



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**  
**MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

**ANA LUIZA DE ALBUQUERQUE SIEBRA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E  
FARMACOLÓGICO *in vivo* E *in vitro* DE *Passiflora cincinnata* Mast.  
(Maracujá-do-Mato)**

CRATO-CE

2013

ANA LUIZA DE ALBUQUERQUE SIEBRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E  
FARMACOLÓGICO *in vivo* E *in vitro* DE *Passiflora cincinnata* Mast.  
(Maracujá-do-Mato)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marta Regina Kerntopf

Co-Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes

CRATO-CE

2013

**ANA LUIZA DE ALBUQUERQUE SIEBRA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E  
FARMACOLÓGICO *in vivo* E *in vitro* DE *Passiflora cincinnata* Mast.  
(Maracujá-do-Mato)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

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

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profª Drª Marta Regina Kerntopf** (Orientadora)  
Departamento de Química Biológica

---

**Profª Drª Andrelina Noronha Coelho de Souza** (Membro Externo)  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** (Membro Interno)  
Departamento de Química Biológica

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes** (Membro Interno)  
Departamento de Química Biológica

CRATO-CE

2013

*Dedico este trabalho, com todo o meu amor, aos  
meus pais, exemplos de força e simplicidade.*

## AGRADECIMENTOS

Neste momento de profunda emoção, agradecer é pouco. Tenho a necessidade de compartilhar tudo o que sinto. Portanto, em cada página escrita, tenham junto comigo, a sensação do dever cumprido, a alegria de vencer mais uma etapa da vida...

Agradeço a Deus, luz que ilumina os meus caminhos, minha força interior, a fé que não me deixa desistir.

À minha mãe, Lúcia de Fátima (*in memoriam*). A sua luta, fé, força, resignação e alegria são o meu maior incentivo, todos os dias de minha vida. Esta vitória é sua, porque sei que estás sempre comigo. Te amo.

Ao meu Querido pai, Assis Nascimento, o meu orgulho. Costumo dizer que poucos têm o privilégio de ter um pai como você; és o meu exemplo, quem está sempre ao meu lado, cuidando de mim, me enchendo de carinho. Homem como poucos, inteligente, sensível, alegre e simples! Amo você.

Aos meus irmãos, Maria Tereza e Antônio Tomaz. Somos frutos da mesma árvore, mas com sabores diferentes... nos amamos e principalmente, respeitamos as nossas diferenças. Estamos distantes fisicamente, mas em coração, estamos sempre unidos.

Ao meu grande amor, David de Carvalho Siebra. O meu melhor amigo, o meu marido. Você sabe todos os passos que dei nesta jornada. Nos conhecemos desde os tempos de faculdade, e o destino nos uniu para vencermos juntos. E esta vitória também é sua! Homem inteligente e bondoso, exemplo pra tudo! Obrigada por me fazer tão feliz...te amo!

À minha família, Albuquerque e Nascimento, por compreender tão bem a minha ausência. Tê-los longe de mim não é tarefa fácil... por isso, em alguns momentos deixei tudo de lado e fui “recarregar as baterias” perto de vocês!

À família Carvalho Siebra, especialmente aos meus sogros, Sr. Marconi e D. Socorro, e Chiquinha, sempre atentos e carinhosos, torcendo para que tudo desse certo! Ao Arthurzinho, pela ajuda, incentivo e empréstimos literários. Ao Isaac Siebra, companheiro de todas as horas.

À minha amiga Silvana Lucena (Silvaninha), que está comigo diariamente há 5 anos, com quem divido alegrias e tristezas. Você é exemplo de generosidade e mora no meu coração. Entendeu a minha ausência, e se tornou amiga das minhas novas amigas.

À dona Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins. As dificuldades do mestrado nos uniram. E deste encontro surgiu mais que uma dupla de trabalho; somos grandes amigas, parceiras. Vivemos tudo muito intensamente, e esta bagagem é só nossa. Tenho a alegria de conviver com você e com o meu professor André Luiz, que me dá todos os dias, logo cedo, a injeção de energia necessária para o resto do dia. Obrigada por tudo!

À querida Larissa Rolim. O que seria de nós sem a *Passiflora cincinnata*? Unidas pelo trabalho, inseparáveis por afinidade. Nossa batalha é árdua, mas recompensadora. Temos histórias pra contar por toda a vida!

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Regina Kerntopf. Jamais esquecerei o seu “sim”. Afinal, ele é o princípio de todo este trabalho. Receber a confiança de quem não nos conhece é um presente! Além disso, tive o prazer de conhecer uma mulher forte, competente, inteligente e de muita personalidade, mas que, quando necessário, exerce o doce papel de mulher, mãe e amiga. Obrigada por acreditar junto comigo neste sonho!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, pelos ensinamentos transmitidos, pela ajuda inestimável.

À família LFQM: Barbosa Neto, Cinara, Luiz Jardelino, Andreza, Renata, Valter, Kelly, Rodolpho, Sharlene, Demontier, Mariana, Heloísa e Norma. A Damiana, pela ajuda e especialmente por sua fé e delicadas palavras. A Daniele, por sua descontração e incentivo.

Aos amigos que me ajudaram antes, durante e após os experimentos; em especial a Gerlânia, Laura, Luís Pereira, Thales, Denício e Datiane. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos e colegas da minha turma de mestrado. Obrigada pela agradável convivência e dedicação na conquista do curso. Torço pelo sucesso de todos! Aos amigos Diógenes, Mário e Patrícia Figueiredo, pelas conversas e trocas de experiências.

As coordenadoras do Programa de Pós-Graduação, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Almeida e Dr<sup>a</sup> Maria Arlene Pessoa, pelos auxílios prestados no decorrer do curso. Aos professores do Mestrado, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Galberto Martins da Costa e ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, pelo apoio na elaboração dos extratos e elucidação fitoquímica.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Molecular, pelo auxílio nos ensaios microbiológicos, em especial a Flaviana, Rose e Saulo.

Ao Laboratório de Botânica e Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima pela identificação da espécie, catalogação da exsicata e atenção recebida.

Às secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira, pela assistência e dedicação ao Programa de Pós-Graduação.

À Universidade Regional do Cariri pela oportunidade de realização deste curso.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, pelo apoio na realização dos experimentos. Ao Prof. Dr. Cláudio Gleidiston Lima da Silva, pelo apoio e compreensão e aos amigos de trabalho pela torcida.

À Universidade de Santa Maria pela colaboração nos experimentos químicos. À Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte pelo fornecimento de animais de laboratório.

Aos meus alunos, por me incentivarem nesta caminhada. Em especial a Emanuel Tavares Leite Alencar.

À todos que fazem a família Privilège/Xoperia, em especial a Juliano, D. Jane e David Barreto.

À banca de Defesa, pelas considerações, elogios e críticas a este trabalho, e por aceitar o convite de participação.

À CAPES, FUNCAP E CNPQ pelo auxílio financeiro.

*Crê em ti mesmo; age e verá os resultados.  
Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.*

*Chico Xavier*



## RESUMO

*Passiflora cincinnata* Mast., conhecida popularmente como maracujá-do-mato, é descrita como uma espécie nativa da caatinga, utilizada com fins nutricionais, medicinais e ornamentais. Na medicina popular, tem sido empregada no tratamento de doenças venéreas, hemorroidas, inflamações, insônias, tosses, gripes e hipertensão, além de ser indicada como sedativa e calmante. Este trabalho teve como objetivo determinar a composição fitoquímica, a atividade antioxidante, os possíveis efeitos tóxicos e a atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC). Investigamos ainda, o potencial antimicrobiano e modulador de antibióticos dos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata*. A prospecção fitoquímica qualificou os metabólitos secundários: taninos condensados, flobacênicos, flavonas, flavononóis, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcaloides. O EHFPC mostrou presença de fenóis totais, com maior representatividade para os flavonoides, além de atividade antioxidante. A CLAE identificou a quercetina, dentre outros, como sendo o componente majoritário do EHFPC. O extrato não apresentou características de toxicidade nem houveram óbitos durante os experimentos. No teste com etanol absoluto, demonstrou melhor resultado na dose de 50 mg/kg, quando comparado ao omeprazol (percentual de inibição de 65,11% vs 45,12%). Em modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado e indometacina, o EHFPC mostrou melhor resultado na dose de 100 mg/kg, quando comparados ao omeprazol (percentual de inibição de 57,40% e 38,58% EHFPC vs 34,78% e 51,17% omeprazol). O teste de barreira física evidenciou a atividade sistêmica do extrato. A atividade cicatrizante foi avaliada através da mensuração da velocidade de fechamento das feridas (Vff) e do percentual de contração (%C) das mesmas. A Vff mostrou-se maior no grupo tratado com EHFPC, quando comparado aos grupos controles. O %C foi maior no grupo tratado com EHFPC, com 99,54%. Os testes de Concentração Inibitória Mínima foram realizados pelo método da diluição em caldo e as linhagens testadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11105 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. A atividade moduladora de antibióticos foi verificada frente às cepas clinicamente isoladas de *S. aureus* 03, *E. coli* 08 e *P. aeruginosa* 04, em concentração sub-inibitória. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica, sendo a CIM sempre maior ou igual a 1024µg/mL. A cepa de *S. aureus* 03 apresentou 13 eventos modulatórios, enquanto a cepa de *E. coli* 08 apresentou apenas 04 eventos. Dentre estes, 14 foram atividade sinérgica potencializando o efeito dos antibióticos e apenas 03 eventos apresentaram atividade antagônica à ampicilina. Polpa e epicarpo apresentaram resposta frente ao aminoglicosídeo amicacina, resultando em sinergismo, e o extrato do epicarpo alterou o fenótipo de *P. aeruginosa* de resistente para sensível. O extrato da polpa também potencializou o efeito dos betalactâmicos benzilpenicilina potássica e oxacilina. Hastes, sementes e folhas não expressaram atividades modulatórias. Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências biológicas em relação ao potencial antioxidante, efeito gastroprotetor, cicatrizante e antimicrobiano dos extratos de *Passiflora cincinnata* Mast.

