iluminação com controle de intensidade de luz. Um orifício no centro da peça foi utilizado para a introdução de um frasco transparente de polipropileno (tipo Eppendorf, 2 mL, Cralplast, Brasil). A câmara foi fabricada em ácido polilático usando uma impressora 3D de acordo com Helfer e colaboradores (2017).

As imagens na região de interesse (ROI) de 64 x 64 pixels foram capturadas após a reação colorimétrica e processadas por meio de um smartphone equipado com o *software* livre PhotoMetrix UVC versão 1.0.7 (GHELPER.NET Inc.), disponível na loja Google Play. O modo de calibração multivariada por regressão PLS foi selecionado no *software* usando valores de histograma RGB. Previamente à determinação de violaceína nas amostras, avaliou-se a condição experimental de luminosidade medida por lux (17,5, 20,25, 25,5, 32,25 e 37,25), os melhores resultados foram avaliados com a intensidade RGB.

O controle da intensidade luminosa da lâmpada LED foi medido em cinco valores utilizando *software* móvel gratuito (CPU-Z para Android, 164 versão 1.29, 2019), disponível no Google Play. O experimento foi realizado com três repetições (n=3). A preparação da curva de calibração para o método baseado em *smartphone* foi realizada conforme Tabela 1. Para a construção do padrão da curva de calibração foi utilizada uma mistura de reagentes e corantes com padrão.

Tabela 1: Mistura de reagentes e corantes utilizadas para a construção da curva de calibração.

| Sequencia | Reagentes | Volume (mL) | Concentração (%) |
|-----------|--------------------------------|-------------|------------------|
| 1 | Azul hidroxinaftol | 2.8 | 0.1 |
| 2 | Butanol | 15.3 | 99.4 |
| 3 | Dodecil sulfato de sódio (SDS) | 8.02 | 10 |
| 4 | Cristal violeta | 1.82 | 0.015 |

Total volume= 27.94 mL

A sequência numérica apresentada na Tabela 1 é a ordem dos reagentes acrescentados para construir a curva de calibração, após serem adicionados a um frasco de 50 mL, foram agitados manualmente por 5 min. A preparação da amostra para o método baseado em *smartphone* foi realizada conforme descrito anteriormente na seção 2.5. No entanto, na determinação da inibição do *Quorum sensing* pela Violaceína foi utilizado 500 µL do sobrenadante.

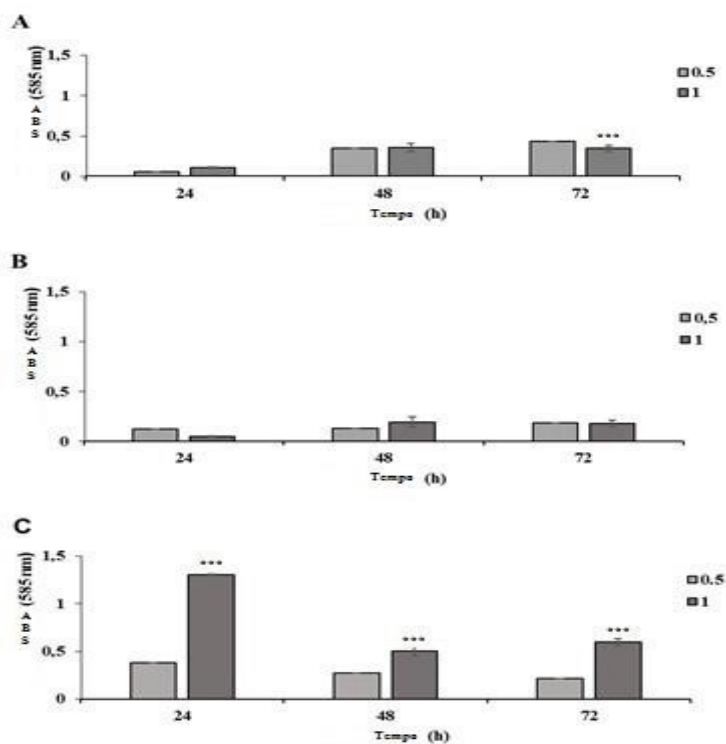
2.7 Análise estatística

Todos os dados numéricos obtidos nos ensaios descritos anteriormente foram tabulados em planilhas do *Software* Statistica 7. Os resultados de densidade óptica foram expressos em média \pm erro padrão e submetidos ao teste t (comparados com o controle positivo), considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$. Os resultados serão expressos em tabelas e gráficos. Para realização dos gráficos, utilizou-se o *software* GraphPad Prism®.

