



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro Mart.*

SHARLENE MARIA OLIVEIRA BRITO

Crato-CE

2014

Sharlene Maria Oliveira Brito

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro Mart.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

CRATO – CE

2014

Sharlene Maria Oliveira Brito

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética científica, e encontra-se à disposição na biblioteca do referido programa.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Orientador)
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araujo (Membro Externo)
Universidade Federal de Sergipe – UFS

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf (Membro Interno)
Universidade Regional do Cariri – URCA

Agradecimentos

Primeiramente Àquele que é a força maior de todo o universo, que dita o rumo de todas as coisas e dá sentido a vida, Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Irwin Rose, que hoje tenho como um grande amigo, pela confiança a mim depositada. Espero não ter tirado muito o seu juízo.

Aos meus amadíssimos pais, Nilde e Raimundo, que me transmitiram os melhores valores que pais podem passar aos filhos. Tudo o que faço é pensando em vocês e em retribuir tudo que vocês fizeram por mim com tanto amor e dedicação. Vocês são perfeitos. Obrigada, meus amores! Essa vitória é de vocês.

Aos meus irmãos, Sheiba, Shirleyane, Angelliny e Alex, que são o meu porto seguro. Com vocês minha vida é completa. Amo demais vocês.

Ao meu tio Zé, *in memoriam*, que foi o patriarca da nossa família e que ajudou a todos nós de forma tão altruísta e paciente. Eternas saudades...

A toda minha família, em especial a tia Ana, minha segunda mãe, minha avó Nailza, e às primas, Simone, Ludmila, Lindalva e Aimêr, que compuseram meu segundo lar durante os últimos anos.

As minhas “júbubinhas” Julia e Giovanna, que alegram meus finais de semana.

Aos meus amigos maravilhosos, Andreza, Cinara, Luiz, Larissa, Válter, Datiane, Érika, Luzia Fernando, Saulo, Luciene, João, Rayane, Héverton, Anita e Gerlânia, que não mediram esforços para me ajudar nessa empreitada e que me deram tanto amor e carinho. Espero ter conseguido retribuir à altura.

Aos professores, Prof. Dr. Henrique Douglas e Profa. Dra. Marta Mendonça, que além de amigos, me deram muito apóio neste trabalho. Muito obrigada.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Prof. Alisson Pontes Pinheiro e Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, coordenado pela Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa, pela catalogação da exsicata e identificação botânica da espécie em estudo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular pelos ensinamentos nesses dois anos de curso.

À URCA e todos os funcionários que me acolheram de braços abertos nos últimos sete anos.

Às secretárias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, pela paciência e solicitude.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram mesmo que direta ou indiretamente para a realização desse estudo. Minha gratidão será eterna.

“Tudo nesse mundo tem seu tempo;

Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar; tempo de chorar e tempo de dançar; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo de afastar. Há tempo de procurar e tempo de perder; tempo de economizar e tempo de desperdiçar; tempo de rasgar e tempo de remendar; tempo de ficar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz.

Tudo tem seu tempo... “

Eclesiaste 3, 1-8

RESUMO

Ziziphus joazeiro Mart., conhecido popularmente como juazeiro, apresenta-se como uma das espécies endêmicas do bioma caatinga, e é utilizada na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos, xampus anticapa e creme dental e na alimentação de animais principalmente nos períodos de seca. Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil químico, o potencial antioxidante, a atividade antimicrobiana, antiparasitária, gastroprotetora e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ). O perfil químico foi mensurado a partir de métodos colorimétricos e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a atividade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH e FRAP, a ação antimicrobiana e antiparasitária foi testada através do método de microdiluição em caldo, o potencial gastroprotetor foi investigado a partir dos modelos clássicos de lesão gástrica (etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina) e a atividade cicatrizante foi avaliada através da indução de lesões no dorso de ratos e quantificada através da velocidade de fechamento e percentual de contração de feridas. Os polifenóis e flavonoides presentes nesse extrato foram quantificados por métodos colorimétrico em 183,14 mg equivalentes de ácido gálico / g de extrato e 7,37 mg equivalentes de quercetina / g de extrato, respectivamente. O resultado para ensaios de DPPH e quelante de ferro, *in vitro*, demonstrou CE50 735,72 µg/mL, explicado, em parte, pela presença de fenóis e flavonóides na sua composição. A atividade antibacteriana do EHFZJ apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) maior que 1024 µg/mL, porém, nos ensaios modulatórios apresentou atividade sinérgica em associação com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, diminuindo a resistência bacteriana quando associado à amicacina e gentamicina frente à linhagem de *Enterobacteriaceae aerogenis*. O EHFZJ apresentou, durante os ensaios, um potencial antiparasitário contra a forma promastigota de *L. braziliensis* com IC50 316.28 µg/mL, epimastigota de *T. cruzi* com IC50 214.12 µg/mL, além de demonstrar baixa citotoxicidade frente a fibroblastos com IC50 de 119.34 µg/mL. Para realização dos ensaios *in vivo* foi determinada a DL₅₀, o qual, não demonstrou registros de óbitos entre os animais tratados oralmente com o EHFZJ em doses de 5000 mg/kg. Nos modelos de lesão gástrica induzida por indometacina, etanol e etanol acidificado, o EHFZJ mostrou efetividade na dose de 400 mg/kg comprovando a sua atividade gastroprotetora. Porém, no teste de barreira física observou-se que apenas a via de administração oral é efetiva quando comparada a via intraperitoneal, o que permite concluir que o mecanismo de gastroproteção do EHFZJ se dá por ação tópica e não sistêmica. No teste para avaliação do potencial cicatrizante, os grupos testados (creme base, EHFZJ 100, 200 e 400 mg/g), não demonstraram diferença estatística significativa em relação ao controle (creme base) para velocidade de fechamento e percentual de contração da ferida nos tempos de observação (0, 3, 7, 11 e 14 dias). Os resultados demonstraram que o mecanismo da gastroproteção se dá por aumento da barreira, de muco, protetora. Apesar da presença de taninos e flavonóides, a formulação creme incorporada ao EHFZJ não apresentou ação cicatrizante estatisticamente significativa. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. possui ação antiparasitária e antimicrobiana significantes.

Palavras-chave: *Ziziphus joazeiro*, atividade gastroprotetora, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, atividade antiparasitária, perfil químico, atividade cicatrizante.

ABSTRACT

Ziziphus joazeiro Mart., popularly known as juazeiro, is presented as one of the endemic species of the caatinga biome, and is used in folk medicine as an expectorant in the treatment of bronchitis and gastric ulcers, in the manufacture of cosmetics, dandruff shampoos and toothpaste and animal feed mainly in periods of drought. This study aimed to identify the chemical profile, antioxidant potential, antimicrobial activity, antiparasitic, gastroprotective and healing the alcoholic extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ). The chemical profile was measured from colorimetric methods and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the antioxidant activity was evaluated by DPPH and FRAP method, and antiparasitic, antimicrobial action was tested by the broth microdilution method, the potential gastroprotective was investigated from the classic gastric lesion (absolute ethanol, acidified ethanol and indomethacin) models and healing activity was assessed by induction of lesions on the backs of rats and quantified by closing speed and percentage of wound contraction. The polyphenols and flavonoids present in this extract were quantified by colorimetric methods in 183.14 mg gallic acid equivalent/g of extract and 7.37 mg of quercetin equivalents/g of extract, respectively. The DPPH test results for iron chelator and in vitro demonstrated EC₅₀ 735.72 mg/mL, partly explained by the presence of phenols and flavonoids in the composition. The antibacterial activity of EHFZJ presented Minimum Inhibitory Concentration (MIC) greater than 1024 mg / mL, but the modulatory assays showed synergistic activity in combination with aminoglycoside class antibiotics, decreasing bacterial resistance when combined with amikacin and gentamicin front line of *Enterobacteriaceae aerogenis*. The EHFZJ presented during rehearsals, an antiparasitic potential against the promastigote of *Leishmania braziliensis* with IC₅₀ 316.28 mg/mL, epimastigote of *Trypanosoma cruzi* with IC₅₀ 214.12 mg/mL, in addition to demonstrating low cytotoxicity against fibroblasts with IC₅₀ of 119.34 mg/mL. For the tests in vivo was determined LD₅₀, which did not show records of deaths among animals treated orally with EHFZJ at doses of 5000 mg/kg. In models of gastric lesions induced by indomethacin, ethanol and acidified ethanol, EHFZJ showed effectiveness at a dose of 400 mg/kg proving its gastroprotective activity. However, the physical barrier test, it was observed that only the oral route of administration is effective when compared to intraperitoneally, leading to the conclusion that the mechanism of gastroprotection EHFZJ is given by the topical and non-systemic action. In the test to evaluate the healing potential of the tested groups (cream base, EHFZJ 100, 200 and 400 mg/g), showed no statistically significant difference compared to control (cream base) for closing speed and percentage of wound contraction in time points (0, 3, 7, 11 and 14 days). The results demonstrated that the mechanism of gastroprotection occurs by increasing the barrier mucus, protective. Despite the presence of tannins and flavonoids, the cream formulation incorporated into EHFZJ no statistically significant healing action. The results obtained in this study allow us to conclude that the hydroalcoholic extract of *Ziziphus joazeiro* Mart. have significant antiparasitic and antimicrobial action.

Keywords: *Ziziphus joazeiro*, gastroprotection, antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, chemical profile, healing.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** Possíveis causas da ulceração péptica 23

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 2** Autorização para atividades com finalidade científica – SISBIO 33

- Figura 3** Folhas e fruto de *Ziziphus joazeiro* Mart. 34

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. realizado em cromatografia líquida de alta eficiência. 65

- Figura 2** Atividade moduladora do EHFZJ frente às cepas multirresistentes de *Enterobacter aerogenes*. 70

CAPÍTULO 2

- Figura 1** Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. realizado em cromatografia líquida de alta eficiência 93

- Figura 2** Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos 96

- Figura 3** Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos 98

- Figura 4** Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos 99

- Figura 5** Gráfico do efeito do EHFZJ administrado via oral e via intraperitoneal no modelo de indução de lesão gástrica em camundongos 100

- Figura 6** Velocidade de fechamento das feridas (cm²/dia) dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 após tratamento diário com creme de cristais líquidos, creme do EHFZJ 100 mg/g, creme do EHFZJ 200 mg/g e creme do EHFZJ 400 mg/g. 102

- Figura 7** Evolução da cicatrização das feridas no dorso dos ratos por grupo e dia de tratamento. 103

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1	Composição do gel creme cristais líquidos	47
-----------------	---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Composição química do extrato de <i>Ziziphus joazeiro</i>	65
-----------------	---	----

Tabela 2	Atividade antileishmania, tripanocídica e citotóxica de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart	68
-----------------	---	----

Tabela 3	Concentração inibitória mínima (mg/mL) do EHFZJ para bactérias e fungos	69
-----------------	---	----

Tabela 4	Valores de concentração de inibição de crescimento dos antibióticos ($\mu\text{g/mL}$) frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i>	69
-----------------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição do gel creme cristais líquidos	91
-----------------	---	----

Tabela 2	Composição química do extrato de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	94
-----------------	---	----

Tabela 3	Comparação do percentual de contração das feridas nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 após tratamento com creme base, creme do EHFZJ 100 mg/g, creme do EHFZJ 200 mg/g e creme do EHFZJ 400 mg/g.	104
-----------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1:2 – proporção de 1 para 2

ad libitum – à vontade

AE% - atividade antiepimastigota

AINE - Antiinflamatório não esteroidal

AlCl₃ - cloreto de alumínio

ANOVA - análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - *Brain Heart Infusion* (do inglês, infusão coração cérebro)

C. albicans - *Candida albicans*

C. krusei - *Candida krusei*

C. tropicalis - *Candida tropicalis*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DL₅₀ - Dose Letal média

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EA – *Enterobacteriaceae aerogenis*

EC - *Escherichia coli*

EGF - fatores de crescimento da epiderme

EHFZJ - Extrato Hidroalcoólico das Folhas do *Ziziphus joazeiro Mart.*

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (do inglês, ensaio imunoenzimático)

EROs - espécies reativas de oxigênio

FLONA - Floresta Nacional do Araripe – Apodi

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power (do inglês, poder antioxidante por redução férrica)

GPS - Global Positioning System (do inglês, sistema de posicionamento global)

H. pilory - *Helicobacter pylori*

H⁺/K⁺-ATPase – bomba de prótons

H₂ – receptor de histamina tipo 2

HIA - *Agar Heart Infusion* (do inglês, agar de infusão de coração)

HPLC-DAD - *High Performance Liquid Chromatography* (do inglês, cromatografia líquida de alta eficiência)

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Biodiversidade

L. braziliensis - *Leishmania braziliensis*

LD - limite de detecção

LOQ - limite de quantificação

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

M – molar

PVPI - polivinilpirrolidona-iodo

SA - *Staphylococcus aureus*

SFB - *Serviço Florestal Brasileiro*

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

UFC/ml – unidades formadoras de colônia

UV – ultravioleta

v. ip. – via intraperitoneal

v.o. – via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 O uso de produtos naturais	18
1.2 <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	19
1.3 Lesões Gástricas	21
1.4 Feridas	24
1.5 Parasitoses	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	33
3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	34
3.3 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS	35
3.3.1 Análise Cromatográfica	35
3.3.1.1 Quantificação dos compostos por meio de CLAE	35
3.3.2 Saponinas	36
3.3.3 Teor de fenóis totais	36
3.3.4 Teor de flavonóides totais	37
3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE	37
3.4.1 Captura do radical livre DPPH	37
3.4.2 Método de redução de ferro (FRAP)	38
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	38
3.5.1 Microorganismos	38
3.5.2 Antibióticos e Antifúngicos	39
3.5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM	39
3.5.2 Modulação	40
3.6 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	40
3.6.1 Linhagens celulares utilizadas	40
3.6.2 Teste de atividade antiepimastigota	41
3.6.3 Teste de atividade antipromastigota	41
3.6.4 Teste de citotoxicidade	42
3.7 ENSAIOS IN VIVO	42
3.7.1 Animais utilizados e aspectos éticos da pesquisa	42
3.7.2 Determinação da dose letal média (DL50)	43
3.7.3 Atividade gastroprotetora	44
3.7.3.1 Indução de lesão gástrica por etanol	44
3.7.3.2 Indução de lesão gástrica por etanol acidificado com ácido clorídrico (HCL)	44
3.7.3.3 Indução de lesão gástrica por Indometacina	45
3.7.3.4 Teste de Barreira física	45
3.7.3 Atividade cicatrizante	46
3.7.4.1 Delineamento experimental	46

3.7.4.2 Procedimento cirúrgico	46
3.7.4.3 Formulação do creme	46
3.7.4.4 Tratamento das feridas	47
3.7.4.5 Percentual de contração da ferida (%C)	48
3.7.4.6 Velocidade de fechamento de feridas cutâneas (VFf)	48
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CAPÍTULO 1: Perfil químico e avaliação da atividade antimicrobiana e antiparasitária do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	51
CAPÍTULO 2: Perfil cromatográfico, avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	79
5. CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	112
APÊNDICES	

Apresentação



O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar a composição química do extrato das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (EHFZJ) e investigar suas possíveis ações biológicas através de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Foi avaliada sua atividade gastroprotetora, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária. Os resultados e discussão desta dissertação foram distribuídos em dois capítulos, de acordo com os objetivos propostos.

O capítulo 1 aborda o perfil químico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., sua capacidade antioxidante frente ao método do DPPH e quelante de ferro, seu potencial antimicrobiano e antiparasitário. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela concentração mínima inibitória frente às cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, e cepas fúngicas de *Candida krusei*, *Candida Tropicalis* e *Candida albicans*. Investigou-se a atividade modulatória do EHFZJ, frente às cepas multirresistentes dos mesmos microorganismos, em associação com os antibióticos: amoxicilina, ciprofloxacina, benzilpenicilina, gentamicina, amicacina e vancomicina, e antifúngicos: mebendazol, benzilmetronidazol e nistatina. O potencial antiparasitário foi mensurado pela atividade antiepipimastigota (*T. cruzi*), antipromastigota (*L. infantum*) e antipromastigota (*L. braziliensis*). O teste de citotoxicidade foi realizado através do percentual de sobrevivência dos fibroblastos.

O capítulo 2 apresenta a análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do EHFZJ em relação à composição de composto fenólicos e flavonóidicos. A partir dos relatos de uso popular e da descrição da composição do EHFZJ após CLAE nossa investigação foi direcionada para a avaliação de uma possível atividade gastroprotetora e cicatrizante. Foi realizado teste para determinação da DL₅₀ que não demonstrou efeito tóxico do EHFZJ para os animais tratados oralmente até a dose de 5000 mg/kg, garantindo assim a segurança para a pesquisa das atividades propostas em modelos animais.

O potencial gastroprotetor foi avaliado através dos modelos de indução de lesões gástricas por etanol, etanol acidificado e indometacina. O EHFZJ foi administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg. Para avaliação da atividade sistêmica do extrato, foi realizado teste de barreira física com a concentração de 400 mg/kg por via oral e intraperitoneal. A atividade cicatrizante foi mensurada através da produção cirúrgica de lesões cutâneas no dorso de ratos que foram tratadas com um controle negativo (creme base) e EHFZ

nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/g por um período de 14 dias. A avaliação do potencial cicatrizante se deu pela observação de características macroscópicas das lesões e das médias do percentual de contração e velocidade de fechamentos das feridas.

Introdução



1.INTRODUÇÃO

1.1 O uso de produtos naturais

Desde os anos 70 a Organização Mundial de Saúde tem reconhecido a importância da medicina tradicional como uma alternativa disponível no descobrimento de novos medicamentos (MOTA, 2009). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O emprego de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto o surgimento da espécie humana. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país até mesmo nos grandes centros urbanos brasileiros, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). E, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Trinta por cento das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2002 são produtos naturais ou derivados desses (CARVALHO, 2006).

Essa prática é fortemente observada na Floresta Nacional do Araripe – Apodi (FLONA), que é classificada como Mesorregião do extremo sul do estado do Ceará, e está localizada no Semi-Árido do Nordeste brasileiro (NACIONAL, 2011). A vasta riqueza e diversidade natural encontrada nesse bioma justificam o crescente uso dos produtos oriundos dessa região pela população local, tornando-se cada vez mais necessário a investigação científica dos seus efeitos farmacológicos para assegurar suas atividades biológicas e seu uso racional e seguro pelos usuários.

A resolução-RDC no. 14/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA define medicamentos fitoterápicos como aqueles preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), devendo estes, possuírem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de enfermidades, validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, registros técnicos e científicos ou ensaios clínicos. A aplicação da ciência e da tecnologia no estudo das plantas medicinais tem dado credibilidade e valor ao seu uso terapêutico, e, portanto tem tornado crescente a sua utilização e recomendação pelos profissionais de saúde (BRASIL, 2010).

A utilização de produtos naturais remete ao surgimento da civilização humana, e eram os produtos minerais, animais e vegetais a base da terapêutica para enfermidades. O advento da revolução industrial trouxe consigo o desenvolvimento da química orgânica, o que possibilitou a obtenção de produtos puros e modificações estruturais necessárias para obtenção de fármacos mais seguros. A partir daí houve a incorporação e primazia dos produtos sintéticos no mercado farmacêutico (RATES, 2001).

Paralelo a supremacia dos produtos sintéticos surgiu o domínio dessa prática pelas grandes companhias farmacêuticas, o que por sua vez encareceu e dificultou o seu uso. As populações mais distantes dos centros de saúde e com poucos recursos para a aquisição dos medicamentos viram-se obrigadas a buscar terapias alternativas como forma de tratamento, através, principalmente do uso de plantas medicinais da sua região, o que rapidamente levantou a questão da automedicação e do conhecimento deficiente acerca da eficácia e segurança desses produtos naturais (VEIGA-JUNIOR, 2008).

O crescente uso de produtos naturais e o potencial valor financeiro agregado a esse setor trouxeram à tona a necessidade de maiores investigações acerca dos mesmos. A base para as pesquisas tem sido a crença popular e aplicabilidade dos tratamentos caseiros. Além disso, segundo Calixto (2003), os produtos naturais são utilizados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico, o que despertou o interesse da indústria farmacêutica a nível mundial, e por ser o Brasil um país de imenso patrimônio natural este se tornou um grande desafio para o aproveitamento racional da sua biodiversidade.

1.2 *Ziziphus joazeiro* Mart.

A Chapada do Araripe, classificada como Mesorregião, está localizada no semi-árido do nordeste brasileiro, possui altitude variando entre 700 e 900 metros, compreende 103 municípios, sendo 25 municípios no Estado do Ceará, 18 municípios no Estado de Pernambuco e 60 municípios no Estado do Piauí. Possui uma área total de 76.654,3 km² e população estimada em 1.806.529 milhão de habitantes. No seu topo localiza-se a Floresta Nacional do Araripe-Apodi, que abrange os municípios do Crato, Barbalha, Jardim,

Santana do Cariri e Missão Velha, perfazendo uma área total de 38.262 hectares (BRASIL, 2011).

Rhamnaceae é uma família composta por cerca de 60 gêneros e 900 espécies com distribuição em todo o globo, sendo composta por 23 gêneros e 170 espécies na América Tropical. O gênero *Ziziphus* possui cerca de 30 espécies (HEALD, 2004). *Ziziphus joazeiro*, membro da família Rhamnaceae, é uma árvore de ocorrência da Caatinga, sendo popularmente conhecida como juazeiro (GIULIETTI et al., 2002). Apresenta considerável importância econômica e ecológica. Suas flores apresentam-se como um importante recurso alimentar para abelhas indígenas, sendo estas utilizadas na meliponicultura, atividade alternativa de renda para produtores de certas áreas da Caatinga (MARINHO et al., 2002).

A espécie apresenta grande potencial econômico e importância para a região semi-árida, uma vez que suas folhas e frutos representam uma valiosa alternativa para os animais no período da seca. Por ser uma das poucas plantas da caatinga que se mantém verde durante todo o ano, constitui uma provisão para o criador rural, pela alimentação que proporcionada ao gado. Constitui um valioso recurso alimentar para bovinos, caprinos e suínos, por apresentar elevado teor de proteína bruta. (CARVALHO, 2007).

Além disso, na medicina popular, é bastante utilizada em tratamentos de gastrites, gripes, contusões e ferimentos; a raspa da entre-casca é rica em saponina, sendo, portanto empregada na produção de sabão. É também aproveitada para a fabricação de creme dental, como tônico capilar na sua forma macerada e a madeira é recomendada para lenha, carvão e marcenaria (SILVA e MATOS, 1998). O seu uso em xampus e em creme dental se deve a presença de saponinas em várias partes da planta, substância esta, reconhecida pelas suas propriedades detergentes e alelopáticas (OLIVEIRA et al., 2009).

Nesta espécie as partes mais utilizadas são as folhas, cascas, entrecascas, frutos e raízes, as suas principais indicações são como febrífugo, bactericida, analgésico, cicatrizantes tópicos; calutório para cavidade oral, gengivites, higiene bucal, já que possui propriedade de retirar a placa dentária, tônico hepático e cardíaco, adstringente, diurético, tônico capilar para seborréia e alopecia, caspa e para a limpeza do couro cabeludo e dos fios capilares, afecções respiratórias bacterianas superiores, tosse, bronquite (LIMA et al., 2006).

Diversas plantas medicinais têm entre os seus constituintes, compostos flavonóides que podem atuar limitando a ação de fatores agressivos ou promover o aumento

da resistência da mucosa estomacal, embora ambas as atividades possam acontecer em simultâneo, sendo eficazes no tratamento de problemas gástricos (BORRELI e IZZO, 2000). Os produtos naturais além de serem potenciais fitoterápicos para os distúrbios estomacais também se apresentam como uma boa alternativa aos medicamentos convencionais usados nessa prática devido ao seu baixo custo, sendo assim mais acessíveis à população de baixa renda (FERREIRA et al., 2008).

Estudos evidenciaram alguns dos efeitos farmacológicos de plantas pertencentes à família Rhamnaceae. Alvarenga (2008) descreve o gel de *Hovenia Dulcis* como possuindo efeito cicatrizante, Moreira (2013) comprovou o potencial antioxidante de *Rhamnus sphaerosperma var. pubescens*, Wahida et al. (2007) evidenciou o efeito antiulcerogênico do extrato aquoso de *Zizyphus lótus* em ratos, Rosas et al. (2007) conclui que *Ampelozizyphus amazonicus* contém compostos potenciais para uso como agentes quimioprolifáticos contra *T.cruzi*.

1.3 Lesões Gástricas

O estômago é considerado um dos principais órgãos envolvidos na digestão, mecanismo este responsável pela captação de nutrientes a partir dos alimentos e sua conversão em energia, necessária para todos os processos vitais. É um órgão sacular que comporta de 1,2 a 1,5 L, podendo ter o seu volume expandido até 3 litros. Apresenta pH entre 0,9 e 2,0 (ácido), localiza-se logo abaixo do diafragma, conectando o esôfago ao duodeno. É subdividido em cinco regiões: corpo, fundo, antro, esfíncter pilórico e cárdia (Figura 2), tendo como camadas de revestimento, em ordem de profundidade, a camada serosa (mais externa), a muscular, submucosa e, mais internamente, a camada mucosa. Revestimento este, semelhante ao restante do trato gastrointestinal (ABBAS, VINAYKUMAR e FAUSTO, 2005).