Palavras-chave: *Passiflora cincinnata*, perfil químico, atividade antioxidante, gastroproteção, atividade cicatrizante, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Passiflora cincinnata* Mast., popularly known as maracujá-do-mato, is described as a native species of the caatinga, used for nutritional purposes, medicinal and ornamental. In folk medicine, have been employed in the treatment of venereal diseases, hemorrhoids, inflammation, insomnia, coughs, colds and hypertension, and is indicated as a sedative and calming. This study aimed to determine the phytochemical composition, antioxidant activity, the possible toxic effects and healing and gastroprotective activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Passiflora cincinnata* Mast. (HELPC). Also investigated the potential modulator of antibiotics and antimicrobial hydroalcoholic extracts of leaves, stems, epicarp and seeds pulp of *Passiflora cincinnata*. The prospecting phytochemical qualify secondary metabolites: tannins, flobabenic, flavones, flavononois, flavonols, xanthones, chalcones, aurons, flavanones, leucoantocianidin, catechins and alkaloids. The HELPC showed the presence of total phenols, with greater representation for flavonoids, and antioxidant activity. HPLC identified quercetin, among others, as being the major component of HELPC. The extract did not show toxicity characteristic there were no deaths during the experiments. In the test with absolute ethanol showed the best result at a dose of 50 mg/kg, when compared to omeprazole (inhibition percentage of 65.11% vs. 45.12%). In a model of gastric lesions induced by acidified ethanol and indomethacin, HELPC showed the best result at a dose of 100 mg/kg compared to omeprazole (inhibition percentage of 57.40% and 38.58% vs. 34.78% and HELPC 51.17% omeprazole). The test showed physical barrier to systemic activity of the extract. The healing activity was assessed by measuring the rate of wound closure (VWc) and the percentage of contraction (%C) of the same. The VWc was higher in the group treated with HELPC when compared to control groups. The %C was higher in the group treated with HELPC, with 99.54%. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests were performed by the broth dilution method and the lineages tested were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 11105 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The modulatory activity of antibiotics was checked against the strains of clinically isolated *S. aureus* 03, *E. coli* 08 and *P. aeruginosa* 04, in subinhibitory concentration. The extracts showed no antimicrobial activity of clinical relevance, and the MIC always greater than or equal to 1024µg/mL. The strain of *S. aureus* 03 showed 13 modulatory events, while the strain of *E. coli* 08 showed only 04 events. Of these, 14 were synergistic activity potentiating effect of antibiotics and only 03 events showed antagonistic activity to ampicillin. Pulp and epicarp showed response against aminoglycoside amikacin, resulting in synergism, and epicarp extract altered the phenotype of *P. aeruginosa* resistant to sensitive. The pulp extract also potentiated the effect of beta-lactam oxacillin and benzylpenicillin potassium. Stems, seeds and leaves no expressed modulatory activities. The results of this study provide biological evidence regarding the potential antioxidant, gastroprotective effect, healing and antimicrobial extracts of *Passiflora cincinnata* Mast.

Keywords: *Passiflora cincinnata*, chemical profile, antioxidant activity, gastroprotection, healing activity, antimicrobial activity.

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APRESENTAÇÃO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Perspectiva histórica sobre o uso de plantas medicinais	25
1.2 Considerações botânicas sobre <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. Passifloraceae	27
1.2.1 Família Passifloraceae	27
1.2.2 <i>Passiflora cincinnata</i> Masters in Gardner, Chron.	28
1.3 Etnofarmacologia da espécie <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	30
1.4 Importância econômica do maracujá	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material botânico	38
3.2 Ensaio <i>in vitro</i>	39
3.2.1 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	39
3.2.1.1 Prospecção fitoquímica	40
3.2.1.2 Análise cromatográfica	41
3.2.1.3 Teor de fenóis totais	41
3.2.1.4 Teor de flavonoides totais	41
3.2.2 Potencial antioxidante	42
3.2.2.1 Captura do radical livre DPPH	42
3.2.2.2 Método de redução de ferro	42
3.2.3 Formulação do gel de EHFPC (100 mg/g) a 10%, para uso tópico na atividade cicatrizante	42
3.2.3.1 Gel de Natrosol	42
3.2.3.2 Gel de EHFPC a 10% (100 mg/g)	43
3.2.4 Atividade antimicrobiana	43
3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
3.3.1 Animais e aspectos éticos da pesquisa	45

3.3.2 Avaliação da toxicidade aguda e determinação da dose letal média (DL <sub>50</sub> )	45
3.3.3 Atividade gastroprotetora	47
3.3.3.1 Avaliação farmacológica	47
3.3.3.2 Lesão gástrica induzida por etanol absoluto (ROBERT <i>et al.</i> , 1979 <i>apud</i> LAPA, 2008)	47
3.3.3.3 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (MIZUI, 1987 <i>apud</i> LAPA, 2008)	47
3.3.3.4 Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969 <i>apud</i> LAPA, 2008)	48
3.3.3.5 Teste de barreira física	48
3.3.4 Atividade cicatrizante	49
3.3.4.1 Animais	49
3.3.4.2 Delineamento experimental	49
3.3.4.3 Procedimento cirúrgico	49
3.3.4.4 Tratamento das feridas	50
3.3.4.5 Percentual de contração da ferida	50
3.3.4.6 Velocidade de fechamento de feridas cutâneas (Vff)	51
3.4 Expressão dos dados e análise estatística	51
3.5 Instituições parceiras e financeiras	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
CAPÍTULO 1: Avaliação da toxicidade, atividade antiulcerogênica e antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	54
CAPÍTULO 2: CLAE e avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	77
CAPÍTULO 3: Atividade antimicrobiana e caracterização fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	104
CAPÍTULO 4: Potenciação da atividade antibiótica por <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	123
5. CONCLUSÕES	146
REFERÊNCIAS	149
ANEXOS	155
Anexo A: Cópia do documento de autorização para coleta da espécie vegetal, emitida pelo SIBIO.	155
Anexo B: Cópia do documento de identificação da espécie, emitido pelo Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri.	156

Anexo C: Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais, autorizando a execução do projeto de Mestrado. 157

PRODUÇÃO CIENTÍFICA 159

Artigo Publicado	159
Artigos Submetidos em Revistas Científicas	159
Resumos publicados em Anais de Congressos	160
Participações em eventos científicos	161
Mini-cursos / Palestras ministradas	162
Disciplinas cursadas	162

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1** Flor da *Passiflora cincinnata* Mast. 30
- Figura 2** Fruto de *Passiflora cincinnata* Mast. 31

### MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 3** Autorização para atividades com finalidade científica – SISBIO. 38
- Figura 4** Localização geográfica do Sítio Barreiro Grande, município de Crato-CE. 39
- Figura 5** Exsicata da espécie depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o número 8097. 40

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. 63
- Figura 2** Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos. 64
- Figura 3** Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos. 66
- Figura 4** Efeito do teste de barreira, ao avaliar a administração intraperitoneal em relação a oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos. 67

## CAPÍTULO 2

- Figura 1** Cromatografia líquida de alta eficiência do perfil de fenóis totais e flavonoides do extrato hidroalcoólico de *Passiflora cincinnata* Mast. 99
- Figura 2** Efeitos do gel de EHFPC 10%, Gel de Natrosol e Gel de Dexametasona 10% no processo de cicatrização nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós cirúrgico. 100
- Figura 2 (cont.)** Efeitos do gel de EHFPC 10%, Gel de Natrosol e Gel de Dexametasona 10% no processo de cicatrização nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós cirúrgico. 101
- Figura 3** Velocidade fechamento das feridas ( $\text{cm}^2/\text{dia}$ ) dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 após tratamento diário com gel de natrosol, gel do EHFPC 10% e gel de dexametasona 10%. 102

## CAPÍTULO 4

- Figura 1** Comparação do número de eventos moduladores dos extratos de *P. cincinnata* quando em associação a aminoglicosídeos e betalactâmicos, frente às cepas de *S. aureus* 03 e *E. coli* 08. 137

## ÍNDICE DE TABELAS

### *MATERIAIS E MÉTODOS*

**Tabela 1:** Origem das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos. 44

**Tabela 2:** Determinação de área lesionada através do sistema de scores. 48

### *CAPÍTULO 1*

**Tabela 1** Determinação da área lesionada através do sistema de scores. 59

**Tabela 2** Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição. 63

**Tabela 3** Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição. 64

**Tabela 4** Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição. 66

**Tabela 5** Efeito do teste de barreira física, ao avaliar administração intraperitoneal em relação a oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado, expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição. 67

### *CAPÍTULO 2*

**Tabela 1** Flavonoides e ácidos fenólicos determinados por CLAE no extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. 97



<b>Tabela 2</b>	Comparação do percentual de contração das feridas nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 após tratamento com gel de natrosol, gel do EHFPC 10% e gel de dexametasona 10%.	98
-----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1</b>	Atividade moduladora dos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.	120
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 2</b>	Classes de metabólitos secundários identificados nos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	121
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1</b>	Origem das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.	135
-----------------	----------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 2</b>	Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.	135
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 3</b>	Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das sementes de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.	135
-----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 4</b>	Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das hastes de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.	136
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 5</b>	Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico do epicarpo de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.	136
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Tabela 6</b>	Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico da polpa de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos	136
<b>Tabela 7</b>	Estudo comparativo da atividade de fármacos antimicrobianos das classes farmacológicas dos aminoglicosídeos e betalactâmicos quando em associação aos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de <i>P. cincinnata</i> , sobre seus efeitos sinérgicos e antagônicos.	138

