



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado



**Atividade antimicrobiana do extrato de *Vismia guianensis* contra
Escherichia coli *in vitro* e *in vivo***

São Luís – MA

2025

SIMONE BATISTA MUNIZ

**Atividade antimicrobiana do extrato de *Vismia guianensis* contra
Escherichia coli *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão como
requisito para obtenção de título de
Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís – MA

2025

FICHA CATALOFRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Batista Muniz, Simone.

Atividade antimicrobiana do extrato de *Vismia guianensis* contra *Escherichia coli* in vitro e in vivo /
Simone Batista Muniz. - 2025.

50 f.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Programa de Pós-graduação Em Ciências da Saúde, 2025.

1. Tenebrio Molitor. 2. Antibacteriano. 3. Biofilme.
4. Adesão. 5. Fatores de Virulência. I. Nassar Meireles
Guerra, Rosane. II. Título.

SIMONE BATISTA MUNIZ

**Atividade antimicrobiana do extrato de *Vismia guianensis* para
Escherichia coli in vitro e in vivo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

APROVADA

NÃO APROVADA

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Elizângela Araújo Pestana Motta
Centro Universitário do Maranhão

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que se faz presente em tudo que faço e por guiar meu caminho, me dando força e perseverança ao longo desta caminhada, sem Ele nada seria possível.

A minha orientadora, Rosane Nassar Meireles Guerra, por toda a paciência, ensinamentos e orientações valiosas, que foram fundamentais para o desenvolvimento no decorrer desse trabalho. Obrigada por ir além da docência, você sempre será lembrada por mim e minha família e todos que lhe tem, como uma grande cientista, mãe e incentivadora da pesquisa. Seu conhecimento e dedicação foram inspirações constantes.

Ao meu esposo, Rafael Keslley pela paciência, amor, apoio emocional e compreensão nos momentos de maior desafio. Seu incentivo e compreensão foram cruciais para que chegasse até o final desse trabalho.

A minha mãe Florisa Batista, pelas orações, conselhos e amor que não se pode medir. Você é minha base e minha motivação para seguir adiante, você me faz amar a vida e acreditar que tudo que se faz com amor e dedicação vale a pena. Ao meu pai Simeão Muniz, pelas conversas, incentivo e apoio. Essa honra é de vocês. Aos meus irmãos Rosemary, Kleyton, Jocikley e Rosinere, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim e que me ajudaram em tudo, em todos os sentidos, que a nossa união permaneça até o fim. Amo vocês.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório de Imunofisiologia, Pâmela, Régis, Danielle, Ariadina, Priscila, Nicolle, Thiago e Hilari que estiveram ao meu lado nos momentos desafiadores compartilhando conhecimento, incentivando e descobrindo meios de se reinventar. Que Deus os recompense grandemente.

A Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e a todos os professores e funcionários que contribuíram, direta ou indiretamente, para minha formação e crescimento acadêmico.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada apoio recebido foi essencial para que esta etapa fosse concluída com êxito.

Muito obrigado(a)!

“Agora sei que o Senhor salva ao seu ungido: Ele o ouvirá desde o seu santo céu, com sua força salvadora da sua destra. Uns confiam em carros, outros em cavalos, mas nós confiamos no nome do Senhor, o nosso Deus.” Salmos 20:6-7

RESUMO

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy, família Hypericaceae, conhecida popularmente como “lacre” tem sido alvo de estudos de bioprospecção devido suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Este estudo avaliou o efeito antibacteriano do extrato hidroetanólico das folhas de *V. guianensis* (EHVG) contra *Escherichia coli* *in vitro* e *in vivo*. A ação antimicrobiana *in vitro* foi avaliada pelo ensaio de microdiluição em caldo, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) sobre amostras padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25923), clínica (*E. coli* 31218) e enteropatogênica (*E. coli* EPEC 2348/69). Foi avaliado o efeito do extrato sobre os fatores de virulência como adesão e formação de biofilmes. Nos ensaios *in vivo* as larvas de *T. molitor* foram utilizadas para padronizar o inóculo letal ao serem infectadas com concentrações bacterianas que variaram de 10^1 e 10^9 UFC/ μ L. Para avaliar o efeito do EHVG na infecção letal por *E. coli* (10^5 CFU/ μ L) as larvas foram divididas em seis grupos (n=10 larvas/grupo): **Sham**-sem infecção ou tratamento, e cinco grupos infectados (*E. coli* 10^5 UFC/ μ L) e tratados por via intracelômica (ic – 10 μ L) da seguinte forma: Controle: recebeu PBS; MERO: tratado com Meropenem (0,625 μ g/mL); EHVG^{1/2} - tratado com o extrato na concentração correspondente a metade do valor de CIM (62,5 μ g/mL); EHGV - tratado com a concentração correspondente ao valor da CIM (125 μ g/mL) e EHVG2 - tratado com a concentração de 2x CIM (250 μ g/mL). A amostra padrão foi a mais sensível ao tratamento com EHVG (CIM de 125 μ g/mL) enquanto as demais culturas apresentaram CIM variando entre 500 μ g/mL (EPEC 2348/69) e 1000 μ g/mL (*E. coli* -31218). A CBM foi semelhante para todas as amostras (1000 μ g/mL) e a razão entre CBM/CIM indicou ação bactericida para o extrato. O EHVG reduziu a biomassa e a viabilidade quanto a adesão, biofilmes pré-formado e biofilmes formado para todas as amostras bacterianas testadas,. Nos ensaios *in vivo* o EHVG prolongou a vida das larvas de *T. molitor* infectadas letalmente com *E. coli*, sendo que melhor resultado ocorreu no grupo tratado com a maior dose (EHVG2). Concluímos que o tratamento com EHVG é capaz de aumentar sobrevida das larvas letalmente infectadas devido sua ação bactericida e sua capacidade de inibir os fatores de virulência em diferentes amostras de *E. coli*.

PALAVRAS-CHAVE: *Tenebrio molitor*; Antibacteriano; Biofilme; Adesão; Fatores de virulência, *E. coli* enteropatogênica.

ABSTRACT

Vismia guianensis (Aubl.) Choisy, from the Hypericaceae family and popularly known as "lacre," has been the focus of bioprospecting studies due to its antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. This study investigated the antibacterial activity of *Vismia guianensis* leaf extract (EHVG) against *Escherichia coli* both *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* evaluation determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against a standard strain of *Escherichia coli* (ATCC 25923), a clinical isolate (*E. coli* 31218), and an enteropathogenic strain (EPEC 2348/69). Additionally, the impact of EHVG on virulence factors, including adhesion and biofilm formation, was assessed. *In vivo* experiments used *T. molitor* larvae to standardize the lethal inoculum, exposing them to *E. coli* concentrations ranging from 10^{10} to 10^9 CFU/mL. To investigate the effects of EHVG on lethally infected larvae, the larvae were divided into six groups (n=10 per group): Sham – without infection or treatment, and five infected groups treated via intracelomic injection (ic – 10 μ L) as follows: Control – received PBS; MERO – treated with Meropenem (0.625 μ g/mL); EHVG^{1/2} – treated with half the MIC value (62.5 μ g/mL); EHVG – treated with the MIC concentration (125 μ g/mL), and EHVG2 – treated with twice the MIC concentration (250 μ g/mL). The standard strain *E. coli* ATCC 25922 showed the highest sensitivity to EHVG (MIC of 125 μ g/mL), while other strains exhibited MIC values ranging from 500 μ g/mL (EPEC 2348/69) to 1000 μ g/mL (*E. coli* 31218). MBC values were consistent across all tested strains (1000 μ g/mL), and the MBC/MIC ratio indicated bactericidal activity. EHVG effectively reduced biomass and viability, impacting adhesion, preformed biofilms, and formed biofilms. *In vivo*, EHVG treatment prolonged the survival of *T. molitor* larvae lethally infected with *E. coli*, with the most significant effect observed at the highest dose (EHVG2). In conclusion, EHVG enhances the survival of lethally infected larvae due to its bactericidal properties and the inhibitory effects on virulence factors in various *E. coli* strains.

Keywords: *Tenebrio molitor*; Antibacterial; Biofilm; Adhesion; virulence factors; enteropathogenic *E. coli*.

SUMÁRIO

	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.OBJETIVOS	22
4.MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.RESULTADOS	27
6.DISSCUSSÃO.....	37
7.CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. (A) Estrutura celular de <i>E. coli</i> ; (B) Micrografias de varredura de <i>E. coli</i> enteropatogênica HND-A111.....	16
Figura 2. <i>E. coli</i> . EPEC, EHEC, ETEC e EAEC	17
Figura 3. Etapas de formação do biofilme.....	19
Figura 4. Distribuição da <i>Vismia</i> no Brasil.....	20
Figura 5. Aspecto macroscópico das folhas (A) flores (B,C); e frutos (D) de <i>Vismia guianensis</i>	21
Figura 6. Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Vismia guianensis</i> , (HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSn)	27
Figura 7. Espectro de primeira ordem para a análise por injeção direta em fluxo (FIA-ESI-ITMS)	27
Figura 8. Estruturas das substâncias identificadas no extrato das folhas de <i>Vismia guianensis</i>	29
Figura 9. Atividade do EHVG na adesão considerando a biomassa e a viabilidade de amostras padrão e clínicas de <i>E. coli</i>	32
Figura 10. O tratamento com EHVG in vitro inibe a biomassa e a viabilidade dos biofilmes pré-formados de amostras padrão e clínicas de <i>E. coli</i>	33
Figura 11. Inibição biomassa e da viabilidade dos biofilmes formados de amostras padrão e clínicas de <i>E. coli</i>	34
Figura 12. Determinação do Inóculo de <i>E. coli</i> capaz de ocasionar infecção em larvas <i>T. molitor</i>	35
Figura 13. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com diferentes inóculos de <i>E. coli</i> (ATCC25922)	36
Figura 14. O tratamento com EHVG aumenta a sobrevivência das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 29922)	37

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Classificação Taxonômica do gênero <i>Vismia</i>	20
Tabela 2. Grupos experimentais de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> para determinar a toxicidade do extrato das folhas de <i>V. guianensis</i>	25
Tabela 3. Grupos de larvas <i>Tenebrio molitor</i> na infecção letal por <i>E. coli</i>	25
Tabela 4. Compostos presentes no extrato de <i>Vismia guianensis</i>	28
Tabela 5. Avaliação de toxicidade aguda de <i>Vismia guianensis</i>	30
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do EHVG em culturas diferentes culturas de <i>E. coli</i>	31

LISTA DE ABREVEATURAS

AMH	-	Ágar Muller Hinton
BFP		Bundle-forming pilus
CBM	-	Concentração Bactericida Mínima
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CMH	-	Caldo Muller Hinton
CV	-	Cristal Violeta
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EHVG	-	Extrato Hidraetanólico de <i>Vismia guianensis</i>
EAEC	-	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EHEC	-	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	-	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
ETEC	-	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
HPLCUV	-	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta
HGT	-	Transferência Horizontal de genes
LEE		Locus of enterocyte effacement
MERO	-	Meropenem
MTT	-	brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil -2,5-difenil-2H-tetrazólio
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	-	padrões associados aos patógenos
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-Buffered Saline)
SiSGen	-	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TIR		Translocated intimin receptor
CFU	-	Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas são distúrbios patológicos causados pela ação de microrganismos que invadem os tecidos, levando ao desequilíbrio da homeostase, o que pode resultar em elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Pinheiro, *et al.*, 2021). Nos últimos anos, o controle das infecções tem sido considerado um grande desafio para os sistemas de saúde mundiais, devido ao aumento de cepas multirresistentes. Esse aumento da resistência tem resultado na busca contínua por novos compostos com ação antibacteriana e antifúngica, capazes de controlar a proliferação desses microrganismos (Sousa *et al.*, 2017; Fontenele, *et al.*, 2023).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica fermentativa, mesófila e neutrofílica. Tem o formato de bacilo, podendo apresentar fímbrias na sua superfície, para facilitar a sua adesão. As bactérias dessa espécie podem se movimentar por flagelos e se organizam em colônias de tamanho médio, com aparência opaca e coloração acinzentada. Tem como habitat natural o intestino de animais vertebrados e invertebrados. Se tornam patogênicas ao ocasionarem infecções graves, sobretudo em organismos imunossuprimidos, crianças e idosos (Iamada, 2017; Boue *et al.*, 2019).

E. coli é considerada um dos principais microrganismos nas infecções de propagação hídrica em humanos. É a espécie de bactéria mais frequente na maioria dos casos de infecções urinárias, gastrointestinais, cutâneas, endodônticas, endocardites, pielonefrites. Além disso, está associada aos casos de bacteremia, meningite infantil e à sepse, sobretudo em pacientes imunossuprimidos (Anes *et al.*, 2015, Andrade *et al.*, 2021). Assim, as infecções ocasionadas por *E. coli* são, ainda hoje, um grande desafio para saúde pública (Caldorin, *et al.*, 2013; Fontenele, *et al.*, 2023).

No decorrer dos anos, *E. coli* desenvolveu resistência aos vários antimicrobianos, utilizados em larga escala na área da saúde, incluindo as tetraciclinas, estreptomicina e ampicilina (Korb *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2018; Fontenele, *et al.*, 2023). Essa resistência está associada aos vários fatores de virulência, incluindo adesão e formação de biofilme. Além disso, essas bactérias comensais são consideradas oportunistas de grande relevância epidemiológica, principalmente pela alta incidência entre os pacientes internados em unidades hospitalares (Reis *et al.*, 2018; Pontinen *et al.*, 2021). Assim, há uma busca constante por alternativas terapêuticas capazes de controlar essas infecções, pois elas apresentam grande potencial de se tornarem letais, sobretudo as causadas pelas linhagens multirresistentes (Alzamora *et al.*, 2019).

Nesse contexto, as plantas são importantes alvos na bioprospecção de novas drogas com ação antimicrobiana e entre elas, destaca-se a espécie *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, pertencente à família Hypericaceae. Essa espécie vegetal, popularmente conhecida como lacre, é frequentemente encontrada em vários estados do Brasil, sobretudo no Maranhão, onde apresenta ampla distribuição (Dias-Filho, 1995; Santos; Machado, 1998; Camelo *et al.*, 2011). Popularmente, as folhas de *V. guianensis* são usadas para tratar infecções fúngicas e bacterianas complicações da coluna vertebral, rins, bem como para atenuar dores (Lins *et al.*, 2016).