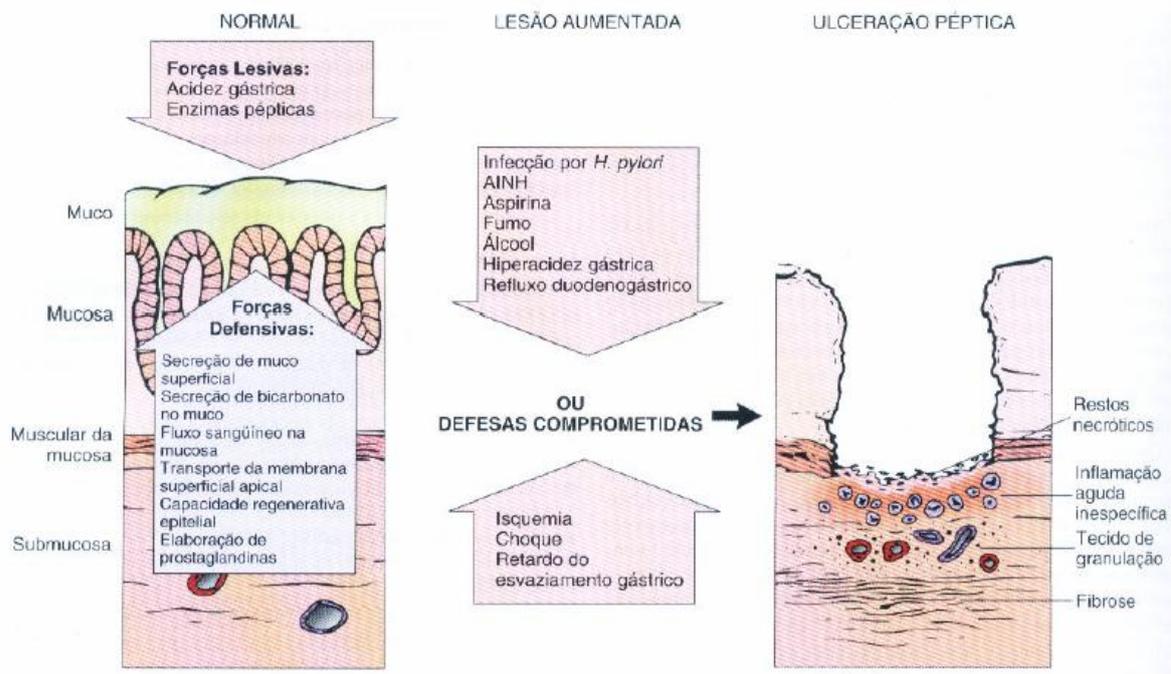
O HCl secretado pelo estômago e a pepsina são os agressores fisiológicos da mucosa gástrica, mas além deles há outros agentes que podem causar lesão, tais como sais biliares regurgitados, alimentos muito quentes ou com elevada osmolaridade, má nutrição, o álcool, estresse, uso de antiinflamatórios não-esteroidais entre outros (CARVALHO, 2006). Portanto, faz-se necessário que a mucosa desenvolva mecanismos que a defendam desses agentes que causam injúria do tecido.

O muco eliminado pelas células parietais forma uma camada em todo o interior da mucosa que se comporta como a linha primordial de defesa desse tecido (barreira física), ele é composto por glicoproteínas (5%), que dão ao muco uma textura viscosa, e água (95%) (LAINE, TAKEUCHI e TARNAWSKI, 2008). Além disso, as células da mucosa estomacal estão em constante renovação, a sua substituição completa acontece a cada dois ou quatro dias, através do processo de extrusão e apoptose, de forma contínua, breve e sem interrupção e função da barreira de epitélio (DHARMANI et al., 2009).

Segundo Wallace e Granger (2008), a proteção da mucosa estomacal ainda envolve fatores como: a secreção de pepsina e gastrina (estimulam a secreção de muco), secreção de bicarbonato (estimulada pelas prostaglandinas, L-glutamato, L-aspartato, L-leucina, entre outros), secreção de prostaglandinas e aumento do fluxo sanguíneo (conseguida principalmente através da atividade vasodilatadora do óxido nítrico, que aumenta a disponibilidade de bicarbonato e protege a mucosa da difusão retrógrada do íon H^+). Há ainda compostos e enzimas antioxidantes que também estão incluídas na sustentação da integridade estomacal.

As doenças gástricas são oriundas de um desequilíbrio entre fatores agressores e protetores da mucosa estomacal (Figura 1). Os agentes responsáveis pela lesão gástrica colaboram com esse desequilíbrio, levando ao aumento dos agentes agressores (ácido e pepsina), diminuição dos mecanismos protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo) ou ambos. Álcool, fumo, antiinflamatórios não esteroidais, isquemia ou diminuição do fluxo de sangue, aumento da acidez, retardo no esvaziamento estomacal, estresse e infecções bacterianas são os principais responsáveis pelo surgimento de lesão na mucosa e conseqüentemente, aparecimento da doença gástrica (GUYTON e HALL, 2006).

Figura 1 - Possíveis causas da ulceração péptica



Fonte: COTRAN e ROBBINS, 1994

Várias são as enfermidades de acometem o estômago, porém as que se apresentam como um dos principais problemas de saúde pública mundial são a gastrite e a úlcera péptica. A gastrite é a inflamação da mucosa estomacal, podendo ser ela aguda ou crônica. O tipo agudo está normalmente associado a ingestão de antiinflamatórios, estresse, fumo, álcool, infecções, trauma, alimentação, entre outros, porém apresenta-se como transitório, ao contrario da forma cônica que é persistente e pode resultar em danos mais severos para a mucosa, como atrofia ou metaplasia. O segundo tipo normalmente está associado à infecção por *H.pylori*, mas também pode ocorrer devido a outros fatores, como dieta inapropriada, tabagismo, alcoolismo, medicamentos e ingestão de substâncias corrosivas, estresse por traumas, procedimentos cirúrgicos, septicemia, insuficiência hepática, irradiação (CHAMSEet al., 2012).

Por definição, úlceras são lesões da mucosa gastrointestinal que consistem na perda circunscrita de tecido, penetrando na camada muscular da mucosa. Quando formadas no estômago são chamadas úlceras estomacais ou gástricas e quando formadas no duodeno são chamadas de úlceras duodenais. Contudo, tanto as úlceras gástricas como as úlceras

duodenais são comumente chamadas de úlceras pépticas. A úlcera péptica é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos em sua gênese. As hipóteses mais prováveis da causa das doenças ulcerosas agrupam fatores genéticos, estilo de vida (fatores emocionais, estresse, dieta alimentar, ingestão de álcool), tabagismo, consumo de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), entre outros (BURCI e SILVA, 2011).

Ainda segundo Burci e Silva (2011), a úlcera gástrica apresenta-se como um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal. Pode ser descrita como uma lesão na mucosa do trato digestivo, que se estende através da camada muscular da mucosa até a submucosa, ou ainda mais profundamente. Nesse tipo de lesão mais profunda tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos.

A terapia medicamentosa utilizada para o tratamento da gastrite e úlcera gástrica não é considerada ideal por apresentar elevada taxa de falha e muitos efeitos colaterais em longo prazo. Ela consiste na utilização de esquemas de combinação de antimicrobianos com atividade na secreção gástrica (metronidazol e claritromicina) e medicamentos com ação luminal (bismuto, amoxicilina, tetraciclina, furazolidona), e antagonistas de receptores H₂ (cimetidina) ou inibidores de bomba protônica (omeprazol). Essas drogas sem mostram bastante efetivas no tratamento dos sintomas, porém seu uso constante acarreta uma séria de efeitos colaterais, entre eles: alteração do paladar, diarreia, náuseas, sialorréia, tontura e cefaléia (COELHO et al., 2004). É imperativa, portanto, a necessidade de realização de estudos para maior entendimento desta doença, bem como a investigação de métodos e fármacos aptos a promover a regressão do seu quadro.

1.4 Feridas

As feridas são definidas como qualquer interrupção da continuidade estrutural da pele, em pequena ou extensa, resultante de algum tipo de trauma químico, físico ou mecânico (PEREIRA, 2005), acionando a partir daí os mecanismos de defesa orgânica, através do processo de cicatrização, descrito abaixo.

A classificação das feridas é de fundamental importância para determinação da forma de implementação do tratamento, avaliação e registro das mesmas. Se forem classificadas de acordo com o tempo de reparação da pele, podem ser diferenciadas em agudas ou crônicas. As agudas são normalmente oriundas de cirurgias ou traumas e o desagravo ocorre em tempo adequado, sem dificuldades. As feridas crônicas são aquelas que não são reparadas no tempo esperado, e apresentam algum tipo de complicação. O segundo sistema de classificação consiste na extensão da injúria tissular, e complementa a classificação anterior. Envolve a injúria superficial (limita-se à epiderme), ferida com perda parcial (limita-se à epiderme e região superior da derme) e a perda total (onde há acometimento da epiderme, derme, tecido subcutâneo, e em casos mais graves, os músculos, tendões e ossos) (BLANES, 2004).

A cicatrização é uma cascata de eventos celulares e moleculares que se articulam em um processo dinâmico, englobando fenômenos bioquímicos e fisiológicos, garantindo ao final do processo normal, a restauração tissular completa (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003).

O processo cicatricial tem compreendido, convenientemente, três fases evolutivas sobrepostas: fase inicial ou inflamatória, fase proliferativa ou de fibroplasia e fase de remodelação ou maturação (NETO et al., 2006). Esse fenômeno é normalmente localizado, transitório e autolimitado, mas quando o estímulo danoso não pode ser eliminado ou removido, desencadeia-se resposta de caráter mais complexo, envolvendo o organismo como um todo, dando origem ao processo inflamatório crônico, o qual muitas vezes pode ser deletério e incapacitante, deixando seqüelas permanentes na estrutura orgânica.

De acordo com Pereira (2005), existem fatores locais e sistêmicos que podem interferir no processo de reparação da pele. Dentre os sistêmicos ressalta-se: a idade, vascularização, presença de corpos estranhos, a imobilidade, o estado nutricional, doenças associadas e o uso de medicamentos continuados, especialmente as medicações que causam imunossupressão. Quando não puderem ser eliminados, esses componentes devem ser rigorosamente controlados. Os principais condicionantes locais são: a região anatômica onde se encontra a ferida, a instalação de infecção, presença tecido morto e outros, sendo todos estes fatores essenciais para a escolha da melhor conduta terapêutica.

O consenso para a escolha do método terapêutico tem intensa interferência do histórico da injúria, que envolve fatores como causa, tempo de acometimento, ausência de

infecção. Ainda deve-se avaliar quanto à presença de dor, diâmetro e profundidade da ferida, edema, peculiaridades do leito da lesão, estado da pele ao redor e presença de secreção. Sua evolução clínica deve ser periódica, devendo-se avaliar a efetividade da cicatrização e a eficácia do tratamento utilizado (DEALEY, 1996).

No tratamento da lesão, devem-se considerar alguns princípios básicos que aceleram seu processo de cura, entre eles é a necessidade de remoção dos tecidos mortos e corpos estranhos das bordas da ferida, ou seja, deve-se proceder como passo inicial e indispensável, a limpeza e desbridamento da mesma. Ainda é recomendado o uso de coberturas específicas, que tem por objetivo a manutenção da umidade entre a cobertura e a ferida, extrair o excedente de exsudato, possibilitar a troca de gases, oferecer um meio adverso a contaminação, manutenção da temperatura adequada e possibilitar a sua remoção sem agravar o quadro através de traumas mecânicos (RODRIGUES et al., 2001). As coberturas mais comuns são: filme de poliuretano, hidrocolóide, hidrogel, papaína, carvão ativado, alginato, entre outras, presentes no mercado atualmente.

O tratamento de doenças que envolvem feridas é, normalmente, oneroso, o que salienta a necessidade de estudos que busquem alternativas medicamentosas mais baratas e com eficácia maior ou equivalente às disponíveis atualmente no mercado (MENDONÇA e NETO, 2011). Dentre as alternativas buscadas para intervenção e promoção desse processo, está a utilização de plantas medicinais, com fins terapêuticos, ou fitoterapia, que foi a base para o tratamento desse acometimento durante vários séculos (NETO, et al., 2006). O advento da medicina moderna e o avanço químico, como dito anteriormente, levaram a substituição progressiva dos produtos naturais pelos fármacos sintéticos produzidos por companhias farmacêuticas, não pelo fato de fitoterápicos terem uma capacidade de cura menor, mas pela comodidade e maior oferta dos produtos alopáticos, especialmente nos grandes aglomerados urbanos.

1.5 Parasitoses

Algumas parasitoses, a exemplo da leishmaniose em sua forma tegumentar, têm relação direta com a integridade da pele, uma vez que sua principal característica é o acometimento dessa área. Além da sua elevada incidência e prevalência, sua relevância também consiste na sua capacidade de causar injúrias destrutiva, debilitantes e desfigurantes, causando um enorme desequilíbrio na área psicossocial da pessoa atingida, podendo vir a ter conseqüências desastrosas para o mesmo (CASAVECHIA et al., 2002).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) consiste em uma patologia que tem como fator etiológico os protozoários do gênero *Leishmania*, conduzida ao homem por picada de mosquitos flebotomíneos. Há, na atualidade, no Brasil cerca de seis espécies de *leishmania* associados à doença propriamente dita e mais de duzentas atribuídas a sua transmissão. É uma doença que surgiu há muito tempo, porém nas duas últimas décadas apresentou aumento considerável do número de casos e distribuiu-se em mais áreas geográficas, encontrando-se em todos os estados do Brasil, com características particulares em cada área. Houve uma estimativa de 523.975 casos entre 1985 e 2003, sendo a maioria deles nas regiões Nordeste e Norte brasileiros (CAMARGO e BASANO, 2004).

A percepção da própria imagem corporal e a relevância da aparência atribuída pela sociedade ocorre simultaneamente, por isso algumas doenças como hanseníase e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), popularmente conhecida como AIDS, produzem no curso da sua evolução, estigmas e preconceito por parte dos próprios pacientes e da sociedade como um todo. A leishmaniose tegumentar, por ter como principal característica clínica o surgimento de inúmeras lesões do tipo úlceras por toda a mucosa, é por vezes associada à hanseníase, repercutindo em transtornos de cunho emocionais nos enfermos (COSTA et al., 1987).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose é o antimonial pentavalente, disponível em duas apresentações: o antimoniato de N-metilglucamina e o stibogluconato de sódio, o segundo não é disponibilizado no Brasil. A droga utilizada como segunda opção é o antibiótico antifúngico poliênico, anfotericina B, usada em casos onde os antimoniais não apresentam eficácia ou caso haja alguma contra-indicação ao seu uso. Durante o uso dessas drogas é comum o aparecimento de efeitos indesejados

como náuseas, alterações cardíacas, êmese, insuficiência renal, pirexia, hipopotassemia e anemia. Há também um alto risco de toxicidade cardíaca e renal durante o uso dessas medicamentos, o que torna inviável a sua utilização em um ambiente que não seja o hospitalar (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

Os medicamentos hoje disponíveis para o tratamento da leishmaniose, os antimoniais e a anfotericina, por se mostrarem excessivamente tóxicas e pouco toleradas pelo organismo, além de estarem rotineiramente em falta nos serviços de saúde, tornam essa uma doença órfã no âmbito das companhias farmacêuticas (BARCINSKI e CAMARGO, 2002), e, portanto faz-se crucial a pesquisa e descobrimento de antiparasitários com menores efeitos colaterais, menos riscos de uso para o paciente, baixos custos e maior disponibilidade.

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, se apresenta como uma doença endêmica em várias regiões do Brasil tendo sido considerada, na década de 1990, como a principal doença parasitária da América Latina. Dentre as diversas manifestações clínicas, diferenciam-se três fases: aguda, indeterminada e crônica, afetando principalmente o músculo cardíaco com dilatação das suas cavidades, podendo ser de diferentes gravidades, desde discretas alterações eletrocardiográficas até insuficiência cardíaca grave ou morte súbita (FARIA et al., 2013).

O grande acometimento da população por feridas agudas e crônicas, causadas por bactérias, fungos e outros parasitas, apresenta-se como grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Ainda que se tenha investido bastante em pesquisa e desenvolvimento de recursos e tecnologias com o objetivo de favorecer esses processos e tenham sido verificados grandes avanços na compreensão dos fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular, essa é uma problemática que repercute em elevados custos financeiros e profundas consequências sociais sobre os portadores dessas injúrias, já que com frequência desenvolvem seqüelas que podem levar à perda de membros e de suas funções, com conseqüente afastamento do trabalho e de suas atividades de vida diária. (MANDELBAUM et al., 2003).

É notória a grande incidência e prevalência de morbimortalidade na população por doenças gástricas, injúrias tissulares e infecções por microorganismos, este assunto é, portanto, de grande interesse não apenas para a comunidade científica, mas para a população em geral, seja ela acometida pelas doenças ou com grande risco e exposição para as mesmas, sendo esse um dos pontos qualificadores do estudo. As pesquisas envolvendo

fitoterápicos ainda contribuem para o maior conhecimento sobre a flora nativa e sua aplicação, levando a uma crescente valorização desses espécimes vegetais e conseqüentemente maior estímulo à conservação da diversidade biológica da chapada do Araripe. A comunidade local, onde essa planta está inserida, se beneficiará amplamente, sobretudo famílias que vivem da coleta de frutos do *Ziziphus joazeiro* Mart., agregando valor a espécie e indicando a possibilidade de maior fonte de renda e emprego para tais famílias.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o perfil químico e avaliar as atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante, antiparasitária e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas do *Ziziphus joazeiro Mart.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os constituintes químicos polifenólicos e flavonoides presente no extrato hidroalcoólico das folhas do *Ziziphus joazeiro Mart.* (EHFZJ) por métodos espectrofotométricos e através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE-DAD.
- Avaliar o potencial antioxidante do EHFZJ *in vitro*, através dos métodos espectrofotométricos de redução do teor de ferro (FRAP) e captura do radical livre DPPH.
- Avaliar a ação antiparasitária do EHFZJ frente aos protozoários de *Leishmania e Trypanosoma cruzi*;
- Verificar a ação antimicrobiana do EHFZJ, a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e modulação da atividade antibiótica (amoxicilina, ciprofloxacino, belzilpenicilina, gentamicina, amicacina e vancomicina);
- Determinar a ação antifúngica do EHFZJ isolado e em associação com mebendazol, nistatina e benzoilmetronidazol frente às cepas de fungos multirresistentes (*cândida albicans*, *cândida tropicalis* e *cândida krusei*);
- Determinar a dose letal média (DL₅₀) do EHFZJ frente a modelos animais;
- Avaliar a atividade gastroprotetora do EHFZJ, em modelos agudos de lesão gástrica induzida por etanol, etanol/ácido clorídrico, indometacina e avaliação dos seus possíveis mecanismos através do teste de barreira física, em camundongos;
- Avaliar a atividade cicatrizante do creme de EHFZJ (100, 200 e 400 mg/g) através da análise de parâmetros morfométricos.

Material e Métodos



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Ziziphus joazeiro Mart., foi a espécie vegetal selecionada para realização dos testes. Para realização da coleta foi solicitada e obtida autorização junto ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), órgão responsável pela FLONA-Araripe-Apodi, sob número 34326-1 (Figura 2).

Figura 2 - Autorização para atividades com finalidade científica – SISBIO.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34326-1		Data da Emissão: 15/05/2012 08:06	
Dados do titular			
Nome: Sharlene Maria Oliveira Brito		CPF: 026.671.593-14	
Título do Projeto: Avaliação da atividade gastroprotetora do óleo essencial do <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.			
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri			CNPJ: 06.740.864/0001-26

As folhas (Figura 3) foram coletadas no mês de Agosto de 2012, no sítio Guaribas, nº 75 sob as coordenadas: longitude oeste 39°46'81,8"; latitude sul 7°21'98,2" e altitude de 708,3 metros em relação ao nível do mar, situado na Chapada do Araripe no município de Crato-CE. A coleta resultou em amostras para identificação e preparação de exsicata, que foi identificada pela professora Dra. Maria Arlene Pessoadá Silva e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Limasob número 30.2013.

Figura 3 - Folhas e fruto de *Ziziphus joazeiro* Mart.



Fonte: http://farm3.staticflickr.com/2533/3768698921_b7408fb254_o.gif

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. foram secas ao ar livre durante 48h ao abrigo do sol. Foram então pesadas, separadas, trituradas e extraídas com solvente etanol e água na proporção de 1:1, por um período de 72h. Em seguida foi realizada filtragem para reter a parte sólida. A mistura filtrada foi concentrada com o auxílio do rota evaporador sob rotação entre 27 a 30 rpm e temperatura de aproximadamente 45°C para destilação do solvente. A solução restante foi submetida ao banho-maria para evaporação do excedente etanólico e, transcorridas 24h, o EHFJZ foi congelado e liofilizado para desidratação. O pó resultante foi armazenado em frasco âmbar e resfriado a 4°C em geladeira para os procedimentos analíticos e ensaios farmacológicos.

3.3 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS

3.3.1 Análise Cromatográfica

3.3.1.1 Quantificação dos compostos por meio de CLAE

Análises cromatográficas de fases reversíveis foram realizadas sob condições de gradiente utilizando uma coluna C18 (4,6 mm x 250 milímetros) carregada com partículas de diâmetro 5µm. A fase móvel água contendo 1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de composição foi o seguinte: 13% de B até 10 minutos e mudou para obter 20%, 30 %, 50 %, 60 %, 70 % , 20% e 10 % de B em 20, 30, 40 , 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente (Boligon et al., 2012), com algumas modificações. O extrato de *Ziziphus joazeiro* foi dissolvido em etanol a uma concentração de 20 mg / mL. A presença de 11 compostos antioxidantes foi investigada, ou seja, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido caféico, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de UV com a dos padrões comerciais.

A taxa de fluxo foi de 0,7 µL / min, volume de injeção de 40 µL e o comprimento de onda de 254 nm para ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para os ácidos cafeico, elágico e clorogênico, e 365 nm para a quercetina, isoquercitrina, quercitrina, rutina e canferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), e em seguida degaseificada por banho de ultra-sons antes da utilização. As soluções de referências foram preparadas em fase móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,030-0,250 µg / mL para canferol, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, catequina, epicatequina e rutina, e 0,030-0,250 µg / mL para gálico, cafeico ácidos elágico e clorogênico. Os picos cromatográficos foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 400 nm).

Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LOQ)

calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como σ 3,3 e $10 / s$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (Boligon et al., 2013).

3.3.2 Saponinas

A determinação da presença de saponinas no extrato das folhas do *Ziziphus joazeiro*, Mart. foi determinada misturando-se 0,5g do EHFZJ a 10 mL de água destilada em um tubo de ensaio. A solução foi agitada fortemente por 2 a 3 minutos e observou-se a formação de espuma. A presença de espuma persistente (por mais de 15 minutos) indica a presença de saponinas, conforme a metodologia proposta por MATOS (1997).

3.3.3 Teor de fenóis totais

A quantidade de fenóis totais no EHFZJ, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200 μ L da solução do EHFZJ (25, 50, 100 e 300 μ g/mL em etanol 80%) a 1mL de reagente de *Folin-Ciocalteau* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 μ L de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico. A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (10, 25, 50, 75, 100, 300 μ g/mL).

3.3.4 Teor de flavonóides totais

Foram preparadas soluções do extrato (25, 50, 100 e 300 µg/mL) e utilizado 1mL destas, adicionando-se 1 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) com concentração de 2% peso/volume. No tubo de ensaio que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato. A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substancia (1,25; 5; 10; 25 µg/mL) diluída em etanol 80%.

3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

3.4.1 Captura do radical livre DPPH

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações do EHFZJ (5, 10, 25, 50, 125 e 250µg/mL) e soluções de vitamina C nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µM, ambas em triplicata. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato e 3,9 mL de solução 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura. A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento de onda (515 nm), com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM), sendo o branco determinado por metanol (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; RUFINO et al., 2007).