3 Resultados e discussão

Segundo o protocolo realizado por Burt e colaboradores (2014), a quantificação da produção de violaceína é feita usando caldo LB. Afim de aprimorar e validar esta metodologia comparou-se a produção do pigmento violeta em diferentes meios e percebeu-se um aumento significativo quando a cepa bacteriana é cultivada em caldo BHI. A figura 1 demonstra a produção do pigmento nos meios de cultura Caldo *Luria Bertani* (LB), *Muller Hinton* (MH) e *Brain Heart Infusion* (BHI), com inócuos ajustados nas escalas 0,5 e 1 de McFarland pelos tempos de 24, 48 e 72 horas. Observa-se diferença significativa da produção de violaceína, quando a *C. violaceum* é cultivada em caldo BHI (1C) comparados com o crescimento em LB (1A) e MH (1B), na escala 1 de McFarland, incubada durante 24 horas a 36 °C.

Figura 1- Cultivo de *C. violaceum* em diferentes meios de cultura LB (1A), MH (1B) e BHI (1C), nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação, com inóculos ajustados em escala de Mcfarland de 0,5 e 1. (***) indicam diferença estatística onde $p \leq 0,05$.



C. violaceum não é considerada uma bactéria exigente, em condição aeróbia, é capaz de crescer em meios com carboidratos simples, como a glicose, frutose, galactose e ribose, utilizando as vias de Embden-Meyerhoff, ciclos de Krebs e do glicoxilato. A cepa é capaz, ainda, de utilizar aminoácidos e lipídios como suplementos energéticos (Choo et al. 2006; Bosgelmez- Tinaz et al. 2007). O caldo BHI, por sua vez, possui peptona e infusão cérebro-coração que servem de fonte de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas, essenciais ao crescimento microbiano. Baixas concentrações de glicose, carboidrato que os microrganismos usam para a fermentação, e fontes de carbono de difícil metabolismo, tais como amido, lactose, manitol e sacarose, favoreceram a produção de violaceína, tornando o caldo BHI um meio de cultura completo para o crescimento de *C. violaceum* (Creczynski-Pasa & Antônio 2004; Wood et al.

2006). A tabela 2 compara os componentes de cada meio de cultura.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura

| BHI | MH | LB |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Infusão cérebro-coração 17,5 g/L | Infusão de carne 300,0 g/L | Triptona 10,0 g/L |
| Pepton a 10,0g/L | Caseína ácida hidrolisada 17,50 g/L | Extrato de Levedura 5,0 g/L |
| Dextros e 2,0 g/L | Amido 1,50 g/L | Cloreto de Sódio 5,0 g/L |
| Cloreto de sódio 5,0 g/L | - | - |
| Fosfato dissódico 2,5 g/L | - | - |

Com relação ao tempo de incubação, leva-se em conta a fase de latência (fase lag) que é caracterizada pela adaptação do microrganismo ao meio ambiente. Nesse período, a contagem de microrganismos não apresenta aumento de número de células devido à necessidade de síntese ou renovação de certos sistemas enzimáticos para o processamento dos nutrientes do meio de cultivo. Já na segunda fase, chamada de fase exponencial (fase log) nota-se um aumento do número de células em ritmo constante, diretamente proporcional ao tempo de geração. Nessa fase os microrganismos se encontram em plena atividade de multiplicação celular e o suprimento de nutrientes é superior as necessidades do microrganismo. É na fase exponencial que obtemos um maior número de células microbianas viáveis, o que pode ser observado durante as primeiras 24 horas de incubação em caldo BHI. A escala 1 de McFarland,

equivalente a 3×10^8 UFC/ ml indica o dobro da densidade populacional da escala 0,5, o que explica o consumo acelerado do meio de cultura, e como consequência favorecendo a produção de violaceína (Mannik et al. 2009; Burt et al. 2014; Vasavi et al. 2017).

Após ser estabelecido o meio de cultura ideal, foi realizado o teste de microdiluição em caldo, onde avaliamos a CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) da *C. violaceum* frente ao ácido salicílico. A CIM foi caracterizada pela ausência da coloração violeta produzida pela CV, já para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi observada a ausência de crescimento de *C. violaceum*. Os resultados obtidos demonstram que o ácido salicílico é capaz de inibir a produção do pigmento, assim como impedir o crescimento do microrganismo quando utilizado em concentração maior (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do ácido salicílico frente a *C. violaceum*.

| Composto | <i>Chromobacterium violaceum</i> | |
|----------------|----------------------------------|-----------------------|
| | CIM | CBM |
| Ác. Salicílico | 125 $\mu\text{g/ml}$ | 2000 $\mu\text{g/ml}$ |

CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima

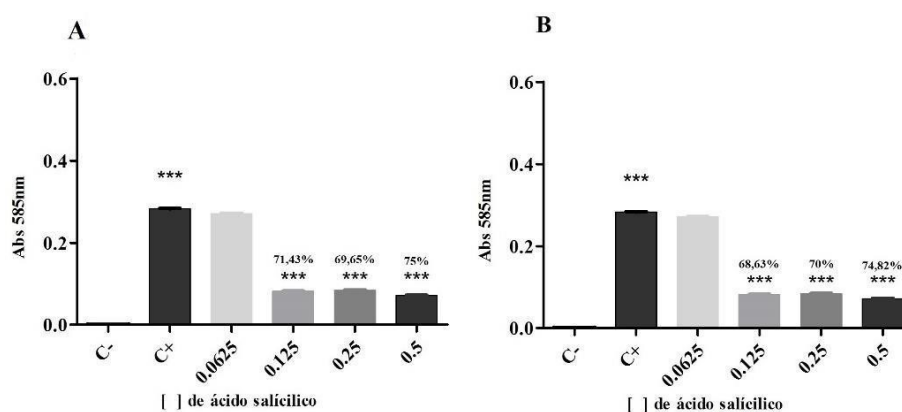
O ácido salicílico é um metabólito secundário, extraído da casca de uma árvore popularmente conhecida como Salgueiro e é utilizado como analgésico, anti-inflamatório e antifebril desde a Era Romana. (Dalglish et al. 2007) encontrado nas plantas de espécie *Salix*, é caracterizado por ser um Beta-Hidroxiácido (β -Hidroxiácido), com propriedades queratolíticas (esfoliantes) e antimicrobianas, atuando na defesa contra diversos patógenos. Possui fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ e massa molar de 138.123 g/mol, apresenta-se como um pó cristalino branco, sem odor, com baixa solubilidade em água (1 g/460 ml) e completamente solúvel em solventes polares (Chow et al. 2011).

Em concentrações sub-inibitórias o ácido salicílico, inibiu em até 75% a produção de violaceína, na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ como podemos observar nas figuras 1A (leitura em

espectrofotômetro) 1B (leitura no Photometrix). Em seu estudo Chow e colaboradores (2011) verificaram, através do uso do ácido salicílico, a inibição do biofilme formado por *P. aeruginosas*, que é Gram-negativa assim como a *C. violaceum*.

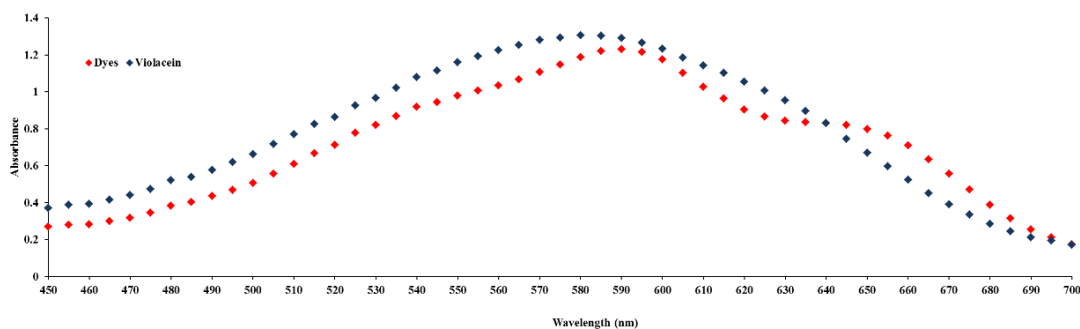
É possível observar que o ácido salicílico inibiu significativamente a produção de violaceína. As concentrações acima de 2.000 µg/ml inibiram o crescimento de *C. violaceum*, e consequentemente a produção de violaceína. Em concentrações inferiores (125 µg/mL), houve a inibição da síntese do pigmento sem inibição do crescimento microbiano, esses resultados sugerem que o ácido salicílico atue de forma inibitória sobre o sistema QS de *C. violaceum*.

Figura 2: Gráficos demonstrando a inibição da violaceína frente ao ácido salicílico. (A) leitura em espectrofotômetro e (B) leitura no Photometrix. (***) indicam diferença estatística onde $p \leq 0,05$.