Em 2012, Silvestre *et al.*, mostraram que o óleo essencial das folhas foi efetivo com agente antimicrobiano para bactérias Gram-positivas, especialmente para aquelas do gênero *Staphylococcus*. A avaliação dos extratos obtidos das folhas de *V. guianensis* identificou a presença de antraquinonas, flavonoides, xantonas e benzofenonas entre outros compostos que foram associados a ação antimicrobiana (Camelo *et al.*, 2011; Rodrigues, 2013) e antifúngica para *Candida spp.* (Costa, 2017; Motta *et al.*, 2022; Muniz, 2022; Costa *et al.*, 2025). Entretanto, somente Oliveira (2009) demonstrou que o extrato hidroetanólico das folhas de *V. guianensis* inibiu o crescimento de *E. coli in vitro* (CIM 12,5 mg/mL), além de apresentar atividade para outras bactérias como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, sugerindo que ainda são escassos os estudos acerca da ação antibacteriana do extrato das folhas de *V. guianensis* sobre nos fatores de virulência de *E. coli*.

Com base nessas considerações o presente estudo investigou o efeito antibacteriano do extrato *V. guianensis* na infecção letal ocasionada por *Escherichia coli* em larvas de *Tenebrio molitor*, visando contribuir com dados pré-clínicos que possam direcionar a elaboração de formulações com atividade antibiótica nas infecções ocasionadas por bactérias dessa espécie. Assim, a hipótese norteadora do estudo foi que a ação antimicrobiana de *V. guianensis* pode controlar a infecção letal ocasionada por *E. coli*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Infecções bacterianas

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que bactérias responsáveis por infecções comuns, em diferentes sistemas do organismo, têm apresentado uma crescente resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, sendo que no Brasil esses percentuais chegam a atingir 14% dos pacientes internados (Lima *et al.*, 2015; Rodrigues, *et al.*, 2018).

As bactérias são encontradas em uma ampla variedade de habitats ecológicos em nosso planeta e tem a capacidade de responder aos estímulos químicos, térmicos e mecânicos. São microrganismos unicelulares e procarióticos que apresentam nucleoides (cadeia circular de

DNA sem núcleo definido). Esses microrganismos têm a capacidade de causar uma variedade de infecções, pois podem infectar seus hospedeiros usando diversas vias, incluindo o trato gastrointestinal (Persat *et al.*, 2015).

As infecções bacterianas são patologias associadas às altas taxas de internação hospitalar, especialmente, quando causadas por bactérias com elevado potencial de colonização e resistência aos antibióticos disponíveis no mercado. Cerca de 90% das infecções bacterianas oportunistas são ocasionadas por *E. coli*, sobretudo em pacientes com imunossupressão ou alterações no funcionamento do sistema imunológico, crianças e idosos (Blount, 2015; Furlan, 2021). As infecções por *E. coli* alteram o equilíbrio do organismo e podem levar à morte (Hartmann et al, 2018; Coelho *et al.*, 2021).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli, família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbico, amplamente distribuído. É o principal microrganismo anaeróbio facultativo do intestino grosso de seres humanos e em outros mamíferos de homeotérmicos. Grande parte das cepas de *E. coli* raramente causam doenças em indivíduos saudáveis, mesmo sendo abundantes na região do cólon. Entretanto, há também diversas cepas de *E. coli* que são patogênicas (Gomes, *et al.*, 2016; Asgari et al, 2023).

Os fatores de virulência presentes em *E. coli* incluem adesão, formação de biofilme e produção de adesinas, que são moléculas essenciais para a colonização e formação do biofilme, classificadas em fímbrias do tipo 1, P e S, proteínas transportadoras e adesinas Afa/Dr. Além disso, essas bactérias apresentam antígenos capsulares ácido-polissacarídeos (K), ação inibidora sobre a fagocitose e sistemas de captação de ferro, que permitem o armazenamento de ferro necessário à sua proliferação (Poirel *et al.*, 2018). Durante a infecção, *E. coli* secreta toxinas (α -hemolisina e fator necrosante citotóxico do tipo 1), que destroem as células dos hospedeiros e propiciam sua multiplicação. As toxinas de *E. coli* participam também da instalação e evolução dos biofilmes, tornando os resistentes aos antibióticos convencionais e à resposta imune dos hospedeiros (De Souza *et al.*, 2018; Guerra *et al.*, 2019).

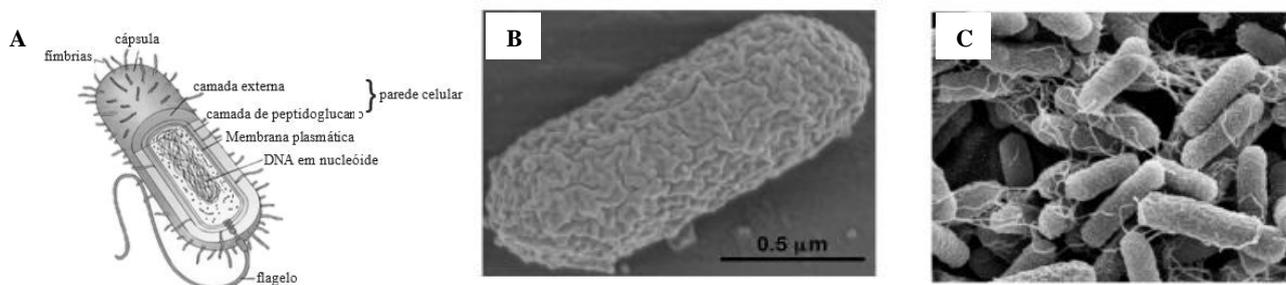


Figura 1. (A) Estrutura celular de *E. coli*; (B) Micrografias de varredura de *E. coli* (REL606), com uma morfologia típica em bastonete *E. coli* O119; (C) *E. coli* enteropatogênica HND A111, (Blount, 2015; Bombardi, 2017).

A resistência de *E. coli* aos antibióticos é crescente e preocupante, pois representa um desafio significativo para a saúde mundial. Essa resistência está relacionada ao aparecimento de novas mutações genéticas espontâneas ou devido a aquisição de genes de resistência via transferência horizontal de genes (HGT - horizontal gene transfer), por conjugação, transformação e transdução (Blount, *et al.*, 2015; Poirel, *et al.*, 2018). Esses mecanismos conferem à *E. coli* uma gama de estratégias para resistir a diversas classes de antibióticos disponíveis no mercado.

Entre os principais fatores de virulência há também a produção de enzimas como as β -lactamases, que inativam a ação dos antibióticos β -lactâmicos, bloqueando sua ação. Há, ainda, as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e as carbapenemases capazes de tornarem as bactérias resistentes aos antibióticos de amplo espectro. Outros mecanismos de virulência incluem as enzimas DNA girase e topoisomerase IV que modificam os alvos moleculares dos antibióticos, sobretudo dos pertencentes a classe das fluoroquinolonas, tornando as bactérias menos sensíveis a ação dessas drogas. Além disso, *E. coli* pode desenvolver bombas de efluxo, que expulsam o antibiótico do interior das suas células, reduzindo a eficácia dessas drogas (Poirel, *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2014).

Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais, classificadas como *E. coli* diarreiogênicas. Essas variantes são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (Figura 2).

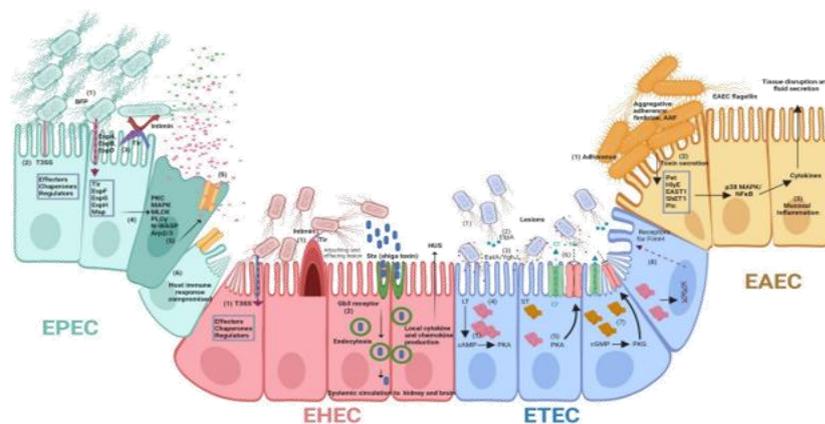


Figura 2. Variantes patogênicas de *Escherichia coli* considerando as colônias. *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) – Subgrupo das STEC, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

2.2.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

A EPEC foi a primeira variante de *E. coli* a ser descoberta e, ainda hoje, é considerada a mais versátil entre as categorias diarreio gênicas. Está, intrinsecamente, associada aos surtos de diarreia em berçários e creches, além de ser uma das principais causas de diarreia em lactentes e em crianças menores de 5 anos de idade, sobretudo, em países em desenvolvimento (Pakbin *et al.*, 2021).

As EPEC podem ser classificadas em duas subcategorias típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). As EPEC-t apresentam o gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e o plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*). Além disso, para cada uma dessas subcategorias há sorotipos (Ochoa; Contreras, 2011). As EPEC-a apresentam o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídio EAF. A interação entre EPEC e as células do hospedeiro podem ocorrer por mecanismos que incluem aderência localizada; aderência mediada pelas fímbrias BFP (*bundle-forming pilus*) e aderência codificada pelo gene plasmidial. Adicionalmente, há os sinais de transdução e a aderência promovida pela intimina (gene *eae*) (Nataro, Kaper 1998).

O subgrupo das EPEC abriga bactérias enterovirulentas, que apresentam forte tropismo por enterócitos e por causarem lesões conhecidas como A/E (*attaching and effacing* – Ligação e apagamento). Esse mecanismo de inativação dos enterócitos envolve genes localizados na região LEE (*locus of enterocyte effacement*), considerada uma ilha de patogenicidade, onde também são encontrados os genes *ler* (regulador transcricional), *esp* (proteínas do sistema de secreção do tipo III), *tir* (*translocated intimin receptor* - receptor de intimina) e o gene *eae* (*E. coli attachment-effacement* - adesina intimina). A região LEE também codifica o Sistema de

Secreção do tipo III, responsável pela injeção intramolecular de proteínas que estão associadas às lesões intestinais mais severas (Tapader *et al.*, 2019). Assim, a infecção por EPEC causa um aplainamento das vilosidades intestinais dos hospedeiros, o que resulta em má absorção dos nutrientes da dieta humana.

O diagnóstico da EPEC é realizado por coprocultura e testes complementares incluindo sorotipagem, ensaio de aderência e técnicas de biologia molecular visando a identificação e subclassificação dessas bactérias (Köhler; Dobrindt, 2011).

O aumento de microrganismos multirresistentes têm sido associado ao uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, em seres humanos e animais e na produção de alimentos, pois cria uma pressão seletiva favorável ao surgimento de cepas resistentes. Assim, a capacidade adaptativa de *E. coli* não apenas se beneficia dessas condições gerando resistência, como também favorece a disseminação da resistência para outras bactérias, ampliando o problema devido ao contexto interespecie (Bezerra *et al.*, 2017; Kant, *et al.*, 2013). Além disso, fatores de virulência como adesão e formação de biofilme são importantes na resistência e permanência das infecções por *E. coli* (Manitz *et al.*, 2014; Gauthier *et al.*, 2018).

2.2 Biofilmes bacterianos

Os biofilmes são frequentemente vistos com grande preocupação no ambiente clínico, devido à capacidade fisiológica das células microbianas encapsuladas serem resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado (Vyas, *et al.*, 2022). Essa estrutura é comumente encontrada em dispositivos médicos como implantes e cateteres, assim como em superfícies do trato respiratório e dentes, por isso, é também considerada como uma das principais causas de disseminação das infecções. Evidências estimam que aproximadamente 65% de todas as infecções bacterianas estão relacionadas à formação de biofilmes (Gloag *et al.*, 2020; Subramanian, *et al.*, 2020).

As células presentes nos biofilmes podem exibir fenótipos temporários de resistência aos antimicrobianos comerciais, o que permite que sobrevivam ao tratamento com múltiplos fármacos. Por isso, é importante desenvolver novas drogas que ajudem a combater ou inibir o crescimento dos biofilmes reduzindo a proliferação de bactérias patogênicas (Amato *et al.*, 2014; Gollan *et al.*, 2019; Abrantes *et al.*, 2022).

A adesão das bactérias na forma planctônica em determinada superfície ocorre por meio de proteínas de ligação. Uma vez aderidas, essas bactérias proliferam e produzem uma substância polissacarídica extracelular, que funciona como uma membrana protetora do

conglomerado. Após a organização estrutural do biofilme e maturação, pequenas porções desse biofilme maduro são dispersas para colonização de outros substratos (Figura 3) (Sauer *et al.*, 2022).

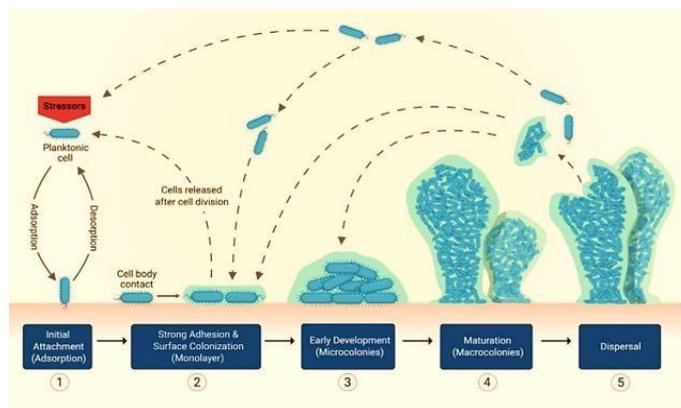


Figura 3: Etapas de formação do biofilme. Adaptado de Guzmán-Soto *et al.*, 2021.

