

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

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
Syzygium cumini (L.) SKEELS E DOS SEUS COMPOSTOS
MAJORITÁRIOS SOBRE BACTÉRIAS PRESENTES NA
MICROBIOTA INTESTINAL E SOBRE CAMUNDONGOS
INFECTADOS POR *Escherichia coli* 042**

IANDEYARA SAVANNA CARNEIRO DA SILVA

São Luís

2020

IANDEYARA SAVANNA CARNEIRO DA SILVA

**EFEITO *in vitro* E *in vivo* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.) SKEELS E DOS SEUS
COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE BACTÉRIAS
PRESENTES NA MICROBIOTA INTESTINAL**

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.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes.

São Luís

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Carneiro da Silva, Iandeyara Savanna.

EFEITO in vitro E in vivo DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* L. SKEELS E DOS SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE BACTÉRIAS PRESENTES NA MICROBIOTA INTESTINAL / Iandeyara Savanna Carneiro da Silva. - 2020. 90 f.

Coorientador(a): Antônio Marcus de Andrade Paes.

Orientador(a): Afonso Gomes Abreu Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

1. Ácido gálico. 2. Miricetina. 3. Polifenóis. 4. Quercetina. 5. *Syzygium cumini*. I. de Andrade Paes, Antônio Marcus. II. Gomes Abreu Júnior, Afonso. III. Título.

IANDEYARA SAVANNA CARNEIRO DA SILVA

**EFEITO *in vitro* E *in vivo* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.) SKEELS E DOS SEUS
COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE BACTÉRIAS
PRESENTES NA MICROBIOTA INTESTINAL**

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.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA

Profª. Drª. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão

Profª. Drª. Ludmila Bezerra da Silva
Universidade Federal do Maranhão

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

“Se o conhecimento estivesse ao alcance da mão e pudesse ser encontrado sem qualquer dificuldade, seria certamente negligenciado. Tudo que é nobre é tão difícil quanto raro”.

Baruch Spinoza

Dedico
À minha maior incentivadora e apoiadora!
Meu grande amor, mamãe.

AGRADECIMENTOS

Muito a agradecer a todos que fizeram parte desse árduo trabalho, primeiramente às forças superiores do universo que me mantiveram sã e com capacidade para chegar até o momento de finalização desse ciclo.

Em seguida, minha eterna gratidão ao Professor Marcus Paes que viu potencialidades em mim e confiou a responsabilidade de fazer ciência a uma jovem do interior com sede de crescimento, guardarei sempre com muito carinho suas aulas que inspiram e fazem jovens como eu sonhar em ter pelo menos 1/3 da sua grandiosidade na ciência e em uma sala de aula no exercício da profissão mais linda do mundo. Minha enorme gratidão, também, ao Professor Afonso Gomes por ter me acolhido de maneira tão gentil e ter me ensinado tanto sobre prática científica, responsabilidades, paciência e a ser uma cientista autônoma e resiliente, almejo a confiança, inteligência e domínio de uma área que é possível observar com facilidade no Prof. Afonso.

Sou grata à minha família que direta ou indiretamente apoiou e incentivou esse sonho, em especial minha mãe e sua empolgação em qualquer empreitada que me proponho, meu irmão e seu amor afável que é a coisa mais importante da minha vida, e ao meu pai que sempre me apoia mesmo quando não entende muito bem tudo que faço.

Gratidão aos amigos que me ajudaram a enfrentar esse processo, seja conversando, me ouvindo, me fazendo rir, me ajudando nos experimentos de laboratório, nas saídas para espairar... vocês foram parte fundamental no processo. Gratidão especial à Maíra que sempre esteve disponível a me ajudar em tudo, eu amo você como a irmã que não tive e sou grata pela tua presença na minha trajetória, foi indispensável; à Thaliana que entende cada um dos surtos que o desenvolvimento desse trabalho causou e entende cada parte do meu ser melhor que eu mesma, você é tudo para mim, thaly! Gratidão a Lucas que me acompanhou em todos esses anos do mestrado e me ajudou em tantos momentos que nunca será possível agradecer à altura, muito obrigada de coração e eu amo você e o que você representa na minha vida. Obrigada aos amigos do grupo Sobreviventes: Thamys, Nelmar, Caio, Pedro, Emilly e Breno, obrigada por cada força e auxílio nesse momento, vocês fizeram com que a caminhada fosse mais leve.