3.4.2 Método de redução de ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante ocorre pela redução de ferro (FRAP) através do método de espectroscopia na região do visível, utilizando a metodologia descrita por Benzie e Strain, 1996, com modificações. Foram usadas soluções tampão de acetato 300 mM, pH 3,6 e 10 mM de TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-S-triazina) em solução de 40 mM HCl e 20 mM FeCl₃ · 6H₂O. A solução de trabalho foi preparada misturando-se 25 ml de tampão de acetato, 2,5 ml de TPTZ e 2,5 ml FeCl₃ 0,6 H₂O. A temperatura da solução foi elevada para 37 ° C antes do uso. O extrato hidroalcoólico de *Ziziphus joazeiro* Mart. (0,15 mL) foi adicionado para reagir com 2,85 mL de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro. Neste método, o complexo férrico-tripiridil-triazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa. O valor encontrado foi considerado como a capacidade em gramas (g) de o extrato reduzir gramas (g) de sulfato ferroso, a partir das absorbâncias obtidas através da interpolação entre a curva de sulfato ferroso e a solução do extrato. A leitura do complexo foi feita num comprimento de onda de 593 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1 Microorganismos

Os experimentos foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacteriaceae* 13048 e multirresistentes como *S. aureus* 10 (SA10), *E. coli* 06 (EC 06) e *Enterobacteriaceae aerogenes* CN64 (EA CN64) e linhagens fúngicas de *Candida krusei* 01, *Candida Tropicalis* 20 e *Candida albicans* 62 e multirresistentes como *C. krusei* LMBM 01 (CK LMBM01), *C. tropicalis* LM 20 (CT LM20) e *C. albicans* LM 62 (CA LM62), todas obtidas da coleção de microorganismos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA). Os

estoques de culturas foram mantidos em *Agar Heart Infusion* (HIA) e armazenados em refrigerador.

3.5.2 Antibióticos e Antifúngicos

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do EHFZJ foram utilizados antibióticos de diversas classes (amoxicilina, ciprofloxacina, benzilpenicilina, gentamicina, amicacina e vancomicina). Para avaliação da atividade moduladora da ação antifúngica do EHFZJ foram utilizados os antifúngicos: mebemdazol, benzilmetronidazol e nistatina.

3.5.2 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI 10%) pelo método de microdiluição, utilizando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e uma concentração do EHFJZ 1024 $\mu\text{g/mL}$ diluída sequencialmente pelo título 1:2 (JAVADPOUR et al., 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento de microorganismos foi observado. Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos e antifúngicos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para as bactérias SA10, EC 06e EA CN64, e para os fungos CK LMBM01, CT LM20 e CA LM62. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C. A leitura dos ensaios bacterianos foi efetuada pela alteração de coloração após adição do corante rezarzurina. A manutenção da coloração azul indica o não crescimento bacteriano, já o surgimento da coloração vermelha evidencia o crescimento bacteriano. Para leitura das cepas de fungos foi utilizado o método de observação da turbidez. O teste foi realizado em triplicata.

3.5.3 Modulação

Para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos e antifúngicos os testes foram realizados em triplicata. Cada poço da placa de microdiluição conteve EHFJZ em concentração subinibitória de forma constante, os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 2500 µg/mL, e os antifúngicos partindo de 5000 µg/mL, diluídas sequencialmente de 1:2 até 2,4 µg/mL e 4,8 µg/mL, sendo misturadas em caldo BHI 10%, tendo sido este preparado com solução destilada estéril. Em cada poço foi adicionado 100 µL de caldo BHI 10% com 128 µg/mL do EHFJZ e inóculo bacteriano ou fúngico (10⁵ UFC/mL). No primeiro poço adicionou-se 100 µL de solução do antibiótico ou antifúngico com 5000 µg/mL procedendo à diluição seqüencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela reazarzurina ou pela turbidez como descrito na determinação da CIM. O teste foi realizado em triplicata.

3.6 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

3.6.1 Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *Trypanossoma cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner et al., 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β-galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne et al., (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e

isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. Seguiram os procedimentos descritos por Roldos et al. (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83), cultivada a 22° C em meio Schneider's Drosophila, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón et al., 2006).

3.6.2 Teste de atividade antiepimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega et al., (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ em 200 μL de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com adição do extrato nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ a 28° C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μL da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μM . As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6h a 37°C e foram submetidas à visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado em triplicata, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência do extrato foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepimastigota (AE%).

3.6.3 Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas até uma concentração de 10^6 células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram

dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

3.6.4 Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram inseridos em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μL , sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

3.7 ENSAIOS *IN VIVO*

3.7.1 Experimentação animal e aspectos éticos da pesquisa

Foram utilizados para os testes camundongos *Swiss (Mus músculos)* de ambos os sexos, com peso entre 15 e 30 gramas e ratos *Wistar* pesando entre 200-250g oriundos do biotério da Universidade Regional do Cariri - URCA. Eles foram levados para a sala de experimentação dois dias antes dos testes e mantidos em rotatividade de ciclo claro e escuro de 12 horas sob regime de água e ração *ad libitum*, mesmas condições observadas no biotério. No dia anterior ao ensaio os animais foram marcados e a ração foi retirada 15 horas antes do experimento. A pesagem dos camundongos foi a primeira fase de cada teste. O trabalho realizou-se de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, que regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos e foi autorizado pelo Comitê

de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri CEUA/URCA, sob número de protocolo 21/2012.2.

3.7.2 Determinação da dose letal média (DL₅₀)

A investigação da toxicidade aguda de *Ziziphus joazeiro* Mart., seguiu as diretrizes da OECD (*Organização for Economic Co-operation and Development*) para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method – OECD 425 – 2008*) para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas.

Para determinar a classe de dose tóxica aguda, cinco animais foram tratados com o EHFZJ a cada dose, sendo a classe definida como a de menor dose, que na seqüência considerada, induz a morte. Portanto, o extrato foi administrado na seqüência da dose menor para a maior. O fator de progressão da dose deve ser de 3,2, quando não existe qualquer informação sobre a inclinação da curva dose-resposta da substância a ser testada. Utilizando-se o fator de progressão padrão, as doses foram selecionadas a partir da seqüência de: 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg. Excepcionalmente, somente quando justificado por regulação específica, o uso de dose superior a 5000 mg/kg deve ser considerada. O EHFJZ foi administrado por via oral (gavagem através de cânula apropriada). O volume administrado por via oral não excedeu 1 mL/100 g de peso corporal e, para manter o volume constante, ajustou-se as concentrações da solução de acordo com o nível de dose e peso dos animais.

Os animais foram observados em intervalos regulares após a administração da droga (30', 1h, 2h, 4h e 24h) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, época do seu aparecimento, intensidade, duração e progressão dos mesmos foram registrados. Observações comportamentais sistemáticas através do *screening* hipocrático (atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção, reflexo do endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo articular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte) também foram realizadas. As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a quatro, correspondendo, respectivamente a: ausente, raro, pouco, moderado e intenso. As alterações encontradas na observação comportamental e exame clínico sistemático dos

animais foram registrados em protocolo impresso com a lista de sinais a serem investigados. Esta lista e a pesquisa de sinais são baseadas no modelo proposto por Malone (1977).

3.7.3 Atividade gastroprotetora

3.7.3.1 Indução de lesão gástrica por etanol

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg v.o.) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por etanol (0,1mL/10g, via oral). Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados. Para avaliação e quantificação das lesões gástricas as imagens foram analisadas no *software (ImageJ)* através da quantificação de pixel. Para determinação da área foi utilizada a relação percentual em relação à área total do corpo gástrico.

3.7.3.2 Indução de lesão gástrica por etanol acidificado com ácido clorídrico (HCL)

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução de lesões por etanol acidificado (0,2 mL da solução 0,3 M de HCL em etanol 60% animal, via oral). Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por meio informatizado anteriormente descrito.

3.7.3.3 Indução de lesão gástrica por Indometacina

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por administração subcutânea de indometacina (30mg/Kg), transcorridas 3 horas após a administração do agente lesivo os pré-tratamentos foram repetidos. Decorridas 6 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por método de *score*. Neste método são atribuídas pontuações para diferentes observações conforme itens a seguir: coloração da mucosa, perda de pregas da mucosa, petéquias, edemas, hemorragia, perda de muco e lesões de úlcera, e foi atribuída uma pontuação conforme a gravidade do sintoma presente, sendo 0 para ausente ou normal, 1 para leve, 2 para moderado e 3 para grave. Já para o grau de lesão foi atribuída uma porcentagem, até 25% (área lesada), igual a 50% (moderada) e maior que 50% (intensa), conforme metodologia proposta por Zinkievich et al. (2010).

3.7.3.4 Teste de Barreira física

Os animais foram tratados com solução salina (0,9 %, 01 mL/10g, v.o.) e o EHFZJ (400 mg/Kg, v.o./v.ip.). Após uma hora dos tratamentos os animais do grupo (v.o.) receberam o etanol acidificado (0,2 mL/animal v.o.) e o grupo (ip.) após 30 minutos. Decorrida 1h da indução em cada grupo, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas de vidro. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com o grupo, com posterior análise através dométodo informatizado anteriormente descrito.

3.7.3 Atividade cicatrizante

3.7.4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados ratos machos e fêmeas com peso entre 250 e 300 g. Após período de adaptação os animais foram previamente identificados e, em cada animal foram feitas quatro lesões cirúrgicas, onde, cada lesão foi unicamente tratada com: CremeBase (controle negativo), Creme de EHFZJ 100 mg/g, Creme de EHFZJ 200 mg/g e Creme de EHFZJ 400 mg/g.

3.7.4.2 Procedimento cirúrgico

Para todos os procedimentos dolorosos e/ou situações de estresse, foi administrada anestesia utilizando cloridrato de xilazina (10mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Após a contenção dos animais em decúbito ventral sobre maca cirúrgica, realizou-se a tricotomia da região dorsolombar e antissepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI), demarcação e incisão da área da ferida com *punch* de biopsia estéril de 10 mm com borda cortante, que se estende até a fáscia muscular. Os cremes foram aplicados imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma vez ao dia, com auxílio de hastes plásticas estéreis.

3.7.4.6 Formulação do creme

O extrato foi diluído em água, e a este foi incorporado o creme de cristais líquidos aos poucos, através de homogeneização sincronizada, a fim de se obter as concentrações finais de 100, 200 e 400 mg/g.

O creme de cristais líquidos é composto por três fases (Fase A), (Fase B) e (Fase C). A solução do extrato diluído previamente em água é adicionada a Fase B. As fases A e B forma

aquecidas separadamente, até 80 °C e, a fase B foi vertida na fase A, sob constante agitação, durante 7 minutos à 3.000 rpm. A solução foi resfriada a 50 °C e acrescentou-se a fase C. Continuou-se a agitação até a mistura esfriar, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Composição do gel creme cristais líquidos

FASE A	
Nikkomulse 41® (Poligliceril-10 Pentastearate - Beenil Alcool e Estearoil Lactilato de sódio (SSL)	2,5 g
Esqualeno vegetal (Phytosqual®)	5 g
FASE B	
Propilenoglicol	2 g
Hidroxietilcelulose (Natrosol®)	2 g
Água Destilada	100 mL
FASE C	
Fenoxietanol / Metilparabeno/ Etilparabeno / Propilparabeno e Butilparabeno (Chemynol®)	0,4 g
Propilenoglicol	2 g

3.7.4.3 Tratamento das feridas

As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 14 dias. A cada nova reposição do tratamento, as lesões foram lavadas com solução fisiológica a 0,9% para remoção de crostas e resíduos do gel. A cada três dias, as lesões cutâneas foram observadas quanto à presença de hiperemia, edema, sangramento, exsudato e tipo de tecido formado. Após anestesia e contenção dos animais foi realizado debridamento das áreas lesionadas e assepsia com solução fisiológica a 0,9% e gazes estéreis, para que as áreas das feridas fossem registradas fotograficamente, nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 pós-cirúrgico. Após tratamento, os animais seguiram para recuperação em suas respectivas gaiolas, devidamente higienizadas.

3.7.4.4 Percentual de contração da ferida (%C)

As feridas de cada animal foram fotografadas digitalmente a uma distancia fixa de 40 cm no dias 0, 3, 7, 11 e 14 após a indução do ferimento. As fotografias no formato *Joint Photographic Experts Group* (JPEG) foram transferidas para um computador e analisadas no *software (ImageJ)* através da quantificação de pixel. Para determinação da área média das feridas foram expressas como uma porcentagem da área inicial (dia 0), utilizando a equação:

$$\%C = 100 * (Ad_0 - A_{da}) / Ad_0$$

Onde, Ad_0 = área da ferida no dia 0, e A_{da} = área da ferida no dia da análise.

3.7.4.5 Velocidade de fechamento de feridas cutâneas (VFf)

A velocidade de fechamento de feridas cutâneas foi calculada usando a equação:

$$VFf = \%C / DAC$$

Onde, DAC é o dia da análise da cicatrização da ferida e %C é o percentual de cicatrização da ferida. A VFf será expressa em cm^2 / dia .

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via e os testes de múltipla

comparação de Newman-Keuls e Turkey, sendo os cálculos realizados a partir do *software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

Resultados e Discussão



Capítulo 1

Perfil químico e avaliação da atividade antimicrobiana e antiparasitária do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Sharlene Maria Oliveira Brito¹ (sharlenebrito@hotmail.com), Henrique Douglas Melo Coutinho² (hdmcoutinho@gmail.com), José Galberto Martins da Costa³ (galberto@urca.br), Fernando Gomes Figueredo² (fernandobiomedico2008.2@gmail.com), Luciene Ferreira de Lima² (lucieneflima@ymail.com), Saulo Relison Tintino² (saulorelison@gmail.com), Irwin Rose Alencar de Menezes¹ (irwinalencar@yahoo.com.br).

¹ Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

² Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

³ Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecido popularmente como juazeiro, apresenta-se como uma das espécies endêmicas do bioma caatinga, e é utilizada na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos, xampus anticaspa e creme dental e na alimentação de animais principalmente nos períodos de seca.

OBJETIVOS: Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil químico, o potencial antioxidante, antimicrobiano e antiparasitário do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ).

MÉTODOS: O extrato foi preparado por maceração em solução hidroalcoólica. O perfil químico foi avaliado por métodos colorimétricos e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(CLAE). A capacidade antioxidante foi mensurada pelos métodos DPPH e FRAPAs atividades antiparasitária, antimicrobiana e a modulação de antibióticos e antifúngicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), realizada em triplicata e significância estatística testada por ANOVA (de duas vias) com o teste post hoc de Bonferroni ($P < 0,001$).

RESULTADOS: Os polifenóis e flavonoides presentes nesse extrato foram quantificados em 183,136 mg equivalentes de ácido gálico / g de extrato e 7,37 mg equivalentes de quercetina / g de extrato, respectivamente. O método de determinação de DPPH e quelante de ferro, *in vitro*, demonstrou a atividade antioxidante do extrato, explicado, em parte, pela presença de fenóis e flavonóides na sua composição. A atividade antibacteriana e antifúngica do EHFZJ foi investigada pelo método de diluição em caldo, tendo sido evidenciada Concentração Inibitória Mínima (CIM) > 1024 que demonstra não ser clinicamente significativa. Porém, nos ensaios de modulação o extrato apresentou atividade sinérgica em associação com antibióticos amicacina e gentamicina frente à linhagem de *Enterobacteriaceae aerogenis* e em associação com a gentamicina frente à *Staphylococcus aureus*, diminuindo a resistência bacteriana quando associado O EHFZJ apresentou, durante os ensaios, um potencial antiparasitário com base no efeito tóxico contra a forma promastigota de *L. braziliensis* e epimastigote *T. cruzi*, além de demonstrar baixa citotoxicidade frente a fibroblastos.

CONCLUSÕES: Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. possui capacidade antioxidante perante metodologia de redução do DPPH e FRAP. O EHFZJ demonstrou ação antiparasitária e atividade modulatória de antibióticos significantes. Isto sugere que estudos posteriores podem ser efetuados para demonstrar a viabilidade para ensaios clínicos em animais.

Palavras-chave: *Ziziphus joazeiro* Mart., perfil químico, atividade antimicrobiana, atividade antiparasitária, atividade antioxidante.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Ziziphus joazeiro* Mart, popularly known as juazeiro, is presented as one of the endemic species of the caatinga biome, and is used in folk medicine as an expectorant

in the treatment of bronchitis and gastric ulcers, in cosmetics, shampoos and dandruff dental and animal feed mainly in periods of drought cream.

OBJECTIVES: This study aimed to identify the chemical profile, antioxidant, antimicrobial and antiparasitic potential of the aqueous extract of *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ).

METHODS: The extract was prepared by maceration in alcohol solution. The chemical profile was evaluated by colorimetric methods and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antioxidant capacity was measured by DPPH and FRAP methods. The antiparasitic, antimicrobial and antifungal antibiotics modulation was performed by microdilution broth method for determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), performed in triplicate and statistical significance tested by ANOVA (for two-way) with Bonferroni post hoc ($P < 0,001$) test.

RESULTS: The polyphenols and flavonoids present in this extract were quantified in 183.136 mg equivalent of gallic ácido/g extract and 7.37 mg of quercetin equivalents/g of extract, respectively. The method of determination of DPPH and iron chelator in vitro showed mild antioxidant activity of the extract, explained in part by the presence of phenols and flavonoids in its composition. The antibacterial and antifungal activity of EHFZJ was investigated by dilution method in broth, having been evidenced Minimum Inhibitory Concentration (MIC) >1024 demonstrating that not be clinically significant. However, when testing the modulation extract showed synergistic activity in combination with amikacin and gentamicin antibiotics front line of *Enterobacteriaceae aerogenis* and in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus*, reducing bacterial resistance when combined EHFZJ The presented during the trials, a antiparasitic based on the potential toxic effect from the promastigote form of *L. braziliensis* and epimastigote of *T. cruzi*, besides demonstrating low cytotoxicity against fibroblasts.

CONCLUSIONS: The results of this study allow us to conclude that the hydroalcoholic extract of *Ziziphus joazeiro* Mart. Have antioxidant capacity reduction methodology before the FRAP and DPPH. The EHFZJ demonstrated antiparasitic action and significant modulatory activity of antibiotics. This suggests that further studies can be performed to demonstrate the feasibility of clinical trials in animals.

Keywords: *Ziziphus joazeiro*, chemical profile, antimicrobial, antiparasitic activity, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

Desde os anos 70 a Organização Mundial de Saúde tem reconhecido a importância da medicina tradicional como uma alternativa disponível no descobrimento de novos medicamentos (MOTA, 2009). O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza

muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O emprego de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto o surgimento da espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país até mesmo nos grandes centros urbanos brasileiros, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). E, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química atualmente, 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Trinta por cento das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2002 são produtos naturais ou derivados desses (CARVALHO, 2006).

O crescente uso de produtos naturais e o potencial valor financeiro agregado a esse setor trouxeram à tona a necessidade de maiores investigações acerca dos mesmos. A base para as pesquisas tem sido a crença popular e aplicabilidade dos tratamentos caseiros. Além disso, segundo Calixto (2003), os produtos naturais são utilizados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico, o que despertou o interesse da indústria farmacêutica em nível mundial, e por ser o Brasil um país de imenso patrimônio natural este se tornou um grande desafio para o aproveitamento racional da sua biodiversidade.

Rhamnaceae é uma família composta por cerca de 60 gêneros e 900 espécies com distribuição em todo o globo, sendo composta por 23 gêneros e 170 espécies na América Tropical. O gênero *Ziziphus* possui cerca de 30 espécies (HEALD, 2004), nove delas ocorrem no Brasil (FORZZA et al., 2010). *Ziziphus joazeiro*, é uma árvore de ocorrência na Caatinga, sendo popularmente conhecida como juazeiro (GIULIETTI et al. 2002). As suas partes mais utilizadas são as folhas, cascas, entrecascas, frutos e raízes, as suas principais indicações são como febrífugo, bactericida, analgésico, cicatrizantes tópicos; calutório para cavidade oral, gengivites, higiene bucal, já que possui propriedade de retirar a placa dentária, tônico hepático e cardíaco, adstringente, diurético, tônico capilar para seborréia e alopecia, caspa e para a limpeza do couro cabeludo e dos fios capilares, afecções respiratórias bacterianas superiores, tosse e bronquite (Lima et al., 2006). O *Ziziphus joazeiro* foi alvo de diversos estudos que comprovaram a atividade farmacológica de algumas de suas partes, a exemplo de Romão et al. (2010) que concluíram que o extrato de raspa de juá apresenta proteção gástrica em determinadas doses, Cruz et al. (2007) que demonstram a atividade antifúngica do seu extrato e Silva et al. (2011) que evidenciaram essa espécie como um recurso promissor contra bactérias devido a comprovação da sua atividade antimicrobiana.

Diversas patologias configuram-se como grave problema de saúde pública, seja por sua elevada incidência ou pelas conseqüências negativas do seu quadro clínico, entre elas encontra-se a leishmaniose, que consiste em uma doença crônica que pode ser classificada, conforme a espécie do parasita infectante, em leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana. É conduzida ao homem por picada de mosquitos flebotomíneos do gênero *Leishmaniae* manifesta-se clinicamente por inúmeras lesões do tipo úlceras. Há no Brasil, atualmente, cerca de seis espécies de *leishmania* associados à doença propriamente dita e mais de duzentas atribuídas a sua transmissão (PIRES et al., 2012). Entre os anos de 2000 a 2009 foram notificados no Brasil 24.684 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). No período de 2005 a 2009 foram registrados no Brasil 3.679 casos de Leishmaniose Visceral (LV), com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009 (PELLISSARI et al., 2011), 77% dos casos de LV estão concentrados na região nordeste do país (BAVIA et al., 2011).

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, se apresenta como uma doença endêmica em várias regiões do Brasil tendo sido considerada, na década de 1990, como a principal doença parasitária da América Latina. Dentre as diversas manifestações clínicas, diferenciam-se três fases: aguda, indeterminada e crônica, afetando principalmente o músculo cardíaco com dilatação das suas cavidades, podendo ser de diferentes gravidades, desde discretas alterações eletrocardiográficas até insuficiência cardíaca grave ou morte súbita (FARIA et al., 2013).

As bactérias são responsáveis por cerca da metade das doenças infecciosas humanas, entre as mais freqüentes está a *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa apontada com um dos agentes etiológicos mais comumente associados aos casos de diarreia em homens e outras espécies animais. A maioria das cepas de *E. coli* que colonizam o trato gastrointestinal são comensais e não causadoras de patologias (AKHAVAN e GHADERI, 2012). Outra bactéria gram-negativa causadora de infecções nosocomiais é a *enterobacter aerogenes*, que é associada também à quadros de bacteremia e sepsis em vários tratos, como o urinário e respiratório (RABELLO et al., 2001). *Pseudomonas aeruginosa* também é uma bactéria do grupo das gram-negativas, é um patógeno colonizador freqüente da área nasocomial, porém é atribuído como causa de diversas infecções em várias áreas do corpo humano, especialmente em paciente com sistema imunológico comprometido. Está presente nos mais diversos ambientes e tem como principais problemáticas a sua capacidade de

sobreviver por longos períodos em ambientes adversos, a sua baixa sensibilidade e alta resistência a diversos antimicrobianos (GALES et al., 2001).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos investigar o perfil químico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., atividade antiparasitária, antimicrobiana, bem como avaliar a atividade modulatória da resistência bacteriana em associação a antimicrobianos utilizados clinicamente frente à cepas multirresistentes de bactérias e fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do extrato

As folhas foram coletadas na Chapada do Araripe no município do Crato-Ceará, Brasil. A coleta resultou em amostras para identificação e preparação de exsicata, que foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob número 30.2013.

As folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. foram secas ao ar livre durante 48h ao abrigo do sol. Em seguida pesadas, separadas, trituradas e extraídas com solvente etanol e água na proporção de 1:1, por um período de 72h. Em seguida foi realizada filtração para reter a parte sólida. A mistura filtrada foi concentrada com o auxílio do aparelho rota evaporador sob rotação entre 27 a 30 rpm e temperatura de aproximadamente 45°C para destilação do solvente. A solução restante foi submetida ao banho-maria para evaporação do excedente etanólico e, transcorridas 24h, o EHFJZ foi congelado e liofilizado. O pó resultante foi armazenado em frasco âmbar e resfriado a 4°C em geladeira para os procedimentos analíticos e ensaios farmacológicos.

Prospecção fitoquímica qualitativa

Testes fitoquímicos foram feitos de forma qualitativa para detectar a presença de ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e saponinas. Os testes foram baseados em leituras colorimétricas ou formação de precipitado conforme descrito por Matos (1997).

Determinação do teor de fenóis totais e flavonoides

Com a determinação da curva de calibração, realizada com leitura da absorbância das diversas concentrações de ácido gálico, foi obtida a seguinte equação: $y = 0,012x + 0,103$, a qual pode ser aplicada para determinação dos fenóis totais em equivalentes mg de ácido gálico / g de extrato. A curva de calibração para determinação dos flavonóides foi obtida após a leitura das diversas soluções de quercetina com concentração determinada, gerando a seguinte equação: $y = 0,033x + 0,056$, aplicada para determinação dos flavonóides como mg equivalente de quercetina / g de extrato.

Ensaio cromatográficos

Quantificação dos compostos por meio de CLAE

Análises cromatográficas de fases reversíveis foram realizadas sob condições de gradiente utilizando uma coluna C18 (4,6 mm x 250 milímetros) carregada com partículas de diâmetro 5µm. A fase móvel água contendo 1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B), e o gradiente de composição foi o seguinte: 13% de B até 10 minutos e mudou para obter 10, 20, 30, 50, 60, 70 % de B em 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente (Boligon et al., 2012), com modificações. O extrato de *Ziziphus joazeiro* foi dissolvido em etanol a uma concentração de 20 mg / mL. A presença de onze compostos antioxidantes foi investigado, ou seja, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido caféico, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de UV com a dos padrões comerciais.