2.3 Bioprospecção de produtos naturais com ação antibacteriana

As infecções resistentes, ou seja, as que não respondem aos antibióticos disponíveis no mercado, resultam em cerca de 700 mil mortes anuais em todo o mundo, com cerca de 35 mil dos casos registrados nos Estados Unidos e aproximadamente 23 mil no Brasil. Essa questão tem despertado o interesse e a necessidade de abordagens terapêuticas mais eficientes por parte de entidades como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas (ONU) (Marmitt *et al.*, 2015; Xavier, 2015; Oliveira *et al.*, 2020; Oliveira; Silveira, 2021). Assim, algumas espécies vegetais são consideradas como alternativas viáveis no tratamento de doenças infecciosas, devido as suas propriedades terapêuticas no tratamento de infecções ocasionadas por microrganismos resistentes (Amparo, *et al.*, 2018).

A vasta diversidade vegetal no Brasil o torna um país com grande potencial para a geração de conhecimento e desenvolvimento de produtos a partir de produtos da sua biodiversidade. A riqueza da biodiversidade enseja também em grande número de estudos sobre etnobotânica e na produção crescente de fitoterápicos, cosméticos e alimentos funcionais. Importa mencionar que cerca de 1/3 dos medicamentos são fabricados a partir de metabólitos secundários oriundos de espécies vegetais, considerando a multiplicidade de atividades que apresentam (Pironon *et al.*, 2024). Nesse contexto, *V. guianensis* surge como espécie promissora como alvo de bioprospecção.

2.4 *Vismia guianensis*

Vismia guianensis (Aubl.) é uma árvore nativa do Brasil, conhecida popularmente como "lacre". Essa espécie tem várias sinonímias, entre as quais se incluem: *Hypericum guianense* Aubl.; *Vismia acuminata* (Lam.) Pers.; *Vismia ferruginea* Kunth; *Vismia reichardtiana* (Kuntze) Ewan; *Vismia caparosa* Kunth.

A espécie vegetal *V. guianensis* tem ocorrência confirmada em vários estados brasileiros incluindo Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Goiás, Mato Grosso e Espírito Santo, indicando que essa espécie é capaz de se adaptar a diferentes domínios Fitogeográficos incluindo floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica (Figura 4) (Reflora 2025). Também já foi identificada em outros países da América do Sul incluindo Colômbia, Venezuela, Guianas e Brasil.

A Tabela 1 mostra a hierarquia taxonômica *V. guianensis* (Tala *et al*, 2013 Reflora, 2025).

Divisão:	Angiospermas
Família:	Cluseaceae
Subfamília:	Hypericoideae,
Tribo:	Vismieae
Gênero:	<i>Vismia</i>



Figura 4: Distribuição da *Vismia guianensis* no Brasil (Reflora, 2025).

As características botânicas classificam *V. guianensis* como uma espécie arbustiva e lenhosa, de porte pequeno, que pode medir de 2 a 5m de altura. Suas folhas são pecioladas, elíptica ou lanceoladas, com coloração ferrugem na parte abaxial e cor verde na parte axial. As flores dispostas em panículas terminais. Os frutos são bagas contendo sementes pequenas e secas, com cor marrom arroxeadada quando jovens e verdes quando maduros (Figura 5) (Dias-Filho, 1995; Santos; Machado, 1998; Camelo *et al.*, 2011, Barbosa *et al.*, 2021).

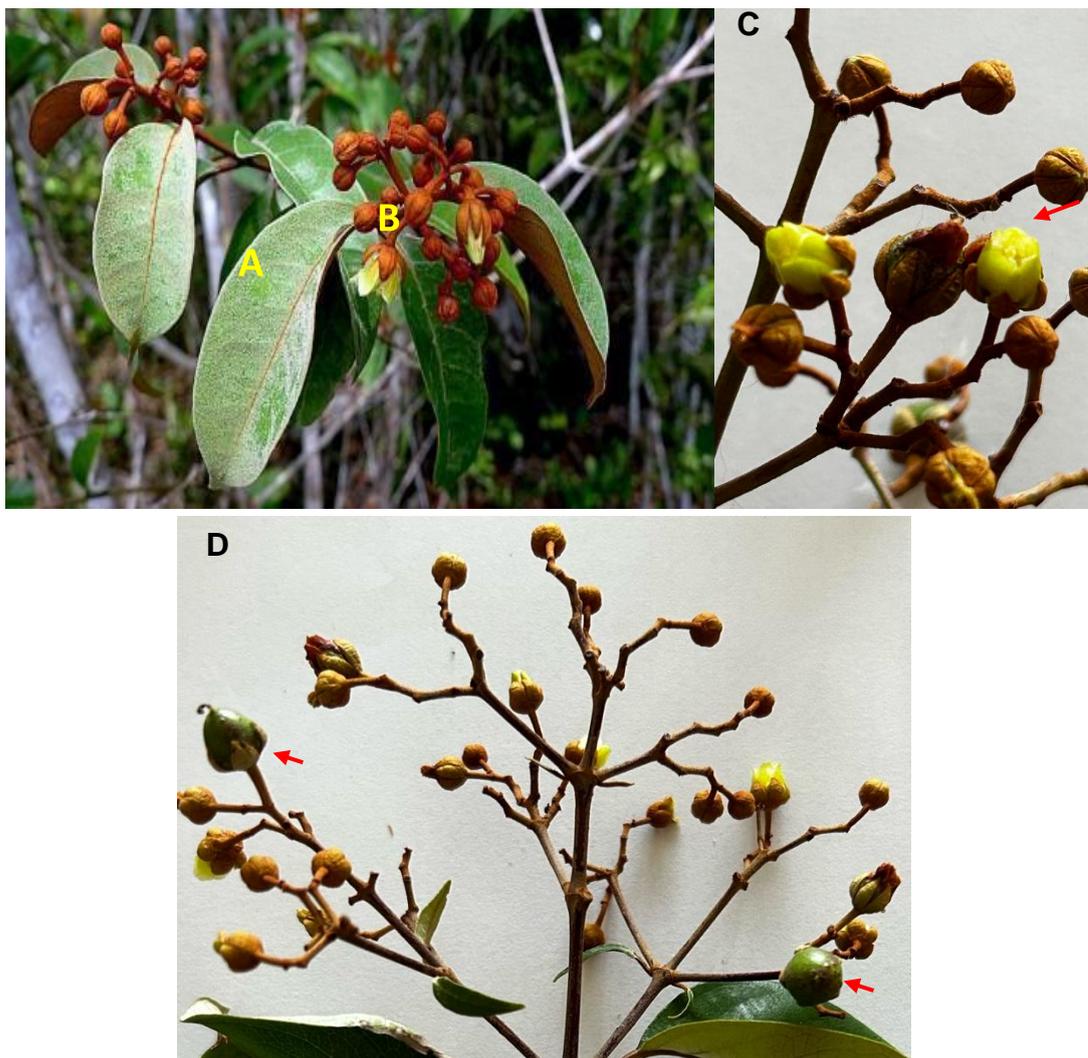


Figura 5: Aspecto macroscópico das folhas (A) panículas terminais com flores (B); flores (C) e frutos (D) de *Vismia guianensis*.

Dados etnobotânicos mostram que as folhas são utilizadas no tratamento de doenças de pele, como herpes, dermatite, hanseníase, sífilis, sarna, eczemas, pano branco (*Pitiriase*

versicolor) e impinges (*Tinea corporea*) e dermatoses (Kerharo, 1986). Há também informações quanto ao uso no tratamento de dores nos rins, na coluna e outros locais (Silvestre, 2012; Rodrigues, 2013; Costa, 2017). Além disso, apresenta propriedades laxantes antipiréticas e antirreumáticas (Lorenzi; Matos, 2002). As folhas são utilizadas como tônico num distrito da Serra Leoa (Macfoy; Sama, 1983)

A avaliação química das partes aéreas de *V. guianensis* identificou a presença de metabólitos secundários, tais como: antraquinonas, xantonas, flavonoides e benzofenonas. Além disso, foram descobertos outros compostos com potencial farmacológico, como vismiona D e ferruginina, que exibem propriedades imunossupressoras (Guerra, 1997); antioxidantes e antibacterianas (Lins *et al.*, 2016; Oliveira, *et al.*, 2017) e antifúngicas para *Candida in vitro* e *in vivo*, devido a ação fungicida e inibição dos principais fatores de virulência (Motta *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2025) Além disso, o extrato aquoso dos frutos e sementes apresenta ação antitumoral, pois foi letal para células de um tipo de adenocarcinoma de cólon (Suffredini *et al.*, 2007) e atividade antibiótica para *Staphylococcus aureus* (Camelo *et al.* 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano do extrato das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy para *Escherichia coli in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato das folhas de *Vismia guianensis*.
- Investigar o efeito do extrato sobre diferentes amostras de *E. coli in vitro*
- Avaliar *in vitro* os efeitos do extrato sobre a adesão e a formação de biofilmes
- Avaliar o efeito do extrato na infecção letal ocasionada por *E. coli* em larvas de *Tenebrio molitor*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato das folhas de *V. guianensis* e caracterização química

O material botânico foi coletado em São Luís – MA, no Campus da Universidade Federal do Maranhão, no mês de agosto de 2023. A planta foi identificada no Herbário do Maranhão pelo botânico Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Junior, onde se encontra catalogada

conforme exsicata n° 11.078. O estudo está registrado no SisGen N°AFE7A08, conforme a Legislação Brasileira (Lei N° 13.123/15).

Para a preparação do extrato as folhas foram secas e trituradas, em moinho elétrico. O pó obtido foi utilizado para obtenção do extrato, por maceração em etanol: água, por sete dias, sob o abrigo da luz, considerando o hidromódulo, 1:10. Após uma semana de maceração, o material foi submetido a rotaevaporação e, em seguida, liofilizado. O material resultante foi mantido sobre refrigeração até a utilização nos ensaios (Motta *et al.*, 2022).

A identificação dos constituintes químicos do extrato foi realizada usando o sistema de HPLC (Shimadzu Corp., Japão), com detector UV-VIS (SPA- 10a) e coluna 150 µm x 4,6 µm (Luna 5µm c18 100 a). Os dados obtidos foram processados com auxílio do software LC solution (Shimadzu Corp., Japão) (Medeiros et al. 2019). Além disso, foi aplicada a análise de infusão direta em fluxo (FIA-ESI-IT-MSN) usando 10 mg do extrato dissolvidos em 1 mL de MEOH: H₂O (1:1, v/v).

4.2 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato de *Vismia guianensis*

4.2.1 Microrganismos

Amostras padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), clínica *E. coli* (31218) e EPEC (2348/69), foram fornecidas pelo Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), sob a curadoria do Prof. Dr. Valério Monteiro Neto, da Universidade Federal do Maranhão. As bactérias foram reativadas em caldo Mueller Hinton a 37 °C, por 24 horas, para os testes de avaliação antimicrobiana.

4.2.2 Determinação de Concentração Inibitória Mínima – CIM

O ensaio foi realizado pelo método de microdiluição em placas estéreis, de 96 poços, de fundo plano, segundo as normas M7-A6 para testes em bactérias (CLSI, 2020). As amostras de *E. coli* foram reativadas em caldo BHI, semeadas em Ágar Muller Hinton (AMH - Merck, Brasil) e incubadas à 37°C, por 24 horas. Após esse período as amostras foram ressuspensas em solução salina e o inóculo foi ajustado segundo escala de McFarland para 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A suspensão resultante foi homogeneizada (Vortex®) durante 15 segundos e a densidade celular ajustada para a concentração de 10^8 UFC/mL, por espectrofotometria (absorbância de 530nm).

Para a determinação do CIM os isolados bacterianos em caldo Muller Hinton (10 µL) foram adicionados às placas contendo diferentes concentrações do EHVG (1000 – 0,98 µg

/mL), ou do antibiótico Meropenem (MERO 1000 – 0,98 µg/mL). Como o DMSO (Dimetilsulfóxido 2% em solução salina - Sigma-Aldrich) foi usado para aumentar a solubilidade do extrato bruto, também o utilizamos como controle negativo, e para testar a esterilidade do meio de cultura. As placas foram mantidas a 37°C, por 24 horas e em seguida foi realizada a leitura a partir da determinação da absorbância (600 nm). A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. O ensaio foi realizado em triplicata (Algaffar *et al.*, 2023).

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada a partir dos resultados da CIM, em placa de Petri contendo AMH. Foram transferidas 10 µL de cada uma das amostras utilizadas para determinar o CIM e placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. A determinação da CBM, considerando as concentrações que inibiram completamente o crescimento bacteriano. Amostras com mais de três Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram consideradas não inibitórias (Xavier *et al.*, 2023). O PBE (percentual de eficiência bacteriostática, %) foi obtida a partir da seguinte equação: $PBE = 100/MIC$ (Siddiqui *et al.*, 2013).

4.2.4 Erradicação de biofilme pré-formado e formado

A avaliação da erradicação dos biofilmes pré-formado e formado de *E. coli* (ATCC 29922) e *E. coli* EPEC (2348/69) foi avaliada conforme descrito por Monteiro-Neto *et al.*, 2020, considerando a determinação da biomassa usando cristal violeta (CV), a viabilidade celular dos biofilmes determinada por MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio). Em resumo, os biofilmes foram preparados e tratados com as concentrações ½, ¼, 2x e 4x CIM do EHVG e MERO. Após o período de incubação, o sobrenadante dos poços foi removido e o produto remanescente foi lavado, suavemente, por duas vezes, com PBS. Em seguida, foi adicionado 100 µL do CMH em cada poço, e as placas foram adicionadas de MTT (50 µL/poço). A leitura foi realizada após incubação de 2 horas, a 37°C.

Para determinação da biomassa as placas foram lavadas, o sobrenadante retirado e cada um dos poços foi adicionado de metanol (200 µL/poço). Após 15 minutos as placas foram invertidas para secar e adicionadas de Cristal Violeta (100 µL a 5%) por 10 minutos. Ao final o cristal violeta foi descartado e os cristais remanescentes foram dissolvidos com metanol P.A (200 µL /poço) e a absorbância determinada a 570 nm.