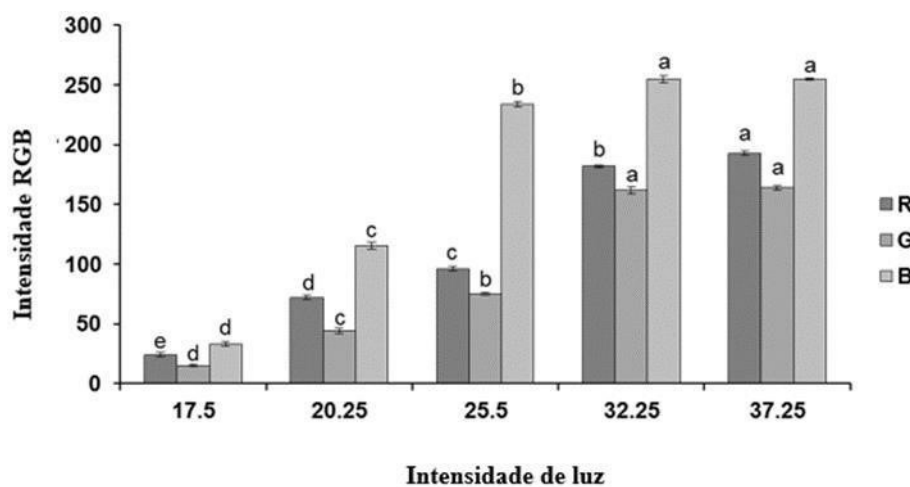
Para a análise da inibição do QS, utilizando parâmetros operacionais baseado no aplicativo, então, realizamos uma varredura de comprimento de onda de 400 a 700 nm usando o espectrofotômetro para determinar o perfil de absorção da mistura de corantes utilizado como padrão (0,1%) comparados com o pigmento violaceína (0,0625) (figura 3).

Figura 3- Perfil de absorção do corante e violaceína.



Observou-se que o perfil de absorbância é semelhante para as duas substâncias avaliadas, sendo que em 585 nm há maior intensidade para ambas. Assim, esse comprimento de onda foi fixado para as demais análises. A iluminação é o parâmetro mais significativo para a análise. Este foi avaliado em diferentes intensidades (17,5 a 37,25 lux), as menores intensidades apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os canais R, G e B. Porém a maior intensidade não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os canais (figura 4).

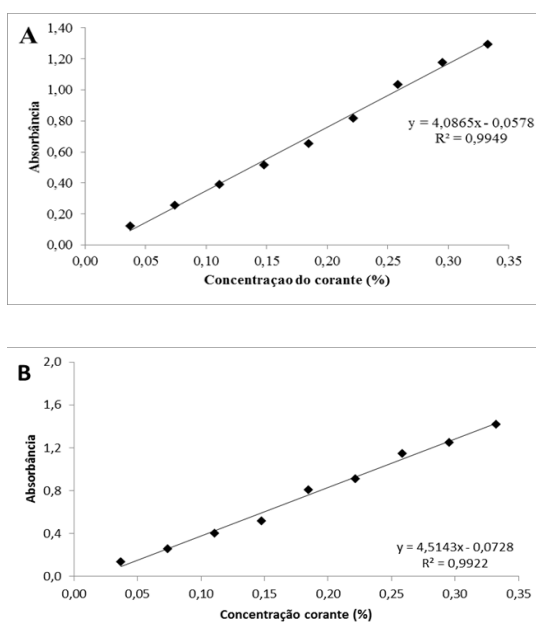
Figura 4: Histograma da intensidade da escala RGB



O RGB é um sistema de cores que origina diversas outras cores por meio das cores básicas iniciais, vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue), os valores desta escala variam do 0 (cores mais escuras) até 255 (cores mais claras) (Ajovalasit et al. 2015). De acordo com o conjunto de resultados obtidos, utilizou-se a iluminação máxima (37,25 luxes) por apresentar maior intensidade para os canais RGB. Os volumes não foram avaliados tendo em vista que o item 2.5 descreve que o volume máximo de sobrenadante extraído é de 500 uL, sendo este o mínimo utilizado para análise de UVC. Desta forma, todas as determinações requerem menor volume de amostras e geram menor quantidade de resíduos.

A figura 5 demonstra a correlação das curvas de calibração dos valores de absorvância em espectrofotômetro (A) e no Photometrix (B). Comparando as duas curvas, podemos observar que os R^2 são semelhantes, o que indica que tanto no espectrofotômetro, quanto no Photometrix, a inclinação da reta, quanto a leitura da concentração do corante, foram praticamente a mesma.

Figura 5: Curvas de calibração (A) Espectrofotometro (B)Photometrix.



Os parâmetros de regressão PSL foram avaliados de acordo com o coeficiente de determinação (R^2 Cal) que para todos os modelos apresentou boa linearidade superior a 0,99 e

não foram observadas diferenças significativas ($p > 0.05$) entre as duas curvas. Também foram calculados os erros de calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSECV) que demonstraram valores satisfatórios (tabela 4) (Neto & Fonseca 2016; Helfer et al. 2017).