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- abs – Absoluto
- AINE's – Antiinflamatórios não-esteróides
- ANOVA – Análise de variância
- APA – Área de Proteção do Araripe
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – *Brain Heart Infusion*
- CEUA – Comissão de ética no uso de animais
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CIM/8 – Concentração subinibitória
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COASF – Coordenadoria de Assistência Farmacêutica
- DAD – detector espectrofotométrico com arranjo de diodos
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DP – Desvio padrão
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- DSM – Diferença significativa mínima
- EPM – Erro padrão da média
- EAG– Equivalente de ácido gálico
- EHFPC – Extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.
- EHHPC – Extrato hidroalcoólico das hastes de *Passiflora cincinnata* Mast.
- EHEPC – Extrato hidroalcoólico do epicarpo de *Passiflora cincinnata* Mast.
- EHSPC – Extrato hidroalcoólico das sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.
- EHPPC – Extrato hidroalcoólico da polpa de *Passiflora cincinnata* Mast.
- EQ – Equivalente de quercetina
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FLONA – Floresta Nacional do Araripe
- FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

H<sup>+</sup> – Íon hidrogênio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HCDAL – Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima  
HCl–Ácido clorídrico  
HIA – *Heart Infusion Agar*  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
M – Concentração molar  
MS – Ministério da Saúde  
n – Número de amostras  
NCCLS – *National Comitee for Clinical Laboratory Standards*  
NUFITO – Núcleo de Fitoterápicos  
ON – Óxido nítrico  
ONS – Óxido nítrico sintetase  
OH– Hidroxila  
p – Nível de significância  
PG's – Prostaglandinas  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PNPMF - Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos  
REPLAME - Relação Estadual de Plantas Mediciniais  
PVPI - Polivinilpirrolidona-iodo  
TGI – Trato gastrointestinal  
tR – Tempo de retenção  
UFC – Unidade formadora de colônia  
v.o. – Via oral  
v.ip. – Via intraperitoneal  
µg – Micrograma  
µL – Microlitros  
●OH – radical hidroxil  
O<sub>2</sub>-● – ânion superóxido

# *Apresentação*

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar a composição química da espécie *Passiflora cincinnata* Mast e, paralelamente, a investigar suas possíveis atividades biológicas, utilizando como ferramentas ensaios *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de avaliar as atividades gastroprotetora, cicatrizante, antioxidante e uma possível toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. cincinnata*. Além disso, propõe-se a investigar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas, epicarpo, hastes, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.

Diante dos objetivos propostos, os resultados e discussão desta dissertação foram organizados em quatro capítulos. A disposição dos experimentos se deu de forma a agrupar os dados no formato de artigos originais, seguindo as normas de formatação propostas pelo corpo editorial de revistas científicas selecionadas de acordo com a área de concentração dos trabalhos.

O capítulo 1 descreve os ensaios de avaliação da toxicidade aguda e determinação da  $DL_{50}$ , através da administração, por via oral, de dose única do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC) e avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos e hematológicos dos animais, comparando-os com o grupo controle tratado com solução salina a 0,9%, seguindo o protocolo experimental proposto pela OECD 2008. Através de ensaios *in vitro*, por espectrofotometria, determinou-se a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e o teor de fenóis totais e flavonoides. A investigação da atividade gastroprotetora ocorreu por ensaios *in vivo*, através dos modelos clássicos de indução de úlceras por administração oral de etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina a camundongos. O EHFPC foi administrado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Como justificativa para a atividade sistêmica do EHFPC, o teste de barreira física foi realizado, com a administração por via oral e intraperitoneal da concentração de 50 mg/kg do EHFPC, e avaliando-se as atividades em modelos de lesão gástrica induzidos por etanol acidificado.

O capítulo 2 apresenta a análise através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do EHFPC, em relação à composição de compostos fenólicos e flavonoídicos. A descrição da composição do EHFPC direcionou a nossa investigação para a avaliação de uma possível atividade cicatrizante, em que lesões cutâneas produzidas cirurgicamente no dorso de camundongos foram tratadas com formulações tópicas à base de gel de Natrosol, ao qual foram incorporados, em concentrações iguais, Dexametasona e EHFPC. O tratamento teve duração de 14 dias, e foi determinado pela obtenção de sucesso cicatricial das lesões por um dos grupos tratados. A avaliação da atividade cicatrizante se deu pela análise de características macroscópicas das lesões e das medidas do percentual de contração e velocidade de fechamento das feridas.

Os dois últimos capítulos abordam a atividade antimicrobiana da *Passiflora cincinnata* Mast. Antes da coleta do material botânico, uma revisão sistemática a respeito das atividades biológicas da espécie foi realizada, e constatou-se a falta de pesquisa na área microbiológica.

Além disso, a descrição de que *Passiflora cincinnata* Mast. é uma espécie nativa da caatinga, especialmente do Nordeste brasileiro, com potencial econômico para consumo como alimento funcional, se destacando entre as demais espécies do gênero *Passiflora*, por apresentar maior longevidade e resistência à pragas (bactérias e fungos), nos direcionou para a elaboração de extratos das partes aéreas da espécie. Produzimos, portanto, extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *P. cincinnata*.

O capítulo 3 qualificou a composição de metabólitos secundários dos extratos hidroalcoólicos de folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *P. cincinnata*. Os ensaios microbiológicos, realizados em triplicata, avaliaram a concentração inibitória mínima dos extratos, frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa*. Em seguida, investigou-se a atividade modulatória dos extratos, quando associados à fármacos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos e betalactâmicos, frente à cepa multirresistente de *P. aeruginosa*.

O capítulo 4 abordou ensaios microbiológicos dos extratos hidroalcoólicos de folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *P. cincinnata*, realizados em triplicata. Os experimentos de avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos foram realizados frente às cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em seguida, investigou-se a atividade modulatória dos extratos, quando associados à fármacos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos e betalactâmicos, frente às cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*.

# *Introdução*



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Perspectiva histórica sobre o uso de plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Ao longo do tempo, têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática, a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos.

Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante com a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Assim, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Indiretamente, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

No Brasil, o documento que regula o uso de plantas medicinais é o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), do Ministério da Saúde. Aprovado pelo Decreto nº 5.813/2006, constitui parte essencial para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, como elementos fundamentais capazes de promover a melhoria na qualidade de vida da população. Dentre as ações previstas pela implementação

política, destacam-se a necessidade do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional (BRASIL, 2009).

As plantas medicinais da flora nativa brasileira são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes estas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, o que não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Seus efeitos adversos, possíveis alterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

O que define a toxicidade de uma planta é a presença de substâncias cujas propriedades naturais, físicas, químicas e físico-químicas, alteram o conjunto funcional-orgânico. Em função da incompatibilidade vital, pode produzir no corpo humano reações biológicas diversas. O grau de toxicidade da planta depende da dosagem e do indivíduo. Na maioria das vezes, a toxicidade é provocada pela falta de informações sobre a planta e a dose ingerida (VASCONCELO, VIEIRA, VIEIRA, 2009).

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidade terapêutica ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença entre a planta medicinal e o fitoterápico reside na manipulação da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente, e não podem estar inclusas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que

de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”. Neste último caso encontra-se o fitofármaco, que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

A experiência mais antiga que influenciou a criação de programas de fitoterapia no Brasil foi o Programa Farmácias Vivas, criado pelo professor Francisco José de Abreu Matos, da Universidade Federal do Ceará, em 1983. É o primeiro programa de assistência social farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil, tendo por objetivo produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população carente (MATOS, 1998). Após a sua criação no estado do Ceará, tornou-se referência para o Nordeste brasileiro e, posteriormente, para todo o país (MALTA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2006).

O projeto deu origem, em 1997, ao Programa Estadual de Fitoterapia, atualmente designado de Núcleo de Fitoterápicos, o Nufito, da Coordenadoria de Assistência Farmacêutica (Coasf), que distribui 16 tipos de medicamentos fitoterápicos para hospitais e unidades da rede estadual de saúde e mantém o Horto de Plantas Medicinais (Horto Matriz) e a Oficina Farmacêutica para preparação de fitoterápicos. A Relação Estadual de Plantas Medicinais (Replame) lista 25 espécies que produzem fitoterápicos indicados como tranquilizantes, broncodilatadores, antissépticos, cicatrizantes, anti-inflamatórios, entre outras indicações. Plantas tradicionais da flora regional já são utilizadas na produção de fitoterápicos, entre elas babosa, capim santo, eucalipto, pau d’arco, confrei, romanzeira, malvariço, malva santa, alfavaca, aroeira, goiabeira e maracujá (CEARÁ, 2009).

## **1.2 Considerações botânicas sobre *Passiflora cincinnata* Mast. Passifloraceae**

### **1.2.1 Família Passifloraceae**

A família Passifloraceae compõe-se de 400 (KILLIP 1938; CERVI, 1997, 2000) à 520 espécies (MACDOUGAL & FEUILLET, 2004), que são amplamente distribuídas através dos neotrópicos. O Brasil é um importante centro de diversidade da família, onde quatro gêneros e 138 espécies ocorrem. *Passiflora* L. é o gênero

mais diverso da Passifloraceae neste país, com 129 espécies nativas (CERVI *et al*, 2010).