A taxa de fluxo foi de 0,7 µl / min, volume de injeção de 40 µl e o comprimento de onda de 254 nm para ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para os ácidos cafeico, elágico e clorogénico, e 365 nm para a quercetina, isoquercitrina, quercitrina, rutina e canferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), e em seguida degaseificada por banho de ultra-sons antes da utilização. As soluções de referências padrões foram preparadas em fase móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,030-0,250 µg / ml para canferol,

quercetina, quercitrina, isoquercitrina, catequina, epicatequina e rutina, e 0,030-0,250 µg / ml para gálico, cafeico ácidos elágico e clorogênico. Os picos cromatográficos foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 400 nm).

Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 14286x + 1395,8$ ($r = 0,9996$); catequina: $Y = 15097x + 1189,3$ ($r = 0,9997$); epicatequina: $Y = 13601x + 1194,5$ ($r = 0,9992$), ácido cafeico: $Y = 12758x + 1.259,7$ ($r = 0,9996$); ácido clorogênico: $Y = 13461x + 1275,3$ ($r = 0,9992$), ácido elágico: $Y = 13576x + 1346,4$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 12,845 + 1305,7$ ($r = 0,9999$); quercetina: $Y = 13560x + 1192,6$ ($r = 0,9991$), isoquercitrina: $Y = 12873x + 1325,6$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 11870x + 1329,8$ ($r = 0,9993$) e o campferol: $Y = 14253x + 1238,9$ ($r = 0,9997$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LOQ) calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como $\sigma 3,3$ e $10 / s$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (Boligon et al., 2013).

Determinação da Atividade Antioxidante DPPH e FRAP

A mensuração da atividade antioxidante foi feita pelo método de seqüestro de radicais livres de DPPH. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato em diferentes concentrações EHFZJ (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL) ou soluções de vitamina C nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 µM e 3,9 mL de solução 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura. A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento de onda (515 nm), porém com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM), sendo o branco determinado por metanol (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; RUFINO et al., 2007). A CE50 foi obtida através da interpolação entre a curva de DPPH e a da solução do extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

A determinação da atividade antioxidante ocorre pela redução de ferro (FRAP) através do método de espectroscopia na região do visível, utilizando a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com modificações. Foram usadas soluções tampão de acetato 300 mM, pH 3,6 e 10 mM de TPTZ (2, 4, 6-tripiridyl-S-triazina) em solução de 40 mM HCl e 20 mM FeCl₃. 6H₂O. A solução de trabalho foi preparada misturando-se 25 ml de tampão de acetato, 2,5 ml de TPTZ e 2,5 ml FeCl₃ 0,6 H₂O. A temperatura da solução foi elevada para 37 ° C antes de usar. O extrato hidroalcoólico de *Ziziphus joazeiro* Mart. (0,15 mL) foi adicionado para reagir com 2,85 ml de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriázina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa. O valor encontrado foi considerado como a capacidade em gramas (g) de o extrato reduzir gramas (g) de sulfato ferroso, a partir das absorvâncias obtidas através da interpolação entre a curva de sulfato ferroso e a solução do extrato. A leitura do complexo foi feita num comprimento de onda de 593 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação da Atividade antimicrobiana e de modulação da resistência bacteriana e fungica

Os testes para atividade antimicrobiana foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* 13048 e multirresistentes como *S. aureus* 10 (SA10), *E. coli* 06 (EC 06) e *Enterobacter aerogenes* CN64 (EA CN64) e linhagens fúngicas de *Candida krusei* 01, *Candida Tropicalis* 20 e *Candida albicans* 62 e multirresistentes como *C. krusei* LMBM 01 (CK LMBM01), *C. tropicalis* LM 20 (CT LM20) e *C. albicans* LM 62 (CA LM62), , todas obtidas da coleção de microorganismos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA). Os estoques de culturas foram mantidos em *Agar Heart Infusion* (HIA) e armazenados em refrigerador.

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do EHFZJ foram utilizados antibióticos de diversas classes (amoxicilina, ciprofloxacina, benzilpenicilina, gentamicina, amicacina e vancomicina). Para avaliação da atividade moduladora da ação antifúngica do EHFZJ foram utilizados os antifúngicos: mebemdazol, benzilmetronidazol e nistatina.

A concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI 10%) pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e uma concentração do EHFJZ 1024 $\mu\text{g/mL}$ diluída sequencialmente pelo título 1:2 (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento de microorganismos foi observado. Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos e antifúngicos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para as bactérias SA10, EC 06 e EA CN64, e para os fungos CK LMBM01, CT LM20 e CA LM62. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C utilizando para a leitura das cepas bacterianas o corante rezarzurina. A manutenção da coloração azul indica o não crescimento bacteriano, já o surgimento da coloração vermelha evidencia o crescimento bacteriano. Para leitura das cepas de fungos foi utilizado o método de observação da turbidez. O teste foi realizado em triplicata

Para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos e antifúngicos os testes foram realizados em triplicata. Cada poço da placa de microdiluição continha EHFJZ em concentração subinibitória de forma constante, os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 2500 $\mu\text{g/mL}$, e os antifúngicos partindo de 5000 $\mu\text{g/mL}$, diluídas sequencialmente de 1:2 até 2,4 $\mu\text{g/mL}$ e 4,8 $\mu\text{g/mL}$, sendo misturadas em caldo BHI 10%, tendo sido este preparado com solução destilada estéril. Em cada poço foi adicionado 100 μL de caldo BHI 10% com 128 $\mu\text{g/mL}$ do EHFJZ e inóculo bacteriano ou fúngico (10^5 UFC/mL). No primeiro poço adicionou-se 100 μL de solução do antibiótico ou antifúngico com 5000 $\mu\text{g/mL}$ procedendo à diluição seqüencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela rezarzurina como descrito na determinação da CIM. O teste foi realizado em triplicata.

Todos ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições. A diferença entre controle e associação foi avaliada pelo teste de variância (ANOVA) de uma via e, para valores de F significativos foram efetuadas comparações utilizando *post hoc* pelo teste de Tukey usando o *software Prism*.

Determinação da Atividade antiparasitária e citoprotetora

Para os testes de atividade antiparasitária *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner *et al.*, 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável

com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le-Senne *et al.*, (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania braziliensis* foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. Seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.*, (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN83), cultivada a 22°C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón *et al.*, 2006).

O teste de atividade antiepigastigota foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega *et al.*, (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em 200 μ L de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 μ g/mL a 28° C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μ L da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μ M. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6h a 37°C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado três vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepigastigota (AE%).

O teste de atividade antipromastigota feito com culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* que foram cultivadas até uma concentração de 10⁶ células/mL

e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriais e comparadas com um controle não tratado.

Fibroblastos NCTC929 utilizados no teste de citotoxicidade foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 µL, sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 µL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições. Para cálculo das IC₅₀ as equações foram determinadas por regressão linear usando o *softwarePrism*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da composição química por métodos colorimétricos

No extrato foi identificada qualitativamente a presença de saponinas, taninos, flavonoides e polifenóis. A presença de saponinas no EHFZJ foi avaliada pela formação de espuma persistente (por mais de 15 minutos) após o extrato ter sido solubilizado em água destilada e a solução ter sido fortemente agitada. Pôde-se concluir a presença de saponinas no EHFZJ.

A presença de saponinas é relatada, em diversos estudos, em plantas do gênero rhamnaceae (SPARG, 2004), como a *Hovenia dulcis* Thunb(WANDSCHEER et al, 2011), e espécies *Zizyphus: Zizyphus spina-christi*L. (SHAHAT et al., 2001); *Zizyphus juazeiro* (TRIPATHI et al., 2001) é referida também a presença desse metabólito secundário nos frutos (MELO et al., 2012), entrecascas(BARBOSA FILHO et al., 1985), e folhas

(CARVALHO, 2007) do *Ziziphus joazeiro*. Os altos teores de saponinas no juazeiro justificam sua principal aplicação comercial, a produção de sabão, e também seu uso como ferramenta para higiene pessoal por suas propriedades detergentes (FONSECA e BRANCO, 2010).

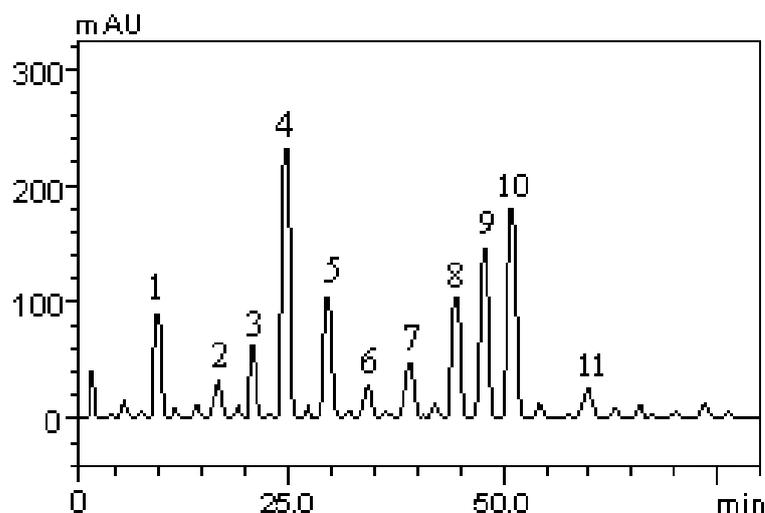
No ensaio quantitativo por espectrofotometria revelou que o extrato das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. possui como teor de polifenóis (183,13 mg/g) e de flavonóides (7,37 mg/g).

Análise da composição química por CLAE

Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 14286x + 1395,8$ ($r = 0,9996$); catequina: $Y = 15097x + 1189,3$ ($r = 0,9997$); epicatequina: $Y = 13601x + 1194,5$ ($r = 0,9992$), ácido cafeico: $Y = 12758x + 1.259,7$ ($r = 0,9996$); ácido clorogênico: $Y = 13461x + 1275,3$ ($r = 0,9992$), ácido elágico: $Y = 13576x + 1346,4$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 12,845 + 1305,7$ ($r = 0,9999$); quercetina: $Y = 13560x + 1192,6$ ($r = 0,9991$), isoquercitrina: $Y = 12873x + 1325,6$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 11870x + 1329,8$ ($r = 0,9993$) e o campferol: $Y = 14253x + 1238,9$ ($r = 0,9997$).

A análise química por CLAE do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* revelou a presença dos seguintes composto na sua composição: ácido gálico (tR = 10,09 min; pico 1), catequina (tR = 16,32 min; pico 2), ácido clorogênico (tR = 21,17 min; pico 3), ácido caféico (tr = 24,93 min; pico 4), ácido elágico (tR = 29,86 min; pico 5), epicatequina (tR = 34,19 min; pico 6), a rutina (tR = 39,05 min; pico 7), isoquercitrina (tR = 44,89 min; pico 8), quercitrina (tR = 47,61 min; pico 9), a quercetina (tR = 51,07 min; pico 10) e o campferol (tR = 60,34 min; pico 11) (Figura 1). A análise por CLAE revelou que há a presença de flavonóides, taninos e os ácidos fenólicos no extrato de *Ziziphus joazeiro* (Tabela 1).

Figura 1 – Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. realizado em cromatografia líquida de alta eficiência.



Detecção UV em 325 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), isoquercitrina (pico 8), quercitrina (pico 9), quercetina (pico 10) e canferol (pico 11).

Tabela 1 – Composição química do extrato de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Componentes	<i>Ziziphus joazeiro</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/ML	µg/mL
Ácido gálico	13.67 ± 0.01 a	1.36	0.015	0.049
Catequina	5.28 ± 0.01 b	0.52	0.032	0.105
Ácido clorogênico	10.45 ± 0.03 c	1.04	0.009	0.029
Ácido cafeico	29.61 ± 0.01 d	2.96	0.024	0.078
Ácido elágico	15.09 ± 0.02 a	1.50	0.013	0.042
Epicatequina	4.83 ± 0.01 b	0.48		
Rutina	9.72 ± 0.02 e	0.97	0.027	0.090
Isoquercitrina	15.24 ± 0.03 a	1.52	0.008	0.026
Quercitrina	19.38 ± 0.01 f	1.93	0.035	0.114
Quercetina	21.30 ± 0.02 g	2.13	0.019	0.063
Canferol	5.17 ± 0.03 b	0.51	0.026	0.085

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey para $p < 0,001$.

Os flavonóides encontrados no EHFZJ foram a quercetina, isoquercetina, quercitrina, rutina e canferol. Os flavonóides possuem comprovada ação antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; PERÉZ-TRUEBA, 2003; ROSA et al., 2010), além

dessa atividade, compostos dessa classe química também apresentam atividade antialérgica; ação contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, ações antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2000) e ainda sugere-se através de estudos que eles agem inibindo a replicação do vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida, SIDA (LIN et al. 1997).

Os taninos catequina e epicatequina foram detectados no extrato de *ziziphus joazeiro*. Esse grupo de compostos pode ser encontrado em diversas partes do vegetal, como folhas, cascas, entrecascas, frutos e sementes. Apresentam em sua constituição os polifenóis e são classificados quimicamente em hidrolisáveis e condensados (PAES et al., 2006). Estudos sugerem, em relação aos taninos, uma expressiva ação antibacteriana (LOGERCIO et al., 2005). É relatada também a sua importância antiinflamatória, antiparasitária, cicatrizante e gastroprotetora (MELLO e SANTOS, 2001).

Dentre os ácidos fenólicos identificados no EHFZJ, o que se mostrou majoritário foi o ácido caféico. Vários estudos relatam a importante atividade pró e antioxidante do ácido gálico e caféico (SOARES, 2002; BIANCHI e ANTUNES, 1999; RAMALHO e JORGE, 2006), ambos presentes no extrato.

Os resultados demonstrados pelo método CLAE indicaram um total de fenóis de 68,82 mg/g de extrato e teor de flavonóides de 55,57 mg/g, já o método colorimétrico indicou um total de 183,13 mg de polifenóis/g de extrato e de 7,37 mg de flavonóides/g de extrato. Os dados do método colorimétrico superestimam a quantidade de polifenóis presentes no extrato. De acordo com Bragagnolo (2001), métodos colorimétricos possuem uma tendência a superestimar o teor de compostos totais pela presença de substâncias interferentes, já os métodos cromatográficos, ainda que mais onerosos, são os mais específicos, pois possuem a capacidade de isolar os interferentes.

Atividade antioxidante por DPPH e FRAP

A atividade antioxidante foi mensurada com o método de seqüestro de radicais livres de DPPH e atividade quelante de ferro, respectivamente. Os resultados demonstraram uma CE_{50} 735,72 $\mu\text{g/mL}$ para o EHFZJ e CE_{50} 40,82 $\mu\text{g/mL}$ para a vitamina C para o ensaio de DPPH e uma CE_{50} 0,87 $\mu\text{g/mL}$ para teste FRAP. O DPPH é um radical livre estável, quando é reduzido perde sua cor púrpura, dessa maneira é utilizado em testes

químicos para detectar o poder redutor, oxidante, de determinadas substâncias (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Em seu estudo comparativo, Silva et al. (2011), identificaram uma CE_{50} de 461,88 e 1743,05 $\mu\text{g/mL}$ para folhas e cascas de *Ziziphus joazeiro*, respectivamente, e $CE_{50} = 13,95 \mu\text{g/mL}$ para o ácido ascórbico. Tais resultados corroboram com nosso estudo, que demonstra que o extrato das folhas *Ziziphus joazeiro* Mart. apresenta baixa atividade para o sequestro do radical livre DPPH quando comparado ao ácido ascórbico. Altos teores de polifenóis e flavonóides presentes em produtos naturais são responsáveis pela sua capacidade de sequestrar radicais livres (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; SOARES, 2002). Compostos fenólicos demonstram sua capacidade antioxidativa, essencialmente, pela característica de sua estrutura química, fatores estes que desempenham um importante envolvimento no sequestro e neutralização dos radicais livres e quelação de metais instáveis, atuando no início do processo oxidativo e na sua propagação (SOUSA et al., 2007). As pequenas quantidades desses compostos detectadas no EHFZJ através dos métodos colorimétricos e CLAE corroboram com a baixa capacidade antioxidante do mesmo.

Atividade antiparasitária

Os resultados para atividade citotóxica, antileishmania e tripanocídica do extrato *Ziziphus joazeiro* Mart. são demonstradas na Tabela 2. O EHFZJ demonstrou contra fibroblastos uma $IC_{50} = 119,34 \mu\text{g/mL}$ atestando sua baixa toxicidade. Quanto à avaliação da atividade antiparasitária apresentou para epimastigotas de *T. cruzi* uma $IC_{50} = 316,28 \mu\text{g/mL}$ e para as formas promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum* IC_{50} de 214,12 $\mu\text{g/mL}$ e 174 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados demonstram que o EHFZJ é eficaz contra todos os protozoários testados, uma vez que, de acordo com Santos et al. (2012), IC_{50} menores que 500 $\mu\text{g/mL}$ já são consideradas clinicamente relevantes.

Tabela 2 - Atividade antileishmania, tripanocídica e citotóxica de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Conc.	%AI	± %DS	%AL	± %DS	%AT	± %DS	%AF	± %DS
-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------	-----	-------

µg/mL								
1000	78,95	0,24	39,3	1,3	60,84	0,61	82,17	0,02
500	24,31	2,7	0	1,84	23,91	0,32	77,54	0,37
250	11,99	1,77	0	2,7	7,12	0,8	70,36	0,67
125	12,05	1,71	0	2,4	3,45	2,69	51,62	0,5

%AI – Porcentagem de promastigotas *L.infantum* de cepas mortas; %AL – Porcentagem de promastigota *L.brasiliensis* de cepas mortas; %AT - Porcentagem de epimastigota de *T.cruzi* CL transfectada mortas; %AF – Porcentagem de fibroblastos mortos N-CTC 929 mortos; ± %DS – Desvio padrão.

Algumas espécies do gênero Rhamnaceae, a exemplo da *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana* (OSORIO, MONTOYA e ARANGO, 2006), *Hovenia dulcis* Thunb (CASTRO et al., 2002), *Ampelozizyphus amazonicus* (ROSAS et al., 2007) e *Ziziphus spina christi* (TONKAL, 2005) foram identificadas como possuindo atividade antiparasitária frente a *leishmaniae T. cruzi*, acredita-se que essa atividade se deva a presença de alcalóides nas mesmas, uma vez que esses compostos possuem atividade tripanocida por inibirem a respiração celular (SOBRINHO et al., 2007). O ponto de partida para o uso de novos compostos em modelos animais é a mensuração da sua toxicidade, atualmente, fármacos utilizados no combate a parasitos como *T. cruzi* e *L. braziliensis* demonstram alto nível de toxicidade devido à grande reatividade dos metabólitos produzidos por eles (DIAS et al., 2009), o EHFZJ apresentou baixa toxicidade. A literatura carece de estudos que tratem da atividade antiparasitária da espécie *Ziziphus joazeiro*.

Atividade antimicrobiana

Pesquisas têm comprovado a eficácia antimicrobiana de plantas medicinais e seus metabólitos secundários, tais estudos foram direcionados pelo uso popular (CAETANO et al., 2002; DUARTE, 2006; LIMA et al., 2006; PACKER e LUZ, 2007; SILVA et al., 2007). Os resultados apresentados na Tabela 3 revelaram um valor da CIM ≥ 1024 µg/mL para todas as bactérias e fungos testados, o que aponta para uma atividade antimicrobiana pouco relevante clinicamente. Estes resultados confirmam os dados dos estudos de Almeida e Amorim (2009); Cavalcante (2010); Melo et al. (2012); Silva et al. (2011), que classificaram a atividade antimicrobiana das folhas do *Ziziphus joazeiro* como leve em relação aos extratos obtidos de outras partes dessa planta, como frutos e cascas.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (mg/mL) do EHFZJ para bactérias e fungos.

Bactéria / Fungo (linhagem)	MIC (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	≥ 1024
<i>Enterobacter aerogenes</i> 13048	≥ 1024
<i>Candida krusei</i> 01 ATCC	≥ 1024
<i>Candida Tropicalis</i> 20 ATCC	≥ 1024
<i>Candida albicans</i> 62 ATCC	≥ 1024

O teste de modulação tem como objetivo avaliar a influência do extrato EHFZJ sobre a ação dos antibióticos utilizados terapeuticamente frente à cepas bacterianas multirresistentes. Os resultados demonstraram que a associação do EHFZJ com os antibióticos, gentamicina e amicacina reduziram a concentração necessária para inibição do crescimento bacteriano de 78 µg/mL para 19 µg/mL e 78 µg/mL para 9,7µg/mL, respectivamente (Tabela 4) demonstrando um sinergismo.

Tabela 4 - Valores de concentração de inibição do crescimento bacteriano dos antibióticos (µg/mL) frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*.

Linhagem	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter aerogenes</i>	
	Associação*	Controle**	Associação*	Controle**	Associação*	Controle**
Vancomicina	1250	1250	2500	2500	2500	2500
Gentamicina	19,5	19,5	156	156	19[#]	78
Amicacina	19,5	19,5	156	156	9,7[#]	78
Benzilpenicilina	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
Amoxicilina	>2500	>2500	>2500	>2500	1250	1250
Ciprofloxacina	19,5	19,5	78	78	19,5	19,5

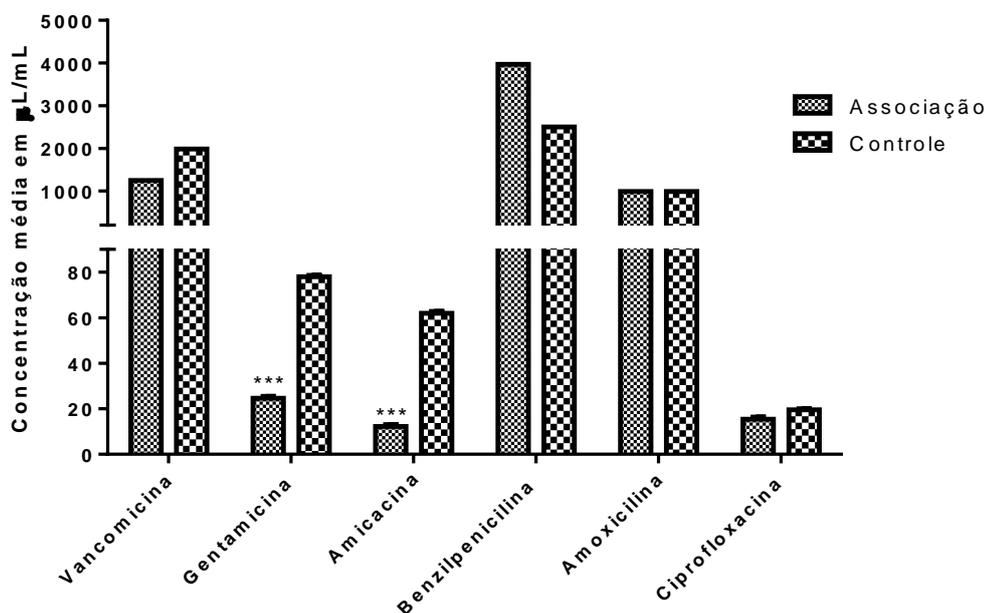
* concentração do antibiótico em associação com a concentração subinibitória do EHFZJ; ** Concentração do antibiótico. Os resultados estão descrito da média das triplicatas # p<0,001 em relação ao controle pelo teste de Tukey.

A utilização de associações entre antibióticos de ação sinérgica já está sendo tomada há tempos, entre β-lactâmicos e β-lactamase, por exemplo, e ainda hoje é uma alternativa competente contra os diversos mecanismos de resistência bacteriana. Devido a esse fato há, atualmente, uma crescente busca por novos compostos com capacidade para inibir, em baixas concentrações, o metabolismo de várias espécies de microorganismos multirresistentes, sejam eles de origem natural ou sintética (SILVEIRA et al., 2006). A associação entre produtos naturais e antimicrobianos tem ganhado destaque nessa busca

(OLIVEIRA et al., 2006), uma vez que essa prática tem sido comprovada, através de diversos estudos (JUNIOR et al., 2011; MATIAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011). Segundo Coutinho et al. (2008), alguns produtos naturais agem potencializando o efeito dos antibióticos, dificultando assim, o desenvolvimento da resistência aos mesmos.

O EHFZJ demonstrou efeito modulador significativo em associação com amicacina e gentamicina frente à *enterobacter aerogenes* (Figura 2). Esse efeito pode ser justificado, em parte, pela presença de metabólitos secundários que alteram a permeabilidade ou rompem a membrana celular do microorganismo, o que aumenta a disponibilidade do antimicrobiano no seu sítio de ação (JOHANN, 2003), metabólitos como os flavonóides, por exemplo, que apresentam ação antimicrobiana comprovada (ZUANAZZI, 2000) e compõe uma das classes químicas presentes no extrato estudado.