Obrigada aos integrantes do Laboratório de Fisiologia da UFMA e Laboratório de Patogenicidade Microbiana da Universidade CEUMA que ajudaram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho, vocês são incríveis!

Obrigada à Universidade CEUMA pela disponibilização dos laboratórios de pesquisa e biotério que foram utilizados durante toda atividade prática deste trabalho, obrigada à Universidade Federal do Maranhão pelo Programa ofertado e disciplinas que tanto engrandeceram minha jornada acadêmica e profissional e, por fim, obrigada à CAPES pelo fomento financeiro que tornou possível minha permanência e conclusão da pesquisa.

RESUMO

A microbiota intestinal (MI) é vista como reguladora chave na fisiologia e fisiopatologia dos seus hospedeiros, demonstrando relação com a regulação do armazenamento de gordura, obtenção de energia, além de uma íntima ligação com o tecido linfóide intestinal e sua rede imunológica ali existente. Os agentes que têm sido bastante estudados nos últimos anos como potenciais terapêuticos no cenário da MI são os polifenóis encontrados em plantas, a exemplo do *Syzygium cumini* (L.) Skeels, também conhecido como azeitona roxa, jambolão ou jamelão. Assim, este estudo teve por objetivo investigar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e dos principais compostos presentes no mesmo sobre bactérias que compõem a microbiota intestinal. Para tanto, foi utilizada a técnica de microdiluição em placa de 96 poços para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* (EHSC) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus faecalis*, bactérias pertencentes ou com potencial de compor a MI. A partir do resultado obtido na CIM, foi realizado o plaqueamento de alíquotas de 10 µl dos poços em placas contendo ágar Mueller Hinton para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), a partir da visualização de crescimento ou não de colônias bacterianas. Além disso, foi realizado o teste de citotoxicidade a partir do teste de viabilidade celular com MTT utilizando células HT29 e a colonização *in vivo* de camundongos *swiss* com a bactéria *E. coli* 042, e posterior tratamento com o EHSC para análise e comparação de resultados. O resultado da CIM foi de 3,12 mg/mL apresentando efeito bacteriostático sobre *E. coli* 042, *E. coli* HB101 e *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* 29212, e de 1,5 mg/mL sobre *L. paracasei*. O resultado da CBM apresentando efeito bactericida foi de 6,25mg/mL sobre estas mesmas bactérias citadas com exceção sobre a *L. paracasei* que apresentou o valor de 3,1 mg/mL. Quanto aos compostos isolados do EHSC: miricetina, quercetina e ácido gálico, a CIM foi respectivamente de 5mg/mL, 0,25mg/mL e 1,25mg/mL sobre *S. aureus* e *L. paracasei*. Para *E. coli* 042 e *E. faecalis* foi de 5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,31 mg/mL, para os mesmos compostos, e de 2,5 mg/mL, 0,12 mg/mL e 0,62 mg/mL sobre *E. coli* HB101. Ademais, o ácido gálico potencializou o efeito da miricetina e quercetina, reduzindo o valor das suas CIM sobre *E. coli* 042 e *L. paracasei* quando combinados os três isolados. Entretanto, todos estes valores foram bacteriostáticos, uma vez que quando realizado o teste de CBM, nenhuma das concentrações utilizadas apresentou efeito bactericida. Foi possível observar que não houve toxicidade de nenhuma das substâncias aqui utilizadas sobre as células HT29 e nem sobre órgão dos animais avaliados. No ensaio de colonização animal, o EH de *S. cumini* diminuiu a eficiência da colonização de *E. coli* 042 a partir do 6º dia nos animais. Portanto, foi possível demonstrar o potencial efeito modulatório do EHSC, uma vez que apresenta diferentes valores sobre diferentes bactérias, bem como da sinergia de seus principais compostos, além da possibilidade de evitar consequências negativas em uma possível colonização bacteriana patogênica ao diminuir a capacidade dessa colonização.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*; polifenóis; Miricetina; Quercetina; ácido gálico; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The intestinal microbiota (IM) is seen as a key regulator in the physiology and pathophysiology of its hosts, demonstrating a relationship with the regulation of fat storage, obtaining energy, as well as an intimate connection with the intestinal lymphoid tissue and its existing immune network. The agents that have been extensively studied in recent years as potential therapies in the IM scenario are the polyphenols found in plants, such as *Syzygium cumini* (L.) Skeels, also known as purple olives, *jambolão* or *jamelão*. Thus, this study aimed to investigate the effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and the main compounds present in it on bacteria that make up the intestinal microbiota. For this purpose, the 96-well plate microdilution technique was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the hydroalcoholic extract of *S. cumini* leaves (EHSC) on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faecalis* strains, bacteria belonging or with potential to compose IM. From the result obtained in the MIC, the plating of 10 µl aliquots of the wells was performed on plates containing Mueller Hinton agar to determine the Minimum Bactericidal Concentration (CBM), from the visualization of growth or not of bacterial colonies. In addition, the cytotoxicity test was performed from the cell viability test with MTT using HT29 cells and the in vivo colonization of Swiss mice with the *E. coli* 042 bacterium, and subsequent treatment with the EHSC for analysis and comparison of results. The MIC result was 3.12 mg / mL showing bacteriostatic effect on *E. coli* 042, *E. coli* HB101 and *S. aureus* ATCC 25923 and *E. faecalis* 29212, and 1.5 mg / mL on *L. paracasei*. The result of CBM showing a bactericidal effect was 6.25mg / mL on these same bacteria mentioned, with the exception of *L. paracasei*, which presented a value of 3.1 mg / mL. As for the isolated compounds of the EHSC: myricetin, quercetin and gallic acid, the MIC was 5mg / mL, 0.25mg / mL and 1.25mg / mL, respectively, over *S. aureus* and *L. paracasei*. For *E. coli* 042 and *E. faecalis* it was 5 mg / mL, 0.25 mg / mL and 0.31 mg / mL, for the same compounds, and 2.5 mg / mL, 0.12 mg / mL and 0.62 mg / ml on *E. coli* HB101. In addition, gallic acid potentiated the effect of myricetin and quercetin, reducing the value of their MICs on *E. coli* 042 and *L. paracasei* when the three isolates were combined. However, all of these values were bacteriostatic, since when the CBM test was performed, none of the concentrations used showed a bactericidal effect. It was possible to observe that there was no toxicity of any of the substances used here on the HT29 cells or on the organs of the evaluated animals. In the animal colonization test, the *S. cumini* EH decreased the efficiency of *E. coli* 042 colonization from the 6th day on in the animals. Therefore, it was possible to demonstrate the potential modulatory effect of EHSC, since it presents different values on different bacteria, as well as the synergy of its main compounds, in addition to the possibility of avoiding negative consequences in a possible pathogenic bacterial colonization by decreasing the capacity of this colonization .