4.3 Ensaio *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*

4.3.1 Avaliação da toxicidade aguda

Para esse ensaio foram utilizadas 150 larvas de *T. molitor*. As larvas foram pesadas e divididas em 10 grupos (n=15/grupo), para depois serem tratadas. Os tratamentos ocorreram por injeção intracelômica (5µL), no 4º septo, localizado entre o 4º e 5º metâmero, sentido posterior-anterior, com auxílio de uma microseringa (Hamilton Gastigh, USA). Este local foi utilizado como padrão em todos tratamentos das larvas de *T. molitor* (Costa et al., 2025). Os grupos utilizados para determinação da toxicidade receberam diferentes doses do EHVG, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Grupos experimentais de larvas de *Tenebrio molitor* para determinação da toxicidade do extrato das folhas de *V. guianensis*.

Grupos*	Tratamento
Limpo	Sem tratamento
Controle	PBS
EHVG1	1mg/kg de EHGV
EHVG5	5mg/kg de EHGV
EHVG50	50mg/kg de EHGV
EHVG100	100mg/kg de EHGV
EHVG500	500mg/kg de EHGV

(*) n= 15 animais/grupo

4.3.2 Padronização de inóculo letal de *Escherichia coli*

Para a preparação dos inóculos, a amostra bacteriana foi cultivada em Agar Mueller Hinton por 24 horas, antes do experimento. No ensaio foram utilizados inóculos bacterianos que variaram de 10^1 a 10^9 UFC/µL. Cada um dos grupos foi formado por 10 larvas, infectadas por via intracelômica (ic. - 5µL) e monitoradas por 7 dias, para determinar a sobrevivência. (Mcgonigle et al., 2016).

4.3.3 Infecção letal de *T. molitor*

Para avaliar efeito do EHVG na infecção letal as larvas foram distribuídas nos seguintes grupos, considerando a concentração do extrato com base na CIM:

Tabela 3: Grupos experimentais de larvas de *T. molitor* infectadas letalmente por *E. coli*.

GRUPOS	TRATAMENTO (10µL/ic)
--------	----------------------

Controle	PBS
MERO	Meropenem na concentração de 0,625 µg/mL
EHVG1/2	Extrato na concentração 62,5 µg /mL (1/2 CIM)
EHVGC	Extrato na concentração de 125 µg /mL (CIM)
EHVG2	Extrato na concentração de 250 µg /mL (2x CIM)

As larvas foram paralisadas por resfriamento com gelo e receberam 5µL do inóculo ($3,0 \times 10^5$ UFC/µL) *Escherichia coli*, via intracelômica (ic). O tratamento com EHVG ocorreu logo em seguida, utilizando a mesma via, no quarto metâmero, na porção ventral. Após o tratamento as larvas foram transferidas para placas de Petri, contendo ração padronizada e foram incubadas ao abrigo da luz. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 7 dias, para avaliação da sobrevivência das larvas.

4.3.4 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (CFU) em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas letalmente por *Escherichia coli*.

Para a realização da quantificação da carga bacteriana foi utilizado o protocolo adaptado de McGonigle *et al.*, (2016). As larvas (n=10 larvas/ grupo) foram infectadas com 5 µL/ic do inóculo de *E. coli* (3.0×10^5 UFC/mL) e foram eutanasiadas nos tempos de 6h, 12h. O ensaio foi realizado em quadruplicada. Para contagem de CFU as larvas foram trituradas PBS estéril (5mL) e a solução resultante diluída serialmente em concentrações entre 10^1 a 10^4 . Em seguida, as amostras (100 µL) com as diferentes diluições foram transferidas para placas de Petri contendo meio Ágar Muller-Hinton, e distribuídas com o auxílio de um espalhador de células. O número de CFU foi quantificado após incubação por 24 horas, a 37°C.

4.4 Análise estatística:

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student ou por análise de variância (ANOVA), conforme o caso, seguida do teste de comparações múltiplas (Newman- Keuls) (Sokal; Rohlf, 1996). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise química dos extratos por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSn do EHVG

A Figura 6 mostra o perfil cromatográfico do EHVG, usando o hidromódulo de 1:10. Foram identificados 8 picos correspondentes aos percentuais de metabólitos secundários presentes no extrato.

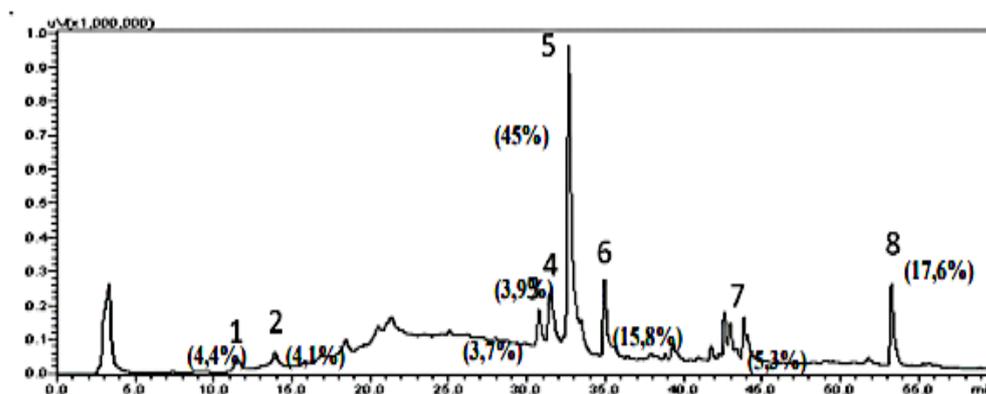


Figura 6. Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Vismia guianensis*, (HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSn) mostrando a presença de 8 picos do percentual presente no extrato.

A Figura 7 mostra o espectro do *full scan*, do extrato hidroalcoólico de *V. guianensis*, hidromódulo 1:10, para a identificação dos compostos químicos. Foi possível identificar 14 compostos, apresentados na Tabela 4, tendo a presença dos marcadores majoritários desses metabólitos, antraquinonas, flavonoides e a vismiona D.

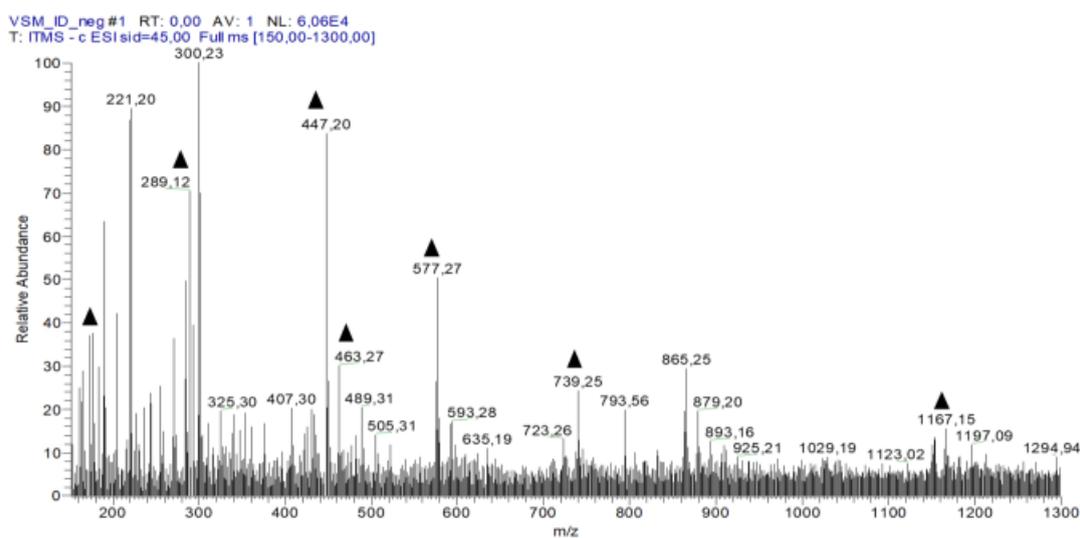
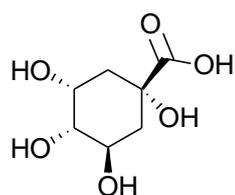


Figura 7. Espectro de primeira ordem para a análise por injeção direta em fluxo (FIA-ESI-ITMS) obtidos em modo negativo para o EHVG (▲) fragmentos dos constituintes químicos identificados.

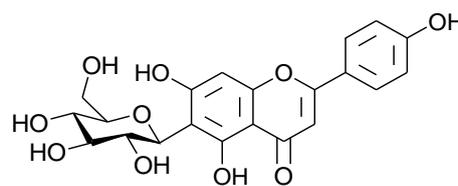
Tabela 4: Compostos presentes no extrato de *Vismia guianensis*

Número	[M-H]-	MSn íons	Composto proposto
1	191	173, 111, 85	Ácido quínico
2	431	269	Isovitexina
3	447	429, 357	Isorientina
4	289	-	Catequina
5	447	429, 301, 269, 229	Orientina
6	431	285, 163	Kaempferol-o-ramnosídeo
7	731	285, 255	Kaempferol galactodídeo-ramnosídeo
8	1153	1001, 983, 789	Tetrâmero de Catequina
9	463	301, 283, 273, 229, 179, 121	Quercetina glicosídeo
10	577	425, 407, 285, 257, 213	Dímero de Catequina
11	1167	1015, 863, 711	Trímero de procianidina digalatoe tipo A
12	409	273, 255	Vismiona D
13	283	269, 239	Antraquinona F
14	285	-	Kaempferol

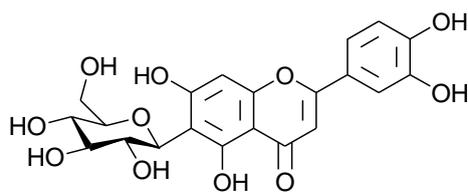
A Figura 8 mostra as estruturas das substâncias identificadas no extrato das folhas de *V. guianensis*, conforme espectro da Figura 7 e tabela 4. Importante notar as estruturas da Vismiona D, da Antraquinona F e do Kaempferol, importantes marcadores do gênero *Vismia*.



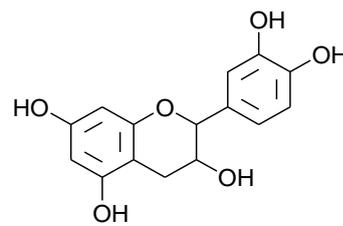
ácido quínico
(1)



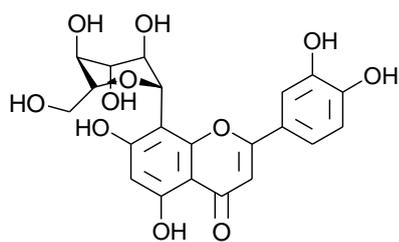
isovitexina
(2)



isorientina
(3)

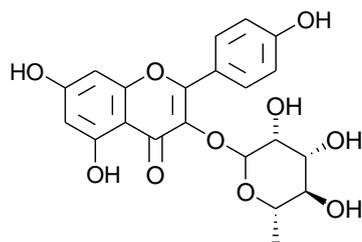


catequina
(4)



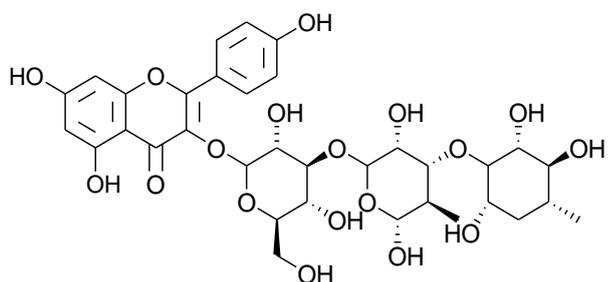
orientina

(5)



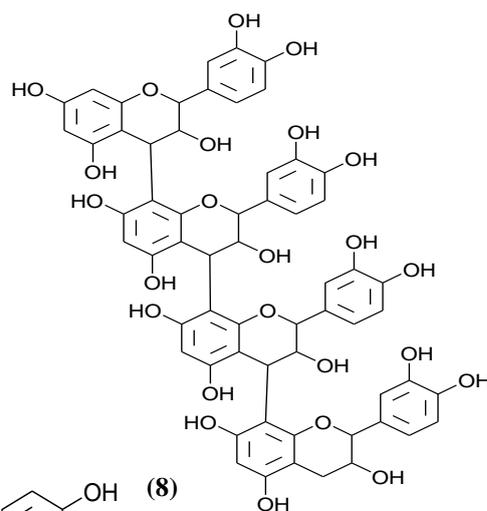
kaempferol-o-ramnosideo

(6)



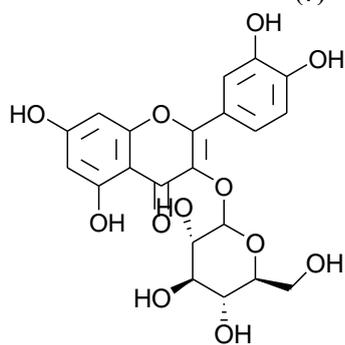
kaempferol-galactoside-ramnosideo-3''-ramnosideo

(7)

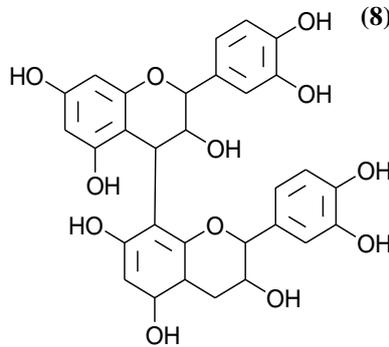


tetramero de catequina

(8)

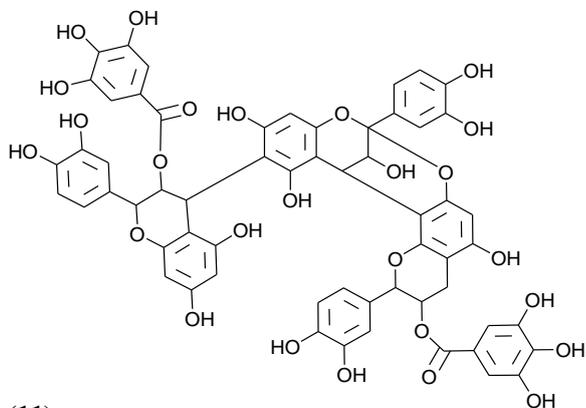
quercetina
glicosideo

(9)

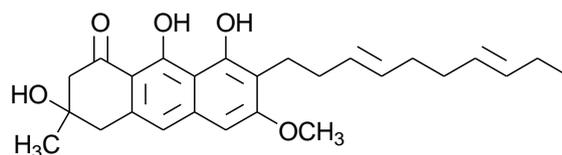


dímero de catequina

(10)



(11) trímtero de Procianidina digalato tipe A



vismiona D

(12)

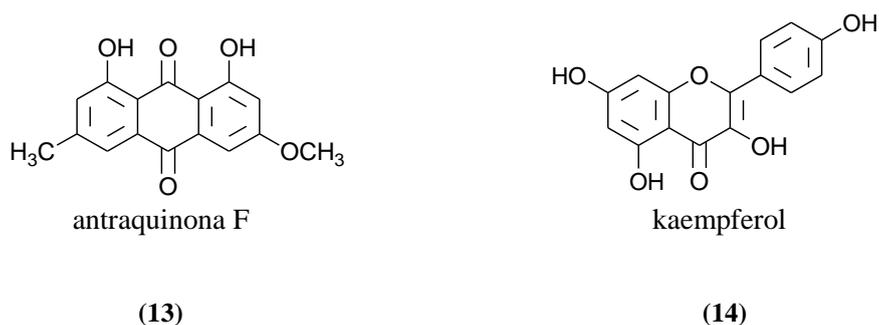


Figura 8. Estruturas químicas de compostos identificados de *Vismia guianensis*.

