

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ– CCIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

THAMYRES FREITAS FERNANDES

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze E SUAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS

IMPERATRIZ

2023

THAMYRES FREITAS FERNANDES

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze E SUAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: Tecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Queli Cristina Fidelis

Coorientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro

IMPERATRIZ

2023

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

Freitas Fernandes, Thamyres.

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM
Marsypianthes chamaedrys Vahl Kuntze E SUAS ATIVIDADES
ANTIBACTERIANAS / Thamyres Freitas Fernandes. - 2023.
89 p.

Coorientador(a): Victor Alves Carneiro.

Orientador(a): Queli Cristina Fidelis.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Tecnologia/ccim, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2023.

1. Compostos fenólicos. 2. Flavonoides. 3.
Lamiaceae. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5. Staphylococcus
aureus. I. Alves Carneiro, Victor. II. Fidelis, Queli
Cristina. III. Título.

THAMYRES FREITAS FERNANDES

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze E SUAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr.^a Queli Cristina Fidelis (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof.^a Dr.^a Regina Maria Mendes Oliveira
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof.^a Dr.^a Shirley Cunha Feuerstein
Instituto de Ensino Superior do Sul do Maranhão (IESMA/UNISULMA)

FICHA DEDICATÓRIA

A Deus e a minha família, minha fonte inesgotável de força e esperança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é toda luz em minha vida, pela incrível oportunidade de realizar mais este sonho e por através deste, passar por um grande processo de evolução acadêmica, profissional e pessoal.

Ao meu esposo e companheiro de vida, Carlos Airton Sanches pelo incentivo, cuidado e apoio em todas as minhas decisões, e por acreditar sempre em mim. Você faz de mim uma pessoa melhor, e por isso eu amo você!

Aos meus pais, irmãs e filha de coração, agradeço pelo amor, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida. Agradeço por compreenderem minha ausência e por acreditarem em minha capacidade de vencer desafios.

A minha orientadora Professora Dra. Queli Cristina Fidelis pelo apoio, incentivo, compromisso e dedicação para realização deste trabalho.

Ao melhor mentor do mundo, professor Dr. Richard Pereira Dutra, com quem muito aprendi e tenho enorme admiração. Serei eternamente grata por tantos ensinamentos, credibilidade, cuidado, apoio e boas energias.

Aos meus queridos amigos e companheiros de bancada Mércia Machado, Efraim Pereira, Wanderson de Sousa e Daniele Caua pelas experiências compartilhadas e por fazerem dos dias de laboratório momentos mais leves e alegres.

A todos do Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão, em especial ao professor Dr. Carlos Alexandre Holanda, Euzinete Borges e a melhor técnica do mundo, Jaqueline Barros, pelo inestimável apoio e colaboração na pesquisa.

Ao professor Dr. Aramys Reis e a Tatielle Dias, do Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica da Universidade Federal do Maranhão, pelo apoio, disponibilização de espaço e equipamentos para análises biológicas.

A todos do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada do Centro Universitário Inta (UNINTA), campus Sobral – CE.

A professora Dra Shirley Cunha Feuerstein, ao professor Me Francisco Dimitre e a todos dos Laboratórios da Área da Saúde do Instituto de Ensino Superior do Sul do Maranhão (IESMA/UNISULMA), pelo apoio e parceria.

Aos professores e colegas do PPGST - UFMA pelo apoio durante estes dois anos de mestrado, e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Que Deus abençoe a todos!

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e no céu passavam cenas de minha vida. Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia. Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida.

Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao meu Senhor: - Senhor, tu não me disseste que, tendo eu resolvido te seguir, tu andarias sempre comigo, em todo o caminho? Contudo, notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo por que nas horas em que eu mais necessitava de ti, tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu: - Meu querido filho. Jamais te deixaria nas horas de prova e de sofrimento. Quando viste na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí, que te carreguei nos braços.