Tabela 4: Parâmetros da regressão PSL

| <i>Parametros</i> | <i>SDS e butanol</i> | <i>SDS e água</i> |
|------------------------------|----------------------|-------------------|
| <i>Calibração da amostra</i> | 27 | 27 |
| <i>Previsão da amostra</i> | 15 | 15 |
| <i>Número de fatores</i> | 7 | 8 |
| <i>R²Cal</i> | 0.992 | 0.995 |
| <i>RMSEC</i> | 0.011 | 0.008 |
| <i>RMSECV</i> | 0.020 | 0.030 |

R²Cal (coeficiente de determinação), erros de calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSECV)

De acordo com diversos estudos, quando se bloqueia a produção da violaceína produzida por *C. violaceum* tem-se um indicativo da inibição da produção do biofilme e que para esse bloqueio não há necessidade de morte bacteriana, ou seja, mesmo com a bactéria viável o sistema QS é paralisado, apenas com a inibição da produção do pigmento (Bosgelmez- Tinaz et al. 2007; Borges et al. 2014; Hossain et al. 2017; Reina et al. 2019).

Na tabela 5 comparamos os valores de SD (desvio padrão) e RSD (desvio padrão relativo) das leituras de inibição de violaceína realizadas através dois métodos, e podemos observar uma concordância de 91 a 97% entre o aplicativo e espectrofotômetro. Indicando um resultado promissor em relação a utilização do aplicativo nas análises em organismos vivos.

Tabela 5 concordâncias entre os métodos espectrofotômetro e Photometrix

| <i>Espectrofotometro</i> | | <i>Photometrix</i> | | Concordancia (%) |
|--------------------------|------------|--------------------|------------|-------------------------|
| SD | RSD | SD | RSD | |
| 0.016 | 5.6 | 0.02 | 5.39 | 95.87 |
| 0.002 | 0.6 | 0.01 | 5.24 | 91.69 |
| 0.003 | 3.6 | 0.01 | 6.93 | 91.24 |
| 0.001 | 0.9 | 0.01 | 8.32 | 97.60 |
| 0.005 | 6.3 | 0.01 | 8.66 | 91.07 |

SD (desvio padrão) e RSD (desvio padrão relativo)

Helfer e colaboradores (2017) utilizaram o mesmo dispositivo para detectar adulterantes (cloreto, hipoclorito, peróxido de hidrogênio e amido) no leite. Outros estudos foram desenvolvidos utilizando aplicativos de smartphones para a detecção de substâncias alérgicas em alimentos, quantificação de enzimas, proteínas e carboidratos. Em todas as pesquisas, o aplicativo PhotoMetrix UVC demonstra ser uma atualização importante para análise química de colorimetria, apresentando resultados satisfatórios e melhorando a aplicabilidade, mobilidade e usabilidade. Além disso, a construção de uma câmera compacta, para aquisição de imagem por câmera endoscópica USB conectada ao smartphone melhora a resistência a fontes externas de interferência e, portanto, a qualidade dos resultados (Coskun et al. 2013; Dutta et al. 2017; Gee et al. 2017).

As análises químicas colorimétricas realizadas através de smartphones vêm se destacando em pesquisas de campo. Principalmente, por que esses instrumentos são de fácil acesso, baixo custo e permitem armazenamento e processamento de dados no mesmo dispositivo, além, de permitirem comunicação sem fio (via internet, *bluetooth*, comunicação de campo próximo) e conexão via USB com outros aparelhos, como por exemplos as câmeras endoscópicas. Este tipo de câmeras pode ser adquirido comercialmente por baixo custo (cerca de US\$ 10), sendo bastante utilizado para aplicações domésticas e automotivas (Neto & Fonseca 2016; Gee et al. 2017).

Em nosso estudo, pela primeira vez, comparamos o método tradicional de espectrofotometria com o *software* livre PhotoMetrix UVC versão 1.0.7 com a produção de violaceína. O QS é a comunicação mediada por moléculas, entre os microrganismos formadores de biofilmes, ou seja, uma sinalização utilizada para trocar informações entre as células microbianas e é expressa quando uma determinada densidade populacional de

microrganismos é atingida. Esta sinalização regula a produção da pigmento violaceína na *C. violaceum*, e a quantificação deste é relevante para o entendimento dos mecanismos do QS e possíveis inibidores de biofilme (Keller & Surette 2006; Williams et al. 2007).