5.2 Avaliação da toxicidade em larvas de *Tenebrio molitor*

O teste de toxicidade em *T. molitor* com o EHVG nas concentrações de 1; 5 e 50mg/kg, mostrou que nenhum dos tratamentos foi tóxico para as larvas, pois todas permaneceram vivas até o final do período de observação que durou 7 dias (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação de toxicidade aguda por sobrevida durante 7 dias após tratamento com diferentes concentrações *Vismia guianensis*.

Grupos	Vivos (N°)	Mortos (N°)	Sobrevida (%)
Limpo	15	0	100
Controle	15	0	100
EHVG1	15	0	100
EHVG5	15	0	100
EHVG50	15	0	100

5.3 O tratamento com EHVG inibiu o crescimento de *E. coli in vitro*.

Os efeitos inibitórios do EHVG contra *E. coli* estão descritos na Tabela 6. Os valores de CIM variaram entre 125 a 1000 µg/mL, dependendo da amostra de *E. coli*, sendo a maior inibição ocorreu para amostra padrão (ATCC 25922) seguida da EPEC (2348/69). Ao que tudo indica o extrato foi pouco efetivo em inibir o crescimento das culturas da amostra clínica de *E. coli* (31218), considerando que os valores da CIM foram superiores a 1000 µg/mL Já os valores de CBM foram semelhantes (1000 µg/mL) para todas as amostras de *E. coli* avaliadas, sendo

que foram pelo menos 4x maiores para *E. coli* ATCC25922 e 2 x maiores para EPEC, indicando maior eficácia como agente bactericida, para essas duas amostras bacterianas.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Extrato de hidroetanólico de *Vismia guianensis* (EHVG) em culturas de cepas de *E. coli*.

<i>E. coli</i> (10 ⁸ UFC/mL)	EHVG (µg/mL)		PBE (%)	Meropenem (µg/mL)	
	CIM	CBM		CIM	CBM
ATCC25922.	125	1000	0,8	0,625	125
Clínica (31218)	>1000	1000	0,1	0,313	0,625
EPEC (2348/69)	500	1000	0,2	0,625	2,5

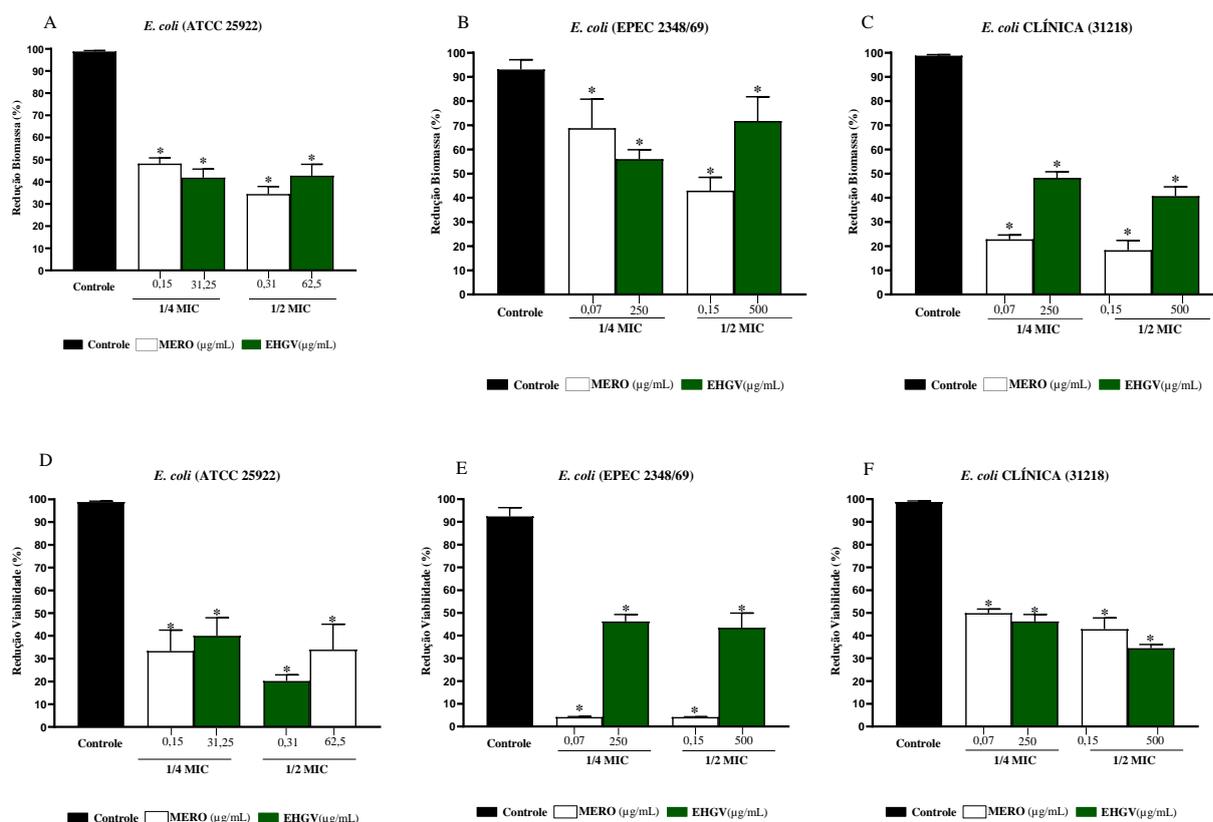
CIM: Concentração inibitória mínima;

CBM: concentração bactericida mínima

PBE: percentual de eficiência bacteriostática (100/MIC)

5.4 O tratamento com o EHVG reduziu adesão de *E. coli* considerando a viabilidade e a biomassa bacteriana

O tratamento com diferentes concentrações do EHVG (0,15 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a adesão das amostras testadas considerando a biomassa (Figuras 9. A, B e C) e a viabilidade (Figuras 9 D, E e F), especialmente com as maiores concentrações. Os resultados são semelhantes aos obtidos com Meropenem, guardadas as devidas proporções, pois as concentrações do antibiótico foram muito menores do que as do extrato em todas as avaliações.



5.5 O tratamento com EHVG inibiu a formação dos biofilmes pré-formados e formados de amostras padrão de *E. coli* e de EPEC (2348/69).

O tratamento com diferentes concentrações do EHVG inibiu os biofilmes pré-formados de *E. coli* e EPEC, quando avaliamos a biomassa (Figuras 10A e 10B) e a viabilidade (Figuras 10C e 10D), independente da concentração de extrato utilizada em concentrações subinibitorias correspondentes aos valores de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da CIM. Nesse ensaio o Meropenem foi utilizado como antibiótico (MERO) e as culturas não tratadas como controle.

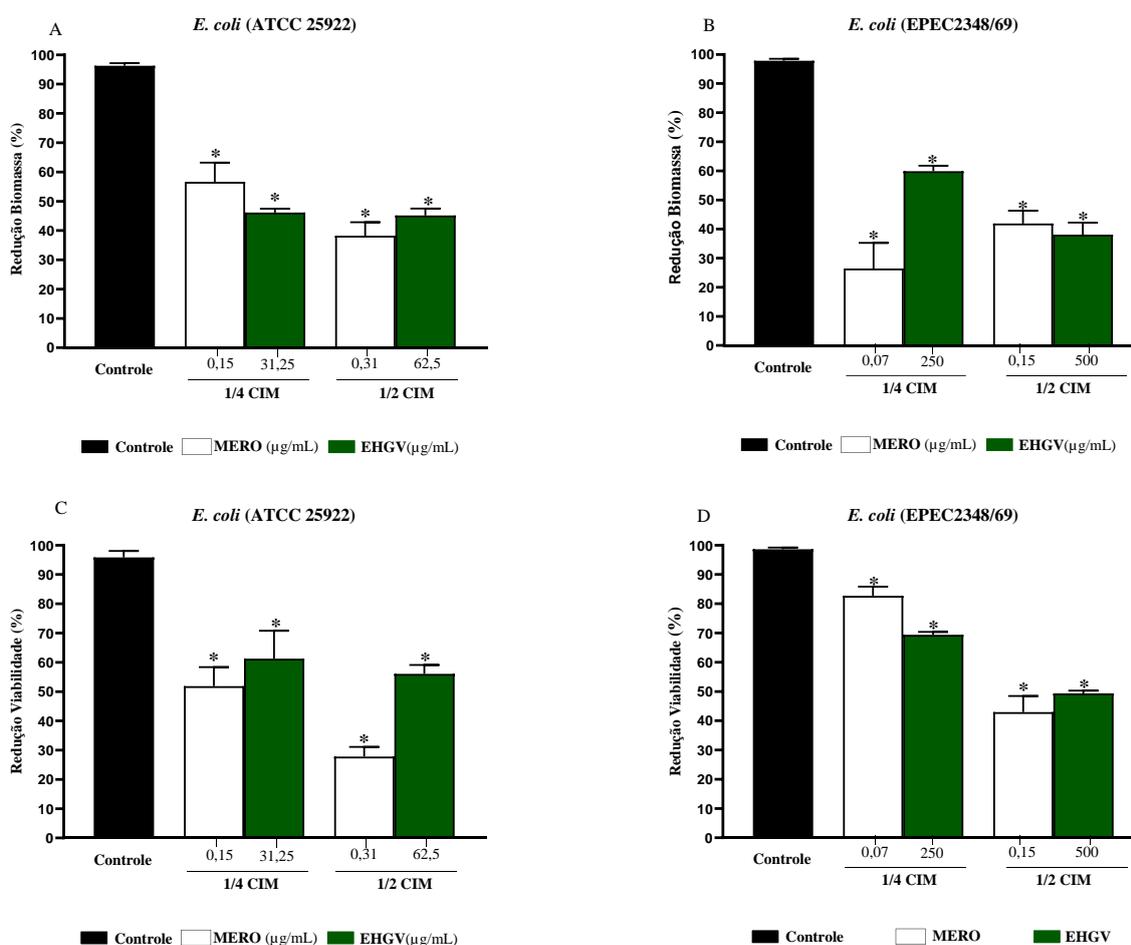


Figura 10. O tratamento com EHVG *in vitro* inibe o biofilme pré-formado de amostras padrão de *E. coli*, ATCC25922 (A e C) e EPEC2348/69 (B e D), utilizado nas concentrações correspondentes $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ CIM, quando avaliamos a biomassa (A e B) e a viabilidade (C e D) do. Os grupos tratados com o extrato foram comparados ao grupo controle, sem tratamento e ao grupo tratado com o antibiótico Meropenem (MERO). Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

A Figura 11 mostra que o tratamento com EHVG inibiu a formação do biofilme maduro ou formado, ao avaliamos a biomassa (Figuras 11A e 11B) ou a viabilidade (Figuras 11C e 11D) com resultados semelhantes ao Meropenem (MERO), se não considerarmos as diferenças entre as doses.

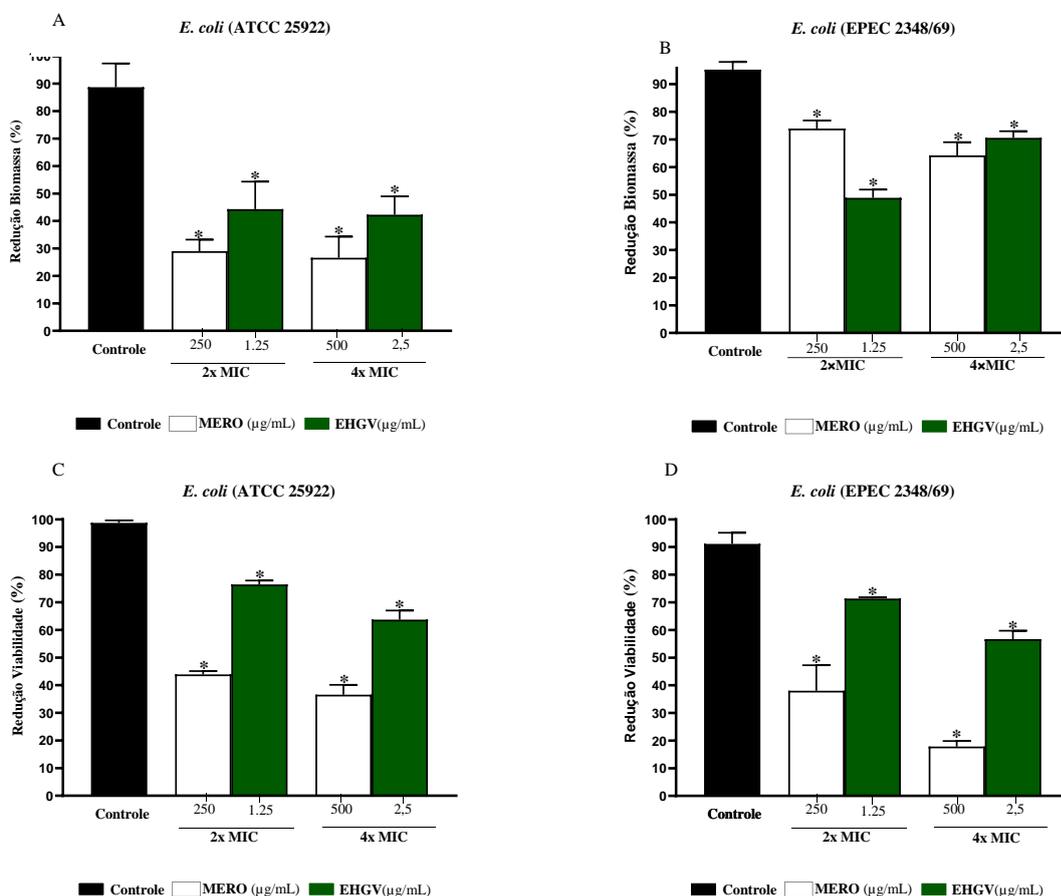


Figura 11. Inibição da formação de biofilme formado de *E. coli* (ATCC 29922) e EPEC (2348/69) considerando a biomassa (A e B) e a viabilidade MTT (C e D). As amostras tratadas com EHVG foram comparadas aos grupos tratados com antibiótico Meropenem (MERO), utilizando concentrações supra inibitórias equivalentes a 2x e 4x os valores de CIM. Esses grupos foram comparados a amostras não tratadas (Controle). As avaliações foram realizadas após 24h,. Os resultados se referem a $X \pm SD$ de amostras individuais testadas em triplicata, (*) $p < 0.05$ em comparação ao Controle.

