

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

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E
IMUNOMODULADORA DE PRODUTOS NATURAIS
ASSOCIADOS**

PRISCILA MENDONÇA MENDES

São Luís
2023

PRISCILA MENDONÇA MENDES

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E
IMUNOMODULADORA DE PRODUTOS NATURAIS
ASSOCIADOS**

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.

Orientadora: Dr.^a Márcia Cristina Goncalves Maciel

São Luís

2023

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

Mendes, Priscila Mendonça.

ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE
PRODUTOS NATURAIS ASSOCIADOS / Priscila Mendonça Mendes. -
2023.

96 p.

Orientador(a): Márcia Cristina Goncalves Maciel.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
SÃO LUÍS, 2023.

1. Cicatrização de feridas. 2. Lesões Infectadas. 3.
MRSA. 4. Própolis. 5. Punica granatum. I. Maciel,
Márcia Cristina Goncalves. II. Título.

PRISCILA MENDONÇA MENDES

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E
IMUNOMODULADORA DE PRODUTOS NATURAIS
ASSOCIADOS**

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

Orientadora: Dr.^a Márcia Cristina Gonçalves Maciel

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.^a Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Doutorado em Biotecnologia-RENOBIO
Universidade Federal de Brasília

Prof. Dr. Bruno de Paulo Ribeiro
Doutorado em Ciências da Saúde-UFMA
Faculdade Gianna Beretta

Prof. Dr.^a Andresa Aparecida Berretta
Doutorado em Ciências Farmacêuticas-USP
Apis Flora

Prof. Dr.^a Rachel Melo Ribeiro
Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida que me concedeu, pela saúde e força para superar as dificuldades me capacitando e possibilitando a conclusão de mais uma etapa tão significativa.

Aos meus pais Deusamar Mendes e Kátia Cristina, que nunca pouparam esforços em ajudar-me e incentivaram-me nessa trajetória, sendo exemplos de força, coragem, perseverança e determinação.

Ao meu amigo irmão Lucas Mendes, que esteve comigo sempre me dando forças e palavras de incentivo e conforto. Ao meu tio, Derivaldo por ser um exemplo de humildade e honestidade, torcendo por mim e comemorando todas as minhas pequenas conquistas. Também quero expressar minha gratidão a minha vó Flor Diliz (*in memoriam*) e a todos os familiares e amigos pelo apoio durante essa jornada.

A minha orientadora Professora Dr^a Márcia Cristina Gonçalves Maciel, pela orientação e direcionamento para realização deste trabalho. Sou infinitamente grata pela oportunidade dada e pela paciência, pelas críticas construtivas que me incentivaram ir além. Por ser minha inspiração como pessoa e excelente profissional.

Agradeço a empresa Apis Flora em nome da Professora Dr^a. Andresa Berretta, por ceder o gel padronizado de *Punica granatum* e Própois utilizado nos experimentos.

Agradeço a parceria do Laboratório de Anatomia Patológica (Histopath) por intermédio da professora Dra. Eveline Madeira pela análise histopatológica.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, por ceder a infraestrutura para a realização do experimento de cicatrização, e aos amigos Guilherme Fontoura, Tatielle Gomes, Régis Farias, Luís Douglas, Liliane Rodrigues, Caroline Martins e André Vale.

