

**TÍTULO:** MARCAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* COM FLUOROCROMO PARA USO NO ENSAIO DE INIBIÇÃO DE ALIMENTAÇÃO LARVAR

**AUTOR(ES):** ALESSANDRO PELEGRINE MINHO, ROBERT DOMINGUES, NATÁLIA JANOVIK, EMANUELLE BALDO GASPAR

**INSTITUIÇÃO:** EMBRAPA PECUÁRIA SUL

O ensaio de inibição da alimentação larvar é o principal bioensaio para a identificação *in vitro* de componentes bioativos com efeito anti-helmíntico. Entretanto, a execução deste teste esbarra na dificuldade de aquisição de produto comercial contendo bactérias marcadas com fluorocromos. Neste trabalho foram adaptadas metodologias de marcação de *Escherichia coli*, cepa K12, com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do ensaio de inibição da alimentação larvar para avaliações futuras do efeito antiparasitário de extratos vegetais. Após crescimento por 18h a 37 °C em meio infusão de cérebro e coração (BHI), as bactérias foram lavadas com tampão bicarbonato 0,1M e a concentração das mesmas foi ajustada para  $10^{10}$  bactérias/ml. O FITC foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 4 mg/ml e foi adicionado à suspensão de bactérias em tampão, de modo que a concentração final de FITC na suspensão bacteriana fosse 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml. As bactérias foram lavadas e observadas em microscópio de epi-fluorescência. Bactérias marcadas com 400 e 200 µg/ml de FITC foram escolhidas para fazer o ensaio de inibição da migração larvar. Foram acrescentados 100, 50, 20 ou 10 µl de bactérias marcadas com 400 ou 200 µg/ml de FITC em contato com 150 larvas de primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus* diluídas em água de torneira q.s.p. 1 ml, durante 18 horas. As larvas marcadas foram observadas em microscópio de epi-fluorescência. Larvas que se alimentaram das bactérias marcadas com FITC apresentaram o trato digestório com marcação fluorescente. Estes experimentos permitiram a escolha da concentração de FITC de 200 µg/ml para a marcação das *E. coli* e da quantidade de 50 µl de bactérias/150 L1. Esta padronização mostrou que o experimento de inibição da alimentação larvar é factível e de fácil execução, mesmo sem a disponibilidade comercial de bactérias marcadas com fluorocromo.