O histórico da *Passiflora* começa a se definir por ocasião da expansão europeia no quadro da conquista e exploração espanhola no Novo Mundo. Assim, tem-se notícia de que a *Passiflora* foi, talvez, a planta americana que maior admiração causou aos colonizadores espanhóis dos séculos XVI e XVII, não só pela beleza de suas flores, mas também pelo misticismo que sua morfologia suscitou entre as pessoas. Dos primeiros contatos dos colonizadores com a *Passiflora* deriva uma propagação de sua flor com sentido religioso e expressão literária singular que faz da sua existência uma notícia de significado cultural marcante. A princípio, conhecia-se esta planta com o nome de *granadilla* porque seu fruto se parecia com a *Punica granatum*; mais tarde, recebeu a denominação de *Passiflora*, passionária ou flor da paixão (*flor de la pasión*). O nome de flor da paixão se deve à primeira espécie descoberta (atualmente *Passiflora incarnata* L.) pelo que representavam, para os seus conhecedores, homens de fé católica, partes da flor e folhas em relação a alguns instrumentos da paixão de Cristo. Por analogia, as folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos, de coloração vermelha e azul, a coroa de espinhos; os três estiletes simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do crucificado. Ressalte-se que o nome *Passiflora* (derivado do latim: *passioni flos*) se deve a L. PLUCKENET (*Almagestrum botanicum*: 281) divulgado em 1696 (CERVI, 1997).

A palavra maracujá, que identifica os frutos das espécies do gênero *Passiflora*, é uma denominação indígena de origem tupi, que significa “alimento em forma de cuia” (MELETI, 2000). O fruto apresenta uso medicinal, amplamente conhecido pela população, e é objeto de diversos estudos farmacológicos (MACHADO, 2009).

### **1.2.2 *Passiflora cincinnata* Masters in Gardner, Chron**

A espécie *Passiflora cincinnata* foi descrita em 1868 por Masters. O epíteto específico *cincinnata* vem do latim e significa que tem por natureza cabelo anelado, encrespado, devido à corona de filamentos da flor, cujos filamentos se enrolam quando a flor está completamente aberta (Figura 1) (WONDRACEK, 2009).

Diversos nomes identificam esta espécie nas diferentes regiões do Brasil, sendo que em Santa Catarina, Mato Grosso, Minas Gerais e Pernambuco é conhecida como maracujá do Cerrado e maracujá-mochila. Em Alagoas e na Paraíba, maracujá-do-mato. Em São Paulo, Paraíba, Alagoas e Pernambuco, maracujá-de-vaqueiro, maracujá-de-casca-verde, maracujá-tubarão e maracujá-brabo. Esta espécie é encontrada em alguns países da América do Sul sendo eles: Paraguai, Argentina, Brasil, Bolívia e Venezuela. No Brasil está distribuída em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas e Bahia. (WONDRACEK, 2009)

No semiárido brasileiro, são descritas dez espécies do gênero *Passiflora*, onde *P. cincinnata* é apontada como uma nova espécie de interesse agrônomo (GIULIETTE *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2007).

Esta espécie é descrita como sendo de ampla distribuição na América do Sul, sendo registrada do leste do Brasil até o oeste da Bolívia, ocorrendo em campo rupestre, caatinga, floresta estacional e cerrado, além de ser frequente em ambientes perturbados (KILLIP, 1938; NUNES, QUEIROZ, 2001; NUNES, QUEIROZ, 2006).

É uma espécie encontrada em ambientes com grande incidência solar. É muito comum na borda da mata de capoeiras, inclusive na borda de cultivos, com florescimento e frutificação de outubro a maio. Com relação ao seu aspecto morfológico, possui grande variação, no tamanho dos frutos, no colorido da flor e na cor e sabor do suco. A casca do fruto permanece verde, mesmo após o amadurecimento. Os frutos possuem formato ovoide ou oblongo e a polpa geralmente apresenta coloração creme, com sementes ovais e foveoladas (Figura 2) (WONDRACEK, 2009).

*Passiflora cincinnata* Mast. é uma trepadeira, em geral, inteiramente glabra, raramente aveludada-pilosa, com caule cilíndrico ou subangular. As folhas são simples, 3 a 5 palmatipartidas, verde-escuras na fase adaxial, pálidas na fase abaxial; com 8 cm de comprimento e 8 a 10 cm de largura, pecíolos com 1,5 a 5,0 cm de comprimento, 2 a 3 glândulas sésses com cerca de 0,2 cm de diâmetro. Flores cor-de-rosa pálido a violeta e violeta azul, de 7,0 a 12 cm de diâmetro, pedúnculos de

2,0 a 8,5 cm de comprimento, com sépalas oblongo-lanceoladas, com 5,0 cm de comprimento. Os filamentos da coroa possuem de 2,0 a 4,0 cm de comprimento; na parte mais baixa, apresentam coloração púrpura carregada, banda média azul-rosado e azul-pálido. As sementes são ovais, com 0,5 a 0,6 cm de comprimento e 0,4 cm de largura (OLIVEIRA E RUGGIERO, 2006).

### 1.3 Etnofarmacologia da espécie *Passiflora cincinnata* Mast.

A família Passifloraceae destaca-se dentre a flora brasileira, por ser bastante utilizada na fitoterapia, e o gênero *Passiflora* é o mais encontrado em todo o Brasil (BARBOSA, 2006).

*Passiflora cincinnata* é uma das espécies que constam na lista relatada por MELETTI *et al.*, 2005, das espécies não cultivadas, mas que têm oferecido contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentarem resistência a doenças ou a pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda inexploradas.

**Figura 1:** Flor da *Passiflora cincinnata* Mast.



Fonte: SIEBRA, A. L. A.

**Figura 2:** Fruto de *Passiflora cincinnata* Mast.



Fonte: SIEBRA, A. L. A.

Conforme estudos etnofarmacológicos, determinações fitoquímicas enumeram, dentre outros constituintes, a presença de  $\beta$ -caroteno, antocianinas e compostos fenólicos na espécie em estudo.

Lessa (2011) cita em seu estudo comparativo entre as polpas das espécies *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. edulis*, que a espécie *P. cincinnata* possui o maior teor de compostos fenólicos, quando comparado às duas espécies, o que lhe confere característica atividade antioxidante. Determinou também que a espécie tem a presença de carotenoides e baixo teor de antocianinas em sua composição.

O  $\beta$ -caroteno é um potente antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares. A oxidação do LDL-colesterol é fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e o  $\beta$ -caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína (AMBROSIO *et. al*, 2006).

As antocianinas são metabólitos secundários que integram o grupo dos flavonoides e são responsáveis pela coloração que varia do vermelho vivo à violeta e de branco a amarelo claro (BOBBIO; BOBBIO, 2001). Estes compostos fitoquímicos podem prevenir injúrias causadas pelos radicais livres de várias formas. Uma delas é carreando diretamente o radical livre. As antocianinas são oxidadas pelos radicais, resultando em um radical menos reativo e mais estável. Em outras palavras, as antocianinas estabilizam as espécies reativas ao oxigênio através de sua reação com o componente reativo do radical (VOLP *et. al.*, 2008).

Os compostos fenólicos apresentam uma gama de efeitos biológicos, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e vasodilatadora (JACQUES, 2009). As formas relevantes e doses destes fitoquímicos, capazes de propiciar efeitos benéficos à saúde humana ainda precisam ser estabelecidas (MENNEM, 2005).

Em seu trabalho sobre plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil, AGRA *et al.*, (2007) descreve a espécie *P. cincinnata* como tendo o seu uso na medicina popular indicado contra doenças venéreas e no tratamento de hemorroidas, sendo as folhas a parte da planta utilizada no preparo de chás.

O infuso de toda a planta é indicado contra inflamações, insônias (AGRA, 1982), como sedativo, hipotensivo e antigripal (EMPERAIRE, 1983). As folhas e os frutos são indicados contra hipertensão, tosses e inflamações (AGRA *et al.*, 1996; NURIT-SILVA *et al.*, 2002).

#### **1.4 Importância econômica do maracujá**

Dentre várias espécies frutíferas da rica flora nacional, destaca-se uma de grande importância econômica: o maracujá; que tem grande potencial para uso na alimentação (produção de sucos e polpas congeladas), como fungicida, na indústria de cosméticos, perfumes e farmacêutica (RUGGIERO *et al.*, 2004).

O Brasil já foi o maior produtor mundial de maracujá. Entretanto, perdeu esta colocação em função da concorrência de outros países que apresentam melhores



condições de competitividade no mercado internacional. Os altos custos envolvidos na produção, perdas causadas por pragas e doenças do maracujazeiro, além dos baixos preços praticados pelos países concorrentes, tornaram menos atraente a alta produtividade visando o mercado externo, levando a uma redução gradativa da produção, o que fez com que o Brasil deixasse de ser o maior produtor de maracujá do mundo (LESSA, 2011).

Atualmente, a região Nordeste do Brasil é a maior produtora de maracujá, com uma produção predominante de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, sendo o estado da Bahia o maior produtor, seguido dos estados do Ceará, Sergipe, Minas Gerais e São Paulo (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2008).

As espécies silvestres do cerrado são amplamente encontradas no estado da Bahia e em vários estados do Nordeste e Centro-Oeste, por apresentarem condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Estas espécies ocorrem principalmente em áreas naturais próximas a pequenas propriedades, onde *Passiflora cincinnata* é obtida por coleta em pequenas plantações de agricultura familiar. Conseqüentemente, a produção obtida não é suficiente para o atendimento da demanda do mercado consumidor, sendo necessário o desenvolvimento e expansão do plantio da espécie (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2008).