A Universidade Federal do Maranhão, ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão Campus Bacanga-MA, e a todos os professores e professoras pela oportunidade de desenvolver este trabalho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Constituição da pele	15
2.1.1 <i>Epiderme.....</i>	15
2.1.2 <i>Derme</i>	16
2.1.3 <i>Hipoderme</i>	16
2.2 Cicatrização.....	17
2.2.1 Fases de cicatrização	17
2.2.1.1 <i>Hemostasia</i>	17
2.2.1.2 <i>Inflamação</i>	18
2.2.1.3 <i>Proliferação.....</i>	19
2.2.1.4 <i>Remodelação</i>	20
2.3 Resistência antibacteriana e cicatrização de feridas	20
2.4 Efeito antimicrobiano e imunomodulador de produtos naturais.....	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 <i>Objetivo geral</i>	24
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	24
4. FLUXOGRAMA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL	25
5. RESULTADOS	26
5.1 CAPÍTULO I	26
5.2 CAPÍTULO II.....	53
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO.....	81
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICES	89
ANEXO.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
ADP	Adenosina difosfato
BRP	Própolis Vermelha
BRPE	Extrato de Própolis Vermelha Brasileira
C₄H₉OH	Butanol
CE	Catequina
CHCl₃	Clorofórmio
CI	Isolado clínico
CTRL	Gel base (Controle negativo)
DFC	Controle positivo (Fibrinase®)
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EtOH	Etanol
F8	Transcrição
FV	Fator V
GAE	Ácido gálico
GC-MS	Espectrometria de massa de cromatografia gasosa
H&E	Hematoxilina e Eosina
H₂O	Água
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17A	Interleucina-17A
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
ITUs	Infecções do trato urinário
LC MS/MS	Espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida
LC-MS	Espectrometria de massa de cromatografia líquida

M1	Macrófago Tipo 1 (efeito pró-inflamatório)
M2	Macrófago Tipo 2 (efeito anti-inflamatório)
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MDR	Resistentes a Múltiplas Drogas
MEC	Matriz extracelular
MeOH	Metanol
MFB	Miofibroblastos
MH	Ágar Mueller Hinton
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MMPs	Metaloproteinase de matriz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSSA	<i>S. aureus</i> suscetível à meticilina,
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-bb	Fator de crescimento derivado de plaquetas β -bb
PE	Extrato de própolis
PG	Punicalagina
PGP	Pó de romã
PGRE	Extrato bruto de casca de romã
PPEs	Extratos etanólicos da casca da romã
PPG	Gel contendo extratos <i>Punica granatum</i> e própolis (Associação)
PS	Óleo de semente de <i>Passiflora edulis</i>
RAM	Resistencia Antimicrobiana
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TM	Tricrômico de Masson
TNFα	Fator de Necrose Tumoral
UFCs	Unidades Formadora de Colônias
UPLC	Cromatografia líquida de desempenho ultra-alto
UV	Luz ultravioleta

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Descrição dos materiais, métodos e resultados dos estudos que avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos de *P. granatum*..... 35

Tabela 2. Caracterização química dos extratos de *P. granatum*..... 38

CAPÍTULO II

Tabela 1. Dosagem de citocinas no soro dos diferentes grupos experimentais durante o processo de cicatrização de feridas infectadas por MRSA..... 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da estrutura da pele.	15
Figura 2. Processo de cicatrização de feridas cutâneas.	17
Figura 3: Fluxograma com etapas do desenvolvimento da pesquisa.	25

CAPÍTULO I

Figura 1 - Fluxograma, segundo o Prism, para seleção de estudos.	31
Figura 2 – Principais cepas utilizadas nos estudos.	33
Figura 3 – Principais farmacógenos utilizados de <i>P. granatum</i>	34
Figura 4 – Principais solventes extratores utilizados.	34
Figura 5 - Estrutura dos compostos identificados de extrato de <i>P. granatum</i>	39
Figura 6 - Efeitos do extrato da casca de <i>P. granatum</i> e seus principais compostos bioativos.	44

CAPÍTULO II

Figura 1- Ilustração de procedimentos experimental.	59
Figura 2 – Imagens representativas da evolução da contração das feridas nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10.	62
Figura 3- Efeitos do tratamento tópico com gel PPG em feridas infectadas por MRSA.	62
Figura 4 - Efeitos do tratamento tópico com gel PPG na carga bacteriana de feridas infectadas por MRSA.	63
Figura 5 – Avaliação histológica da cicatrização de feridas infectadas por MRSA e tratadas com a associação de PPG.	65
Figura 6 - Micrografias da lesão na pele de camundongos Swis durante o processo de cicatrização de feridas infectadas por MRSA e tratadas com PPG.	66
Figura 8 – Avaliação histológica da cicatrização de feridas infectadas por MRSA e tratadas com a associação de PPG.	67
Figura 9 - Micrografias da lesão na pele de camundongos Swis durante o processo de cicatrização de feridas infectadas por MRSA e tratadas com PPG.	68
Figura 10- Efeitos do tratamento tópico do Gel contendo em sua constituição a associação de <i>Punica granatum</i> e própolis em feridas infectadas por MRSA.	72