Figura 2: Atividade moduladora do EHFZJ frente às cepas multirresistentes de *Enterobacter aerogenes*.



Cada poço da placa de microdiluição continha EHFZJ em concentração subinibitória de forma constante, os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 2500 µg/mL, diluídas sequencialmente de 1:2 até 2,4 µg/mL e 4,8 µg/mL, sendo misturadas em caldo BHI 10%, tendo sido este preparado com solução destilada estéril. Em cada poço foi adicionado 100 µL de caldo BHI 10% com 128 µg/mL do EHFZJ e inóculo bacteriano (10⁵ UFC/mL). No primeiro poço adicionou-se 100 µL de solução do antibiótico ou antifúngico com 5000 µg/mL procedendo à diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela rezarzurina. O teste foi realizado em triplicata.

O efeito antibacteriano demonstrado pode estar relacionado, ainda, à presença de saponinas no EHFZJ, que tem como característica a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos das membranas celulares que possibilitam ações biológicas diversas, entre elas defesa contra bactérias (CASTEJON e STRINGHINI, 2011). A ação desse metabólito secundário sobre a membrana celular pode agir alterando a permeabilidade da mesma ou causando a sua destruição completa (SCHENKEL et al., 2001).

Estudos comprovaram o efeito antimicrobiano de plantas pertencentes à família Rhamnaceae frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas: *Condalia buxifolia* (MALDANER, 2005); *Ziziphus abyssinica* e *Berchemia discolor* (GUNDIDZA e SIBANDA, 1991); *Scutiabuxifolia* (BOLIGON et al., 2012). Em estudos para determinação dos halos de inibição, o extrato das cascas do *Ziziphus joazeiro* apresentou atividade bactericida significativa, porém nesse mesmo método o extrato das folhas não obteve desempenho relevante (ALMEIDA e AMORIM, 2009; KATO et al., 1998; SILVA, et al., 2011). A literatura carece de estudos que tratem do efeito de extratos do *Z. joazeiro* em associação com antibióticos e que avaliem seus efeitos sinérgicos ou antagônicos em relação a estes.

O teste de modulação para antifúngicos tem como objetivo analisar a influência do EHFZJ em concentração subinibitória sobre diversas concentrações de antifúngicos frente às cepas fúngicas multirresistentes. Para isso, a concentração subinibitória, determinada pela CIM/8, apresentou concentração de 128 µg/mL para ser utilizada nos ensaios de modulação da resistência fúngica. Os resultados demonstraram que o EHZJ não potencializou a ação de nenhum dos antifúngicos frente às linhagens de fungos testadas. Tais resultados corroboram com Melo et al. (2012), que não identificou atividade antifúngica nos extratos de nenhuma das partes do *Ziziphus joazeiro* e Cruz et al. (2007) que concluiu que apenas o extrato das entrecascas de *Ziziphus joazeiro* apresenta atividade sobre os fungos *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Fonsecaea pedrosoi*.

CONCLUSÃO

Foi possível determinar a presença de flavonóides, fenóis, taninos e saponinas no extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., além de comprovar

sua capacidade antioxidante pelo seqüestro do radical livre DPPH e FRAP, ainda que a mesma tenha se mostrado discreta quando comparada aos padrões de vitamina C.

O teste de microdiluição não demonstrou atividade antimicrobiana clinicamente relevante para o EHFZJ, entretanto, para a atividade modulatória da resistência bacteriana foi observada ação sinérgica do extrato em associação com amicacina e gentamicina frente à *Enterobacter aerogenes*. Em relação à atividade antifúngica o EHFZJ não apresentou atividade clinicamente relevante frente às linhagens fúngicas testadas nem atividade modulatória em associação com os antifúngicos adotados.

O EHFZJ apresentou, durante os ensaios, potencial antiparasitário com base no efeito tóxico contra a forma promastigota de *L. braziliensis* e *L. infantum* e epimastigota de *T. cruzi*, além de demonstrar baixa citotoxicidade frente a fibroblastos. Tais resultados se mostram promissores, uma vez que o desafio hoje consiste em descobrir e aperfeiçoar moléculas bioativas de produtos naturais que selecionem apenas as proteínas alvo do parasita, com o mínimo de riscos e danos para as células do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

AKHAVAN, O.; GHADERI, E. *Escherichia coli* bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner. **Carbon**, v. 50, n. 5, p. 1853-1860, 2012. ISSN 0008-6223.

ALMEIDA, C. B. R. de; AMORIM, E. L. C. de. Estudo da atividade antimicrobiana de *Zizyphus joazeiro* Mart. e teste de toxicidade frente *Artemia salina* Leach. **I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**. UFPE, 2009. Disponível em: <[http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20\(E\)/conic/pibic/40/094031216SCPO.pdf](http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20(E)/conic/pibic/40/094031216SCPO.pdf)>.

BARBOSA FILHO, J.; TRIGUEIRO, J.; CHERIYAN, U.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 152-153, 1985. ISSN 0163-3864.

BAVIA, M. E.; RIBEIRO, F. S.; MARTINS, M. D. S.; CARDIM, L. L.; SILVA, M. M. N.; CARNEIRO, D. D. M. T. Geotecnologias na identificação de fatores ambientais relacionados à ocorrência da leishmaniose visceral americana em Conde, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, 2011. ISSN 1519-9940.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. ISSN 0003-2697.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; DE BRUM, T. F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS, R. C. V.; DOS SANTOS ALVES, C. F. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 1-11, ISSN 0137-5881.

BRAGAGNOLO, N. Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol. CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2001. Embrapa Suínos e Aves Concórdia.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996. ISSN 0066-4804.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.; MAIA, M. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002. ISSN 0102-695X.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003. ISSN 0009-6725.

CARVALHO, J. E. DE Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. 2006.

CASTEJON, F. V. TANINOS E SAPONINAS. Disponível em: <http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_semi2011_Fernanda_Castejon_1c.pdf>.

CASTRO, T. C. D.; PELLICCIONE, V. L. B.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, R. O. D. A.; BOZZA, M. T.; VIANA, V. R. C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 96-99, 2002. ISSN 0102-695X.

CAVALCANTE, A. L. F. D. A. PLANTAS MEDICINAIS E SAÚDE BUCAL: Estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa. Disponível em: <http://bdt.d.biblioteca.ufpb.br/tde_arquivos/27/TDE-2010-05-04T143659Z-475/Publico/arquivototal.pdf>.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008. ISSN 0102-695X.

CRUZ, M.; SANTOS, P.; BARBOSA JR, A.; DE MÉLO, D.; ALVIANO, C.; ANTONIOLLI, A.; ALVIANO, D.; TRINDADE, R. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007. ISSN 0378-8741.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf, 2006>.

FARIA, D.; DE BRITO, J. R. A.; REIS, D. G. D.; RABELLO, N. N.; RABELO, N. N. R.; SOARES, J. D.; TALLO, F. S.; LOPES, R. D.; RABELO, D. R. Doença de Chagas congênita com manifestações pleomórficas: relato de caso; Congenital Chagas disease in adolescent with pleomorphic manifestations: case report. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 11, n. 1, 2013. ISSN 1679-1010.

FONSECA, F. C. S.; BRANCO, A. Obtenção de triterpenos pentacíclicos a partir do extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). Disponível em: <<http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-031FER918-220.pdf>>

FORZZA, R. C.; DE JANEIRO, J. B. D. R. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001. ISSN 0095-1137.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L. D.; BARBOSA, M. D. V.; BOCAGE NETA, A.; FIGUEIREDO, M.; SAMPAIO, E.; GIULIETTI, A.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. Espécies endêmicas da caatinga. **Vegetação e flora da caatinga**, p. 103-115, 2002.

GUNDIDZA, M.; SIBANDA, M. Antimicrobial activities of *Zizyphus abyssinica* and *Berchemia discolor*. **Central african journal of medicine**, v. 37, n. 3, p. 80-83, 1991. ISSN 0008-9176.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W.-C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996. ISSN 0022-2623.

JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/86538>>.

JÚNIOR, F. E.; DE OLIVEIRA, D. R.; BENTO, E. B.; LEITE, L. H.; SOUZA, D. O.; SIEBRA, A. L. A.; SAMPAIO, R. S.; MARTINS, A. O.; RAMOS, A. G.; TINTINO, S. R.

Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. ISSN 1741-427X.

KATO, E. T. M.; OHARA, M. T.; NISHITAMI, M. Estudo da atividade antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Martius; Evaluation of antimicrobial property of *Ziziphus joazeiro* Martius. **Lecta-USF**, v. 16, n. 2, p. 75-84, 1998. ISSN 0104-0987.

LE-SENNE, A.; MUELAS-SERRANO, S.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1101-1105, 2002. ISSN 0074-0276.

LIMA, J.; FURTADO, D.; PEREIRA, J.; BARACUNHY, J.; XAVIER, H. Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. **Campina Grande**, 2006.

LIN, Y.-M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y.-H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H.; CHEN, F.-C. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of natural products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997. ISSN 0163-3864.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005. ISSN 0103-8478.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. ISSN 0100-4042.

MALDANER, G.; SANTA MARIA, R. **Estudo dos metabólitos secundários da *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**: Santa Maria 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATIAS, E. F.; SANTOS, F. A.; SILVA, J. M. F.; SOUZA, C. E.; TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M.; MEDEIROS, C. R.; BRAGA, M. F.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. Screening the in vitro modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 1902-1907, 2012. ISSN 1996-0808.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoterapia experimental. **Fortaleza**: ED – UFC, 1997.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MELO, M. D. S. F.; DA ROCHA, C. Q.; DOS SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, 2012. ISSN 1517-0276.

MOTA, M. L. Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE um modelo murino–*Plasmodium beghei*. **Dissertação de Mestrado. Brasil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, Brasil**, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; BRITO-JUNIOR, F. E.; BENTO, E. B.; MATIAS, E. F.; SOUSA, A. C. A.; COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 1265-1270, 2011. ISSN 1388-0209.

OLIVEIRA, R.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. L.; TRAJANO, V.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OSORIO, J.; MONTOYA, G.; ARANGO, G. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. **Vitae**, v. 13, n. 1, 2006.

PACKER, J. F.; LUZ, M. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 102-7, 2007.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no Semi-Árido Brasileiro. **Cerne, Lavras**, v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. D. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011. ISSN 1679-4974.

PÉREZ-TRUEBA, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 22, n. 1, p. 0-0, 2003. ISSN 0864-0300.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G.; ALVIM, A. D. C.; NASCIMENTO, F. R. F. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: uma revisão. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, 2013. ISSN 1516-7534.

RABELLO, S. B.; GODOY, C. V. C.; SANTOS, F. R. W. D. Presença de bactérias em instrumentais e superfícies do ambiente clínico odontológico; Presence of bacteria in instruments and surfaces of the clinic odontologic ambient. **Rev. bras. odontol**, v. 58, n. 3, p. 184-7, 2001.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755, 2006. ISSN 0100-4042.

ROLÓN, M.; SECO, E. M.; VEGA, C.; NOGAL, J. J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 28, n. 2, p. 104-109, 2006. ISSN 0924-8579.

ROMÃO, M. O. D. C.; COSTA, A. M. D. D.; TERRA, F. D. S.; BORIOLLO, M. F. G.; SOARES, E. A. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá; Assessment of gastric protective of rasp juá extract. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 8, n. 3, 2010. ISSN 1679-1010.

ROSA, E. A. D.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M. D.; TANAKA, C.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. D. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010. ISSN 0102-695X.

ROSAS, L.; CORDEIRO, M.; CAMPOS, F.; NASCIMENTO, S.; JANUÁRIO, A.; FRANÇA, S.; NOMIZO, A.; TOLDO, M.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 40, n. 5, p. 663-670, 2007. ISSN 0100-879X.

RUFINO, M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. D.; MORAIS, S. D.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, v. 127, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002. ISSN 1082-0132.

SANTOS, K. K.; MATIAS, E. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; TINTINO, S. R.; MORAIS-BRAGA, M. F.; GUEDES, G. M.; SANTOS, F. A.; A. SOUSA, A. C.; ROLÓN, M.; VEGA, C. Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 162-166, 2012. ISSN 1388-0209.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap. 27, p. 597-619.

SHAHAT, A. A.; PIETERS, L.; APERS, S.; NAZEIF, N. M.; ABDEL-AZIM, N. S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Chemical and biological investigations on *Zizyphus spina-christi* L. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 593-597, 2001. ISSN 1099-1573.

SILVA, J. G. D.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 4, p. 572-7, 2007.

SILVA, T. C. D. L.; ALMEIDA, C. C. B. R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.; AMORIN, E. L. C.; COSTA, E. P.; ARAÚJO, J. M. D. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart.(Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011. ISSN 2179-443X.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; TERENCEZI, M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006. ISSN 0100-4042.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes; Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. ISSN 1415-5273.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. D. M.; DE LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; ROLIM NETO, P. J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, 2007. ISSN 1980-8178.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.; BRANDÃO, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPARG, S.; LIGHT, M.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 219-243, 2004. ISSN 0378-8741.

TONKAL, A.; SALEM, H.; JAMJOOM, M.; ALTAIEB, A.; AL-BAR, H. Preliminary Study on the Effect of *Ziziphus spina christi*. on Selected *Leishmania* spp. **J. of Al-Azhar Medical Faculty (Girls)**, v. 26, n. 1, 2005. ISSN 1110-2381.

TRIPATHI, M.; PANDEY, M.; JHA, R.; PANDEY, V.; TRIPATHI, P.; SINGH, J. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus jujuba*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 507-510, 2001. ISSN 0367-326X.

VEGA C.; ROLÓN M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ A.R.; ESCARIO JÁ, GÓMEZ-BARRIO A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing Beta galactosidase. **Parasitol Res.** 95: 296-298. 2005.

WANDSCHEER, A. C. D.; BORELLA, J.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb.(Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2011. ISSN 1677-941X.

ZUANAZZI, J. S. S. - **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, p.489-515.

Capítulo 2

Perfil cromatográfico, avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Perfil cromatográfico, avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Sharlene Maria Oliveira Brito¹ (sharlenebrito@hotmail.com), Rayane Oliveira¹ (rayane_braya@hotmail.com), Cinara Vidal¹ (cinaravidal@hotmail.com), Luiz Jardelino de Lacerda Neto¹ (ljneto@yahoo.com.br), Luzia Paulo da Cruz¹, Erika Amaro Nascimento¹ (erikanascimento11@hotmail.com) Irwin Rose Alencar de Menezes¹ (irwinalencar@yahoo.com.br)

¹ Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecido popularmente como juazeiro, apresenta-se como uma das espécies endêmicas do bioma caatinga, é relatado seu uso na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites, de úlceras gástricas e ferimentos de pele, na fabricação de cosméticos, xampus anticaspa e creme dental e na alimentação de animais principalmente nos períodos de seca.

OBJETIVOS: Este trabalho teve como objetivo quantificar o teor de ácidos fenólicos e flavonóides através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o potencial gastroprotetor do extrato e cicatrizante de cremes contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ).

MÉTODOS: A investigação do potencial gastroprotetor foi feita através dos modelos clássicos de lesão gástrica por etanol, etanol acidificado e indometacina e pelo método de barreira. A atividade cicatrizante das lesões cutâneas induzidas no dorso de ratos foi avaliada através da mensuração da velocidade de fechamento das feridas (VFF) e do percentual de contração (%C) das mesmas.

RESULTADOS: O resultado da DL₅₀ não demonstrou nenhum registro de óbitos entre os animais tratados oralmente com dose 5000mg/kg do EHFZJ. Nos modelos de lesão gástrica induzida por indometacina, etanol e etanol acidificado, o EHFZJ mostrou efetividade na dose de 400 mg/kg comprovando a sua atividade gastroprotetora. Porém, no teste de barreira física observou-se que apenas a via de administração oral é efetiva quando comparada a via intraperitoneal. No teste para avaliação do potencial cicatrizante os grupos testados (creme base, EHFZJ 100, 200 e 400 mg/g) não demonstraram diferença estatística significativa em relação ao percentual de contração e à velocidade de fechamento da ferida nos tempos de observação (0, 3, 7, 11 e 14).

Nos modelos de indução de lesão gástrica por etanol e etanol acidificado, o EHFZJ mostrou maior efetividade na dose de 400 mg/kg, apresentando percentual de redução da área lesionada de 47,16% e 63,11%, respectivamente, quando comparados ao omeprazol, que reduziu em 57,32% e 55,17% em cada teste, respectivamente. Nas lesões induzidas por indometacina, o EHFZJ na dose de 400 mg/kg, obteve pontuação de $2,85 \pm 0,40$, semelhante à pontuação atribuída ao omeprazol ($2,42 \pm 0,42$), comprovando a sua atividade gastroprotetora. No teste de barreira física observou-se que apenas a via de administração oral é efetiva quando comparada a via intraperitoneal.

CONCLUSÕES: Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. possui ação gastroprotetora, o mecanismo de gastroproteção do EHFZJ se dá pela formação de uma camada mucoproteica desencadeada pela aderência de taninos à mucosa gástrica, o que justifica o seu uso popular para gastrite. Mecanismo de gastroproteção se dá por via tópica. O creme do EHFZJ, por sua vez, não apresentou ação cicatrizante estatisticamente significativa em relação ao controle negativo.

Palavras-chave: *Ziziphus joazeiro*, CLAE, atividade gastroprotetora, atividade cicatrizante.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Ziziphus Joazeiro* Mart., popularly known as juazeiro, is presented as one of the endemic species of the caatinga biome, it reported its use in folk medicine as an

expectorant in the treatment of bronchitis, gastric ulcers and skin wounds, in manufacturing cosmetics, dandruff shampoos and toothpaste and animal feeding especially during dry periods.

OBJECTIVES: This study aimed to quantify the content of phenolic acids and flavonoids by high performance liquid chromatography (HPLC), the gastroprotective potential of the extract and healing creams containing the hydroalcoholic extract of *Ziziphus joazeiro* Mart. (EHFZJ).

METHODS: The investigation of the potential gastroprotective was taken by classic models of gastric damage by ethanol, acidified ethanol and indomethacin and the barrier method. The healing activity of skin lesions induced in the dorsum of rats was assessed by measuring the rate of wound closure (VFF) and the percentage of contraction (% C) of the same.

RESULTS: The results of LD50 showed no record of deaths among animals treated orally with a dose of 5000mg/kg EHFZJ. In models of gastric lesions induced by indomethacin, ethanol and acidified ethanol, EHFZJ showed effectiveness at a dose of 400 mg / kg proving its gastroprotective activity. However, the physical barrier test, it was observed that only the oral route of administration is effective when compared to intraperitoneally. In the test to evaluate the healing potential of the tested groups (cream base, EHFZJ 100 , 200 and 400 mg/g) showed no statistically significant difference in relation to the percentage of contraction and the rate of wound closure in observation times (0 , 3 , 7, 11 and 14). In models of induced gastric lesions in ethanol and acidified ethanol, EHFZJ showed greater effectiveness at a dose of 400 mg / kg, with a percentage reduction of lesions of 47.16 % and 63.11 %, respectively, compared to omeprazol area which decreased by 57.32 % and 55.17 % in each test, respectively. In indomethacin induced lesions, EHFZJ at a dose of 400 mg / kg , obtained score of 2.85 ± 0.40 , similar to scores assigned to omeprazole (2.42 ± 0.42) , proving its gastroprotective activity. In the physical barrier test, it was observed that only the oral route of administration is effective when compared to intraperitoneally.

CONCLUSIONS: The results of this study allow us to conclude that the hydroalcoholic extract of *Ziziphus joazeiro* Mart. Have gastroprotective action, the mechanism of gastroprotection EHFZJ occurs by the formation of a layer mucoproteica triggered by adhesion of tannins to the gastric mucosa, which explains its popular use for gastritis mechanism of gastroprotection is given topically. The cream EHFZJ, in turn, were not significant healing action in relation to the negative control.

Keywords: *Ziziphus joazeiro*, HPLC, gastroprotective activity, healing activity.

INTRODUÇÃO

O crescente uso de produtos naturais e o potencial valor financeiro agregado a esse setor trouxeram à tona a necessidade de maiores investigações acerca dos mesmos. A base para as pesquisas tem sido a crença popular e aplicabilidade dos tratamentos caseiros.

Além disso, segundo Calixto (2003), os produtos naturais são utilizados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico, o que despertou o interesse da indústria farmacêutica a nível mundial, e por ser o Brasil um país de imenso patrimônio natural este se tornou um grande desafio para o aproveitamento racional da sua biodiversidade.

O gênero *Ziziphus* possui cerca de 30 espécies (HEALD, 2004). *Ziziphus joazeiro*, é uma das árvores de maior ocorrência na Caatinga, sendo popularmente conhecida como juazeiro (GIULIETTI et al. 2002). A espécie apresenta grande potencial econômico e importância para a região semi-árida, uma vez que suas folhas e frutos representam uma valiosa alternativa para os animais no período da seca. Por ser uma das poucas plantas da caatinga que se mantém verde durante todo o ano (CARVALHO, 2007). Além disso, na medicina popular, é bastante utilizada em tratamentos de gastrites, gripes, contusões e ferimentos; a raspa da entre-casca é rica em saponina, sendo, portanto empregada na produção de sabão. É também aproveitada para a fabricação de creme dental, como tônico capilar na sua forma macerada e a madeira é recomendada para lenha, carvão e marcenaria (SILVA e MATOS, 1998).

Os tipos de feridas, suas etiologias e locais de acometimento são os mais diversos possíveis, e, portanto apresenta-se como outro grave problema de saúde pública. Ainda que se tenha investido bastante em pesquisa e desenvolvimento de recursos e tecnologias nessa área e tenham sido verificados grandes avanços na compreensão dos fenômenos envolvidos nas diversas fases da reparação tissular, essa ainda é uma problemática que repercute em elevados custos financeiros e profundas conseqüências sociais sobre os portadores dessas injúrias, já que com freqüência esses desenvolvem seqüelas que podem levar à perda de membros e de suas funções, com conseqüente afastamento do trabalho e de suas atividades de vida diária (MANDELBAUM et al., 2003).

Por definição, úlceras são lesões da mucosa gastrointestinal que consistem na perda circunscrita de tecido, penetrando na camada muscular da mucosa. Quando formadas no estômago são chamadas úlceras estomacais ou gástricas e quando formadas no duodeno são chamadas de úlceras duodenais. Contudo, tanto as úlceras gástricas como as úlceras duodenais são comumente chamadas de úlceras pépticas. A úlcera péptica é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos em sua gênese. As hipóteses mais prováveis da causa das doenças ulcerosas agrupam fatores genéticos, estilo de vida (fatores

emocionais, estresse, dieta alimentar, ingestão de álcool), tabagismo, consumo de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), entre outros (BURCI e SILVA, 2011).

Entre os produtos naturais mais efetivos utilizados para cicatrização de feridas cutâneas destaca-se o mel, a própolis, as folhas de *Aloe vera* e óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) (OLIVEIRA et al., 2007). Acredita-se que o mecanismo de atuação de substâncias naturais que favorecem o processo de cicatrização de feridas e úlceras seja similar ao da indometacina, que age inibindo a síntese de prostanoídes, diminuindo a colagenólise nos primeiros dias de cicatrização, favorecendo a produção de colágeno (BEZERRA et al., 2006) ou ainda, através da precipitação de proteínas sintetizadas pelos polifenóis presentes nos extratos de plantas (CARVALHO, 2006).

Segundo Burcy e Silva (2011), a úlcera gástrica apresenta-se como um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal. Pode ser descrita como uma lesão na mucosa do trato digestivo, que se estende através da camada muscular da mucosa até a submucosa, ou ainda mais profundamente. Nesse tipo de lesão mais profunda tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos.

Nesse paradigma, várias plantas medicinais tem sido alvo de pesquisas para a formulação de novos fármacos para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e lesões cutâneas. Por ser relatado o uso popular do *Ziziphus joazeiro* para tais fins, este trabalho se propõe a avaliar sua composição química e seu potencial gastroprotetor e quantificar o potencial cicatrizante do extrato hidroalcoólico incorporado a uma formulação do tipo creme.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas foram coletadas na Chapada do Araripe no município de Crato-Ceará, Brasil. A coleta resultou em amostras para identificação e preparação de exsicata, que foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob número 30.2013 sendo identificada pela Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva.

As folhas do *Ziziphus joazeiro* Mart. foram secas ao ar livre durante 48h ao abrigo do sol. Em seguida pesadas, separadas, trituradas e extraídas com solvente etanol e água na proporção de 1:1, por um período de 72h. Em seguida foi realizada filtragem para reter a parte sólida. A mistura filtrada foi concentrada com o auxílio do aparelho rota evaporador sob rotação entre 27 a 30 rpm e temperatura de aproximadamente 45°C para destilação do solvente. A solução restante foi submetida ao banho-maria para evaporação do excedente etanólico e, transcorridas 24h, o EHFJZ foi congelado e liofilizado. O pó resultante foi armazenado em frasco âmbar e resfriado a 4°C em geladeira para os procedimentos analíticos e ensaios farmacológicos.