*Passiflora cincinnata* apresenta potencial comercial e, de forma particular, para a industrialização em pequenas fábricas caseiras, por se constituir em um produto diferenciado, de sabor característico, quando comparado ao maracujá-amarelo. Seu cultivo é vantajoso por sua natureza perene e resistência à seca, desenvolvendo-se nos mais diversos solos da região semiárida, em condições absolutas de sequeiro. Seus frutos, isentos de agrotóxicos e de sabor exótico, já são comercializados em pequenas feiras livres de vários municípios do semiárido, embora sua produtividade, de cerca de nove toneladas por hectare seja considerada bem menor do que a do maracujá-amarelo. O produto processado na forma de geleia é exportado para Alemanha e Itália, sendo também consumido na merenda escolar dos municípios de Uauá, Curaçá e Canudos, na Bahia (ARAÚJO *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2007).

Os frutos de *P. cincinnata* possuem compostos fitoquímicos com reconhecida atividade biológica. Entretanto, esta característica não proporciona aumento de preço e, por conseqüência, não influencia diretamente no aspecto econômico, mas podem vir a interferir, uma vez que os consumidores buscam cada vez mais

alimentos que proporcionem saúde e bem estar. Portanto, estudos que determinem a eficácia destas substâncias podem incentivar o aumento do consumo, afetando positivamente toda a cadeia produtiva (LESSA, 2011).

Atualmente, *P. cincinnata* é comercializada na região Nordeste na entressafra da *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo uma opção de renda para os pequenos agricultores, em virtude da sua disponibilidade, por ser uma espécie nativa da região, adaptando-se bem às severas condições climáticas e ambientais, bem como aos métodos de cultivo utilizados (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2008).

Durante a coleta do material botânico a ser utilizado nas pesquisas químicas e farmacológicas deste trabalho, questionamos os moradores da localidade Sítio Barreiro Grande, localizado na Chapada do Araripe, município de Crato-CE, sobre a utilização da espécie *Passiflora cincinnata*, seja no âmbito comercial (*in natura* ou processado), ou mesmo na medicina popular. Alguns relatos apontaram para o uso medicinal das folhas da espécie, na forma de chá, para um efeito tranquilizante e também como antiinflamatório. Os frutos da espécie são utilizados no preparo de sucos para consumo próprio, especialmente na entressafra das espécies comerciais mais comuns do gênero *Passiflora*, que são cultivadas na comunidade. Não houve relatos de cultivo de *P. cincinnata*, nem processamento dos frutos com finalidade comercial (polpas, geleias, compotas), o que poderia significar importante fonte de renda para a comunidade, uma vez que a espécie é conhecida por sua excelente produtividade e resistência às infecções bacterianas ou fúngicas, que porventura atacassem parcial ou totalmente as lavouras cultivadas com tal espécie.

Atualmente, vem sendo explorada somente para subsistência e extrativismo. A associação da fruticultura às atividades de pequenas indústrias de beneficiamento e processamento dos frutos em doces, geleias, mousses e sucos, sinalizam um mercado promissor para a comercialização de *Passiflora cincinnata* (KIILL *et al.*, 2010).

# *Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil químico, toxicológico e farmacológico *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Mast. (Maracujá-do-Mato).

### 2.2 Objetivos específicos

- Elaborar extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. e classificar as principais classes de constituintes químicos derivados do metabolismo secundário;
- Quantificar os constituintes químicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC) através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar o teor de fenóis totais e flavonóides presentes no EHFPC por métodos espectrofotométricos;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do EHFPC, através dos métodos espectrofotométricos de captura do radical livre DPPH e redução do teor de ferro (FRAP);
- Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast., a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e modulação da atividade antibiótica (aminoglicosídeos e betalactâmicos);
- Avaliar a toxicidade aguda do EHFPC através da administração de dose única, por via oral, sob a orientação do protocolo da OECD 2008;
- Determinar a dose letal média (DL<sub>50</sub>) do EHFPC frente a modelos animais;
- Avaliar o efeito gastroprotetor do EHFPC em modelos de lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina;
- Investigar a ação do EHFPC na atuação da atividade gastroprotetora, através do teste de barreira física;
- Determinar a atividade cicatrizante do gel de EHFPC (100 mg/g) a 10%, através da análise de parâmetros morfométricos.


# *Material e Métodos*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material botânico

Neste trabalho, utilizou-se a espécie vegetal *Passiflora cincinnata* Mast, coletada com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), para a realização de atividades com finalidade científica, sob o número 32140-1 (Figura 3).

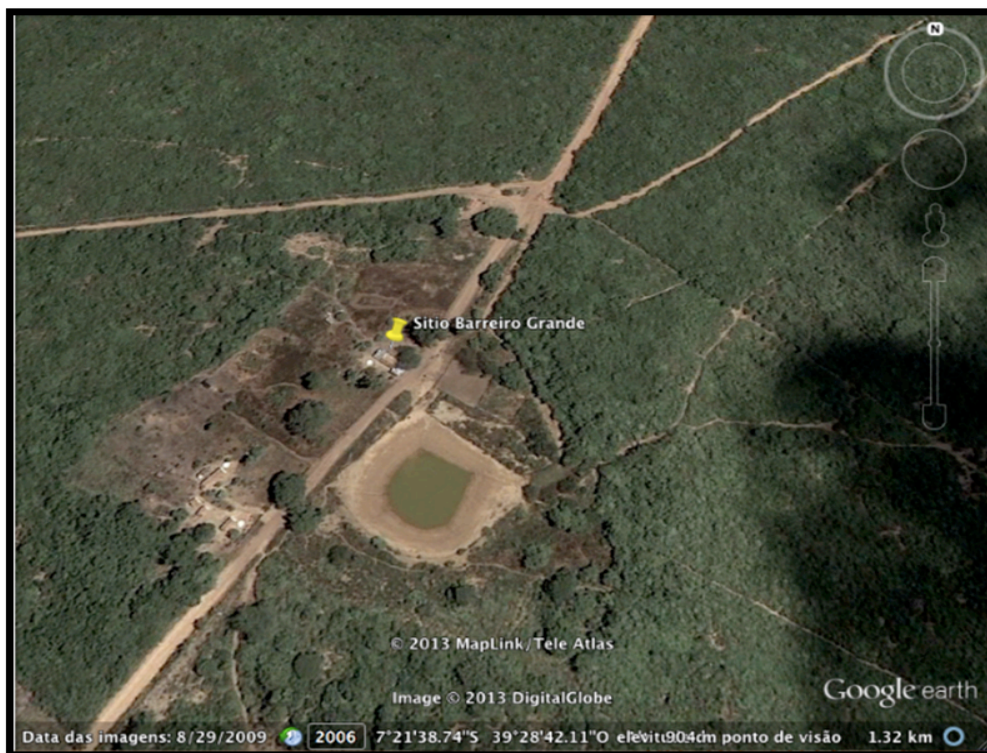
**Figura 3:** Autorização para atividades com finalidade científica – SISBIO.

 <p>Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO</p>	
<b>Autorização para atividades com finalidade científica</b>	
Número: 32140-1	Data da Emissão: 30/01/2012 09:00
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Ana Luiza de Albuquerque Siebra	CPF: 010.487.934-35
Título do Projeto: BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOGNÓSTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

A coleta foi realizada no Sítio Barreiro Grande (07° 21'44,0''S e 39°28'41,0''W, com altitude de 901m acima do nível do mar), situado no município de Crato-CE e com proximidade de 65,9 km do município de Serrita-PE (Figura 4). As informações foram obtidas através de aparelho GPS.

Para a identificação da espécie, foi coletada uma amostra representativa para confecção da exsicata (DI STASI, 1996), que está depositada junto ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade e Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o número de tombo 8097, como evidenciado na Figura 5.

**Figura 4:** Localização geográfica do Sítio Barreiro Grande, município de Crato-CE.



Fonte: Google Earth

### 3.2 Ensaaios *in vitro*

#### 3.2.1 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast.

O material vegetal colhido foi transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de sanidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas), lavado e submetido à secagem natural até que o excesso de umidade fosse extraído, e o material pudesse ser manuseado, de acordo com as suas características físicas, sendo triturado, a fim de aumentar a sua superfície de contato com o material solvente a ser utilizado no processo de maceração. As massas obtidas foram submersas em uma solução hidroalcoólica (1:1), por um período de 72 horas. Os extratos foram filtrados e em seguida concentrados em evaporador rotativo e banho-maria. Após este processo, os extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. foram congelados e encaminhados ao processo de liofilização, seguindo a metodologia de Matos (2009).

**Figura 5:** Exsicata da espécie depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o número 8097.



Fonte: Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima.

### 3.2.1.1 Prospecção fitoquímica

A identificação dos compostos (prospecção fitoquímica) que resultam do metabolismo secundário dos extratos de folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *P. cincinnata*, Mast. foi realizada a partir das mudanças de coloração e formação de precipitados após a adição de reagentes específicos, seguindo a metodologia proposta por Matos, 1997.



### **3.2.1.2 Análise cromatográfica**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi a técnica utilizada para a quantificação dos ácidos fenólicos: gálico, clorogênico, elágico e caféico, e os flavonoides: quercetina, quercitrina, rutina, campferol, catequina e epicatequina, identificados diante da comparação entre o seu tempo de retenção e do espectro de absorção de UV, com o uso dos padrões comerciais, seguindo a metodologia de Laghari *et al.*, 2011. Todas as operações cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata.

### **3.2.1.3 Teor de fenois totais**

A quantificação do teor de fenois totais presentes no EHFPC foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu descrito por Singleton, Lamuela-Raventos, 1999 e ligeiramente modificado por Dewanto, Adom, Liu, 2002. O teor de fenois totais foi expresso em grama (g) de ácido gálico por grama (g) de extrato, através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata.

### **3.2.1.4 Teor de flavonoides totais**

A determinação do teor de flavonoides totais presentes no EHFPC foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível seguindo a metodologia adaptada por Arvouet-Grand *et al.*, 1994. Os valores foram expressos em grama (g) de quercetina por grama (g) de extrato, através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de quercetina. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e triplicata.

