



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO



***Platonia insignis* Mart: Caracterização Química e efeito antimicrobiano em bactérias causadoras de sepse.**

São Luís
2022

DANIELLE CRISTINE GOMES FRANCO

***Platonia insignis* Mart: Caracterização Química e efeito antimicrobiano em bactérias causadoras de sepse.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra.

São Luís
2022

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

Franco, Danielle Cristine Gomes.

Platonia insignis Mart: Caracterização Química e efeito antimicrobiano em bactérias causadoras de sepse / Danielle Cristine Gomes Franco. - 2022.

81 p.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Antibacteriano. 2. Enterococcus faecalis. 3. Escherichia coli. 4. Platonia insignis. 5. Sepse. I. Guerra, Rosane Nassar Meireles. II. Título.

DANIELLE CRISTINE GOMES FRANCO

***Platonia insignis* Mart: Caracterização Química e efeito antimicrobiano em bactérias causadoras de sepse.**

Aprovado em: 27 de Setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Marcia Cristina Gonçalves Maciel
Universidade de Brasília

Rafael Cardoso Carvalho
Universidade federal do Maranhão

Elizângela Araújo Pestana Motta
Universidade Estácio de Sá

Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

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

“A ciência não é perfeita, com frequência é mal utilizada. Não é mais que uma ferramenta, mas, ainda assim, é a melhor ferramenta que temos. Se autocorrige, sempre está evoluindo e pode se aplicar a tudo. Com esta ferramenta conquistamos o impossível”

Carl Sagan

Dedico este trabalho a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a
sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e força para superar todos os desafios nesta trajetória.

Aos meus pais, pelo suporte e por não medirem esforços para me ajudarem.

Aos meus irmãos pelo carinho.

Ao meu grande parceiro e amigo neste processo tão importante, Josivan Regis Farias, pela instrução, dedicação e companheirismo em todos os experimentos e elaboração deste trabalho.

Ao meu amigo e companheiro Arthur André, por sempre se dispor a me auxiliar desde o início deste projeto de pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra, pela generosa orientação, pelo incentivo para que eu sempre persistisse no mundo da ciência, pela compreensão nos momentos difíceis que tivemos na pandemia, pelo apoio, aqui fica registrado a minha gigantesca admiração pelo exemplo de pessoa e profissional.

A Jefferson, pelo cuidado, preocupação e disponibilidade em todos esses anos.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN) coordenado pela Profa. Dra. Claudia Quintino da Rocha e colaboradoras Jessyane Nascimento e Amanda Miranda, grata pela atenção e dedicação em contribuir com esta pesquisa.

Aos amigos de laboratório, Vitor Ferreira, Alex Brall, Andréa Galiza, Aline Santana, Aluísio Oliveira, Nicolle Barbosa, Pamela, Simone, Anderson, Gleycka Frazão, Irla Licá, Cláudia pelas trocas de conhecimentos.

A Renan pelo auxílio e incentivo nesta etapa tão importante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de mestrado.

Aos queridos professores da banca examinadora da qualificação, pela disposição e contribuições para o enriquecimento deste estudo.

A toda minha família que sempre incentivou meus estudos e mesmo com distância física sempre fez questão de estarem presentes de alguma forma.

A todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

A sepse é um problema de saúde pública, pois ocasiona anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas que são provocadas pela infecção associada à inflamação sistêmica não controlada. Dessa forma, a busca por novos tratamentos é sempre necessária, sendo os produtos naturais uma das alternativas mais promissoras, a exemplo, a espécie vegetal *Platonia insignis* Mart. As várias partes de *P. insignis* apresentam atividades biológicas diversas, porém existem poucos estudos utilizando as folhas. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar quimicamente o extrato hidroetanólico das folhas de *P. insignis* Mart (EHPI) e avaliar sua toxicidade e efeito antibacteriano do *in vitro* e *in vivo*. O EHPI foi caracterizado quimicamente por (CLAE-DAD) e (LC-ESI/MS). A toxicidade foi avaliada *in vitro* utilizando-se eritrócitos de carneiro e *in vivo* em larvas *Tenebrio molitor*. O perfil de sensibilidade antibacteriana do extrato, foi determinado a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), em amostras padrão de bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *S. pneumoniae* (ATCC 49619)] e Gram-negativas [*Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)]. A partir dos resultados dos CIM/CBM, foram realizados ensaios de curva de crescimento, viabilidade do biofilme e avaliação do efeitos do EHPI na infecção letal em larvas de *Tenebrio molitor* com *Enterococcus faecalis* ou *Escherichia coli* ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL). Avaliamos também os efeitos do EHPI *in vivo* em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana pelo método de perfuração e ligação cecal (CLP). A caracterização química identificou a presença de Ácido quínico, Vitexina, Orientina, Ononina, Fukugentina, Dímero de Fukugentina e Dímero de Procianidina como compostos majoritários. A atividade hemolítica para eritrócitos de carneiro foi inferior a 3% para as três menores concentrações de (1 mg/mL: 0,257% e 5 mg/mL: 2,079% e 10 mg/mL: 2,075%) e foi de 11% para a concentração de 50 mg/mL indicando baixa toxicidade. A baixa toxicidade do extrato nas mesmas doses foi também confirmada *in vivo* em larvas de *T. Molitor*. Somente a maior concentração (50mg/kg) foi tóxica para as larvas. O extrato apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* para todas as cepas testadas, sendo mais efetivo para *E. faecalis* (0.19 ± 0.17) e *E. coli* (0.25 ± 0.11). Além disso o EHPI reduziu a curva de crescimento e diminuiu a viabilidade do biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *E. coli* (ATCC 35218). Na avaliação *in vivo* as larvas infectadas e não tratadas morreram em até 72h, já o tratamento com EHPI prolongou a sobrevivência de todos os animais letalmente infectados com *E. faecalis* (ATCC 29212) ou *E. coli* (ATCC 35218), de forma dose dependente e com eficácia semelhante ao Meropenem. No ensaio de sobrevivência realizado com camundongos, o EHPI apresentou melhor resultado em relação aos outros grupos. Concluímos que o aumento da sobrevivência dos animais está associado à presença de compostos bioativos com atividade antimicrobiana, com atuação direta sobre o crescimento bacteriano, o que permite classificar o EHPI como importante alvo na bioprospecção de produtos com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Sepse, Antibacteriano, *Platonia insignis*; *Escherichia coli*. *Enterococcus faecalis*; *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Sepsis is a public health problem, as it causes physiological, pathological, and biochemical abnormalities as a result of an association between the infection and the uncontrolled systemic inflammation. Thus, the search for new treatments is always necessary, and the natural products are the most promising alternatives, including, the plant species *Platonia insignis* Mart. The various parts of *P. insignis* have different biological activities, but there are few studies using the leaves. Thus, our aim was to chemically characterize the hydroethanolic extract of *P. insignis* Mart leaves (EHPI) and to evaluate its toxicity and its antibacterial effect *in vitro* and *in vivo*. The EHPI was chemically characterized by (HPLC-DAD) and (LC-ESI/MS). Toxicity was evaluated *in vitro* using sheep erythrocytes and *in vivo* on *Tenebrio molitor* larvae. The antibacterial sensitivity profile was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), using standard samples of Gram-positive bacteria [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *S. pneumoniae* (ATCC 49619)] and Gram-negative [*Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)]. The EHPI *in vivo* action was determined in *Tenebrio molitor* larvae lethally infected with *Enterococcus faecalis* or *Escherichia coli* (1.5×10^8 CFU/ mL) and in mice to a polymicrobial sepsis cecal perforation and ligation (CLP) method. The major compounds identified were Quinic Acid, Vitexin, Orientin, Ononine, Fukugentin, Fukugentin Dimer and Procyanidin Dimer. Hemolytic activity for sheep erythrocytes was less than 3% for the three lowest concentrations (1 mg/mL: 0.257% and 5 mg/mL: 2.079% and 10 mg/mL: 2.075%) and was 11% for the highest concentration (50 mg/kg). The low toxicity of the extract was also confirmed *in vivo* after treatment of *T. molitor* larvae with the same doses, but in this assay the highest concentration (50mg/mL) was toxic to the larvae. The extract showed *in vitro* antimicrobial activity for all strains tested, but was more effective for *E. faecalis* (0.19 ± 0.17) and *E. coli* (0.25 ± 0.11). The treatment with EHPI reduced the growth curve and decreased the viability of *E. faecalis* (ATCC 29212) or *E. coli* (ATCC 35218) biofilms. The infected and untreated larvae died within 72 hours, while the treatment with EHPI prolonged the survival of all animals lethally infected with *E. faecalis* (ATCC 29212) or *E. coli* (ATCC 35218), in a dose-dependent manner. and with similar efficacy to Meropenem. EHPI was also able to improve the survival mice submitted to lethal Sepsis by CLP, when compared to the other groups. In conclusion EHPI improved the survival during experimental sepsis due to the presence of bioactive compounds with antimicrobial activity, and direct action on bacterial growth, which allows classifying the EHPI as an important target in the bioprospecting of products with antibacterial activity.

Keywords: Sepsis, Antibacterial, *Platonia insignis*; *Escherichia coli*. *Enterococcus faecalis*; *Tenebrio molitor*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Perfil celular e molecular da resposta inflamatória na sepse.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Etapas de formação do biofilme. Fases reversíveis e fases irreversíveis (Motilidade, Adesão, Maturação, Dispersão e propagação). ...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3. Modelo experimental de “ligadura e perfuração cecal – CLP”**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Ciclo de vida do *T. molitor*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5. Exemplar da espécie vegetal *Platonia insignis* (Mart.)**Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. Resumo esquemático do ensaio de toxicidade aguda**Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. O tratamento com o extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. (EHPI) aumenta a sobrevivência de animais submetidos a sepse por perfuração e ligação cecal (CLP)... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 8. Cromatogramas do extrato hidroetanólico de *Platonia insignis*. Íons totais obtidos na análise por CLAE-PDA..... 49