Análise Cromatográfica

Procedimentos químicos, aparelhos e geral

Todos os produtos químicos foram de grau analítico. Acetonitrila, ácido fórmico, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico e ácido cafeico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina, canferol e foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) foi realizada com o sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), Proeminence Sampler Auto (SIL-20A), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT ligados ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, DAD detector UV-VIS (diodo) SPD-M20A e solução LC Software 1.22 SP1.

Quantificação dos compostos por meio de CLAE

Análises cromatográficas de fases reversíveis foram realizados sob condições de gradiente utilizando uma coluna C18 (4,6 mm x 250 milímetros) carregada com partículas de diâmetro 5µm. A fase móvel água contendo 1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B), e o gradiente de composição foi o seguinte: 13% de B até 10 minutos e mudou para obter 20%, 30 %, 50 %, 60 %, 70 % , 20% e 10 % de B em 20, 30, 40 , 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente (BOLIGON et al., 2012), com ligeiras modificações. O extrato de

Ziziphus joazeiro foi dissolvido em etanol a uma concentração de 20 mg / mL. A presença de onze compostos antioxidantes foi investigado, ou seja, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido cafeico, catequina, epicatequina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina e canferol. A identificação destes compostos foi realizada comparando o seu tempo de retenção e o espectro de absorção de UV com a dos padrões comerciais.

A taxa de fluxo foi de 0,7 µl / min, volume de injeção de 40 µl e o comprimento de onda de 254 nm para ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 325 nm para os ácidos cafeico, elágico e clorogênico, e 365 nm para a quercetina, isoquercitrina, quercitrina, rutina e canferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm, e em seguida degaseificada por banho de ultra-sons antes da utilização. As soluções de referências padrões foram preparadas em fase móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,030-0,250 µg / ml para canferol, quercetina, quercitrina, isoquercitrina, catequina, epicatequina e rutina, e 0,030-0,250 µg / ml para gálico, cafeico ácidos elágico e clorogênico. Os picos cromatográficos foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 400 nm).

ENSAIOS *IN VIVO*

Animais utilizados e aspectos éticos da pesquisa

Foram utilizados para os testes camundongos *Swiss (Mus músculos)* de ambos os sexos, com peso entre 15 e 30 gramas oriundos do biotério da Universidade Regional do Cariri - URCA. Eles foram levados para a sala de experimentação dois dias antes dos testes e mantidos em rotatividade de ciclo claro e escuro de 12 horas sob regime de água e ração *ad libitum*, mesmas condições observadas no biotério. No dia anterior ao ensaio os animais foram marcados e a ração foi retirada 15 horas antes do experimento. A pesagem dos camundongos foi a primeira fase de cada teste. O trabalho realizou-se de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, que regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos e foi autorizado pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri CEUA/URCA, sob número de protocolo 21/2012.2.

Determinação da dose letal média (DL₅₀)

A investigação da toxicidade aguda de *Ziziphus joazeiro* Mart., seguiu as diretrizes da OECD (*Organização for Economic Co-operation and Development*) para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method* – OECD 425 – 2008) para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas.

Para determinar a classe de dose tóxica aguda, cinco animais foram tratados com o EHFZJ a cada dose, sendo a classe definida como a de menor dose, que na seqüência considerada, induz a morte. Portanto, o extrato foi administrado na seqüência da dose menor para a maior. O fator de progressão da dose deve ser de 3,2, quando não existe qualquer informação sobre a inclinação da curva dose-resposta da substância a ser testada. Utilizando-se o fator de progressão padrão, as doses foram selecionadas a partir da seqüência de: 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg. Excepcionalmente, somente quando justificado por regulação específica, o uso de dose superior a 5000 mg/kg deve ser considerada. O EHFJZ foi administrado por via oral (gavagem através de cânula apropriada). O volume administrado por via oral não excedeu 1 mL/100 g de peso corporal e, para manter o volume constante, ajustou-se as concentrações da solução de acordo com o nível de dose e peso dos animais.

Os animais foram observados em intervalos regulares após a administração da droga (30', 1h, 2h, 4h e 24h) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, época do seu aparecimento, intensidade, duração e progressão dos mesmos foram registrados. Observações comportamentais sistemáticas através do *screening* hipocrático (atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção, reflexo do endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo articular, reflexo corneal, tremores, convulsões, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte) também foram realizadas. As intensidades dos eventos foram tabuladas de zero a quatro, correspondendo, respectivamente a: ausente, raro, pouco, moderado e intenso. As alterações encontradas na observação comportamental e exame clínico sistemático dos animais são registrados em protocolo impresso com a lista de sinais a serem investigados. Esta lista e a pesquisa de sinais são baseadas no modelo proposto por Malone (1977).

Atividade gastroprotetora

Indução de lesão gástrica por etanol

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por etanol (0,1mL/10g, via oral). Após 1 hora minutos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados. Para avaliação e quantificação das lesões gástricas as imagens foram analisadas no *software (ImageJ)* através da quantificação de pixel. Para determinação da área foi utilizada a relação percentual em relação à área total do corpo gástrico.

Indução de lesão gástrica por etanol acidificado com ácido clorídrico (HCL)

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução de lesões por etanol acidificado (0,2 mL da solução 0,3 M de HCL em etanol 60% animal, via oral). Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por meio informatizado anteriormente descrito.

Indução de lesão gástrica por Indometacina

Os camundongos foram divididos em grupos (n=8): controle negativo ou lesionado (pré-tratado com solução salina 0,9%, 0,1mL/10g), controle positivo (pré-tratados com Omeprazol 30mg/kg) e os grupos *screening* (pré-tratados com EHFZJ nas concentrações

de 100, 200 e 400 mg/kg). Este pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da indução das lesões por administração subcutânea de indometacina (30mg/kg), transcorridas 3 horas após a administração do agente lesivo os pré-tratamentos foram repetidos. Decorridas 6 horas da administração de indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos foram removidos e abertos na curvatura maior, lavados com solução salina 0,9% e preparados para avaliação e quantificação das lesões gástricas por método de *score*. Neste método são atribuídas pontuações para diferentes observações conforme itens a seguir: coloração da mucosa, perda de pregas da mucosa, petéquias, edemas, hemorragia, perda de muco e lesões de úlcera, e foi atribuída uma pontuação conforme a gravidade do sintoma presente, sendo 0 para ausente ou normal, 1 para leve, 2 para moderado e 3 para grave. Já para o grau de lesão foi atribuída uma porcentagem, até 25% (área lesada), igual a 50% (moderada) e maior que 50% (intensa), conforme metodologia proposta por Zinkievich et al. (2010).

Teste de barreira física

Os animais foram tratados com solução salina (0,9 %, 01 mL/10g, v.o.) e o EHFZJ (400 mg/kg, v.o./v.ip.). Após uma hora dos tratamentos os animais do grupo (v.o.) receberam o etanol acidificado (0,2 mL/animal v.o.) e o grupo (v.ip.) após 30 minutos. Decorrida 1h da indução em cada grupo, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas de vidro. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com o grupo, com posterior análise através dométodo informatizado anteriormente descrito.

Atividade cicatrizante

Animais

Foram utilizados 10 ratos *Wistar* com peso entre 200-250 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha, que foram trocada três vezes por semana. A temperatura ambiente foi mantida em torno de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, num ciclo de 12h de claro e escuro, com livre acesso à água potável e ração.

Delineamento experimental

Após período de adaptação os animais foram previamente identificados e pesados, em cada animal foram feitas quatro lesões, uma para cada tipo de tratamento com: CremeBase (controle negativo), Creme de EHFZJ 100 mg/g, Creme de EHFZJ 200 mg/g e Creme de EHFZJ 400 mg/g.

Procedimento cirúrgico

Para todos os procedimentos dolorosos e/ou situações de estresse, foi administrada anestesia utilizando cloridrato de xilazina (10mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Após a contenção dos animais em decúbito ventral sobre maca cirúrgica, realizou-se a tricotomia da região dorsolombar e antisepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI), demarcação e incisão da área da ferida com *punch* de biopsia estéril de 10 mm com borda cortante, que se estende até a fáscia muscular. Os tratamentos foram aplicados imediatamente após o procedimento cirúrgico no volume de 0,5 mL, uma vez ao dia, com auxílio de seringas graduadas e hastes plásticas estéreis.

Tratamento das feridas

As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 14 dias. A cada nova reposição do tratamento, as lesões foram lavadas com solução fisiológica a 0,9% para remoção de crostas e resíduos do gel. A cada três dias, as lesões cutâneas foram observadas quanto à presença de hiperemia, edema, sangramento, exsudato e tipo de tecido formado. Após anestesia e contenção dos animais foi realizado debridamento das áreas lesionadas e assepsia com solução fisiológica a 0,9% e gazes estéreis, para que as áreas das feridas fossem registradas fotograficamente, nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 pós-cirúrgico. Após tratamento, os animais seguiram para recuperação em suas respectivas gaiolas, devidamente higienizadas.

Preparação do gel

O extrato foi diluído em água, e a este foi incorporado o creme de cristais líquidos aos poucos, através de homogeneização sincronizada, a fim de se obter as concentrações finais de 100, 200 e 400 mg/g. O creme de cristais líquidos é composto por três fases (Fase A), (Fase B) e (Fase C) conforme visto na Tabela 1. A solução do extrato diluído previamente em água é adicionada a Fase B. As fases A e B foram aquecidas separadamente, até 80 °C e, a fase B foi vertida na fase A, sob constante agitação, durante 7 minutos à 3.000 rpm. A solução foi resfriada a 50 °C e acrescentou-se a fase C. Continuou-se a agitação até a mistura esfriar.

Tabela 1: Composição do gel creme cristais líquidos

FASE A	
Nikkomulse 41® (Poligliceril-10 Pentastearate - Beenil Alcool e Estearoil Lactilato de sódio (SSL))	2,5 g
Esqualeno vegetal (Phytosqual®)	5 g
FASE B	
Propilenoglicol	2 g
Hidroxietilcelulose (Natrosol®)	2 g
Água Destilada	100 mL
FASE C	
Fenoxietanol / Metilparabeno/ Etilparabeno / Propilparabeno e Butilparabeno (Chemynol®)	0,4 g
Propilenoglicol	2 g

Percentual de contração da ferida (%C)

As feridas de cada animal foram fotografadas digitalmente a uma distância fixa de 40 cm no dias 0, 3, 7, 11 e 14 após a indução do ferimento. As fotografias foram transferidas para um computador e convertidas para um formato de arquivo *Joint Photographic Experts Group* (JPEG). Estas imagens foram processadas e utilizadas para medir a área da ferida utilizando o Software Image J 6.0. A área média das feridas foi expressa como uma porcentagem da área inicial (dia 0), utilizando a equação:

$$\%C = 100 * (Ad_0 - Ad_a) / Ad_0$$

Onde, Ad_0 = área da ferida no dia 0, e Ad_a = área da ferida no dia da análise.

Velocidade de fechamento de feridas cutâneas (VFf)

A velocidade de fechamento de feridas cutâneas foi calculada usando a equação:

$$VFf = \%C / DAC$$

Onde, DAC é o dia da análise da cicatrização da ferida e %C é o percentual de cicatrização da ferida. A VFf será expressa em cm^2 / dia .

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via e os testes de múltipla comparação de Newman-Keuls e Turkey, sendo os cálculos realizados a partir do *software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

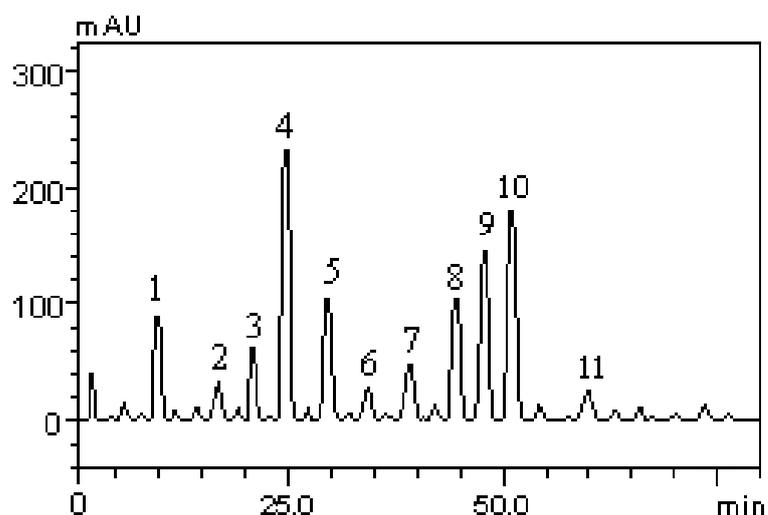
Análise da composição química por CLAE

A análise química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* revelou a presença dos seguintes composto na sua composição: ácido gálico (tR = 10,09 min; pico 1), catequina (tR = 16,32 min; pico 2), ácido clorogênico (tR = 21,17 min; pico 3), ácido caféico (tr = 24,93 min; pico 4), ácido elágico (tR = 29,86 min; pico 5), epicatequina (tR = 34,19 min; pico 6), a rutina (tR = 39,05 min; pico 7), isoquercitrina (tR = 44,89 min; pico 8), quercitrina (tR = 47,61 min; pico 9), a quercetina (tR = 51,07 min; pico 10) e o campferol (tR = 60,34 min; pico 11) (figura 1). A análise por CLAE revelou que há a presença de flavonóides, taninos e os ácidos fenólicos no extrato de *Ziziphus joazeiro* (tabela 2).

Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 14286x + 1395,8$ ($r = 0,9996$); catequina: $Y = 15097x + 1189,3$ ($r = 0,9997$); epicatequina: $Y = 13601x + 1194,5$ ($r = 0,9992$), ácido cafeico: $Y = 12758x + 1.259,7$ ($r = 0,9996$); ácido clorogênico: $Y = 13461x +$

1275,3 ($r = 0,9992$), ácido elágico: $Y = 13576x + 1346,4$ ($r = 0,9999$); rutina: $Y = 12,845 + 1305,7$ ($r = 0,9999$); quercetina: $Y = 13560x + 1192,6$ ($r = 0,9991$), isoquercitrina: $Y = 12873x + 1325,6$ ($r = 0,9998$); quercitrina: $Y = 11870x + 1329,8$ ($r = 0,9993$) e o campferol: $Y = 14253x + 1238,9$ ($r = 0,9997$). O limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LOQ) calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como $\sigma / 3,3$ e $10 / S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (Boligon et al., 2013).

Figura 1 – Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. realizado em cromatografia líquida de alta eficiência.



Detecção UV em 325 nm. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), isoquercitrina (pico 8), quercitrina (pico 9), quercetina (pico 10) e canferol (pico 11).

Tabela 2– Composição química do extrato de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Componentes	Ziziphus joazeiro		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/ml	µg/mL
Ácido gálico	13.67 ± 0.01 a	1.36	0.015	0.049
Catequina	5.28 ± 0.01 b	0.52	0.032	0.105
Ácido clorogênico	10.45 ± 0.03 c	1.04	0.009	0.029
Ácido caféico	29.61 ± 0.01 d	2.96	0.024	0.078
Ácido elágico	15.09 ± 0.02 a	1.50	0.013	0.042
Epicatequina	4.83 ± 0.01 b	0.48		
Rutina	9.72 ± 0.02 e	0.97	0.027	0.090
Isoquercitrina	15.24 ± 0.03 a	1.52	0.008	0.026
Quercitrina	19.38 ± 0.01 f	1.93	0.035	0.114
Quercetina	21.30 ± 0.02 g	2.13	0.019	0.063
Canferol	5.17 ± 0.03 b	0.51	0.026	0.085

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey para $p < 0,001$.

Os flavonóides encontrados no EHFZJ foram quercetina, isoquercetina, quercitrina, rutina e canferol. Os flavonóides possuem comprovada ação antioxidante (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; PERÉZ-TRUEBA, 2003; ROSA et al., 2010), além dessa atividade, compostos dessa classe química também apresentam atividade antialérgica; ação contra o desenvolvimento de tumores, anti- hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, ações antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2000) e ainda sugere-se através de estudos que eles agem inibindo a replicação do vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida, SIDA (LIN et al. 1997).

Os taninos catequina e epicatequina foram detectados no extrato de *ziziphus joazeiro*. Esse grupo de compostos pode ser encontrado em diversas partes do vegetal, como folhas, cascas, entrecascas, frutos e sementes. Apresentam em sua constituição os polifenóis e são classificados quimicamente em hidrolisáveis e condensados (PAES et al., 2006). Estudos sugerem, em relação aos taninos, uma expressiva ação antibacteriana (LOGERCIO et al., 2005). É relatada também a sua importância antiinflamatória, antiparazitária, cicatrizante e gastroprotetora (MELLO e SANTOS, 2001)

Dentre os ácidos fenólicos identificados no EHFZJ, o que se mostrou majoritário foi o ácido caféico. Vários estudos relatam a importante atividade pró e antioxidante do ácido gálico e caféico, ambos presentes no extrato (SOARES, 2002; BIANCHI e ANTUNES, 1999; RAMALHO e JORGE, 2006).

Dose letal média (DL₅₀)

O extrato hidroalcoólico da folhas de *Ziziphus joazeiro* apresentou baixa toxicidade nos ensaios realizados para obtenção da DL₅₀, quando administrado por via oral, de acordo com o protocolo estabelecido pela OECD 2008. Os animais tratados com o EHFZJ não apresentaram sintomas de toxicidade aguda, como mortes, estado de depressão, excitação, convulsão, salivação, piloereção e lacrimejamento.

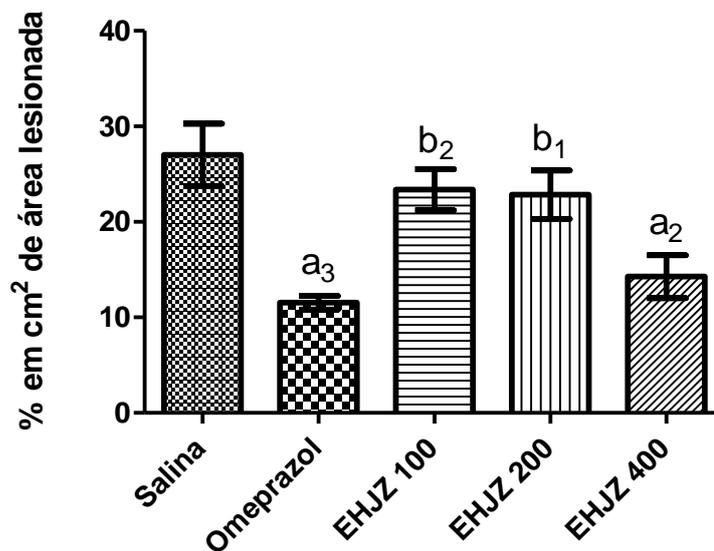
Substâncias administradas por via oral são classificadas de acordo com seu potencial tóxico como: que classifica os agentes tóxicos via oral como toxicidade extrema (DL₅₀ igual ou inferior a 25 mg/kg), toxicidade alta (DL₅₀ entre 100 e 500 mg/kg), toxicidade média (DL₅₀ entre 500 e 2000 mg/kg) e toxicidade baixa (DL₅₀ acima de 2000 mg/kg) (LARINI, 1997). Assim, optou-se por utilizar concentrações menores que 10% da DL₅₀ do EHFZJ para compor as doses utilizadas nos ensaios in vivo, foram elas: 100, 200 e 400 mg/kg, mantendo assim a segurança dos testes.

Lesão gástrica induzida por etanol

O modelo de indução de lesão por etanol absoluto (96%) produz lesões com necroses na mucosa gástrica devido à redução da secreção do bicarbonato e produção do muco, desencadeados pela redução do fluxo sanguíneo, isquemia, produção de radicais livres, liberação de endotelina, inibição da produção de prostaglandinas e desgranulação de mastócitos (MARHUENDA et al., 1993). No grupo que recebeu apenas solução salina, os estômagos apresentaram maior porcentagem de área lesionada devido à ação do etanol, com média de $27,01 \pm 3,26$. O grupo que recebeu omeprazol (30 mg/Kg), fármaco de referência, apresentou média $11,53 \pm 0,71$ com significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. Os grupos que receberam 100, 200 e 400 mg/kg de EHFZJ apresentaram respectivamente médias de $23,37 \pm 2,14$, $22,86 \pm 2,53$ e $14,27 \pm 2,26$. Apenas o grupo de EHFZJ com dose de 400

mg/kg apresentou significância, de $p < 0,01$ em relação ao grupo salina conforme pode ser observado na figura 2.

Figura 2 - Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.



Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.) Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

O uso de diversas plantas medicinais tem sido difundido na cultura popular para o tratamento de doenças gástricas, tendo, portanto enorme potencial para desenvolvimento de novos medicamentos nessa área. Alguns compostos presentes nesses fitoterápicos tiveram sua ação comprovada na prevenção às lesões gástricas, a exemplo dos fenóis, alcalóides, taninos, flavonóides e saponinas (RODRIGUES et al., 2012; ROMÃO et al., 2010; BORELLA et al., 2006; CARVALHO, 2006; FERRAZOLI, 2006)

O extrato de *Ziziphus Joazeiro* possui na sua composição química flavonóides, taninos e fenóis, que podem atuar no mecanismo de proteção da mucosa gástrica induzida por modelos experimentais. No teste de indução de lesão por etanol absoluto foi comprovada a ação gastroprotetora desse extrato na dose de 400 mg/kg, pois reduziu a porcentagem de área lesionada em 47,17%, redução semelhante estatisticamente à obtida pelo omeprazol (57,32%), medicamento de referência utilizado no teste.

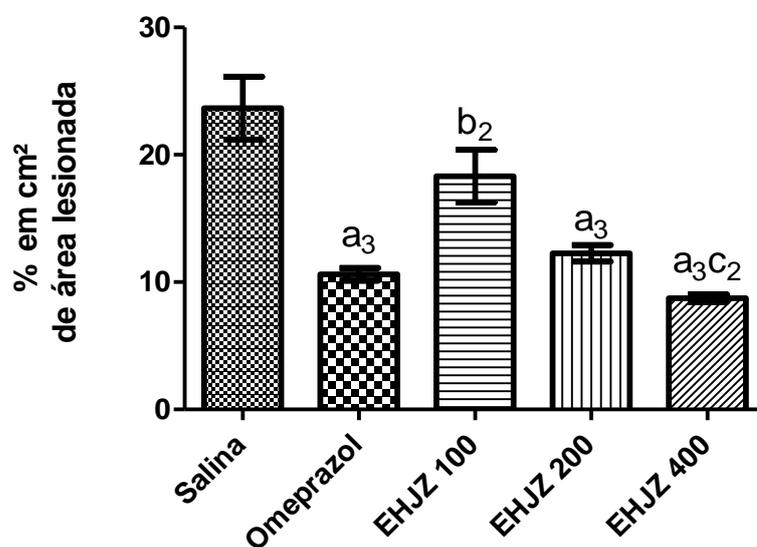
Lesão gástrica induzida por etanol acidificado

O modelo de indução de lesão por etanol acidificado tem a mesma via de ação apresentado pela indução por etanol. O etanol causa lesão na mucosa gástrica devido a diminuição do fluxo sanguíneo na mesma, que precede a estase sanguínea, o que facilita o desencadeamento de hemorragias e necrose tecidual (GUTH, 1984), e a adição de ácido clorídrico (HCl) apenas acelera e torna mais grave esse mecanismo (MIZUI e DOTEUCHI, 1983).

No grupo que recebeu apenas solução salina, os estômagos apresentaram maior porcentagem de área lesionada devido a ação do etanol acidificado, com média de $23,67 \pm 2,47$. O grupo de recebeu omeprazol (30 mg/kg), fármaco de referência, apresentou média $10,61 \pm 0,50$ com significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina. Os grupos que receberam 100, 200 e 400 mg/kg de EHFZJ apresentaram respectivamente médias de $18,32 \pm 2,07$, $12,26 \pm 0,65$ e $8,73 \pm 0,28$. Os grupo de EHFZJ com dose de 200 e 400 mg/kg apresentaram significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo salina conforme pode ser observado na figura 3.

No teste de indução de lesão por etanol acidificado foi comprovada a ação gastroprotetora do extrato nas doses de 200 e 400 mg/kg, pois reduziu a porcentagem de área lesionada em 48,20% e 63,11%, respectivamente, mostrando-se as doses de 200 e 400mg/kg efetivas na redução das lesões, com ação semelhante ou maior que a do omeprazol (55,17%), droga de escolha. Como a lesão por esse modelo está ligada a produção endógena de compostos peróxidos, que causam dano ao endotélio vascular, a ação gastroprotetora do EHFZJ pode estar associada a sua capacidade antioxidativa, e como já relatado, os seus compostos majoritários, ácido caféico e quecetina, apresentam atividade antioxidante.

Figura 3 - Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.