Conclusão

A *Chromobacterium violaceum* demonstrou maior produção do pigmento violaceína em caldo BHI com inóculo ajustado na escala 1 de Macfarland. O ácido salicílico foi capaz de bloquear a produção de violaceína em até 75% nas concentrações sub-inibitórias e inibir o crescimento da bactéria em concentrações altas. O *software* PhotoMetrix UVC versão 1.0.7 mostrou-se bastante eficaz na quantificação de violaceína, não apresentando diferença significativa das leituras, quando comparadas com o espectrofotômetro. Diante disso, podemos concluir que o PhotoMetrix pode ser utilizado como método alternativo nas triagens de substâncias com possíveis atividade anti-QS e antibiofilme, facilitando as pesquisas e reduzindo os custos.

5. CONCLUSÃO GERAL

Fundamentando os objetivos propostos neste estudo e os resultados experimentais obtidos, podemos concluir que:

- A C.V demonstrou maior produção de violaceína, quando cultivada em BHI, com inculo ajustado à escala 1 de Mcfarland;
- O ácido salicílico frente à *C. violaceum* inibiu o crescimento microbiano na CIM de 125 $\mu\text{g/ml}$;
- O ácido salicílico frente à *C. violaceum* eliminou o microrganismo na CBM de 2000 $\mu\text{g/ml}$;
- O ácido salicílico foi capaz de bloquear em até 75% a produção da violaceína na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$;
- Não houve diferença significativa nas leituras realizadas pelo espectrofotômetro quando comparadas com o Photometrix;

Referências

- Abudoleh SM, Mahasneh AM. 2017. Anti-quorum sensing activity of substances isolated from wild berry associated bacteria. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 9:23–30.
- Borges A, Serra S, Cristina Abreu A, Saavedra MJ, Salgado A, Simões M. 2014. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. *Biofouling*. 30:183–195.
- Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Ugur A, Ceylan O. 2007. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Current Microbiology*.
- Burt SA, Ojo-Fakunle VTA, Woertman J, Veldhuizen EJA. 2014. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS ONE*. 9:1–6.
- Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*. 42:637–641.
- Chow S, Gu K, Jiang L, Nassour A. 2011. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. *Journal of experimental microbiology and immunology*. 15:22–29.
- Clinical and Laboratory Standards Institute C. 2017. M100- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. [place unknown].
- Coskun AF, Wong J, Khodadadi D, Nagi R, Tey A, Ozcan A. 2013. A personalized food allergen testing platform on a cellphone. *Lab on a Chip*. 13:636–640.
- Creczynski-Pasa TB, Antônio R V. 2004. Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and Molecular Research*. 3:162–166.
- Dalgleish T, Williams JMG., Golden A-MJ, Perkins N, Barrett LF, Barnard PJ, Au Yeung C, Murphy V, Elward R, Tchanturia K, Watkins E. 2007. [No Title]. *Journal of Experimental Psychology: General*. 136:23–42.
- Dominguez MA, Centurión ME. 2015. Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina. *Microchemical Journal* [Internet]. 118:110–114. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.08.002>
- Dutta S, Saikia GP, Sarma DJ, Gupta K, Das P, Nath P. 2017. Protein, enzyme and carbohydrate quantification using smartphone through colorimetric digitization technique. *Journal of Biophotonics*. 10:623–633.
- Gee CT, Kehoe E, Pomerantz WCK, Penn RL. 2017. Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test. *Journal of Chemical Education*. 94:941–945.

- Helfer GA, Magnus VS, Böck FC, Teichmann A, Ferrão MF, Da Costa AB. 2017. PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 28:328–335.
- Hossain MA, Lee SJ, Park NH, Mechesso AF, Birhanu BT, Kang J, Reza MA, Suh JW, Park SC. 2017. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Scientific Reports*. 7:1–16.
- Keller L, Surette MG. 2006. Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*. 4:249–258.
- Mannik J, Driessen R, Galajda P, Keymer JE, Dekker C. 2009. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76:46–65.
- Neto GFS, Fonseca A. 2016. *Quim. Nova.*, 39:876–881.
- Oliveira CGDE. 2005. Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum* Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*.
- Reina JC, Pérez-Victoria I, Martín J, Llamas I. 2019. A *Quorum-Sensing* Inhibitor Strain of *Vibrio alginolyticus* Blocks Qs-Controlled Phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Drugs*. 17:494.
- Remis JP, Costerton JW, Auer M. 2010. Biofilms: Structures that may facilitate cell-cell interactions. *ISME Journal*.
- Vasavi HS, Sudeep H V., Lingaraju HB, Shyam Prasad K. 2017. Bioavailability-enhanced Resveramax™ modulates quorum sensing and inhibits biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis* [Internet]. 104:64–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.015>
- Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. 2007. Look who's talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 362:1119–1134.
- Wood TK, González Barrios AF, Herzberg M, Lee J. 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*