(Autor desconhecido)

RESUMO

Produtos de origens naturais vem sendo utilizados em tratamentos de afecções de pele, e tem demonstrado grande potencial até mesmo contra microrganismos multirresistentes. *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze é uma planta da família Lamiaceae com uso medicinal. Esta espécie tem demonstrado rica composição química e atividade anti-inflamatória, bem como atividade antioxidante *in vitro*. Nanopartículas de prata são compostos de tamanho nanométricos que vem sendo pesquisadas e utilizadas em formulações cosméticas e fármacos principalmente por apresentarem atividade antibacteriana. Este trabalho avaliou o perfil químico e atividade antibacteriana de *Marsypianthes chamaedrys* frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e sintetizou nanopartículas de prata utilizando o método de síntese verde. No primeiro capítulo foi realizado uma revisão integrativa sobre a utilização de plantas da família Lamiaceae no tratamento de infecções de pele causadas por microrganismos. Os resultados mostram que a família Lamiaceae apresenta importante atividade antimicrobiana *in vitro* e em estudos clínicos randomizados. Seus extratos, frações, óleos essenciais ou constituintes isolados demonstraram atividade antimicrobiana promissoras. No segundo capítulo foi realizada a síntese e avaliação antibacteriana de nanopartículas de prata com frações de *M. chamaedrys*. O extrato etanólico da parte aérea foi submetido a fracionamento por partição com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano, diclorometano e acetato de etila. Em seguida foram obtidos o perfil químico, determinação de fenóis totais e flavonoides e análise de espectrometria de massas, e atividade antibacteriana do extrato e frações de *M. chamaedrys*. As frações de maiores polaridades apresentaram teores elevados de fenóis e flavonoides. A análise de espectrometria de massas da fração em diclorometano revelou a presença de dezoito compostos, sendo catorze ácidos fenólicos, dois flavonoides e dois ácidos graxos. A fração em diclorometano apresentou a maior concentração de flavonoides totais e foi a única amostra a apresentar atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 200 µg.mL⁻¹ para ambas. Para potencializar a atividade antibacteriana de *M. chamaedrys*, foram sintetizadas nanopartículas de prata. A fração de *M. chamaedrys* foi usado como agente redutor, produzindo partículas com formato esférico, estrutura cristalina e tamanho inferior a cem nanômetros. As nanopartículas de prata apresentaram efeito bactericida contra ambas as bactérias e baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7. Os resultados deste estudo demonstram o potencial biossintético de *M. chamaedrys* na síntese de nanopartículas de prata para uso terapêutico, sendo a fração em diclorometano a mais ativa contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (CIM de 50 µg.mL⁻¹) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM de 100 µg.mL⁻¹). O método de síntese verde é uma alternativa para a produção de nanopartículas de prata com baixa toxicidade e potencial antibacteriano, podendo-se sugerir uma opção promissora ao desenvolvimento de fitoformulações contra infecções de pele causadas por bactéria de interesse clínico.

Palavras-chaves: Lamiaceae. Compostos fenólicos. Flavonoides. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRAT

Natural origins products have been used in skin treatments and have shown great potential even against multi-resistant microorganisms. *Marsypianthes chamaedrys* (VAHL) Kuntze is a Lamiaceae family plant with medicinal use. This species has shown rich chemical composition and anti-inflammatory activity, as well as *in vitro* antioxidant activity. Silver nanoparticles are composed of nanometric size that have been researched and used in cosmetic formulations and drugs mainly because they have antibacterial activity. This work evaluated the chemical profile and antibacterial activity of *Marsypianthes chamaedrys* against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and synthesized silver nanoparticles using the green synthesis method. In the first chapter, an integrative review was made on the use of Lamiaceae family plants in the treatment of skin infections caused by microorganisms. The results show that the Lamiaceae family has an important antimicrobial activity *in vitro* and in randomized clinical studies. Their extracts, fractions, essential oils or isolated constituents demonstrated promising antimicrobial activity. In the second chapter, the synthesis and antibacterial evaluation of silver nanoparticles with *M. chamaedrys* fractions was made. The ethanolic extract of the aerial part was subjected to partition fractionation with solvents in increasing order of polarity, hexane, dichloromethane, and ethyl acetate. Then the chemical profile, determination of total phenols and flavonoids and mass spectrometry analysis, and antibacterial activity of the extract and *M. chamaedrys* fractions were obtained. The fractions of greatest polarities presented high levels of phenols and flavonoids. Dichloromethane fraction mass spectrometry analysis revealed the presence of eighteen compounds, fourteen phenolic acids, two flavonoids, and two fatty acids. The fraction in dichloromethane presented the highest concentration of total flavonoids and was the only sample to present antibacterial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, with minimum inhibitory concentration (CIM) of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both. To enhance the antibacterial activity of *M. chamaedrys*, silver nanoparticles were synthesized. The fraction of *M. chamaedrys* was used as a reductive agent, producing spherical-shaped particles, crystalline structure, and size less than one hundred nanometers. Silver nanoparticles had a bactericidal effect against both bacteria and low cytotoxicity in raw 264.7 macrophages. The results of this study demonstrate the biosynthetic potential of *M. chamaedrys* in silver nanoparticles synthesis for therapeutic use, being the most active dichloromethane fraction against bacteria *S. aureus* (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and *P. aeruginosa* (CIM 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The green synthesis method is an alternative for the production of low-toxicity silver nanoparticles and antibacterial potential, and a promising option can be suggested for the development of skin infections caused by bacteria of clinical interest.

Keywords: Lamiaceae. Phenolic compounds. Flavonoids. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

Figura 1 -	Furúnculo localizado no membro inferior de paciente adulto do sexo masculino	21
Figura 2 -	Foliculite no tronco, apresentando pápulas eritematosas. Produzida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 3 -	<i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	25
Figura 4 -	Síntese verde de nanopartículas de prata	28
Capítulo I	Utilização de plantas da família Lamiaceae frente às afecções de pele	
Figura 1 -	Fluxograma de seleção dos artigos incluídos no estudo	34
Figura 2 a -	O número de estudos por atividades	36
Figura 2 b -	O número de estudos por material	36
Figura 2 c -	Número de espécies de Lamiaceae por patógenos	36
Capítulo II	Perfil fenólico por CLAE-IES-SM^N de extrato e frações de <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze e suas atividades antioxidante e antibacteriana	
Figura 1 -	Cromatogramas de pico base IES-EM (BPC) obtidos do sistema CLAE-EM/EM e UV registrados a 254 e 350 nm da fração FDM	75
Figura 2 -	Compostos identificados na FDM das folhas de <i>M. chamaedrys</i> por espectrometria de massas	77
Figura 3 -	Espectros de nanopartículas de prata AgNP-FDM, AgNP-FAE e AGNP-FHA	78
Figura 4 -	Gráfico de curvas de contorno para a síntese de AgNP-FDM...	79
Figura 5 -	Gráfico de curvas de contorno para a síntese de AgNP-FAE....	79
Figura 6 -	Gráfico de curvas de contorno para a síntese de AgNP-FHA...	80
Figura 7 -	Caracterização das nanopartículas de prata por DLS	80
Figura 8 -	Tamanho da nanopartícula por MET	81
Figura 9 -	Avaliação da viabilidade celular	82
Figura 10 -	Histograma - Percentual do tamanho médio das AgNP-FDM .	83

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 -	Constituintes químicos, ação e referência	26
------------	---	----

Capítulo I

Tabela 1 -	Publicações selecionadas segundo espécie, microrganismo, material, concentração, resultado, referência	37
------------	--	----

Capítulo II

Tabela 1 -	Constituintes identificados na fração FDM CLAE-IES-EM ⁿ	76
------------	--	----