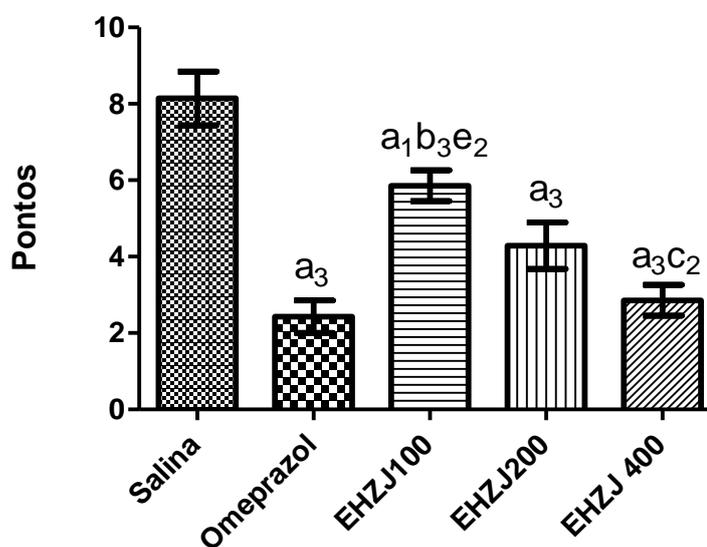
Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol_{acid.} (0,2 mL/animal v.o.) Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos à análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes. a₂ = p < 0,05 vs salina; b₁ = p < 0,01 vs dexametasona. Onde a corresponde ao grupo salina, b ao grupo omeprazol e c ao grupo EHFZJ 100. ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

Lesão gástrica induzida por indometacina

Os dados dos testes de indução de lesão gástrica por indometacina são expressos em valores de média ± erro padrão da média da pontuação registrada na análise, observados na Figura 4.

No grupo que recebeu apenas solução salina, os estômagos receberam maior pontuação devido à ação da indometacina, com média de $8,14 \pm 0,70$. O grupo que recebeu omeprazol (30 mg/kg), fármaco de referência, apresentou média $2,42 \pm 0,42$ com significância de p < 0,001 em relação ao grupo salina. Os grupos que receberam 100, 200 e 400 mg/kg de EHFZJ apresentaram respectivamente médias de $5,85 \pm 0,40$, $4,28 \pm 0,60$ e $2,85 \pm 0,40$. Todos os grupos testados apresentaram significância em relação ao grupo salina, a dose de 100mg/kg de EHFZJ com significância de p < 0,05 e os grupos de 200 e 400 mg/kg de EHFZJ com significância de p < 0,001, conforme Figura 4.

Figura 4 - Efeito da administração oral do EHFZJ sobre lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.



Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de indometacina (0,2 mL/animal s.c.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keuls como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes. a₂ = p < 0,05 vs salina; b₁ = p < 0,01 vs dexametasona. Onde a corresponde ao grupo salina, b ao grupo omeprazol e c ao grupo EHFZJ 100. ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

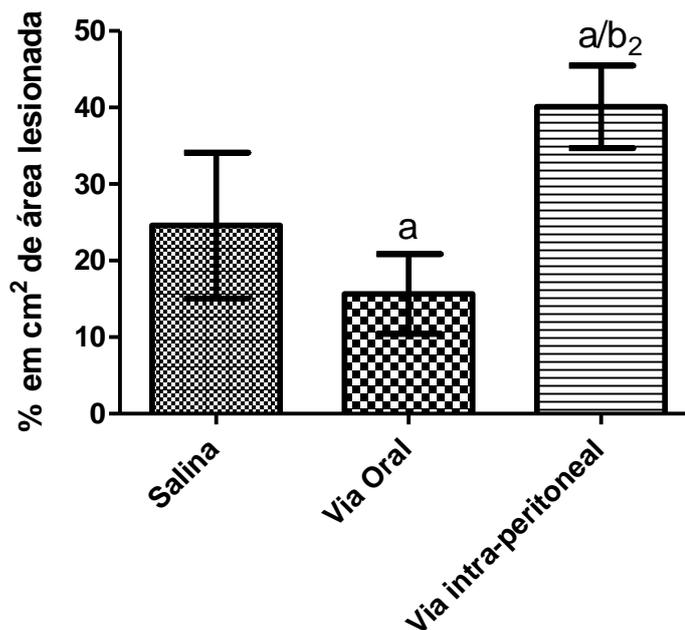
No modelo de indução de lesão por indometacina, bem como nos demais modelos testados, a dose de 400 mg/kg mostrou-se a mais efetiva em relação a proteção da mucosa gástrica. Segundo Monteiro et al. (2008), a indometacina é um AINE, e, por conseguinte está envolvido diretamente na toxicidade gástrica devido a sua ação de inibição das ciclooxigenases (COX) que desencadeia o bloqueio da síntese de prostaglandinas. Alguns dos principais mecanismos de defesa gástrica são mediados por essa síntese, como a produção de muco, aumento do fluxo sanguíneo, reparação do tecido e manutenção da imunidade da mucosa.

Teste de barreira física

O teste de barreira física permite evidenciar a possível contribuição mecânica promovida pelos compostos presentes no EHFZJ. No grupo que recebeu apenas salina, os estômagos apresentaram grande área de lesão devido à ação do etanol acidificado, com média de $24,58 \pm 3,88$. O grupo no qual o EHFZJ foi administrado por via oral

apresentou média de $15,64 \pm 5,21$, com significância de $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e $p < 0,01$ em relação ao grupo via oral, já o grupo que recebeu o EHFZJ por via intraperitoneal obteve média de $40,09 \pm 5,40$, com significância de $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. Conforme observado na figura 5.

Figura 5 - Gráfico do efeito do EHFZJ administrado via oral e via intraperitoneal no modelo de indução de lesão gástrica em camundongos.



Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (400 mg/kg v.o.) ou EHFZJ (400 mg/kg v.i.p.) foram administrados por via oral, 1 hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da administração de etanol_{acid.} (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keuls como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes. a2 = $p < 0,05$ vs salina; b1 = $p < 0,01$ vs dexametasona. Onde a corresponde ao grupo salina, b ao grupo omeprazol e c ao grupo EHFZJ 100. ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

O grupo que recebeu o EHFZJ via oral apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo salina, o que permite concluir que a contribuição para a barreira física é considerável. O grupo cuja administração do EHFZJ foi por via intraperitoneal demonstrou uma média na área das lesões maior que a observada no grupo salina, não havendo inibição. Segundo Rowland (1972) e Gibaldi e Perrier (1975), a administração intraperitoneal dá indícios de uma atividade sistêmica pelo fato do

medicamento atingir rapidamente a corrente sanguínea, evidenciando a pequena participação do EHFZJ nessa via.

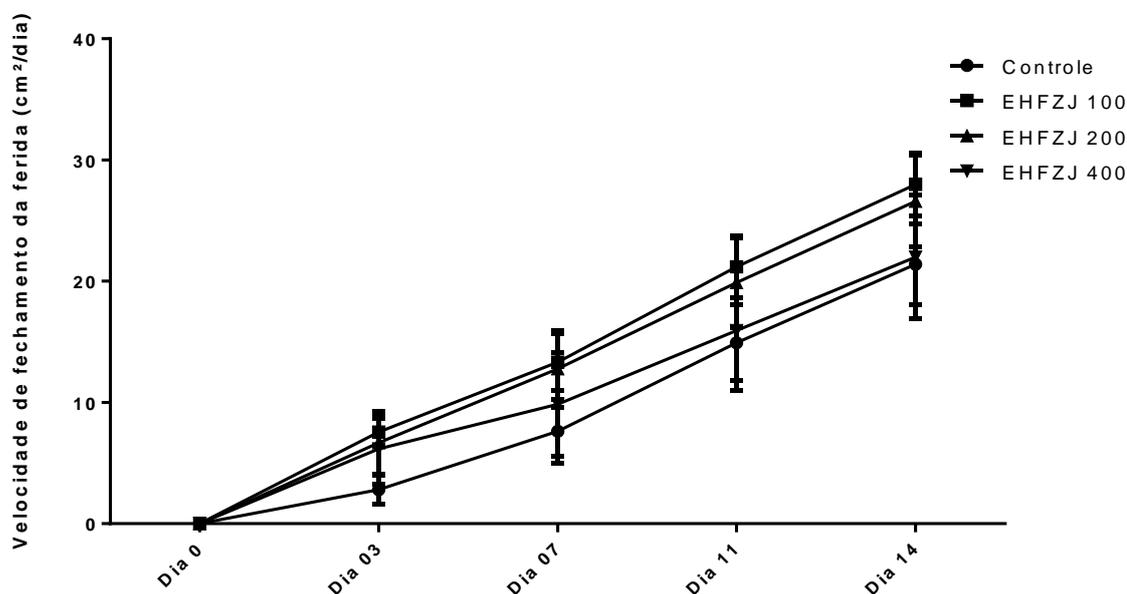
A efetividade do EHFZJ apenas pela via oral dá indícios de que o mecanismo de gastroproteção desse extrato se dá pela formação de uma camada de mucoproteínas na mucosa gástrica. Segundo John e Onabanjo (1990) essa ação deve-se a presença de taninos no extrato que se aderem à camada mucosa do estômago formando um precipitado de proteínas que originam uma película impermeável que evita a absorção de substâncias tóxicas. Esse precipitado mucoprotéico ainda se mostra resistente à proteólise de enzimas endógenas.

Atividade cicatrizante

A análise macroscópica das feridas cutâneas no dorso dos ratos tratados demonstrou evolução positiva do reparo tecidual. Hemorragias e secreção purulenta estiveram ausentes em todas as feridas nos diferentes tempos de observação (0, 3, 7, 11 e 14) e nos diferentes tratamentos (creme base, EHFZJ 100, 200 e 400 mg/g). No processo cicatricial foi evidenciada a presença de crostas e exsudato do terceiro dia de observação em diante, em todos os grupos de tratamento. A fase de epitelização foi observada no 11º dia de análise, e no 14º dia todos os ferimentos haviam evoluído para tecido de maturação com crescimento de pelos ao redor de todas as incisões cirúrgicas. As observações clínicas durante os tratamentos diários mostraram recuperação adequada, estado geral bom, presença de atividade física e ingestão adequada de ração e água em todos os animais testados.

O processo cicatricial ocorre como um processo biológico natural, que resulta no restabelecimento da hemestasia e recuperação do tecido danificado. Entretanto, alguns fatores podem retardar ou impedir essa reparação, tais como infecções e reação inflamatória exacerbada. Ações como limpeza adequada da ferida para retirar o acúmulo de sujidades e líquidos inflamatórios, remoção de tecidos mortos e uso de tratamento adequado com agentes tópicos podem acelerar o processo de cicatrização, diminuindo o risco de complicações (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003).

Figura 6: Velocidade de fechamento das feridas (cm²/dia) dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 após tratamento diário com creme de cristais líquidos, creme do EHFZJ 100 mg/g, creme do EHFZJ 200 mg/g e creme do EHFZJ 400 mg/g.



A Figura 6 ilustra a velocidade de fechamento das feridas em cm²/dia em função do tempo em dias, das lesões cutâneas no dorso dos ratos para os diferentes tratamentos (creme base, EHFZJ 100, 200 e 400 mg/g). Os dados mostram que a velocidade de fechamento é crescente em todos os dias de observação (0, 3, 7, 11 e 14) para todos os grupos. As lesões tratadas com o creme do EHFZJ nas concentrações de 100 e 200 mg/g tiveram uma velocidade de fechamento superior à das lesões tratadas com o creme base e o creme do EHFZJ na concentração de 400 mg/g, o que justifica o relato popular do seu uso para esta finalidade, porém a diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa, sugerindo que o seu uso não tem eficácia científica comprovada.

A comparação do percentual de contração das feridas mostrada na Tabela 3 corrobora com os dados da velocidade de fechamento das feridas (Figura 6), demonstrando evolução positiva para todos os grupos. Vale ressaltar que os padrões de contração foram semelhantes para todos os grupos, não havendo diferença estatística significativa entre eles, e, portanto, a utilização do extrato do *Ziziphus joazeiro* não interferiu significativamente no processo cicatricial natural (Figura 7).

Figura 7: Evolução da cicatrização das feridas no dorso dos ratos por grupo e dia de tratamento.

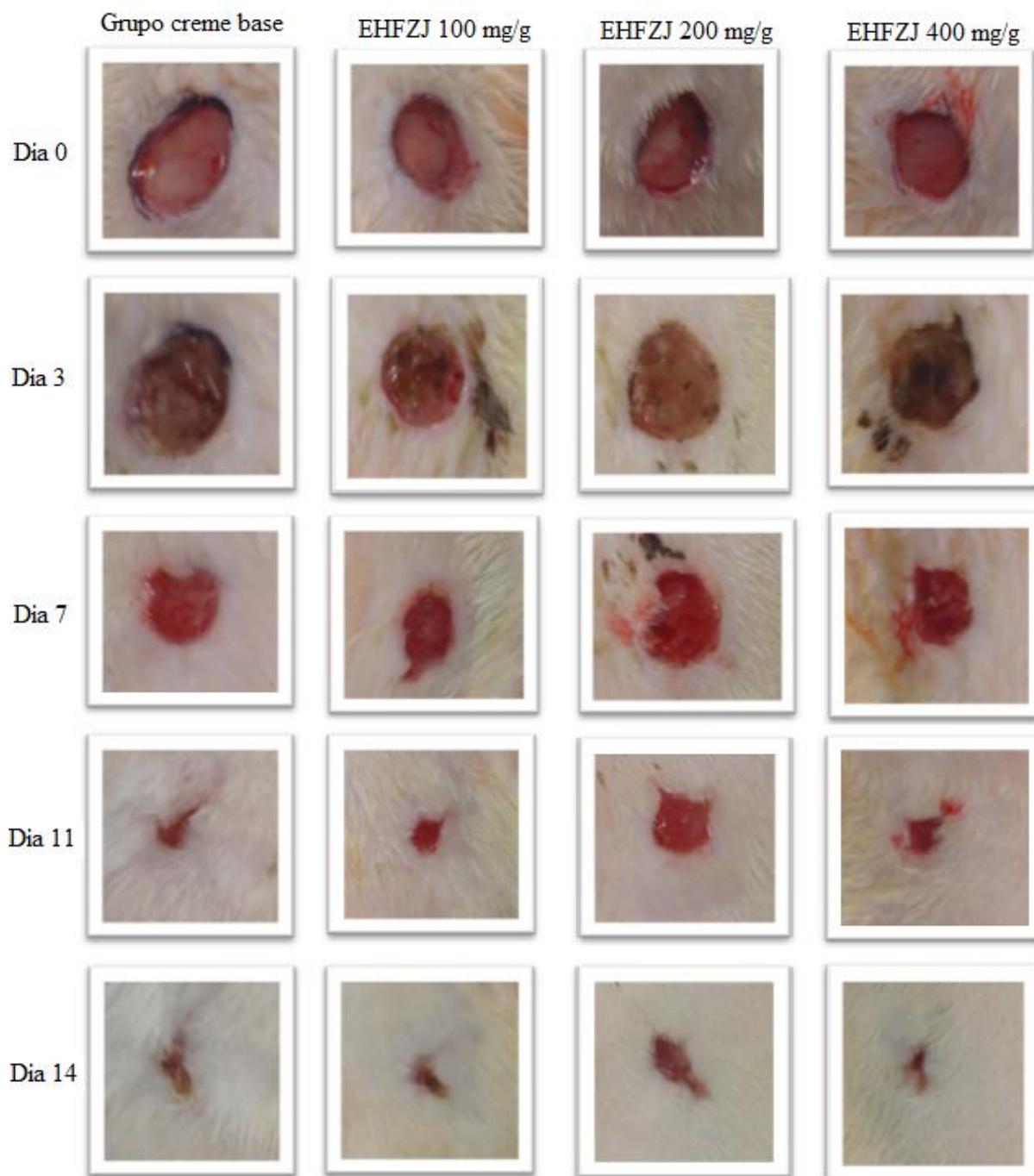


Tabela 3: Comparação do percentual de contração das feridas nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 após tratamento com creme base, creme do EHFZJ 100 mg/g, creme do EHFZJ 200 mg/g e creme do EHFZJ 400 mg/g.

Dia	Base	EHFZJ 100	EHFZJ 200	EHFZJ 400
0	0%	0%	0%	0%
3	8,39 ± 5,86	22,69 ± 1,44	20,04 ± 2,71	18,54 ± 3,45
7	33,74 ± 8,14	40,26 ± 1,77	42,68 ± 1,63	25,70 ± 2,61
11	80,40 ± 1,23	86,64 ± 1,06	78,16 ± 1,28	66,90 ± 1,45
14	90,50 ± 1,11	95,04 ± 1,02	93,87 ± 1,03	84,86 ± 1,08

Cada grupo apresenta média de cinco animais. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média, avaliados pela análise de variância (ANOVA), sendo os cálculos realizados a partir do *software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey para $p < 0,001$

Estudos demonstram que extratos de plantas que contém na sua composição altos teores de taninos apresentaram boa atividade cicatrizante devido à sua ação adstringente que desencadeia a precipitação das proteínas do tecido acometido, formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) na área lesada, isolando-a do meio ambiente (PANIZZA et al., 1988; NETO et al., 1996). É possível que fracionamentos de extratos de plantas, que excluam saponinas ou outras substâncias irritativas, forneçam bons indícios de atividade cicatrizante (ALVARENGA, 2008).

A baixa atividade cicatrizante do EHFZJ pode ser atribuída às pequenas quantidades de taninos e altos teores de saponinas identificadas no extrato estudado. A revisão da literatura médica nas bases de dados da Medline e Lilacs não identificou trabalhos experimentais que tenham avaliado o extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., nem outras espécies do mesmo gênero, no processo de cicatrização de feridas abertas no dorso de ratos.

CONCLUSÃO

Metabólitos secundários de origem fenólica e flavonoídica, bem como taninos foram identificados no extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O teste para determinação da DL₅₀ não demonstrou efeito tóxico do EHFZJ para os animais tratados oralmente até a dose de 5000 mg/kg, garantindo assim a segurança para a pesquisa das atividades propostas em modelos animais.

Analisando os dados dos três modelos usados como screening (etanol, etanol acidificado e indometacina), foi constatado que o EHFZJ possui atividade gastroprotetora, tendo sido a dose de 400mg/kg a mais efetiva entre as testadas. No teste de barreira física observou-se que apenas a via de administração oral é efetiva quando comparada a via intraperitoneal, o que permite concluir que o mecanismo de gastroproteção do EHFZJ se dá por via mecânica.

A análise macroscópica do processo de cicatrização permitiu concluir que o creme do EHFZJ em diferentes concentrações não interferiu no processo de cicatrização de feridas, não demonstrando diferença estatística quando comparada com o creme base (controle negativo).

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, L. F. Estudo da *Hovenia dulcis* na diabetes e na cicatrização de feridas em coelhos. 2008. 219f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

BEZERRA, J. A. F.; CAMPOS, A. C. L.; VASCONCELOS, P. D.; NICARETA, J.; RIBEIRO, E.; SEBASTIÃO, A. P. M.; URDIALES, A. I. A.; MOREIRA, M.; BORGES, A. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. Suppl 3, p. 16-25, 2006.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; DE BRUM, T. F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS, R. C. V.; DOS SANTOS ALVES, C. F. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 1-11, ISSN 0137-5881.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000. ISSN 0951-418X.

BURCY, L. M.; SILVA, L. da M. Farmacologia de produtos naturais. **Paraná**, 2011. Disponível em: <http://insightltda.com.br/images/dinamica/pdf_7fe1310c8e894324299fcfd3b8f760ef.pdf#page=23>.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003. ISSN 0009-6725.

CARVALHO, J. E. DE Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. 2006.

CARVALHO, P. E. R. C. Juazeiro-Ziziphus joazeiro. **Embrapa Florestas**, 2007.

FERRAZOLI, C. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DOS CAPÍTULOS DE *Eriocaulon ligulatum* VELL.(ERIOCAULACEAE)**. Universidade Estadual Paulista, 2008.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. Route of administration and drug disposition. **Drug Metabolism Reviews**, v. 3, n. 1, p. 185-199, 1975. ISSN 0360-2532.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L. D.; BARBOSA, M. D. V.; BOCAGE NETA, A.; FIGUEIREDO, M.; SAMPAIO, E.; GIULIETTI, A.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. Espécies endêmicas da caatinga. **Vegetação e flora da caatinga**, p. 103-115, 2002.

GUTH, P. H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterology**, v. 87, n. 5, p. 1083-1090, 1984. ISSN 0016-5085.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

HEALD, S.; SMITH, N.; MORI, S.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.; HEALD, S. Flowering plants of the neotropics. **Flowering Plants of the Neotropics**, 2004.

JOHN, T. A.; ONABANJO, A. Gastroprotective effects of an aqueous extract o *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 87-93, 1990. ISSN 0378-8741.

LARINI, L. Toxicologia. **Journal Articlén**.1605, 1987.

LIN, Y.-M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y.-H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H.; CHEN, F.-C. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of natural products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997. ISSN 0163-3864.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) *Skells*). **Ciência rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005. ISSN 0103-8478.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

MALONE, M. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: (Ed.). *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*: **Springer**, 1977. p.23-53. ISBN 3642666841.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.; ALARCON LASTRA, C. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 1, p. 13-16, 1993. ISSN 1099-1573.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese journal of pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 939-945, 1983. ISSN 0021-5198.
MONTEIRO, E. C. A.; DE FREITAS TRINDADE, J. M.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica, São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MONTEIRO, E. C. A.; DE FREITAS TRINDADE, J. M.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica, São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

NETO, J.J.; FRACASSO, J.F.; NEVES, M.C.L.C.; SANTOS, L.E.; BANUTH, V.L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* e/ou com *Stryphnodendron barbatiman* (vellozo) *martius*. **Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo**, v.17, p.181-186, 1996.

OLIVEIRA, S. T. D.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; MANFRON, M. P. Formulações de confrei (*Symphytum Officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, v. 7, n. 1, 2007. ISSN 0104-4257.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no Semi-Árido Brasileiro. **Cerne, Lavras**, v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA E SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) *Martius*: teor em Tannino na casca e sua propriedade cicatrizante; *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) *Martius*: Tannin content and cicatrissant properties of its bark. **Rev. ciênc. farm**, v. 10, p. 101-6, 1988. ISSN 0101-3793.

PÉREZ-TRUEBA, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 22, n. 1, p. 0-0, 2003. ISSN 0864-0300.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755, 2006. ISSN 0100-4042.

RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, Í. G.; ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 113-122, 2012. ISSN 0001-3765.

ROMÃO, M. O. D. C.; COSTA, A. M. D. D.; TERRA, F. D. S.; BORIOLLO, M. F. G.; SOARES, E. A. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá; Assessment of gastric protective of rasp juá extract. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 8, n. 3, 2010. ISSN 1679-1010.

ROSA, E. A. D.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M. D.; TANAKA, C.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. D. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010. ISSN 0102-695X.

ROWLAND, M. Influence of route of administration on drug availability. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 61, n. 1, p. 70-74, 1972. ISSN 1520-6017.

SILVA, L.; MATOS, V. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.–Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.–Rhamnaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 25-31, 1998.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes; Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. ISSN 1415-5273.

ZINKIEVICH, J. M.; GEORGE, S.; JHA, S.; NANDI, J.; LEVINE, R. A. Gastric acid is the key modulator in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulceration in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 7, p. 654-661, 2010. ISSN 1440-1681.

Conclusões



5 CONCLUSÕES

Foi possível determinar a presença de flavonóides, fenóis e taninos e saponinas no extrato hidroalcoólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., além de comprovar sua capacidade antioxidante pelo seqüestro do radical livre DPPH e FRAP, ainda que a mesma tenha se mostrado discreta quando comparada aos padrões de vitamina C.

O teste de microdiluição não demonstrou atividade antimicrobiana clinicamente relevante para o EHFZJ, entretanto, para a atividade modulatória da resistência bacteriana foi observada ação sinérgica do extrato em associação com amicacina e gentamicina frente à *Enterobacteriaceae* e em associação com a gentamicina frente à *S. aureus*. Porém, em relação à atividade antifúngica o EHFZJ não apresentou atividade clinicamente relevante frente às linhagens fúngicas testadas nem atividade modulatória em associação com os antifúngicos adotados.

O EHFZJ apresentou, durante os ensaios, potencial antiparasitário com base no efeito tóxico contra a forma promastigota de *L. braziliensis* e epimastigota de *T. cruzi*, além de demonstrar uma elevada citotoxicidade frente a fibroblastos.

O teste para determinação da DL₅₀ não demonstrou efeito tóxico do EHFZJ para os animais tratados oralmente com as doses administradas, garantindo assim a segurança para a pesquisa das atividades propostas em modelos animais.

Analisando os dados dos três modelos usados como screening (etanol, etanol acidificado e indometacina), foi constatado que o EHFZJ possui atividade gastroprotetora, tendo sido a dose de 400mg/kg a mais efetiva entre as testadas. No teste de barreira física observou-se que apenas a via de administração oral é efetiva quando comparada a via intraperitoneal, o que permite concluir que o mecanismo de gastroproteção do EHFZJ se dá pela aderência dos taninos do extrato à mucosa e conseqüente formação de uma camada mucoprotéica que impede a absorção de substâncias tóxicas e a ação de enzimas proteolíticas endógenas.