REFERÊNCIAS

- ABUDOLEH, S. M.; MAHASNEH, A. M. Anti-quorum sensing activity of substances isolated from wild berry associated bacteria. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 23–30, 2017.
- AHMED, W. et al. Corrigendum to “Precipitation influences pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes abundance in storm drain outfalls in coastal sub-tropical waters” **Environment International**, v. 119, n. June, p. 239, 2018.
- ALMEIDA, F. A. DE; BRASIL, M. G. **Influência do quorum sensing na formação de biofilme e no perfil de expressão de proteínas de Salmonella enterica sorovar Enteritidis**. p. 69, 2014.
- ALVES, C.F.S et al. **Antimicrobial, cyto and genotoxic activities of Equisetum hyemale**. Pharmacognosy Journal, n. 6, V. 11, p. 1-9, 2019.
- ANTUNES, Adriana Almeida. **Chromobacterium violaceum: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato-PHA**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2006.
- ARGENTA S.J et al., In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Terbinafine Alone or in Combination against *Pythium insidiosum* Isolates from Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 52(2): 767–769, 2008.
- BAUMANN, Luiza et al. Uso do aplicativo PhotoMetrix no monitoramento da concentração de flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água. **Águas subterrâneas**, v. 33, n. 2, 2019.
- BARBOSA, A. et al. In Silico Approach for the Identification of Potential Targets and Specific Antimicrobials for *Streptococcus mutans*. **Adv Biosci Biotech**, v. 5, n. March, p. 373–385, 2014.
- BARBOSA D.B.M., Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon Winterianus Jawitti* (CITRONELA) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus*. Tese de doutorado (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOOTHKUMAR, 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**, v. 8, n. 1, p. 68–83, 2013.
- BOISBAUDRAN, L. D. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp. Rend. Acad. Sci**, v. 94, p. 562-563, 1882.
- BONEZ, Pauline Cordenonsi, Atividade da clorexidina sobre biofilmes microbianos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2014

BÖCK, Fernanda C. et al. Rapid determination of ethanol in sugarcane spirit using partial least squares regression embedded in smartphone. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1951-1957, 2018..

BUENO, Diana; MUNOZ, Roberto; MARTY, Jean Louis. Fluorescence analyzer based on smartphone camera and wireless for detection of Ochratoxin A. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 232, p. 462-468, 2016.

BURT, S. A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in chromobacterium violaceum and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–6, 2014.

BOLIGON, A. A. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2229–2239, 2013.

BOLIGON, A. A. et al. Potential use of *Buddleja thyrsoides* for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 71–78, 2014.

CADY, Nathaniel C. et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38492, 2012.

CARPENTIER, Brigitte; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CAVALHEIRO S.A., **Atividade in vitro da terbenafina e associações sobre *Pythium Insidiosum***. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

CEVENINI, Luca et al. Smartphone-interfaced 3D printed toxicity biosensor integrating bioluminescent “sentinel cells”. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 225, p. 249-257, 2016.

CHOO, J. H.; RUKAYADI, Y.; HWANG, J.-K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. **Letters in applied microbiology**, v. 42, n. 6, p. 637-641, 2006.

CHOW, Samuel et al. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. **Journal of experimental microbiology and immunology**, v. 15, p. 22-29, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. M07-A9. Wayne, P.A.; CLSI, 2019.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CUENCA-ESTRELLA, M., Combinations of antifungal agents in therapy: what value are they **J. Antimicrob. Chemother.** 54:854–869, 2004.

CUSHNIE, T. P. T.; HAMILTON, V. E. S.; CHAPMAN, D. G.; TAYLOR, P. W.; LAMB, A. J. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonolgalangin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1562-1567, 2007.

DALGLEISH, T. et al. Reduced specificity of autobiographical memory and depression: the role of executive control. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 136, n. 1, p. 23, 2007.

DE ALMEIDA VAUCHER, Rodrigo et al. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 2015.

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

GALLEGOS, Dustin et al. Label-free biodetection using a smartphone. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 11, p. 2124-2132, 2013.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Report**. v. 21. p. 263-277, 2004.

HELFER, Gilson A. et al. PhotoMetrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

HOEFLER, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **boletim Farmacoterapêutico**, n. 4, 2006.

HU, Wei et al. Smartphone software development course design based on android. In: **2010 10th IEEE International Conference on Computer and Information Technology**. IEEE, 2010. p. 2180-2184.

HUSSAIN, I.; AHAMAD, K.; NATH, P. Water turbidity sensing using a smartphone. **Rsc Advances**, v. 6, n. 27, p. 22374-22382, 2016.