### **3.2.2 Potencial antioxidante**

#### **3.2.2.1 Captura do radical livre DPPH**

A determinação do potencial antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível utilizando a metodologia descrita por Rufino *et al.*, 2007. O valor encontrado foi considerado como a capacidade em gramas (g) de o extrato capturar gramas (g) do radical livre de DPPH, a partir das absorbâncias obtidas e através da interpolação entre a curva de DPPH e a solução do extrato.

#### **3.2.2.2 Método de redução de ferro**

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 Rufino *et al.*, 2006. 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 e através da interpolação entre a curva de sulfato ferroso e a solução do extrato.

### **3.2.3 Formulação do gel de EHFPC (100 mg/g) a 10%, para uso tópico na atividade cicatrizante**

#### **3.2.3.1 Gel de natrosol**

Dissolveu-se o nipagim - nome comercial de metilparabeno - em água aquecida a 70°C, e aos poucos foi adicionando o natrosol – hidroxietilcelulose - sob agitação lenta e constante, até a dissolução completa. Logo após este processo, o material foi resfriado a 40°C, intercalando com um repouso e adicionando o Germall – Imidazolidinil. Ao final do preparo, o gel apresentou as seguintes características: gel transparente, incolor ou levemente amarelado, com pH variando entre 5 e 6.

### 3.2.3.2 Gel de EHFPC a 10% (100 mg/g)

O extrato foi diluído em água, e a este foi incorporado o gel de natrosol, aos poucos, através de uma homogeneização sincronizada, a fim de se obter a concentração final de 100mg/g.

### 3.2.4 Atividade antimicrobiana

Foram utilizados isolados clínicos oriundos do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba, conforme detalhado: bactérias (padrões): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11105 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e bactérias (multirresistentes): *S. aureus* 03, *E. coli* 08 e *P. aeruginosa* 04 seguindo a tabela 1, de acordo com os respectivos perfis de resistência. Os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina e os betalactâmicos ampicilina, benzilpenicilina potássica e oxacilina, foram utilizados na concentração inicial de 5000µg/mL. Todas as drogas foram dissolvidas em água estéril.

O método utilizado foi o da microdiluição em caldo. Para se chegar à concentração de 1024µg/mL a ser utilizada nos testes, inicialmente uma massa de cada extrato (folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes) (0,010g) foi diluída em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de se obter concentração final de 100 mg/mL, que em seguida foi diluída em água destilada e estéril. O inóculo foi diluído em BHI (*Brain Heart Infusion*) 10%, chegando-se a uma concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Foram distribuídos 100µL do BHI e do inóculo em cada poço de uma placa contendo 96 poços, e em seguida, procedeu-se a microdiluição seriada com 100µL da solução dos extratos, obtendo-se diluições variando nas concentrações de 512 a 8µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37°C. A concentração inibitória mínima (MIC) é definida como a menor concentração em que nenhum crescimento é observado (NCCLS, 2008), sendo determinada pelo método descrito por JAVADPOUR *et al.*, 1996.

No teste de modulação de drogas, utilizou-se o método proposto por COUTINHO *et al.*, 2008, onde as soluções dos extratos foram testadas a partir de uma concentração sub-inibitória (MIC/8). Foram distribuídos 100µL de uma solução contendo BHI 10%, inóculo e extratos em cada poço no sentido alfabético da placa. Em

seguida, 100µL da droga foi misturado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de aminoglicosídeos e betalactâmicos variavam gradualmente de 5000 a 1,22µg/mL.

**Tabela 1.** Origem das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

<b>Bactéria / Origem</b>	<b>Resistência</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> 03 Escara	Cefadroxil / Cefalexina / Cefalotina / Oxacilina / Penicilina / Ampicilina / Amoxicilina / Moxifloxacina / Ciprofloxacina / Levofloxacina / Ampicilina + Sulbactam / Amoxicilina + Ácido Clavulânico / Eritromicina / Claritromicina / Azitromicina / Clindamicina / Mupirocina
<i>Escherichia coli</i> 08 Urocultura	Ceftriaxona / Cefalotina / Cefalexina / Cefadroxil / Cefepime / Ciprofloxacina / Levofloxacina / Ampicilina + Sulbactam
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 04 Swab anal (fezes)	Cefepime / Ceftazidima / Levofloxacina / Ciprofloxacina

### **3.3 Ensaaios *in vivo***

#### **3.3.1 Animais e aspectos éticos da pesquisa**

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), com massa corpórea entre 20 - 30 g, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados no Biotério Experimental da URCA, em conformidade com as normas e procedimentos em biossegurança aplicada para biotérios.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura de  $23 \pm 2$  °C, utilizando ciclo claro/escuro de 12 h e tendo livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®). Foi realizado jejum de sólidos quando necessário, antes dos testes.

Foram realizadas avaliações diárias, tais como: número de animais por caixa, fluxo de pessoas (ruídos), nutrição, estoque/qualidade do material, sexagem de animais, condições de equipamentos e instalações, desinfecção e esterilização, higiene pessoal, ambiental e na manutenção dos animais, com a finalidade de garantir qualidade nos resultados e minimizar os erros.

Todos os procedimentos seguiram as normas de utilização de animais, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, protocolado sob o número: 10/2012 (ANEXO C)

#### **3.3.2 Avaliação da toxicidade aguda e determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>)**

A investigação da toxicidade aguda de *Passiflora cincinnata* Mast. seguiu as diretrizes da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method* – OECD 425 - 2008) e as diretrizes da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde, para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de se enquadrar nas exigências da RDC 17, de 24 de fevereiro 2000 da ANVISA/MS.

Para determinar a dose tóxica aguda, cinco animais foram tratados com o EHFPC a cada dose, sendo a classe definida como a menor dose que, na sequência considerada, induz a morte. Portanto, o extrato é administrado na sequência 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 sequência de: 19, 61, 195, 625 e 2000 mg/kg. Excepcionalmente, e somente quando justificado por regulação específica, o uso de dose superior a 5000 mg/kg deve ser considerado. O EHFPC foi administrado por via oral (gavagem através de cânula apropriada). O volume administrado 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 valor de dose e peso dos animais.

Os animais foram observados em intervalos regulares após a administração da droga (30 minutos, uma, duas, quatro e 24 horas) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, a 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 da cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, 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 ou 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 foram baseadas no modelo proposto por MALONE, 1977.

Os pesos corporais e o consumo de ração foram avaliados durante os 14 dias. Ao final do período de teste, após anestesia dos animais, foi realizada coleta de sangue (plexo infraorbital), para análise bioquímica dos seguintes parâmetros: hemograma, contagem de plaquetas, glicose, colesterol, triglicerídeos, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), fosfatase alcalina, ureia e creatinina. Após sacrifício, órgãos (cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e rins), foram pesados e analisados macroscopicamente. Foi notificado também, o número de óbitos para a determinação da DL<sub>50</sub>.

### **3.3.3 Atividade gastroprotetora**

#### **3.3.3.1 Avaliação farmacológica**

O estudo de dose-resposta antiúlcera foi realizado utilizando-se as doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast., sempre diluído em água destilada, constituindo as soluções a serem administradas por via oral ou intraperitoneal aos animais. Os animais dos grupos controle positivo e negativo receberam, respectivamente, solução de omeprazol na concentração de 30 mg/kg (grânulos macerados e diluídos em água destilada) e solução salina na concentração de 0,9%.

#### **3.3.3.2 Lesão gástrica induzida por etanol absoluto (ROBERT *et al.*, 1979 *apud* LAPA, 2008)**

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v. o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam a administração do etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal v.o.). Decorrido uma hora da indução, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior análise através do “software” (*Image J*). A área lesionada foi expressa em porcentagem da área total do corpo gástrico.

#### **3.3.3.3 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (MIZUI, 1987 *apud* LAPA, 2008)**

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam a administração de etanol<sub>acid.</sub> (0,2 mL/animal, de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 60%, v.o.). Após uma hora da indução, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior análise

através do “software” (*Image J*), sendo a área lesionada expressa em porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

#### **3.3.3.4 Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969 *apud* LAPA, 2008)**

Os animais receberam os tratamentos, de acordo com seus grupos, solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Após uma hora do pré-tratamento foi realizado a indução das lesões por administração de indometacina (10 mg/kg, v.o.). Decorridas três horas da administração do agente indutor, foi realizada a repetição dos pré-tratamentos. Depois de seis horas da administração da indometacina, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, sendo a área lesionada quantificada e qualificada a partir de scores previamente estabelecidos pela metodologia descrita por ZINKIEVICH *et al.*, 2010, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2:** Determinação de área lesionada através do sistema de scores.

<b>Pontuação</b>	<b>Tipo de lesão</b>
0	Ausente
1	Leves edemas
2	Edema e hemorragia
3	1-2 Úlceras pontuais
4	1-2 Úlceras extensas
5	Várias úlceras pontuais
6	Úlceras extensas e visíveis em toda mucosa

Fonte: Adaptado por ZINKIEVICH, et al., 2010.