RESUMO

A cicatrização de feridas cutâneas é um mecanismo altamente complexo e dinâmico que visa restaurar o tecido danificado. Entretanto, diversos fatores podem interferir no reparo normal da cicatrização da ferida, como infecções, que provocam inflamação contínua e persistente, resultando numa cicatrização excessiva e na formação de cicatrizes fibroproliferativas, incluindo quelóides e cicatrizes hipertróficas. Essas condições podem acarretar perdas funcionais e estéticas, tornando crucial um adequado desenvolvimento desse processo para a manutenção da função da pele. Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura do potencial terapêutico da espécie *Punica granatum* e investigar o potencial imunomodulador e antibacteriano de uma nanoemulsão contendo a associação de produtos naturais (PPG) sobre um modelo murino de feridas infectadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). O capítulo I tem como título: “Potencial Terapêutico de *Punica granatum* e seus Compostos Isolados: avanços baseados em evidências para tratar infecções bacterianas” e o capítulo II apresenta o estudo experimental do tratamento de feridas infectadas utilizando a formulação contendo associação de produtos naturais. No estudo experimental, as feridas excisionais (78,5 mm²) foram induzidas no dorso de camundongos Swiss fêmeas, os animais foram alocados em três grupos (n=14), incluindo controle negativo (CTRL); Fibrinase® (DFC, controle positivo); uma nanoemulsão contendo a associação de produtos naturais (PPG). Após a indução da lesão, os grupos infectados receberam aproximadamente 1,5×10⁸ CFU/ferida e foram tratados diariamente, desde o 1º dia ao 10º dia pós-infecção. O diâmetro da ferida e a porcentagem de cicatrização foram investigados com o auxílio do software ImageJ. A análise macroscópica das feridas foi realizada em dias alternados. Aleatoriamente, animais de cada grupo foram eutanasiados nos dias 3º, 7º e 10º e, em seguida, a pele da área lesionada foi retirada para análise dos parâmetros histológicos (epitelização, infiltração de células inflamatórias (PMN), proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese). Os níveis de mediadores inflamatórios (IL-2; IL-4; IL-6; IFN-γ; TNF-α; IL-17A; IL-10) foram dosados no soro e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas feridas foram analisadas para verificar a atividade antibacteriana do PPG nos três tempos. O tratamento tópico de feridas em camundongos com lesão infectada induziu retração completa da ferida no dia 10º em todos os grupos. A aplicação tópica de PPG foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a proliferação de macrófagos ($p=0,013$; CTRL=2,33±0,51; DFC=3,33±0,51; PPG=2,33±0,51) e reduzir o índice de PMN ($p=0,038$; CTRL=2,33±0,51, DFC=1,66±0,51; PPG=2,00±0,81) no 7º dia de tratamento. Além disso, foi capaz de aumentar no 10º dia a deposição de colágeno ($p=0,038$; CTRL=2,33±0,51; DFC=2,33±0,51; PPG=3,00±0,00) e angiogênese ($p=0,023$; CTRL=1,50±0,57; DFC=2,00±0,00; PPG=2,33±0,51). Os efeitos positivos do tratamento do PPG na redução de carga bacteriana nos dias 7º (CTRL=9,71±0,14; DFC=9,72±0,04; PPG=9,39±0,22 Log UFC/mL) e 10º (CTRL=10,67±0,09; DFC=10,18±0,11; PPG=10,31±0,22 Log UFC/mL) e, aumento de IFN-γ ($p= 0,0373$; CTRL=0,00±0,00; DFC=0,04±0,11; PPG=0,76±1,32). Em conclusão, a nanoemulsão revelou-se uma alternativa promissora para o tratamento de feridas infectadas, não apenas pelo seu efeito no controle do agente infeccioso, mas também pela promoção do reparo tecidual eficaz. Esses eventos estão diretamente relacionados à melhora no aspecto da área lesionada, destacando a potencial aplicação clínica do gel PPG como uma abordagem terapêutica para feridas infectadas, com impacto positivo na qualidade e eficácia do processo de cicatrização.