HOSSAIN, Md Arafat et al. Combined “dual” absorption and fluorescence smartphone spectrometers. **Optics letters**, v. 40, n. 8, p. 1737-1740, 2015.

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

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: An ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 249–258, 2006.

KRIGGER, Sheila Pereira. Obtenção e aplicação de microcápsulas de betalaínas extraídas da pitaya vermelha como corante natural em iogurtes e avaliação da estabilidade através de imagens digitais. 2019.

KUMAR, Dhirendra. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, v. 228, p. 127-134, 2014.

LAMOUNIER, K. C. et al. Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012.

LANE, Nicholas D. et al. A survey of mobile phone sensing. **IEEE Communications magazine**, v. 48, n. 9, p. 140-150, 2010.

LEE, Seung Ah; YANG, Changhuei. A smartphone-based chip-scale microscope using ambient illumination. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 16, p. 3056-3063, 2014.

MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: A “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 123, n. 6, p. 309–313, 2013.

MEI, Qingsong et al. Smartphone based visual and quantitative assays on upconversional paper sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 427-432, 2016.

MICHELE MIGUEL, E. et al. Formação de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 53, 2014.

MORAIS, PA de O. et al. Uso de aplicativo para smartphones na análise de solo: classificação e análise granulométrica do solo. In: **Embrapa Arroz e Feijão-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS, 11., 2017, Santo Antônio de Goiás. Coletânea dos resumos apresentados. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2017., 2017.

NAVRUZ, Isa et al. Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 20, p. 4015-4023, 2013.

NI, N.; LI, M.; WANG, J.; WANG, B. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 65-124, 2009.

OLIVEIRA, Cristiana Gomes de et al. Regulação gênica da biossíntese de violaceína e *Quorum sensing* em *Chromobacterium violaceum*. 2005.

OLIVERO-VERBEL, J. et al. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 759–767, 2014.

PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 19, p. 1581-1601, 2009.

PINTON, R. et al. Caracterização morfo-cultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 284–293, 2010.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; ALAKOMI, H. L.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 8-18, 2005.

REMER, Itay; BILENCA, Alberto. Laser speckle spatiotemporal variance analysis for noninvasive widefield measurements of blood pulsation and pulse rate on a cameraphone. **Journal of biophotonics**, v. 8, n. 11-12, p. 902-907, 2015.

RÍOS J. L, RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

SALAW, S. O.; OGUNDARE, A. O.; OLA-SALAWU, B. B.; AKINDAHUNSI, A. A.

Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 486-492, 2011.

SAN PARK, Tu et al. Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 24, p. 4832-4840, 2013.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 53–62, 2017.

SILVA, Bruna Alves da. Adaptação de metodologia para monitoramento in situ da concentração de H₂O₂ em processos de tratamento avançados. 2018.

SOLA, M. Mecanismos de Quorum Sensing e Sua Relevância na Microbiologia de Alimentos. **Enciclopédia Biosfera**, p. 1419–1441, 2012.

SOUZA, Darliana Mello et al. Uso do aplicativo photometrix® para determinação de fosfato em fertilizantes: um recurso didático para o ensino de química analítica. **Redin-Revista Educacional Interdisciplinar**, v. 8, n. 1, 2019.

STEMPLE, C. Christopher et al. Smartphone-based optofluidic lab-on-a-chip for detecting pathogens from blood. **Journal of laboratory automation**, v. 19, n. 1, p. 35-41, 2014.

TACCONELLI, E. et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, v. 27, 2017.

TOASSI, Ramona Fernanda Ceriotti; PETRY, Paulo Cauhy. Motivation on plaque control and gengival bleeding in school children. **Revista de saude publica**, v. 36, n. 5, p. 634-637, 2002.

VAN-VUUREN, Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, p. 462-472, 2008.

VATTEM, D. A.; MIHALIK, K.; CRIXELL, S.H.; MCLEAN, R. J. C. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. **Fitoterapia**, v. 78, p. 302–310, 2007.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. Tese de Doutorado. Ph. D. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

WEI, Q. et al. Z. n. Göröcs, LA Bentolila, T. T. Wu and R. Sun, **Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone**, **ACS Nano**, v. 7, n. 10, p. 9147-9155, 2013.

WILLIAMS, P. et al. Look who's talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1483, p. 1119–1134, 2007.

ZHAO, Weiqing; SUN, Yafei; DAI, Lijuan. Improving computer basis teaching through mobile communication and cloud computing technology. In: **2010 3rd international conference on advanced computer theory and engineering (ICACTE)**. IEEE, 2010. p. V1-452-V1-454.