A análise macroscópica do processo de cicatrização permitiu concluir que o EHFZJ em diferentes concentrações não interferiu no processo de cicatrização de feridas, não demonstrando diferença estatística quando comparada com o creme base (controle negativo).

Referências



REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; VINAY KUMAR, M.; FAUSTO, N. ROBBINS & COTRAN – PATOLOGIA: BASES PATOLÓGICAS DAS DOENÇAS. **Elsevier Brazil**, 2005.

AGUIAR RODRIGUES, S. M. DE; DO ROSÁRIO GONÇALVES, E. D. G.; MELLO, D. M.; DE OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 407-411, 2001.

AKHAVAN, O.; GHADERI, E. *Escherichia coli* bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner. **Carbon**, v. 50, n. 5, p. 1853-1860, 2012. ISSN 0008-6223.

ALMEIDA, C. B. R. de; AMORIM, E. L. C. de. Estudo da atividade antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. e teste de toxicidade frente *Artemia salina* Leach. **I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**. UFPE, 2009. Disponível em: <[http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20\(E\)/conic/pibic/40/094031216SCPO.pdf](http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2009/anais%20(E)/conic/pibic/40/094031216SCPO.pdf)>.

ALVARENGA, L. F. Estudo da *Hovenia dulcis* na diabetes e na cicatrização de feridas em coelhos. 2008.

BARBOSA FILHO, J.; TRIGUEIRO, J.; CHERIYAN, U.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 152-153, 1985. ISSN 0163-3864.

BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004. ISSN 1415-790X.

BAVIA, M. E.; RIBEIRO, F. S.; MARTINS, M. D. S.; CARDIM, L. L.; SILVA, M. M. N.; CARNEIRO, D. D. M. T. Geotecnologias na identificação de fatores ambientais relacionados à ocorrência da leishmaniose visceral americana em Conde, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, 2011. ISSN 1519-9940.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. ISSN 0003-2697.

BEZERRA, J. A. F.; CAMPOS, A. C. L.; VASCONCELOS, P. D.; NICARETA, J.; RIBEIRO, E.; SEBASTIÃO, A. P. M.; URDIALES, A. I. A.; MOREIRA, M.; BORGES, A. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. Suppl 3, p. 16-25, 2006.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BLANES, L.; BAPTISTA-SILVA, J. Tratamento de feridas. **Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo**, 2004.

BOLIGON, A. A.; KUBIÇA, T. F.; MARIO, D. N.; DE BRUM, T. F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S. H.; SANTOS, R. C. V.; DOS SANTOS ALVES, C. F. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 1-11, ISSN 0137-5881.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A.; MENEZES JR, A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A.; VENEZIANI, R. C.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 557-561, 2006.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000. ISSN 0951-418X.

BRAGAGNOLO, N. Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol. CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2001. Embrapa Suínos e Aves Concórdia.

BRASIL. ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 14, de 5 de abril de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2010.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996. ISSN 0066-4804.

BURCY, L. M.; SILVA, L. da M. Farmacologia de produtos naturais. **Paraná**, 2011. Disponível em: <http://insightltda.com.br/images/dinamica/pdf_7fe1310c8e894324299fcfd3b8f760ef.pdf#page=23>.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.; MAIA, M. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002. ISSN 0102-695X.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003. ISSN 0009-6725.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003. ISSN 0009-6725.

CARVALHO, J. E. DE Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. 2006.

CARVALHO, P. E. R. C. Juazeiro-Ziziphus joazeiro. **Embrapa Florestas**, 2007.

CASAVECHIA, M.; ARAÚJO, S. D.; TEIXEIRA, J.; LONARDONI, M. A leishmaniose tegumentar sob a perspectiva do paciente: resultado de uma prática educativa; Cutaneous leishmaniasis under the patient's perspective: an educational practice result. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2002. ISSN 0370-369X.

CASTEJON, F. V. TANINOS E SAPONINAS. Disponível em: <http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_semi2011_Fernanda_Castejon_1c.pdf>. Goiânia, 2011.

CASTELO BRANCO NETO, M. L.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A. D.; CZECZKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. D. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos; Evaluation of hydroalcoholic extract of Aroeira (*Shinus Terebinthifolius* Raddi) in the healing process of wound skin in rats. **Acta cir. bras.**, v. 21, n. supl. 2, p. 17-22, 2006. ISSN 0102-8650.

CASTRO, T. C. D.; PELLICCIONE, V. L. B.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, R. O. D. A.; BOZZA, M. T.; VIANA, V. R. C.; ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L. Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 96-99, 2002. ISSN 0102-695X.

CAVALCANTE, A. L. F. D. A. PLANTAS MEDICINAIS E SAÚDE BUCAL: Estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa. Disponível em: <http://bdt.d.biblioteca.ufpb.br/tde_arquivos/27/TDE-2010-05-04T143659Z-475/Publico/arquivototal.pdf>.

CHAMSE, L. Fatores associados com a gastrite crônica em pacientes com presença ou ausência do *helicobacter pylori*. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.** 2012;25(2):96-100

COELHO, L. G. V.; MATTOS, A. A. D.; FRANCISCONI, C. F. D. M.; CASTRO, L. D. P.; ANDRÉ, S. B. Eficácia do regime terapêutico empregando a associação de pantoprazol, claritromicina e amoxicilina, durante uma semana, na erradicação do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera péptica. **Arquivos de gastroenterologia= Archives of gastroenterology. São Paulo. Vol. 41, n. 1 (jan./mar. 2004), p. 71-76**, 2004. ISSN 0004-2803.

COSTA, J. M. L.; VALE, K. C.; CECÍLIO, I. N.; OSAKI, N. K.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANÇA, F.; BARRETO, M. D. C.; MARSDEN, P. D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 77-82, 1987. ISSN 0037-8682.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008. ISSN 0102-695X.

CRUZ, M.; SANTOS, P.; BARBOSA JR, A.; DE MÉLO, D.; ALVIANO, C.; ANTONIOLLI, A.; ALVIANO, D.; TRINDADE, R. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007. ISSN 0378-8741.

DEALEY, C. Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras; The care of wounds: a guide for nurses. 1996.

DHARMANI, P.; SRIVASTAVA, V.; KISSOON-SINGH, V.; CHADEE, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 2, p. 123-135, 2008. ISSN 1662-8128.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf, 2006>.

FARIA, D.; DE BRITO, J. R. A.; REIS, D. G. D.; RABELLO, N. N.; RABELO, N. N. R.; SOARES, J. D.; TALLO, F. S.; LOPES, R. D.; RABELO, D. R. Doença de Chagas congênita com manifestações pleomórficas: relato de caso; Congenital Chagas disease in adolescent with pleomorphic manifestations: case report. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 11, n. 1, 2013. ISSN 1679-1010.

FERRAZOLI, C. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DOS CAPÍTULOS DE *Eriocaulon ligulatum* VELL.(ERIOCAULACEAE)**. Universidade Estadual Paulista, 2008.

FERREIRA, M. D. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOKKEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 170-174, 2008. ISSN 0378-8741.

FONSECA, F. C. S.; BRANCO, A. Obtenção de triterpenos pentacíclicos a partir do extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). Disponível em: <<http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-031FER918-220.pdf>>

FORZZA, R. C.; DE JANEIRO, J. B. D. R. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2001. ISSN 0095-1137.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. Route of administration and drug disposition. **Drug Metabolism Reviews**, v. 3, n. 1, p. 185-199, 1975. ISSN 0360-2532.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L. D.; BARBOSA, M. D. V.; BOCAGE NETA, A.; FIGUEIREDO, M.; SAMPAIO, E.; GIULIETTI, A.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. Espécies endêmicas da caatinga. **Vegetação e flora da caatinga**, p. 103-115, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003. ISSN 0037-8682.

GUNDIDZA, M.; SIBANDA, M. Antimicrobial activities of *Ziziphus abyssinica* and *Berchemia discolor*. **Central african journal of medicine**, v. 37, n. 3, p. 80-83, 1991. ISSN 0008-9176.

GUTH, P. H.; PAULSEN, G.; NAGATA, H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterology**, v. 87, n. 5, p. 1083-1090, 1984. ISSN 0016-5085.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

HEALD, S.; SMITH, N.; MORI, S.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.; HEALD, S. Flowering plants of the neotropics. **Flowering Plants of the Neotropics**, 2004.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W.-C. J.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996. ISSN 0022-2623.

JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/86538>>.

JOHN, T. A.; ONABANJO, A. Gastroprotective effects of an aqueous extract of *Entandrophragma utile* bark in experimental ethanol-induced peptic ulceration in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 87-93, 1990. ISSN 0378-8741.

JÚNIOR, F. E.; DE OLIVEIRA, D. R.; BENTO, E. B.; LEITE, L. H.; SOUZA, D. O.; SIEBRA, A. L. A.; SAMPAIO, R. S.; MARTINS, A. O.; RAMOS, A. G.; TINTINO, S. R. Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. ISSN 1741-427X.

KATO, E. T. M.; OHARA, M. T.; NISHITAMI, M. Estudo da atividade antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* martius; Evaluation of antimicrobial property of *Ziziphus joazeiro* martius. **Lecta-USF**, v. 16, n. 2, p. 75-84, 1998. ISSN 0104-0987.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008. ISSN 0016-5085.

LARINI, L. Toxicologia. 1ª Ed. **Masnole**. p. 301. São Paulo, 1987.

LARINI, L. Toxicologia. **Journal Articlén**.1605, 1987.

LE-SENNE, A.; MUELAS-SERRANO, S.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1101-1105, 2002. ISSN 0074-0276.

LIMA, J.; FURTADO, D.; PEREIRA, J.; BARACUNHY, J.; XAVIER, H. Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil. **Campina Grande**, 2006.

LIN, Y.-M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y.-H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H.; CHEN, F.-C. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of natural products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997. ISSN 0163-3864.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) *Skells*). **Ciência rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005. ISSN 0103-8478.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. ISSN 0100-4042.

MALDANER, G.; SANTA MARIA, R. **Estudo dos metabólitos secundários da *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**: Santa Maria 2005.

MALONE, M. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: (Ed.). *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*: **Springer**, 1977. p.23-53. ISBN 3642666841.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.; ALARCON LASTRA, C. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 1, p. 13-16, 1993. ISSN 1099-1573.

MARINHO, I.; FREITAS, M.; ZANELLA, F.; CALDAS, A.; CIACCHI, A.; FIGUEIRÊDO, A.; FERREIRA, L. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2002. Fórum de Pró-Reitores de Extensão das Universidades Públicas Brasileiras João Pessoa.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MATIAS, E. F.; SANTOS, F. A.; SILVA, J. M. F.; SOUZA, C. E.; TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M.; MEDEIROS, C. R.; BRAGA, M. F.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. Screening the in vitro modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 1902-1907, 2012. ISSN 1996-0808.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoterapia experimental. **Fortaleza**: ED – UFC, 1997.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MELO, M. D. S. F.; DA ROCHA, C. Q.; DOS SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, 2012. ISSN 1517-0276.

MENDONÇA, R. D. S. C.; RODRIGUES, G. B. D. O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos; Major dermatological changes in obese patients. **ABCD arq. bras. cir. dig**, v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011. ISSN 0102-6720.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese journal of pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 939-945, 1983. ISSN 0021-5198.
MONTEIRO, E. C. A.; DE FREITAS TRINDADE, J. M.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES). **Temas de Reumatologia Clínica, São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MONTEIRO, E. C. A.; DE FREITAS TRINDADE, J. M.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES). **Temas de Reumatologia Clínica, São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MOREIRA, T. F. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae). 2013.

MOTA, M. L. Atividade antimalárica de plantas medicinais da biorregião do Araripe-CE um modelo murino-*Plasmodium berghei*. **Dissertação de Mestrado. Brasil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba, Brasil**, 2009.

NACIONAL, M. D. I. **MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL – Programa de Sustentabilidade de Espaços Sub-regionais – PROMESO**. Disponível em: <http://www.integracao.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=55ad7cc0-c050-4a56-af51-52f638f47b08&groupId=10157>.

NETO, J.J.; FRACASSO, J.F.; NEVES, M.C.L.C.; SANTOS, L.E.; BANUTH, V.L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* e/ou com *Stryphnodendron barbatiman* (vellozo) *martius*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.17, p.181-186, 1996.

OLIVEIRA, A. K. D.; DIÓGENES, F. É. P.; COELHO, M. D. F. B.; MAIA, S. S. S. Allelopathy caused by fruit extract of juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.-Rhamnaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 1186-1189, 2009. ISSN 0102-3306.

OLIVEIRA, D. R.; BRITO-JUNIOR, F. E.; BENTO, E. B.; MATIAS, E. F.; SOUSA, A. C. A.; COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 12, p. 1265-1270, 2011. ISSN 1388-0209.

OLIVEIRA LIMA, I. DE; OLIVEIRA, R. D. A. G.; DE OLIVEIRA LIMA, E.; FARIAS, N. M. P.; DE SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

OLIVEIRA, R.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. L.; TRAJANO, V.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, S. T. D.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; MANFRON, M. P. Formulações de confrei (*Symphytum Officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, v. 7, n. 1, 2007. ISSN 0104-4257.

OSORIO, J.; MONTOYA, G.; ARANGO, G. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. **Vitae**, v. 13, n. 1, 2006.

PACKER, J. F.; LUZ, M. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 102-7, 2007.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; MARINHO, I. V.; LIMA, C. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no Semi-Árido Brasileiro. **Cerne, Lavras**, v. 12, n. 3, p. 232-238, 2006.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA E SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em Tannino na casca e sua propriedade cicatrizante; *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: Tannin content and cicatrisant properties of its bark. **Rev. ciênc. farm**, v. 10, p. 101-6, 1988. ISSN 0101-3793.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. D. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011. ISSN 1679-4974.

PEREIRA, A.; BACHION, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. **Rev bras enferm**, v. 58, n. 2, p. 208-13, 2005.

PÉREZ-TRUEBA, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 22, n. 1, p. 0-0, 2003. ISSN 0864-0300.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G.; ALVIM, A. D. C.; NASCIMENTO, F. R. F. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

TEGUMENTAR AMERICANA: uma revisão. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, 2013. ISSN 1516-7534.

RABELLO, S. B.; GODOY, C. V. C.; SANTOS, F. R. W. D. Presença de bactérias em instrumentais e superfícies do ambiente clínico odontológico; Presence of bacteria in instruments and surfaces of the clinic odontologic ambient. **Rev. bras. odontol**, v. 58, n. 3, p. 184-7, 2001.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755, 2006. ISSN 0100-4042.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, Í. G.; ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 113-122, 2012. ISSN 0001-3765.

ROLDOS, V.; NAKAYAMA, H.; ROLÓN, M.; MONTERO-TORRES, A.; TRUCCO, F.; TORRES, S.; VEGA, C.; MARRERO-PONCE, Y.; HEGUABURU, V.; YALUFF, G. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1797-1807, 2008. ISSN 0223-5234.

ROLÓN, M.; SECO, E. M.; VEGA, C.; NOGAL, J. J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 28, n. 2, p. 104-109, 2006. ISSN 0924-8579.

ROMÃO, M. O. D. C.; COSTA, A. M. D. D.; TERRA, F. D. S.; BORIOLLO, M. F. G.; SOARES, E. A. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá; Assessment of gastric protective of rasp juá extract. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 8, n. 3, 2010. ISSN 1679-1010.

ROSA, E. A. D.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M. D.; TANAKA, C.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. D. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010. ISSN 0102-695X.

ROSAS, L.; CORDEIRO, M.; CAMPOS, F.; NASCIMENTO, S.; JANUÁRIO, A.; FRANÇA, S.; NOMIZO, A.; TOLDO, M.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 40, n. 5, p. 663-670, 2007. ISSN 0100-879X.

ROWLAND, M. Influence of route of administration on drug availability. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 61, n. 1, p. 70-74, 1972. ISSN 1520-6017.

RUFINO, M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. D.; MORAIS, S. D.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, v. 127, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002. ISSN 1082-0132.

SANTOS, K. K.; MATIAS, E. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; TINTINO, S. R.; MORAIS-BRAGA, M. F.; GUEDES, G. M.; SANTOS, F. A.; A. SOUSA, A. C.; ROLÓN, M.; VEGA, C. Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of Momordica charantia. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 162-166, 2012. ISSN 1388-0209.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap. 27, p. 597-619.

SHAHAT, A. A.; PIETERS, L.; APERS, S.; NAZEIF, N. M.; ABDEL-AZIM, N. S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Chemical and biological investigations on Zizyphus spina-christi L. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 593-597, 2001. ISSN 1099-1573.

SILVA, J. G. D.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de Anacardium occidentale Linn. em amostras multiresistentes de Staphylococcus aureus. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 4, p. 572-7, 2007.

SILVA, L.; MATOS, V. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (Caesalpinia pyramidalis Tul.–Caesalpinaceae) e de juazeiro (Zizyphus joazeiro Mart.–Rhamnaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 25-31, 1998.

SILVA, T. C. D. L.; ALMEIDA, C. C. B. R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T.; AMORIN, E. L. C.; COSTA, E. P.; ARAÚJO, J. M. D. Atividades antioxidante e antimicrobiana de Zizyphus joazeiro mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011. ISSN 2179-443X.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; TERENCEZI, M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006. ISSN 0100-4042.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes; Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. ISSN 1415-5273.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. D. M.; DE LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; ROLIM NETO, P. J. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, 2007. ISSN 1980-8178.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. D. M.; BRANDÃO, M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPARG, S.; LIGHT, M.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 219-243, 2004. ISSN 0378-8741.

TONKAL, A.; SALEM, H.; JAMJOOM, M.; ALTAIEB, A.; AL-BAR, H. Preliminary Study on the Effect of *Ziziphus spina christi*. on Selected *Leishmania* spp. **J. of Al-Azhar Medical Faculty (Girls)**, v. 26, n. 1, 2005. ISSN 1110-2381.

TRIPATHI, M.; PANDEY, M.; JHA, R.; PANDEY, V.; TRIPATHI, P.; SINGH, J. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus jujuba*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 507-510, 2001. ISSN 0367-326X.

VEGA C.; ROLÓN M.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ A.R.; ESCARIO JÁ, GÓMEZ-BARRIO A. A new pharmacologica screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing Beta galactosidase. **Parasitol Res.** 95: 296-298. 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev bras farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008.

WAHIDA, B.; ABDERRAHMAN, B.; NABIL, C. Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus*(L.) extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 228-231, 2007. ISSN 0378-8741.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **The FASEB journal**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996. ISSN 0892-6638.

WANDSCHEER, A. C. D.; BORELLA, J.; BONATTI, L. C.; PASTORINI, L. H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis Thunb.*(Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L.(Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2011. ISSN 1677-941X.

ZINKIEVICH, J. M.; GEORGE, S.; JHA, S.; NANDI, J.; LEVINE, R. A. Gastric acid is the key modulator in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulceration in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 7, p. 654-661, 2010. ISSN 1440-1681.

ZUANAZZI, J. S. S. - **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.***Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, p.489-515.

Apêndices



Apêndice 1 – Tabelas dos resultados dos testes farmacológicos

Tabela – Efeito do EHFZJ e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg	% área lesionada	% de inibição
Salina		27,01 ± 3,26	
Omeprazol	30	11,53 ± 0,71	57,32
EHFZJ	100	23,37 ± 2,14	13,47
EHFZJ	200	22,86 ± 2,53	15,36
EHFZJ	400	14,27 ± 2,26	47,16

Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol 96% (0,2 mL/animal v.o.) Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

Tabela – Efeito do EHFZJ e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg	% área lesionada	% de inibição
Salina		23,67 ± 2,47	
Omeprazol	30	10,61 ± 0,50	55,17
EHFZJ	100	18,32 ± 2,07	22,6
EHFZJ	200	12,26 ± 0,65	48,2
EHFZJ	400	8,73 ± 0,28	63,11

Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de etanol_{acid.} (0,2 mL/animal v.o.) Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos à análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

Tabela – Efeito do EHFZJ e do omeprazol no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg	Pontuação
Salina		8,14 ± 0,70
Omeprazol	30	2,42 ± 0,42
EHFZJ	100	5,85 ± 0,40
EHFZJ	200	4,28 ± 0,60
EHFZJ	400	2,85 ± 0,40

Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (100, 200 e 400 mg/kg) ou omeprazol (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes da administração de indometacina (0,2 mL/animal s.c.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

Tabela – Efeito do EHFZJ administrado por via oral e intraperitoneal em modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos.

Grupo	Via de administração	Dose mg/kg	% de área lesionada	% de inibição
Salina	v.o.		24,58 ± 3,88	
EHFZJ	v.o.	400	15,64 ± 5,21	36,37
EHFZJ	v.i.	400	40,09 ± 5,40	

Os animais foram tratados com salina (0,9%, 10 mL/kg), EHFZJ (400 mg/kg v.o.) ou EHFZJ (400 mg/kg v.i.p.) foram administrados por via oral, 1 hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da administração de etanol_{acid.} (0,2 mL/animal v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do agente indutor de lesão, seus estômagos retirados e submetidos a análise no programa *Image J*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média para 6 animais / grupo pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Student Newman Keulsm como teste post hoc, com cálculos realizados a partir do *Software* estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

Apêndice 2 - Imagens digitalizadas de um estômago de cada grupo em cada modelo de indução de lesão gástrica em camundongos.

Imagem 1 - Digitalização dos estômagos por grupo no modelo de indução de lesão gástrica por etanol.



Omeprazol

Salina



EHFZJ 100 mg/kg

EHFZJ 200 mg/kg

EHFZJ 400 mg/kg

Imagem 2 - Digitalização dos estômagos do grupo salina e do EZFZJ nas administrações por via oral e via intraperitoneal.

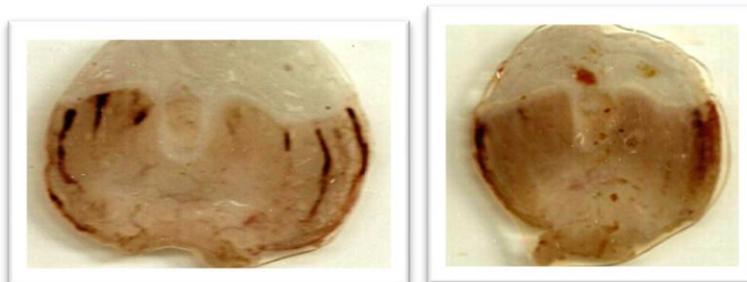


Salina

Via oral

Via intraperitoneal

Imagem 2 - Digitalização dos estômagos por grupo no modelo de indução de lesão gástrica por etanol acidificado.



Salina

Omeprazol

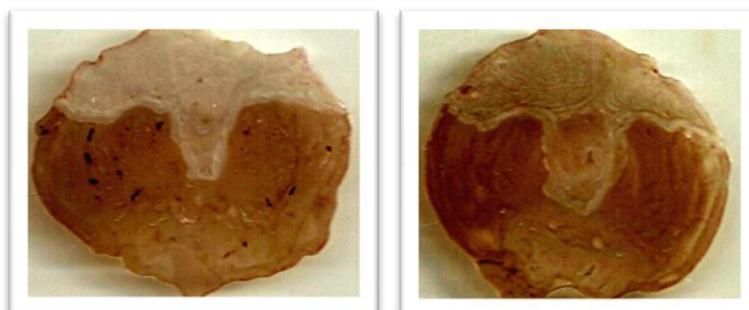


EHFZJ 100 mg/kg

EHFZJ 200 mg/kg

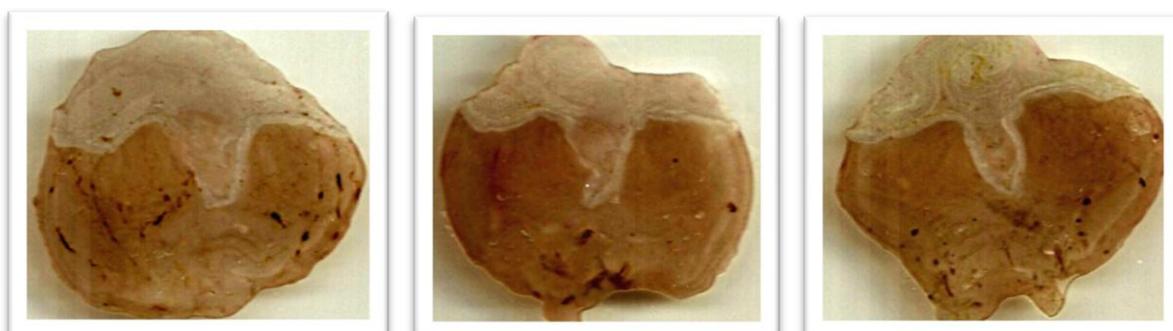
EHFZJ 400 mg/kg

Imagem 3 - Digitalização dos estômagos por grupo no modelo de indução de lesão gástrica por indometacina.



Salina

Omeprazol



EHFZJ 100 mg/kg

EHFZJ 200 mg/kg

EHFZJ 400 mg/kg