Palavras-chave: Própolis; *Punica granatum*; MRSA; Lesões Infectadas; Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Cutaneous wound healing is a highly complex and dynamic mechanism aimed at restoring damaged tissue. However, several factors can interfere with the normal repair of wound healing, such as infections, which cause continuous and persistent inflammation, resulting in excessive healing and the formation of fibroproliferative scars, including keloids and hypertrophic scars. These conditions can lead to functional and aesthetic losses, making proper development of this process crucial for maintaining skin function. The aim of this study was to review the literature on the therapeutic potential of the *Punica granatum* species and to investigate the immunomodulatory and antibacterial potential of a nanoemulsion containing the association of natural products (PPG) on a murine model of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Chapter I is entitled: "Therapeutic Potential of Punica granatum and its Isolated Compounds: Evidence-Based Advances for Treating Bacterial Infections" and Chapter II presents the experimental study of the treatment of infected wounds using the formulation containing a combination of natural products. In the experimental study, excisional wounds (78.5 mm²) were induced on the back of female Swiss mice, the animals were allocated to three groups (n=14), including negative control (CTRL); Fibrinase® (DFC, positive control); a nanoemulsion containing the association of natural products (PPG). After lesion induction, the infected groups received approximately 1.5×10⁸ CFU/wound and were treated daily from day 1 to day 10 post-infection. The diameter of the wound and the percentage of healing were investigated using ImageJ software. Macroscopic analysis of the wounds was carried out every other day. At random, animals from each group were euthanized on days 3, 7 and 10 and then the skin from the injured area was removed for analysis of histological parameters (epithelialization, inflammatory cell infiltration (PMN), fibroblast proliferation, collagen deposition and angiogenesis). The levels of inflammatory mediators (IL-2; IL-4; IL-6; IFN-γ; TNF- α; IL-17A; IL-10) were measured in the serum and the count of colony-forming units (CFU) present in the wounds was analyzed to verify the antibacterial activity of PPG at the three time points. Topical treatment of wounds in mice with infected lesions induced complete wound retraction on day 10 in all groups. Topical application of PPG was able to significantly (p < 0.05) increase macrophage proliferation (p=0.013; CTRL= 2.33±0.51; DFC=.33±0.51; PPG=2.33±0.51) and reduce the PMN index (p=0.038; CTRL=2.33±0.51, DFC=1.66±0.51; PPG=2.00±0.81) on the 7th day of treatment. In addition, it was able to increase collagen deposition on day 10 (p=0.038; CTRL=2.33±0.51; DFC=2.33±0.51; PPG=3.00±0.00) and angiogenesis (p=0.023; CTRL=1.50±0.57; DFC=2.00±0.00; PPG=2.33±0.51). The positive effects of PPG treatment on reducing bacterial load on days 7 (CTRL=9.71±0.14; DFC=9.72±0.04; PPG=9.39±0.22 Log CFU/mL) and 10 (CTRL=10.67±0.09; DFC=10.18±0.11; PPG=10.31±0.22 Log UFC/mL) and increased IFN-γ (p= 0.0373; CTRL=0.00±0.00; DFC=0.04±0.11; PPG=0.76±1.32). In conclusion, the nanoemulsion proved to be a promising alternative for the treatment of infected wounds, not only for its effect in controlling the infectious agent, but also for promoting effective tissue repair. These events are directly related to the improvement in the appearance of the injured area, highlighting the potential clinical application of PPG gel as a therapeutic approach for infected wounds, with a positive impact on the quality and effectiveness of the healing process.

Keywords: Propolis; *Punica granatum*; MRSA; Infected Lesions; Wound Healing.