5.6 Determinação do inóculo letal de *E. coli* na infecção das larvas de *T. molitor*.

Para avaliação da susceptibilidade das larvas na infecção por *E. coli*, as larvas foram infectadas com diferentes concentrações das suspensões bacterianas, variando de 10^8 a 10^1 CFU/ μ L. Os resultados apontam que, os inóculos entre 10^5 e 10^8 UFC/ μ L, apresentaram

respostas semelhantes com a morte de 100% das larvas em até 24 horas após a infecção. Nos grupos infectados com 10^3 e 10^4 UFC/ μ L a morte de 100% das larvas ocorreu somente após 48h e 72 horas. Os inóculos bacterianos com valores menores, 10^1 a 10^3 UFC/ μ L, apresentaram baixa letalidade (Figura 12). O inóculo 10^5 CFU/ μ L foi utilizado para infecção letal de *E. coli*.

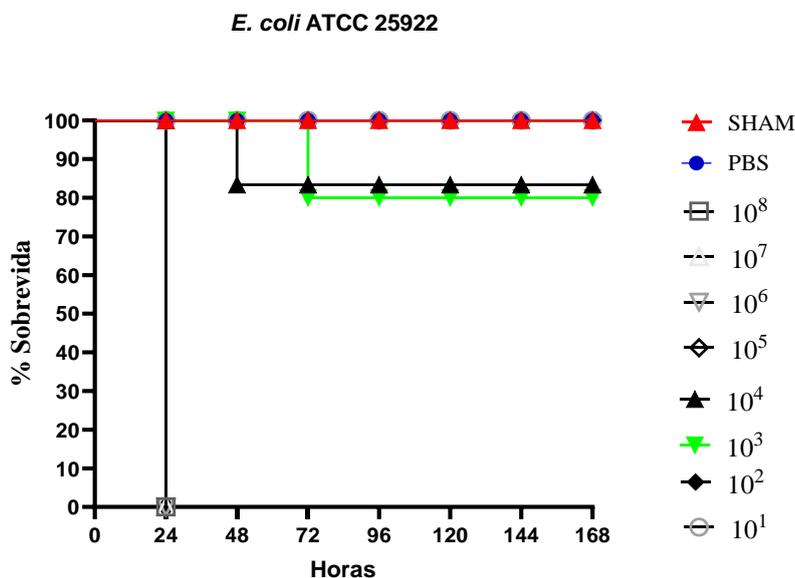


Figura 12. Determinação do inóculo de *E. coli* capaz de ocasionar infecção letal em larvas de *T. molitor*. Foram utilizadas concentrações bacterianas crescentes (10^1 a 10^7 CFU/ μ L) para a infecção. As larvas foram monitoradas durante 7 dias. Os dados se referem a média \pm desvio padrão de três ensaios independentes agrupados totalizando 10 larvas/grupo. As análises utilizaram curvas de Kaplan-Meier, seguida de teste estatístico de Log-Rank. (*) $p \leq 0,05$ na comparação aos animais não tratados.

5.7 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU) em *T. molitor* durante infecção letal por *E. coli* (ATCC 29922).

Com base nos dados quanto a letalidade (Figura 12), optou-se por avaliar a carga bacteriana, quantificando o número de CFU nos intervalos de 6 e 12h após a infecção. Os resultados mostraram um crescimento exponencial de *E. coli* nos dois intervalos, com maior número de CFU após 12 horas. Nos dois intervalos a carga bacteriana foi sempre maior do que o observado no grupo não infectado (Figura 13).

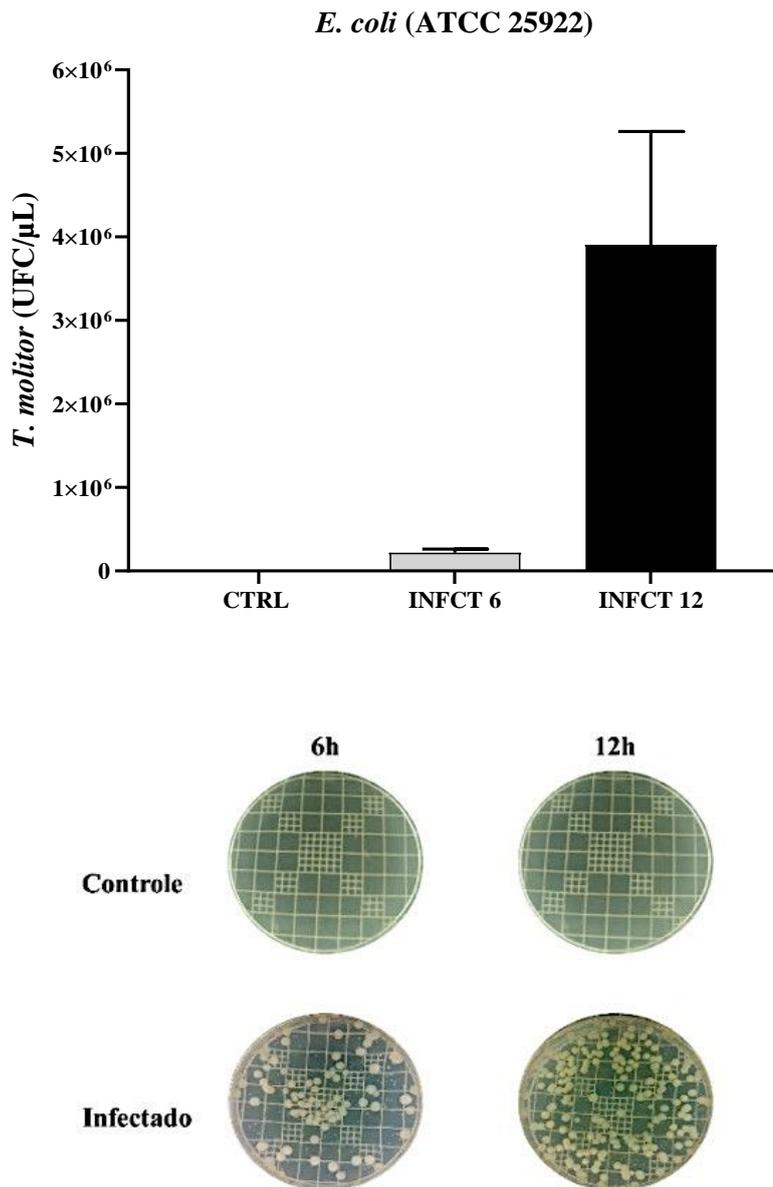


Figura 13. Número de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) em larvas de *T. molitor* infectadas com *E. coli* (ATCC25922), ($3,0 \times 10^5$ CFU/μL) conforme avaliação realizada 6 e 12h depois da infecção. Os maiores aumentos ocorreram 12 horas após a infecção. Os dados se referem a média ± desvio padrão de n=10 larvas/grupo.

5.8 O extrato de EHVG aumenta a sobrevivência de larvas de *T. molitor* durante infecção letal por *E. coli*

O tratamento com EHVG aumentou a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com inóculo letal de *E. coli*, como indica a figura 14. A concentração correspondente aos

valores de 2x CIM apresentaram melhor efeito, pois manteve todas as larvas vivas até o final da avaliação. As larvas do grupo Meropenem ficaram vivas até o 7º dia.

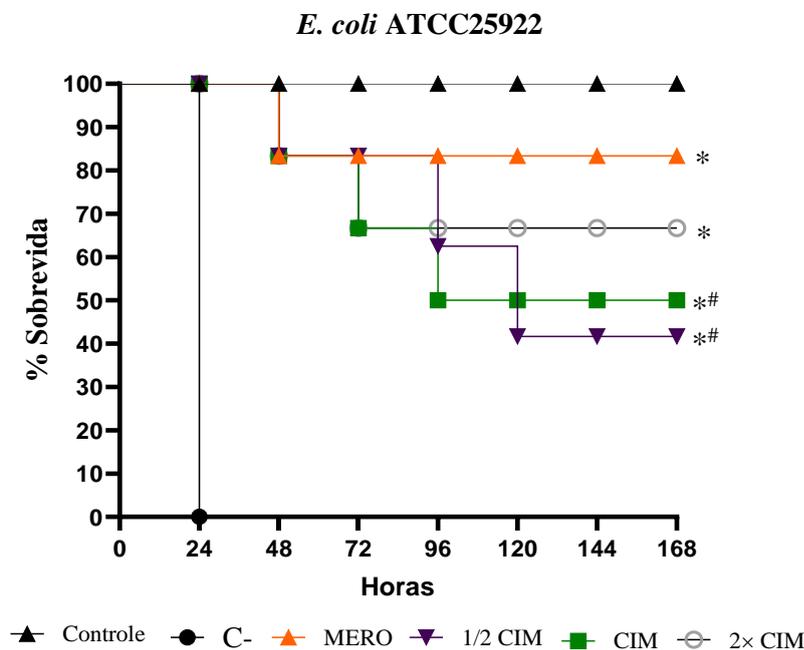


Figura 14. O tratamento com EHVG aumentou a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com *E. coli* (ATCC 29922) ($3,0 \times 10^5$ CFU/ μ L). Grupos de 10 larvas foram tratados com diferentes concentrações do EHVG, por via intracelômica, logo após a infecção, considerando os valores correspondentes a 1/2 CIM, CIM e 2x CIM e comparados ao grupo tratado com o valor CIM do Meropenem (MERO) e ao grupo controle não tratado. A sobrevivência foi monitorada, diariamente, por 7 dias. A mortalidade foi avaliada por curvas de Kaplan-Meier, seguida de teste estatístico de Log-Rank. Os resultados se referem a média \pm desvio padrão. (*) $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle infectado e não tratado e (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo MERO.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito antimicrobiano do extrato das folhas de *V. guianensis* (EHVG) *in vitro*, sobre amostras padrão e clínicas de *E. coli*, considerando os efeitos sobre adesão e formação de biofilme. Além disso, também foi avaliado o efeito do extrato *in vivo* em larvas de *T. molitor* infectadas letalmente com a amostra padrão de *E. coli*.

A análise química do EHVG revelou a presença de antraquinonas, xantonas e flavonoides, compostos conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Silvestre *et al.*, 2012).

Na análise química do extrato das folhas de *V. guianensis*, foram detectados os mesmos compostos descritos anteriormente por Motta *et al.*, 2022, o que provavelmente se deve ao fato da coleta ter sido feita no mesmo local e na mesma época do ano. Outros autores também investigaram a composição química de extrato das folhas de *V. guianensis* e encontraram elevadas concentrações de compostos fenólicos, como a quercetina (Lopes, 2023). A quercetina é um composto com propriedades antioxidantes, pois consegue paralisar ou sequestrar radicais livres, desempenhando um papel fundamental no processo oxidativo, ou seja, proporcionando benefícios à saúde. Esse efeito ocorre porque os fenóis possuem um ou mais hidrogênios das hidroxilas disponíveis para se ligarem aos radicais livres, promovendo a ação antioxidante no organismo (Alharbi *et al.*, 2025).

As evidências indicam que vários dos compostos bioativos oriundos de plantas têm a capacidade de interagir com a membrana bacteriana. Os flavonoides presentes no EHVG, como o kaempferol e quercetina são capazes de inibir a síntese de ácidos nucleicos e afetar a função da membrana citoplasmática, resultando em aumento da permeabilidade celular e redução da adesão e formação de biofilme, fatores essenciais para o crescimento bacteriano (Mickymaray, 2019), o que poderia explicar os efeitos no EHVG sobre a adesão e formação de biofilmes.

Adicionalmente, tanto o kaempferol como a quercetina podem penetrar nas células bacterianas devido a capacidade de neutralizar as cargas das proteínas de membrana (Teffo, *et al.*, 2010; Leite, *et al.*, 2014). Dessa forma, sugere-se que os flavonoides detectados no EHVG podem afetar as estruturas das membranas de *E. coli*, aumentando a permeabilidade e a absorção do extrato. Assim, uma das perspectivas a ser testada é uso simultâneo do extrato e do Meropenem, considerando que EHVG pode potencializar a ação do antibiótico.

O potencial antibacteriano do EHVG para *E. coli*, foi avaliado a partir da determinação da CIM, da CBM e do PBE. Nos ensaios *in vitro*, observou-se que tanto o CIM, quanto o CBM o extrato foi mais efetivo para amostra padrão. Resultados semelhantes aos anteriormente descritos por Oliveira *et al.*, (2009) ao avaliarem a ação antibacteriana de extratos das folhas de *V. guianensis* contra cepas de *E. coli*.