Tabela 2 -	Conteúdo fenólico total, flavonoides, antioxidante, concentração inibitória mínima	78
------------	--	----

Tabela 3 -	Variáveis experimentais para otimização de nanopartículas com frações de <i>M. chamaedrys</i>	79
------------	---	----

Tabela 4 -	Atividade antibacteriana com e sem biossíntese de nanopartículas de prata.	82
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – *American Type Culture Collection*
- AgNP – NanoPartícula de prata
- AgNP-FAE – NanoPartícula de prata com Fração em Acetato de Etila
- AgNP-FDM – NanoPartícula de prata com Fração em Diclorometano
- AgNP-FHA – NanoPartícula de prata com Fração hidroalcolica
- CCD – *Central Composite Design*
- CFT – Conteúdo de Fenóis Total
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DLS – Dispersão de luz dinâmica
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EBT – Extrato bruto
- ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EAG – Equivalente a ácido gálico
- EQ – Equivalente a quercetina
- IC₅₀ – Concentração inibitória 50%
- FAE – Fração em acetato de etila
- FDM – Fração em diclorometano
- FHA – Fração em hidroalcolica
- FHN – Fração em hexano
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MIC – Concentração inibitória mínima
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilina
- m/z – Razão massa carga
- NPs – Nanopartículas
- NPMs – Nanopartículas metálicas
- PDI – Índice de polidispersão
- TSB – Caldo de tríptica soja
- UFC – Unidade formadora de colônia
- UV-Vis – Espectroscopia na região do ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 A pele	17
3.2 Microbiota cutânea	19
3.3 Infecções de pele	20
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.4 Agentes antimicrobianos nas infecções de pele	22
3.5 Família Lamiaceae e gênero <i>Marsiphyanthes</i>	24
3.5.1 Gênero <i>Marsiphyanthes</i>	24
3.5.2 Espécie <i>Marsiphyanthes chamaedrys</i>	25
3.6 Nanopartículas	27
3.6.1 Síntese verde	27
4. CAPÍTULO I	29
Utilização de plantas da família Lamiaceae frente às afecções de pele	
Introdução	32
Metodologia	33
Resultados	34
Estudos <i>in vitro</i> e clínicos	34
Discussão	45
Conclusões	47
Referências	48

5. CAPÍTULO II	51
Perfil fenólico por CLAE-IES-MS ⁿ de extrato e frações de <i>Marsyphiantes chamaedrys</i> (Vahl kuntze) e suas atividades antioxidante e antibacteriana	
1. Introdução	54
2. Materiais e métodos	56
2.1 Material Vegetal	56
2.2 Reagentes	57
2.3 Obtenção de extrato e fracionamento	57
2.4 Análise de massa por CLAE-IES-MS ⁿ	57
2.5 Determinação do conteúdo de fenóis totais	58
2.6 Determinação do conteúdo de flavonoides	58
2.7 Determinação da atividade antioxidante in vitro (DPPH)	59
2.8 Síntese verde de nanopartículas de prata com frações de <i>M. chamaedrys</i>	59
2.9 Planejamento experimental e otimização por superfície de resposta	59
2.10 Caracterização das nanopartículas de prata com frações de <i>M. chamaedrys</i>	60
2.8 Ensaio de suscetibilidade antimicrobiana	60
2.12 Citotoxicidade das nanopartículas de prata	61
3. Resultados e discussão	62
3.1 Perfil fenólico por CLAE-IES-MS ⁿ	62
3.2 Conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e antioxidante	63
3.3 Síntese verde e otimização de nanopartículas com frações de <i>M. chamaedrys</i>	64
3.4 Caracterização de nanopartículas de prata com frações de <i>M. chamaedrys</i>	65
3.5 Determinação da atividade antibacteriana	66
3.6 Citotoxicidade das nanopartículas de prata	67
4. Conclusão	67
REFERÊNCIAS	69