Figura 9. Estrutura das substâncias identificadas no extrato hidroetanólico das folhas de *Platonia insignis*..... 50

Figura 10. O extrato hidroetanólico das folhas de *Platonia insignis* (EHPI) apresenta baixa toxicidade para eritrócitos de carneiro 51

Figura 11 O extrato das folhas de *Platonia insignis* (EHPI) apresenta baixa toxicidade para as larvas de *T. molitor*..... 52

Figura 12 O tratamento in vitro com EHPI inibe o crescimento de *E. faecalis* (A) e *E.coli* (B)..... 54

Figura 13 . O tratamento com EHPI in vitro inibe a formação do biofilme de *E. faecalis* (A) e *E. coli*. (B)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 14 O tratamento com EHPI aumenta a sobrevivência de larvas de *T. molitor* infectadas com *E. faecalis* (A) e com *E.coli* (B).....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fatores de virulência de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas causadoras de sepse. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Formas bacterianas causadoras de sepse, sensibilidade aos antibacterianos e estratégias de tratamento. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. *Platonia insignis Mart: Partes* da planta, atividade biológica, constituintes químicos e tipos de extração. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4. Identificação das substâncias do extrato hidroetanólico das folhas de *Platonia insignis*. 50

Tabela 5. Determinação na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da ação bactericida ou bacteriostática do EHPI. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Ágar Mueller Hinton
APCs	Célula Apresentadora de Antígenos
AQ	Ácido Quínico
ATCC	Coleção de Cultura Tipo Americana
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPS	Polissacarídeo Capsular
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DIC	Coagulação Intravascular Disseminada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EHPI	Extrato Hidroetanólico de <i>Platonia insignis</i>
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FIA	Injeção de Fluxo Contínuo
GPX	Glutathione Peroxidase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IT	<i>Ion-Trap</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
RRP	Receptores de Reconhecimento de padrões
SOD	Superóxido Dismutase
TGF-β	Fator de Transformação de Crescimento beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2. REFERENCIAL TEÓRICO	Erro! Indicador não definido.
2.1 Sepse: definição e contexto geral	Erro! Indicador não definido.
2.2. Sistema Imune e sepse bacteriana	Erro! Indicador não definido.
2.3 Fatores de virulência bacteriana	Erro! Indicador não definido.
2.3.1 Cápsula Bacteriana	Erro! Indicador não definido.
2.3.2 Mudança morfológica	Erro! Indicador não definido.
2.3.3 Formação de Biofilme	Erro! Indicador não definido.
2.3.4 Outros fatores de virulência	Erro! Indicador não definido.
2.4 O Tratamento antibacteriano e seus desafios na sepse	Erro! Indicador não definido.
2.5 Modelos experimentais de sepse	Erro! Indicador não definido.
2.6 Bioprospecção de produtos naturais com finalidade antimicrobiana	Erro! Indicador não definido.
2.7 <i>Platonia insignis</i> Mart.	Erro! Indicador não definido.
3. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.3 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
3.4 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Obtenção e preparo do extrato das folhas de <i>P. insignis</i> (EHPI)	Erro! Indicador não definido.
4.2 Análise do extrato bruto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ...	Erro! Indicador não definido.
4.3 Caracterização química por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS)	Erro! Indicador não definido.
4.4 Determinação da atividade hemolítica	Erro! Indicador não definido.
4.5 Ensaio da toxicidade aguda em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> ...	Erro! Indicador não definido.
4.6 Microrganismos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.

- 4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.9 Efeito do EHPI sobre a Curva de crescimento **Erro! Indicador não definido.**
- 4.10 Efeitos do EHPI na formação do Biofilme **Erro! Indicador não definido.**
- 4.11 Ensaio da infecção letal das larvas de *T. molitor* **Erro! Indicador não definido.**
- 4.12 Indução de sepse pelo método de ligação e perfuração cecal - CLP (*cecal ligation and puncture*)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.12.1 Avaliação da sobrevida após a CLP **Erro! Indicador não definido.**
- 4.13 Análise estatística **Erro! Indicador não definido.**
- 5. RESULTADOS Erro! Indicador não definido.**
- 5.1 EHPI aumenta sobrevida de camundongos com sepse.. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.2 Caracterização Química e identificação de compostos presentes no extrato..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.3 EHPI apresenta baixa toxicidade *in vitro*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.4 EHPI apresenta baixa toxicidade em larvas de *T. molitor*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.5 EHPI tem ação antimicrobiana para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas **Erro! Indicador não definido.**
- 5.6 EHPI inibe crescimento de *E. coli* e *E. faecalis*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.7 O tratamento com EHPI reduz a viabilidade de biofilmes de *E. faecalis* ou *E. coli*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.8 EHPI aumenta sobrevida das larvas de *T. molitor* infectadas com *E. faecalis* ou *E. coli*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 6. DISCUSSÃO Erro! Indicador não definido.**
- 7. CONCLUSÕES Erro! Indicador não definido.**
- REFERÊNCIAS..... Erro! Indicador não definido.**
- ANEXOS Erro! Indicador não definido.**