A atividade antimicrobiana foi descrita como segura, conforme os critérios estabelecidos por Barbosa *et al* (2021), uma vez que o EHVG apresentou valores de CIM entre 100 e 500 µg/mL. Além disso, a relação entre a concentração bactericida mínima (CBM) e CIM indica que o EHVG exerceu ação bacteriostática sobre a amostra padrão e bactericida para

as duas amostras clínicas de *E. coli*. Esse dado é relevante, sobretudo se considerarmos que a inibição do crescimento bacteriano também pode reduzir a virulência das bactérias, impedindo assim a disseminação da infecção pelo organismo, com reflexos sobre a redução de internações e de óbitos por sepse bacteriana (Paim, Lorenzini, 2014).

Na progressão do estudo, foram utilizadas a bactéria *E. coli* ATCC 2592 e a amostra clínica de EPEC para avaliação do efeito do extrato na adesão, e na formação de biofilmes. O EHVG foi efetivo em inibir tanto a adesão como os biofilmes pré-formados e formados, sendo efetivo para as duas amostras bacterianas e com semelhante eficácia para todas as concentrações testadas.

Importante lembrar que a adesão e formação de biofilmes são fatores críticos de virulência bacteriana. A adesão é a primeira etapa da infecção, pois permite a colonização inicial. Já os biofilmes são estruturas complexas e organizadas, compostas por comunidades bacterianas que se fixam em superfície.

O extrato EHVG apresentou importante capacidade de inibição, tanto sobre biofilmes em formação quanto sobre biofilmes já estabelecidos, com efeitos similares ao Meropenem, antibiótico utilizado como controle. A avaliação da formação de biofilme, mostrou que o EHVG foi eficaz, tanto na redução da viabilidade como da biomassa dos biofilmes, indicando interessante atividade contra esse fator de virulência.

Tanto a adesão, como o biofilme oferecem suporte ao crescimento microbiano. Adicionalmente, os biofilmes protegem as colônias do sistema imune do hospedeiro e da ação dos antibióticos, contribuindo assim para a disseminação e persistência da infecção (Chetri, 2025). Importante lembrar que bactérias como *E. coli* podem mudar do estado planctônico para uma comunidade gerando os biofilmes, o que otimiza sua capacidade de sobrevivência ambientes hostis e dificulta o controle da infecção. Assim, os biofilmes são estruturas auto-organizadas, com estrutura tridimensional, onde as bactérias ficam encerradas numa matriz extracelular, que elas mesmo produzem, e que em geral encontra-se aderida a um substrato (Guzmán-Soto et al., 2021).

Segundo Madigan et al 2016 a presença de biofilmes pode reduzir significativamente a eficácia de antibióticos. Além disso, Cepas *et al.*, (2019) concluíram que a aquisição de resistência antimicrobiana específica pode comprometer ou aumentar a formação de biofilme em diversas espécies de bactérias Gram-negativas, incluindo a *E. coli*. Assim, nossos achados são clinicamente relevantes, especialmente considerando a efetividade do extrato em baixas concentrações. Ao que tudo indica esse parece ser o primeiro relato sobre a ação do EHVG em

amostras clínicas de *E. coli*, abrangendo seus efeitos sobre fatores de virulência como adesão e formação de biofilme.

Uma das lacunas do presente estudo, devido a carência de materiais específicos, foi não investigar os efeitos do EHVG sobre outros fatores de virulência de *E. coli*, sobretudo se consideramos que os biofilmes dessas bactérias exibem metabolismo e expressão gênica distintos de suas contrapartes planctônicas. Além disso, produzem β -lactamases e carbapenemases, que inativam a ação dos antibióticos e aumentam a resistência dessas bactérias aos antibióticos convencionais de amplo espectro. Outro aspecto importante dos biofilmes de *E. coli* inclui a propriedade de criar bombas de efluxo, capazes de expulsar ou impedir o acesso dos antibióticos do interior das células bacterianas, impactando negativamente a eficácia dessas drogas (Poirel, *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2014). Nesse contexto, os efeitos do EHVG sobre os biofilmes pré-formados e formados, merece destaque, pois sugere uma ação direta sobre os mecanismos de escape de *E. coli*.

No presente estudo optamos por fazer as avaliações *in vivo* utilizando larvas de *Tenebrio molitor*, considerando resultados que essas larvas permitem avaliar infecções ocasionadas por diferentes microrganismos em condições controladas, pois é possível avaliar tanto a concentração do inóculo quanto do tratamento (Andrade-Oliveira *et al.*, 2023). As larvas de *T. molitor* são amplamente usadas em laboratório para testes com agentes biológicos devido ao seu tamanho avantajado e facilidade de criação (Richards; Davies, 1983)

As larvas de *T. molitor* podem chegar até 3 cm de comprimento, por 2 mm de espessura, com peso aproximado de 0,35 g antes de se tornar pupa. Essas larvas se alimentam de folhas, grãos diversos entre outras coisas e como armazenam a água extraída dos alimentos, não necessitam de muita água para sobreviver (Pantoja; Bermúdez, 2010; Souza *et al.*, 2015), o que representa uma vantagem adicional aliada a facilidade de aquisição e manuseio.

As larvas são amplamente comercializadas no Brasil e fáceis de cultivar em laboratório. Outra vantagem diz respeito à forma de inoculação, que é realizada por injeção intracelômica, diferentemente de outras larvas que tanto a infecção como o tratamento são feitos por imersão nas soluções (Souza, *et al.*, 2015).

Os testes de toxicidade do EHVG em larvas de *T. molitor* mostraram que o extrato não apresentou toxicidade, mesmo quando utilizado nas maiores concentrações (50 mg/kg), indicando que seu uso *in vivo* é seguro. Durante o período de observação, todas as larvas permaneceram vivas e sem sinais perceptíveis de comprometimento fisiológico ou de alterações comportamentais. Esses achados coadunam com observações anteriores em outros estudos do nosso grupo; os quais também demonstraram baixa toxicidade do EHVG *in vitro*

em eritrócitos (Motta et al., 2022) ou *in vivo* (Costa et al., 2025) em larvas de *T. molitor* e camundongos. Além disso, os achados corroboram com os estudos de Suffredini et al., 2006, que investigaram a toxicidade e ação antibacteriana de outras espécies do gênero de *Vismia*.

A padronização do inóculo foi realizada na perspectiva de avaliar se as larvas eram susceptíveis a infecção por *E. coli* e para determinar a concentração do inóculo letal. Os resultados mostraram que o menor inóculo capaz de matar todas as larvas em 24h, foi 10^5 CFU/ μ L. Também avaliamos a carga bacteriana nesses grupos de larvas nos intervalos de 6h e 12h. Os resultados mostraram que já nas primeiras 6 horas ocorreu crescimento bacteriano exponencial. Esse crescimento foi ainda maior na avaliação realizada 12 horas após a infecção, comprovando que a letalidade das larvas estava associada a infecção por *E. coli* e ainda mostrando grande susceptibilidade das larvas a essa infecção. Estes dados corroboram com estudos que destacam a importância de usar métodos padronizados de inoculação, como o estudo de Longo et al. (2014) ao explorar como a densidade inicial de microrganismos pode influenciar a formação de biofilmes.

Utilizamos as culturas de *E. coli* ATCC (25922) na infecção letal em larva de *T. molitor*, com base nos valores de CIM (125 μ g/mL). Os resultados mostraram que o tratamento com EHVG sempre prolongou a sobrevivência das larvas de *T. molitor*, com todas as concentrações testadas, sendo o melhor resultado foi obtido como a maior concentração ($2\times$ CIM), já que esse dado foi similar ao grupo tratado com Meropenem. Esse resultado pode tanto estar associado aos diversos metabólitos secundários presentes no EHVG, que podem agir individualmente como a kaempferol e quercetina ou como fitocomplexo, como também a capacidade do extrato em estimular o sistema imune das larvas. Reforçam essa nossa hipótese os resultados anteriores descritos por Haine et al., (2008) demonstrando que a atividade antimicrobiana da hemolinfa de *T. molitor* aumenta significativamente nas primeiras horas de infecção e permanece em níveis elevados por até 14 dias quando submetidos a infecção por *E. coli*.

Esse controle foi importante, para avaliar a eficácia do EHVG, pois a resistência aos antibióticos vem se tornando uma preocupação mundial. Nesse contexto, uma das alternativas é o estudo de antimicrobianos de origem vegetal (Simonetti *et al.*, 2015) o que aumenta a relevância dos dados aqui descritos.

Estudos científicos apontam uma série de atividades biológicas de *V. guianensis*, como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antifúngicas, especialmente a partir de extratos de suas folhas (Motta *et al.*, 2022; Lins *et al.*, 2016). Essas propriedades sugerem que o EHVG apresenta um alto potencial biológico e pode ser utilizado na busca por alternativas aos antimicrobianos ocasionais, que enfrentam resistência bacteriana crescente (Oliveira,

2009). Assim propomos que a ação do EHVG na infecção letal das larvas de *T. molitor* esteja relacionada aos compostos presentes no extrato devido sua ação atividade bacteriana. Uma outra hipótese é que o EHVG pode aumentar a sobrevivência das larvas devido à ação sobre o sistema imune, embora não tenhamos aqui investigado essa possibilidade.

7. CONCLUSÕES:

O extrato de *V. guianensis* apresenta ação antibacteriana eficaz contra diferentes culturas de *E. coli*, evidenciada pela redução significativa no crescimento bacteriano, inibição da adesão e da formação de biofilmes, fatores cruciais para a resistência bacteriana. Além disso, o extrato tem baixa toxicidade *in vivo*, e foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas de *T. molitor*, o que sugere uma possível ação sinérgica entre os compostos presentes no extrato.

Esses achados são promissores e podem contribuir significativamente para o avanço do conhecimento científico, abrindo caminhos para futuras pesquisas e o desenvolvimento de produtos derivados de fontes naturais. Entretanto, mesmo que as substâncias provenientes de fontes naturais tenham significativa importância no desenvolvimento de novas drogas há ainda um longo percurso entre os resultados pré-clínicos e a indústria farmacêutica, pois ainda é preciso assegurar padronização dos extratos e controle de qualidade dos insumos, bem como realizar testes clínicos e a produção em grande escala.

REFERÊNCIAS

Abrantes, J.A; Nogueira, J.R. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. Revista Brasileira de Análises Clínicas, p. 2448-3877, 2022. DOI: 10.21877/2448-3877.202200074.

Algaffar, S. O; Verbon, A; Khalid, S.A; Van de Sande, W.W.J. Development and validation of a resazurin assay for in vitro susceptibility testing of *Actinomyces madurae*: a common causative agent of actinomycetoma. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 78, n. 1, p. 155-160, 2023.

Alharbi, H. O. A., Alshebremi, M., Babiker, A. Y., Rahmani, A. H. The Role of Quercetin, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis Through Regulation of Oxidative Stress, Inflammation, and Biological Activities. Biomolecules, 15(1), 151, 2025.

Alzamora, M.C; Echevarría, A.C; Ferraro, V.A.M; Riveros, D.B; Zambruni, M.A; Ochoa, T.J. Resistencia antimicrobiana de cepas comensales de *Escherichia coli* en niños de comunidades

rurales peruanas., Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, v.36(3) p.459-63, 2019.

Amato SM, Brynildsen MP. Nutrient transitions are a source of persisters in *Escherichia coli* biofilms. PLoS One, vol, 9, 2014.

Amparo TR, Braga VC, Teixeira GHB, Medeiros LF. Métodos para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. Infarma - Ciências Farmacêuticas, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018.

Andrade NL, Cruz Campos AC, Cabral AM, Damasco PH, Lo-Ten-Foe J, Rosa, A. CP, Damasco PV. Infective endocarditis caused by Enterobacteriaceae: phenotypic and molecular characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 52(4), p. 1887–1896, 2021.

Andrade-Oliveira AL, Lacerda-Rodrigues G, Pereira MF, Bahia AC, Machado EA, Rossi CC, Giambiagi-deMarval M. *Tenebrio molitor* as a model system to study Staphylococcus spp virulence and horizontal gene transfer. Microbial Pathogenesis, 183, 106304, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106304>

Anes J, Mccusker MP, Fanning S; Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. Frontiers Microbiology v.6, p.587, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00587

Asgari B, Burke JR, Quigley BL, Bradford G, Hatje E, Kuballa A, Katouli M. Identification of virulence genes associated with pathogenicity of translocating *Escherichia coli* with special reference to the Type 6 secretion system. Microorganisms, v.12, n. 9, p. 1851, 2024.

Barbosa AT; Silva VHN; Silva BYK; Lopes ASN; Guesdon IR; Maia PJS; Abegg MA; Corrêa GM; Carmo DFM. Chemical composition and biological activities of essential oils from fresh *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy and *Vismia cayennensis* (Jacq.) Pers. Leaves. Research, Society and Development, v. 10, n. 8, p. e37410817440, 2021.

Bezerra, W.G.A. Fatores de virulência e resistência à antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em granjas de frangos de corte Fortaleza. 2017.

Boue L; Sánchez S; Garbey L; Rondón N; Castellanos I. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* em pacientes com infecção do trato urinário. Revista Información Científica, v.98, n.6, p.755-764, 2019.

Bombardi, F.M.L et al. Sensoriamento ótico da dinâmica do crescimento de colônias de *Escherichia coli* em ambiente hídrico. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. eLife, v. 4, p. e05826, 2015.