Keywords: *Syzygium cumini*; polyphenols; Myricetin; Quercetin, Gallic Acid; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACIPP	Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEUA	Comitê de Pesquisa em Uso Animal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller Hington
DCA	Doenças Cardiovasculares Adquiridas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Dieta Normal
DO	Densidade óptica
DP	Doença de Parkinson
DRL	Dieta Rica em Lipídios
DT2	Diabetes Tipo 2
EH	Extrato Hidroalcoólico
EHSc	Extrato Hidroalcoólico de <i>Syzygium cumini</i>
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GLP-1	Peptídeo-1 do tipo Glucagon

GOS	galacto-oligossacarídeos
HFD	<i>High Fat Diet</i>
IgA	Imunoglobulina A
MI	Microbiota Intestinal
MSG	<i>Monosodium Glutamate</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SII	Síndrome do Intestino Irritável
TGI	Trato Gastrointestinal
TMAO	N-óxido de Trimetilamina
TMF	Transplante de Microbiota Fecal
TSB	Caldo de Soja Trypticase
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Microbiota Intestinal e sua Diversidade Bacteriana	15
2.2	Alterações da Microbiota Intestinal e sua Relação com a saúde e doença	17
2.3	Modulação da Microbiota Intestinal como Ferramenta Terapêutica	24
2.3.1	<i>Prebióticos</i>	24
2.3.2	<i>Uso de Probióticos</i>	25
2.3.3	<i>Transplante fecal</i>	26
2.3.4	<i>Alimentação</i>	27
2.3.5	<i>Polifenóis</i>	28
2.4	<i>S. cumini</i> como uma fonte potencial de compostos antimicrobianos moduladores da microbiota intestinal	30
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	CAPÍTULO 1	37
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A - Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA) – Universidade Ceuma Protocolo Aprovado - Nº 184/19	79
	ANEXO B - Diretrizes Para Publicação De Trabalhos Na Revista Frontiers in Microbiology	80