#### **3.3.3.5 Teste de barreira física**

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.) ou EHFPC (50, mg/kg, v.o./v.ip.). Após 1h dos tratamentos, os animais do grupo (v.o.) receberam a administração do etanol acidificado (0,2 mL/animal v.o.) e o grupo (v.ip.)



após 30 minutos. Decorrido 1h da indução de acordo com seus respectivos tempos, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior análise através do “software” (*Image J*), sendo a área lesionada expressa em porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

### **3.3.4 Atividade cicatrizante**

#### **3.3.4.1 Animais**

Foram utilizados 24 camundongos *Swiss (Mus musculus)*, com massa corpórea entre 20-30 g. Os animais foram mantidos, em dupla, em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha irradiada, que foi trocada três vezes por semana. A temperatura ambiente foi mantida em torno de  $23 \pm 2$  °C. O fotoperíodo foi controlado para prover luz durante 12 horas diárias (6:00 às 18:00 horas). Tiveram livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

#### **3.3.4.2 Delineamento experimental**

Após período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas (dois animais/gaiola), e divididos em três grupos: Grupo Natrosol, em que as lesões nos animais foram tratadas topicamente com gel de Natrosol; Grupo EHFPC 10%, onde as lesões foram tratadas topicamente com gel do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast., na concentração de 100 mg/g e o Grupo Dexametasona, no qual as lesões foram tratadas topicamente com gel à base de Dexametasona, na mesma concentração do grupo EHFPC.

#### **3.3.4.3 Procedimento cirúrgico**

Para todos os procedimentos dolorosos e/ou situações de estresse, foi administrada anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), administrada por via intramuscular. 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 biópsia estéril de seis milímetros com lâmina cortante na borda, que se estendeu até a fáscia muscular. Os tratamentos foram aplicados imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma vez ao dia, com auxílio de hastes plásticas estéreis.

#### **3.3.4.4 Tratamento das feridas**

As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 15 dias. A cada nova reposição do tratamento, as lesões foram lavadas com solução fisiológica a 0,9% para a 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 qual o 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 gaze estéreis, para que as áreas das feridas fossem registradas fotograficamente, nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós-cirúrgico. Em seguida, excisões abrangendo a área da lesão e a pele íntegra de dois milímetros foram realizadas em dois animais de cada grupo, a cada dia de análise, e encaminhadas para análise histopatológica. Após tratamento, os animais seguiram para recuperação em suas respectivas gaiolas, devidamente higienizadas.

#### **3.3.4.5 Percentual de Contração da ferida (%C)**

As feridas de cada animal foram fotografadas digitalmente a uma distância fixa de 40 cm (Nikon D90 SLR Digital com lente Nikon 18-105 mm VR) a 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a indução do ferimento. As fotografias digitais das feridas cutâneas foram transferidas para um computador e convertidas para o formato de arquivo *Joint Photographic Experts Group File Format* (JPEG). Estas imagens foram processadas e utilizadas para medir a área da ferida utilizando o *Software Image J 1.3.1* (NIH, Estados Unidos). A área média das feridas foi expressa como uma porcentagem da área inicial (dia 0), utilizando a equação:

$$\%C = 100 * (Ad0 - Ada) / Ad0$$

onde, Ad0 = área da ferida no dia 0 e Ada = área da ferida no dia da análise.

### **3.3.4.6 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 de análise da cicatrização da ferida e %C é o percentual de cicatrização da ferida. A VFf foi expressa em cm<sup>2</sup>/dia.

### **3.4 Expressão dos dados e análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via e os testes de múltipla comparação de Newman Keuls, Bonferroni ou Tukey (conforme apropriado), sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

### **3.5 Instituições parceiras e financeiras**

A realização desta pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições e dos profissionais: do Biotério da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (FMJ), do Biotério da Universidade Regional do Cariri (URCA) e dos Laboratórios da Universidade Regional do Cariri: Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal (LFQM) para os ensaios *in vivo*, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) para obtenção do extrato, prospecção fitoquímica, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) para os ensaios microbiológicos, o Laboratório de Botânica (LB) para identificação da espécie. Da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, Faculdade de Medicina, na realização de ensaios *in vivo* e *in vitro* e da Universidade Federal de Santa Maria na quantificação de compostos por CLAE.

Os recursos financeiros para execução desse projeto foram advindos do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri e dos Programas CAPES, FUNCAP e CNPQ.

## *Resultados e Discussão*

# *Capítulo 1*

---

Avaliação da toxicidade, atividade antiulcerogênica e antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.

---

Este capítulo está formatado para publicação na Revista Biofar

## **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Passiflora cincinnata* MAST.**

### **Farmácia**

Ana Luiza de Albuquerque Siebra<sup>1</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup>, Larissa Rolim de Oliveira<sup>1</sup>, David de Carvalho Siebra<sup>2</sup>, Irwin Rose Alencar Menezes<sup>3</sup>, Marta Regina Kerntopf<sup>3</sup>.

**RESUMO** - *Passiflora cincinnata* Mast., conhecida popularmente como maracujá-do-mato, é descrita como uma espécie nativa da caatinga, utilizada com fins nutricionais, medicinais e ornamentais. Na medicina popular, tem sido empregada no tratamento de doenças venéreas, hemorroidas, inflamações, insônias, tosses, gripes e hipertensão, além de ser indicada como sedativa e calmante. Este trabalho objetiva investigar o teor de fenois totais e flavonoides, a atividade antioxidante, os possíveis efeitos tóxicos e a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC). O EHFPC mostrou presença de fenois totais, com maior representatividade para os flavonoides, além de atividade antioxidante. Não apresentou características de toxicidade nem registro de óbitos durante os experimentos. No teste com etanol absoluto, o EHFPC demonstrou melhor resultado na dose de 50 mg/kg, quando comparado ao omeprazol (percentual de inibição de 65,11% vs 45,12%). Nos testes com indução por etanol acidificado e indometacina, o EHFPC mostrou melhor resultado na dose de 100 mg/kg, quando comparados ao omeprazol (percentual de inibição de 57,40% e 38,58% EHFPC vs 34,78% e 51,17% omeprazol). O teste de barreira física evidenciou a atividade sistêmica do extrato. Os resultados deste estudo mostram que o EHFPC não é tóxico e apresenta atividade gastroprotetora, possivelmente intermediada pelos compostos fenólicos e potencial antioxidante presentes na espécie. Estudos mais específicos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesta atividade.

**Unitermos:** *Passiflora cincinnata* Mast., gastroproteção, atividade antioxidante, toxicidade aguda, fenois totais.

### **EVALUATION OF THE TOXICITY AND ANTIULCEROGENIC ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Passiflora cincinnata* Mast. LEAVES**

**ABSTRACT** - *Passiflora cincinnata* Mast., popularly known as maracujá-do-mato, is described as a native species of the caatinga, used for nutritional purposes, medicinal and ornamental. In folk medicine, have been employed in the treatment of venereal diseases, hemorrhoids, inflammation, insomnia, coughs, colds and hypertension, and is indicated as a sedative and calming. This study aims to investigate the content of total

---

<sup>1</sup>Aluna do Mestrado em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato-CE, Brasil. email: [analu\\_farm@yahoo.com.br](mailto:analu_farm@yahoo.com.br); [anitaoliveira24@yahoo.com.br](mailto:anitaoliveira24@yahoo.com.br); [larissarolim.ufcg@hotmail.com](mailto:larissarolim.ufcg@hotmail.com) <sup>2</sup>Professor Universidade Federal do Ceará Campus Cariri, Faculdade de Medicina, UFC. Barbalha – CE, Brasil. [david.siebra@hotmail.com](mailto:david.siebra@hotmail.com) <sup>3</sup> Professor DSc Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato-CE, Brasil. [irwinalencar@yahoo.com.br](mailto:irwinalencar@yahoo.com.br); [martakerntopf@yahoo.com.br](mailto:martakerntopf@yahoo.com.br).

of 50 mg / kg, when compared to omeprazole (inhibition percentage of 65.11% vs. 45.12%). In tests with acidified ethanol induced by indomethacin and the phenols and flavonoids, antioxidant activity, the possible toxic effects and gastroprotective activity of hydroalcoholic extract of leaves of *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC). In this study, we evaluated the total phenols and flavonoids, antioxidant activity (DPPH and FRAP), toxicity and antiulcer property (by the methods of absolute ethanol, acidified ethanol and indomethacin) of EHFPC. The EHFPC showed the presence of phenolic compounds, with greater representation for flavonoids, and antioxidant activity. Characteristics showed no toxicity or death record during the experiments. In the test with absolute ethanol, EHFPC showed the best result at a dose EHFPC showed better results at a dose of 100 mg / kg compared to omeprazole (percentage inhibition of 57.40% and 38.58% vs. 34.78% EHFPC and 51 omeprazole 17%). The test of physical barrier showed an systemic activity of the extract. The results of this study show that EHFPC is not toxic and has gastroprotective activity, possibly mediated by phenolics and antioxidant present in the species. More specific studies are needed to elucidate the mechanisms involved in this activity.

**Uniterms:** *Passiflora cincinnata* Mast., gastroprotection, antioxidant activity, acute toxicity, total phenols.

## INTRODUÇÃO

*Passiflora cincinnata* Mast. é uma espécie não cultivada que tem oferecido contribuições importantes ao melhoramento genético, apresentando resistência a doenças e pragas, longevidade, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica (Meletti *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2010). Conhecida popularmente como maracujá-do-mato, é descrita como uma espécie nativa da caatinga, utilizada com fins nutricionais, medicinais e ornamentais, sendo empregada também como fonte de genes em programas de melhoramento genético (Bernacci *et al.*, 2003; Kill *et al.*, 2010; Zucarelli, 2007; Vanderplanck, 2000; Meletti *et al.*, 2002; Lawinsky, 2010). Em levantamento realizado por Agra *et al.* (2007) no Nordeste brasileiro, esta espécie tem sido relatada pelos nativos como sendo utilizada para o tratamento de doenças venéreas e hemorroidas. O infuso de toda a planta é indicado no tratamento de inflamações e insônias, (Agra, 1982), como sedativo, hipotensivo e antigripal (Empereire, 1983). As folhas e os frutos são indicados contra hipertensão, tosses e inflamações e como calmante (Agra, 1996; Nurit-Silva *et al.*, 2002).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (Matos, 1989).