- Caldorin M, Zago Castanheira de Almeida IA, Tanury Macruz Peresi J, Cardiga Alves E. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *Revista Bepa*, vol.10, pag.4-20, 2013.
- Camelo, S.R.P; Costa, R.S; Costa R.M.R; Barbosa, W.L.R; Vasconcelos, F; Vieira, J.M.S; Junior, J.O.C.S. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *Journal Pharmaceutical Sciences and Research*, v.2, p. 3224-3229, 2011.
- Cepas, V; Lopez, Y, Munoz, E; Rolo, D; Ardanuy, C; Martí, S; Xercavins, M; Horcajada, J.P; Bosh; Soto, S.M. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Journal of Microbial Drug Resistance*, vol. 25, 2019. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>.
- Chetri S. *Escherichia coli*: An arduous voyage from commensal to Antibiotic-resistance. *Microbial pathogenesis*, 198, 107173, 2025.
- Coelho, T. L. F.; Jericó, R. C.; Pereira, T. J.; Silva, C. F.; Naue, C. R. Perfil bacteriano das infecções hospitalares de pacientes cirúrgicos em um hospital terciário. *HURevista.v.4*, n.33652, p. 47:1-7, 2021.
- Costa, A.A.C., Motta, E.P., Oliveira, A.S., Santos, P.G., Farias, J.R., Franco, D.C.G., Silva, M. C.P., Barbosa, N.T., Muniz, S.B., Silva, L.D.M., Silva, L.A., Rocha, C.Q., Nascimento, F.R. F., Guerra, R.N.M. *Vismia guianensis* improves survival of *Tenebrio molitor* and mice during lethal infection with *Candida albicans*. *Antibiotics*, vol. 14, n. 1, p. 72, 2025.
- Costa, L.A.; Gusmão, L.F.P. Communities of saprobic fungi on leaf litter of *Vismia guianensis* in remnants of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Forestry Research* v.28, p.163–172, 2017.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI suplemente M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- Davis, G. R. F. & H. B. Schiefer,. Effects of dietary diacetoxy- scirpenol on growth of larvae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* v.74 p.167–171, 1983.
- De Souza M., B.; Azola, J.M; Gouvêa, C. M.C.P. Marcadores moleculares para identificação e caracterização do potencial patogênico de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 13, n. 1, p. 41-52, 2018.
- Dias-Filho, M.B.D. Physiological responses of *Vismia guianensis* to contrasting light environments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.7, p.35-40, 1995.

Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri AJR, Darini AL. Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens, 2014.

Fontenele RD; Costa CL. Resistência antimicrobiana: os desafios nas infecções bacterianas multirresistentes no Brasil. *Brazilian Journal of Health Review*, 6(3), 11347–11357, 2023. <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n3-234>

Furlan APF, Salomão AJG, Nunes BVT, Sousa DR, Martins RR, Silva CM, Silva ACMS. Prevalence, and profile of bacterial resistance in urinary tract infections in hospitals in the north and northeast regions of Brazil: *Brazilian Journal of Health Review*, v.4, pág. 9244–9256, 2021. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n2-423>.

Gauthier L, Dortet L, Cotellon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, Bonnin RA, Naas T. Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates, 3 France 2012 -2013. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 8, 2018.

Gloag ES; Fabbri S, Wozniak DJ; Stoodley P. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival, *Biofilm*,v.2,100017, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100017>.

Gollan B, Grabe G, Michaux C, Helaine S. Bacterial Persists and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annu Rev Microbiol*. 2019; 73: 359-385.

Gomes, T.A.T; Eliais W.P; Scaletsky I.C.A; Guth,B.E.C; Rodrigues,J.F; Piazza, R.M.F; Ferreira, L.C.S; Marina B. Martinez, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian*, v.47, pag 3-30, 2016.

Guerra RNM. Atividade Imunossupressora dos frutos de *Vismia reichardtiana*. [Tese de doutorado] Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 1997

Guerra, S.T; Paula, C.L.D; Bolaños, C.A.D; Hernandez, R,T; Ribeiro, M.G. Fatores de virulência de *Escherichia coli*: Revisão de Infecções em Humanos e animais com Ênfase na Mastite Bovina. *Revista Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, p. 2087-2100, 2019.

Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, Mah TF, Griffith M, Alarcon EI. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience*, v. 24, n. 5, 2021.

Haine, E.R. Pollitt, L.C; Moret, Y, Siva-Jothy, M.T a, Rolff, J. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 6, p. 1090-1097, 2008.

Hartmann RCB; Kakitani DH; Sawada AY. A prevalência bacteriana de colonização versus infecção de pacientes internados em UTI'S. *Revista Uningá*, v. 55, n. S1, p. 97-105, 2018.

- Iamada, P. Prevalência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário. Academia de Ciência, Tecnologia São José do Rio Preto. p.1-10, 2017.
- Kant, V.; Singh, P.; Verma, P.K.; BAIS, I.; Parmar M.S.; Gopal A. and Gupta, V. Anticoccidial drugs used in the poultry: An overview. *Sci Int*, 1: 261-265, 2013.
- Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol.*;301(8):642-647, 2011. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
- Korb, A; Nazareno, E; Mendonça, F; Dalsenter, P. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v.13, n.1, p.72-79, 2013.
- Leite, L , Tintino, S.R , Figueredo, F.G , Oliveira, C.D.M , Oliveira, L , Siebra, A.L.A, Sampaio, R.S.S , Boligon, A.A , Souza, D.O, Athayde, M.L, Coutinho, H.D.M , Costa, J.G.M, Lima, M.F.P; Borges, M.A; Parente, R.S; Júnior, R.V., Oliveira, M.E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. *Revista UNINGÁ*, v.21, n.1, pag.32-39, 2015.
- Lins, A. C. S.; Agra, M. F.; Conceição, D. C. O; Pinto, F. C. T.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante das partes aéreas de *Clusia paralicola* (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). *Revista Virtual de Química*, v.8, p. 157-168, 2016.
- Longo, F; Vuotto, C; Donelli, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*, vol.37, pag. 119-127, 2014.
- Lopes, A.S.N. Constituintes químicos e atividade antioxidante em *Vismia cayeannensis* (Jacq.) Pers. [Dissertação de Mestrado], Universidade Federal do Amazonas, AM, Brazil, 2023.
- Lorenzi H and Matos FJA: Medicinal plants of Brazil, native and exotic. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; p. 512, 2002.
- Macfoy C.A.; Sama, A.M. Medicinal Plants in Pejehun district of Sierra Leone. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 8: p. 215-223, 1983.
- Machado, P. R. L.; Araújo, M. I. A. S.; Carvalho, L.; Carvalho, E. M. Immune response mechanisms to infections. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, n.6, p.647-664, 2004.
- Manitz, J.; Kneib, T.; Schlather, M.; Helbing, D.; Brockmann, D. Detecção de origem durante surtos de doenças transmitidas por alimentos - Um estudo de caso do surto de EHEC/HUS de 2011 na Alemanha. *PLoS atual*.2014.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S. *Microbiologia de Brock - 14a Edição*. [s.l.]: Artmed Editora, 2016.

Marmitt, D.J; Rempel, C; Goettert, M.I; Silva, A.C. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: Revisão Sistemática. Revista de Saúde Pública, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2024.

Mickymaray, S. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. Antibiotics, v. 8, n. 4, p. 257, 2019.

Motta, E.P., Farias, J.R., Costa, A.A.C., Silva, A.F., Oliveira-Lopes, A.J., Cartágenes, M.S.S., Nicolete, R., Abreu, A.G., Fernandes, E.S., Nascimento, F.R.F., Rocha, C.Q., Monteiro, C.A., Guerra, R.N.M. The Anti-virulence effect of *Vismia guianensis* against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Antibiotics, vol.11(12): 1834, 2022. doi: 10.3390/antibiotics11121834.

Muniz, SB; Atividade anti-*Candida albicans* e *Candida parapsilosis* de *Vismia guianensis*, [Monografia] Curso de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, 2022.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev.;11(1):142-201, 1998.

Ochoa, T.J.; Contreras, C.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. Current opinion in infectious diseases, v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.

Oliveira A.G, Silveira, D. Resistência microbiana a antibióticos: quo vadis? Revista Infarma Ciências Farmacêuticas, v.33, p.215-216, 2021.

Oliveira, A.H.; Portuondo, D.F; Duharte, A.B; Carlos, I.Z. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii* Journal of Ethnopharmacology, p. 266-274, 2017.

Oliveira, G. R., Oliveira, V. B. de, Cunha, R. S. da, Mazarotto, E. J., Gregório, P. C., Oliveira, M; Pereira K.D.S; Zamberla, C.R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública, Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação. Criciúma, v. 6.n.11, pag. 2675 –3337, 2020.

Oliveira, O.H. Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre). [Dissertação de Mestrado] – Universidade Estadual Paulista; São Paulo, SP, Brazil, 2009.

Paim R, Lorenzini E. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana. Rev Cuid. vol.5, pag.757-64, 2014. <http://dx.doi.org/10.15649/cuidarte.v5i2.88>

Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. Int J Mol Sci.; 22(18):9922, 2021. doi: 10.3390/ijms22189922. Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. Current Opinion Infectious Diseases, 24(5): 478-483, 2021.

- Pantoja, V.C; Bermúdez G.U; Extracción y caracterización del aceite de las larvas del *Tenebrio molitor*. Revista Sociedade de Química Peru, v.76.(4), 2010.
- Persat, A; Nadell, C.D; Kim, M.K; Ingremeau, F; Siryaporn, A; Drescher, K; Ned S.W; Bassler, B.L; Gitai, Z; Stone, H.A. The Mechanical World of Bacteria, Cell, v. 161, p. 988-997, 2015.
- Pinheiro, L., Martins, C., Martins, C., Caires, P., Aragão, V., Aragão, O., Ferraz, R., Felisberto, Y., Neto, F., Chaves, M. Fatores e risco e mortalidade em pacientes criticamente enfermos com infecções por microrganismos multirresistentes. Revista Eletrônica Acervo Saúde. v.13, n.4, 1-7, 2021.
- Pironon, Samuel et al. The global distribution of plants used by humans. Science, v. 383, n. 6680, p. 293-297, 2024.
- Politi, M., Sanogo, R., Ndjoko, K., Guilet, D., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., & Morelli, I. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. Phytochemical Analysis, V.15, p. 355-364, 2004.
- Pontinen, A. K., Top, J., Alonso, S. A. A., Hill, G. T., Freitas, A. R., Novais, C., Gladstone, R. A., Pesonen, M., Menezes, R., Pesonen, H., Lees, J. A., Jamrozy, D., Bentley, S. D., Lanza, V. F., Torres, C., Peixes, L., Coque TM, Parkhill J, Schurch AC, Willens RJL, Corander, W., Corander, J. Apparent nosocomial adaptation of *Enterococcus faecalis* predates the modern hospital era. Nature Communications, 12: 1-13. 2021.
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiology spectrum, 6 (4), 2018
- REFLORA. <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil>, consulta em 3 de janeiro de 2025.
- Reis, A. C. S.; Maranhão, P.; Moura, L. A.; Maranhão, M. Nova tendência da medicação intracanal para a atuação sobre *Enterococcus faecalis*: uma revisão de literatura. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research. v.24, n.1, p.115-121, 2018.
- Richards, K., & ARME, C. The rostellar tegumentary cytoplasm of the metacestode of *Hymenolepis diminuta* (Cyclophyllidae: Cestoda). Parasitology, v.86(1), p.83-88, 1983.doi:10.1017/S003118200005719X
- Rodrigues, I.C. Desenvolvimento e padronização de produto seco por aspersão de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. com atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Manaus, AM. Universidade Federal do Amazonas, 2013.
- Rodrigues, T.S.; Santos, A.M.R.; Lima, P.C.; Moura, M.E.B.; Goiano, P.D.O.L; Fontinele, D.R.S. Resistência bacteriana à antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. Revista Infecção e Saúde, v.4, p. 73-50, 2018.

- Santos, M.J.L; Machado, I.C. Biologia floral e heterostilia em *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). Acta Botanica Brasileira, v.12, n. 3, p.451-464.1998.
- Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D. M.; Hall-Stoodley, L.; Burmolle, M.; Stewart, P. S.; Bjarnsholt, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. vol.20, pag.608-620, 2022.
- Siddiqui, M. F; Singh, L; Zularisam, A.W; Sakinah, M. Biofouling mitigation using Piper betle extract in ultrafiltration MBR. Desalination and Water Treatment, v. 51, n. 37-39, p. 6940-6951, 2013.
- Silvestre, R.G; Moraes, M.M; Lins, A.C.S; Ralph, M.T; Filho, J.V.L; Camara, C.A; Silva, T.M.S. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. African Journal of Biotechnology, v. 11, p. 9888-9893, 2012.
- Simonetti, E.; Ethur, M.E.; Castro, L.C.; Kauffmann, C.; Giacomini, A.C.; Ledur, A; Arossi, K; Pacheco, L.A; Goettert, M.I; Faleiro, D.; Freitas, E.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 18: 9-18, 2016.
- Souza, P. C.; Caloni, C. C.; Wilson, D.; Almeida, R. S. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. v.4, n.125, p.1-12, 2018
- Souza, P.C; Morey, T.A; Castanheira, G.M; Bocate, K.P; PANagio, L.A;
- Tto, F.A; Furlaneto, M.C; Ogatta, S.F.Y; Costa, I.N; Mora-montes, H.M; Almeida, R.S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. Journal of Microbiology Methods. v.118, p.182-186,2015.
- Subramanian, S; Huiszoon, R.C; Chu, S; Bentley W.E; Ghodssi, R. Microsystems for biofilm characterization and sensing – A review. Biofilm, v.2, 100015, 2.
- Suffredini IB, Paciencia MLB, Varella AD, Younes RN: In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. Fitoterapia vol.78, pag. 223-226, 2007.
- Tapader R, Basu S, Pal A. Secreted proteases: A new insight in the pathogenesis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol.; 309(3-4):159-168, 2019.
- Tala, M.F. et al. Anthraquinones and triterpenoids from seeds of *Vismia guineensis*. Biochem. Syst. Ecol, v. 50, p. 310-312, 2013.
- Toledo, E; Folcon, N; Flores, C; Rebatta, M; Guevara, J; Ramos, D; Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* obtenidas de muestras de heces de cerdos destinados a Consumo Humano. Revista Salud y Tecnología Veterinaria, 3: 35-40, 2015.

Teffo L.S, Aderogba M.A, Eloff J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 76: 25 – 29, 2010.

Vyas, H.K.N; Xia, B; Mai-prochnow, A. Clinically relevant in vitro biofilm models: A need to mimic and recapitulate the host environment. *Biofilm*, v. 4, p. 100069, 2022.

Xavier, A. De L., Silva, N. C. De O., Soares, R. R., Abreu, S., De Araújo, E. A., Júnior, J. B. O., Siqueira, A. B. S. Antibacterial activity of the ethanolic extract of Brazilian red propolis against multidrug-resistant extended-spectrum β lactamase and carbapenemase-producing bacteria.v.19, n.4, p. 1-12, 2023.