A medicina popular, baseada principalmente no uso de plantas, desfruta atualmente de uma posição respeitável, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade dos serviços de saúde modernos é limitado. Seguros, eficazes e de baixo custo, os fitoterápicos estão ganhando popularidade entre as pessoas, seja de origem urbana ou rural. Informações a respeito do uso popular da medicina tradicional

têm desempenhado um papel fundamental na descoberta de novos produtos a partir de plantas, como, por exemplo, agentes quimioterápicos (Agra *et al.*, 2007).

Neste contexto, várias plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, muitas vezes, sem o conhecimento da efetividade do seu uso para determinado fim. Por se tratar de uma espécie ainda pouco estudada em seus princípios farmacológicos e potencial toxicológico, *Passiflora cincinnata* Mast. é o objeto de estudo deste trabalho, que se propõe a investigar a atividade antiulcerogênica, antioxidante e sua possível toxicidade, com o intuito de fornecer informações básicas sobre a ação de seus princípios ativos, uma vez que os altos preços dos medicamentos indicados para o tratamento dos distúrbios gastrointestinais torna-os muitas vezes inacessíveis à população, fazendo com que o uso de plantas medicinais surja como alternativa de baixo custo e acesso facilitado para o alívio dos sintomas de saúde.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Material botânico*

Folhas da espécie *Passiflora cincinnata* Mast foram coletadas no município de Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado, e uma exsicata está depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob o número de tombo: HCDAL 8097.

### *Preparo do extrato*

O material vegetal colhido foi transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de sanidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas), lavado e submetido à secagem natural até que o excesso de umidade fosse extraído, e em seguida triturado, a fim de aumentar a sua superfície de contato com o material solvente a ser utilizado no processo de maceração. A massa obtida foi submersa em uma solução hidroalcoólica (1:1), por um período de 72 horas. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo e banho-maria. Após este processo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. foi congelado e encaminhado ao processo de liofilização.

### *Animais*

Para realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), com massa corpórea entre 20 - 30 g, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados no Biotério Experimental da URCA, em conformidade com as normas e procedimentos em biossegurança aplicada para biotérios.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura de  $23 \pm 2$  °C, utilizando o ciclo claro/escuro de 12 h e tendo livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®). Foi realizado jejum de sólidos quando necessário, antes dos testes.

Todos os procedimentos seguiram as normas de utilização de animais, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, protocolado sob o número 10/2012.



### ***Teor de fenois totais***

A quantificação do teor de fenois totais presentes no EHFPC foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999) e ligeiramente modificada por Dewanto *et al.* (2002). Sendo o teor expresso em grama (g) de ácido gálico por grama (g) de extrato, através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e triplicata.

### ***Teor de flavonoides totais***

A determinação do teor de flavonoides totais presentes no EHFPC foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível seguindo a metodologia adaptada por Arvouet-Grand *et al.* (1994). Os valores foram expressos em grama (g) de quercetina por grama (g) de extrato, através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de quercetina. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e triplicata.

### ***Captura do radical livre DPPH***

A determinação do potencial antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi realizada através do método de espectroscopia na região do visível utilizando a metodologia descrita por Rufino *et al.*, (2007). O valor encontrado foi considerado como a capacidade em gramas (g) de o extrato capturar gramas (g) do radical livre de DPPH, a partir das absorbâncias obtidas e através da interpolação entre a curva de DPPH e a solução do extrato.

### ***Método de redução de ferro***

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 Rufino *et al.* (2006). 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 e através da interpolação entre a curva de sulfato ferroso e a solução do extrato.

### ***Avaliação da toxicidade aguda e determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>)***

A investigação da toxicidade aguda de *Passiflora cincinnata* Mast. seguiu as diretrizes da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method* – OECD 425 - 2008) e as diretrizes da Portaria 116/96 do Ministério da Saúde, para avaliação da toxicidade aguda oral de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de se enquadrar nas exigências da RDC 17, de 24 de fevereiro 2000 da ANVISA/MS.

Para determinar a classe de dose tóxica aguda, grupos de cinco animais foram tratados com o EHFPC a cada dose, sendo a classe definida como a menor dose que, na sequência considerada, induz a morte. Portanto, o extrato foi administrado na sequência 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 sequência de: 19, 61, 195, 625 e 2000 mg/kg. Excepcionalmente, e somente quando justificado por regulação específica, o uso de dose superior a 5000 mg/kg deve ser considerada. O EHFPC foi administrado por via oral (gavagem através de cânula apropriada). O volume administrado 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 valor da dose e peso dos animais.

Os animais foram observados em intervalos regulares após a administração da droga (30 minutos, uma, duas, quatro e 24 horas) e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, intensidade, duração e progressão dos mesmos foram registrados. Observações comportamentais sistemáticas através do *screening* hipocrático (atividade geral, frênilo vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, 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 ou 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 estão baseadas no modelo proposto por Malone (1977).

Os pesos corporais e o consumo de ração foram avaliados durante os 14 dias. Ao final do período de teste, após anestesia dos animais, foi realizada coleta de sangue (via infraorbital), para análise bioquímica dos seguintes parâmetros: hemograma, contagem de plaquetas, glicose, colesterol, triglicérides, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), fosfatase alcalina, ureia e creatinina. Após sacrifício, órgãos (cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e rins), foram pesados e analisados macroscopicamente. Foi notificado também, o número de óbitos para a determinação da DL<sub>50</sub>.

### ***Avaliação Farmacológica***

O estudo de dose-resposta antiúlcera foi realizado utilizando-se as doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast., sempre diluídas em água destilada, constituindo as soluções a serem administradas por via oral ou intraperitoneal aos animais. Os animais dos grupos controle positivo e negativo receberam, respectivamente, solução de omeprazol na concentração de 30 mg/kg (grânulos macerados e diluídos em água destilada) e solução salina na concentração de 0,9%.

### ***Lesão gástrica induzida por etanol absoluto (Robert et al., 1979 apud Lapa, 2008).***

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam a administração de etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/animal v. o.). Decorrido uma hora da indução, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior análise através do “software” (*Image J*), sendo a área lesionada expressa em porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

***Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (Mizui, 1987 apud Lapa, 2008).***

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Após 1h dos tratamentos, os animais receberam a administração de etanol acid. (0,2 mL/animal, de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 60%, v.o.). Após uma hora da indução, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior análise através do “software” (*Image J*), sendo a área lesionada expressa em porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

***Lesão gástrica induzida por indometacina (Djahanguiri, 1969 apud Lapa, 2008).***

Os animais receberam os tratamentos, de acordo com seus grupos, solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), omeprazol (30 mg/kg, v.o.) ou EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Após uma hora do pré-tratamento foi realizado a indução das lesões por administração de indometacina (10 mg/kg, v.o.). Decorridas três horas da administração do agente indutor, foi realizada a repetição dos pré-tratamentos. Depois de seis horas da administração da indometacina, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina a 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, sendo a área lesionada quantificada e qualificada a partir de scores previamente estabelecidos pela metodologia descrita por Zinkievich *et al.*, 2010, como mostra a tabela 1.

**Tabela 1:** Determinação da área lesionada através do sistema de scores.

Pontuação	Tipo de lesão
0	Ausente
1	Leves edemas
2	Edema e hemorragia
3	1-2 Úlceras pontuais
4	1-2 Úlceras extensas
5	Várias úlceras pontuais
6	Úlceras extensas e visíveis em toda mucosa

Fonte: Adaptado por Zinkievich *et al.*, 2010.

***Teste de barreira física***

Os animais foram tratados com solução salina (0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.) e o EHFPC (50, mg/kg, v.o./v.ip). Após 1h dos tratamentos, os animais do grupo (v.o) receberam a administração do etanol acidificado (0,2 mL/animal v.o.) e o grupo (v.ip.) após 30 minutos. Decorrido uma hora da indução de acordo com seus respectivos tempos, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas de acordo com os grupos, com posterior

análise através do “software” (*Image J*), sendo a área lesionada expressa em porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

### ***Expressão dos dados e 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, Bonferroni e Tukey (quando necessário), sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism*, de acordo com os valores obtidos nos testes.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A quantificação do teor de fenóis totais foi determinada a partir da interpolação da absorbância da amostra contra a curva de calibração construída a partir de padrões de ácido gálico, sendo expressos em g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A concentração do EHFPC foi de 272,13 mg de extrato/ g de equivalente de ácido gálico, sendo a equação da curva de calibração do ácido gálico  $C = 0,0144A + 0,2937$ , onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 760 nm e o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9901$ .

O teor de flavonoides totais foi determinado a partir da interpolação da absorbância da amostra contra a curva de calibração construída a partir de padrões de quercetina, sendo expressos em g de EQ (equivalentes de quercetina) por g de extrato. O conteúdo de flavonoides presentes na amostra do extrato hidroalcoólico de *Passiflora cincinnata* Mast. foi de 67,40 mg/g de quercetina, sendo a equação da curva de calibração de quercetina  $C = 0,0207A + 0,0093$ , onde C é a concentração de quercetina, A é a absorbância a 415 nm e o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9822$ .

Em seu estudo de determinação de compostos fitoquímicos de espécies silvestres de *Passiflora*, Lessa (2011) realizou determinações fitoquímicas da polpa de *Passiflora cincinnata* Mast. que evidenciou a presença de  $\beta$ -caroteno, pequena quantidade de antocianinas (compostos fitoquímicos importantes na prevenção de doenças degenerativas relacionadas às reações oxidativas) e o teor de compostos fenólicos, quantificando que a polpa apresenta 0,210 g de ácido gálico, resultado que corrobora com o determinado através deste estudo para as folhas (0,272 g de ácido gálico). Constatando, assim, que os alimentos derivados de frutas possuem diversas substâncias fenólicas que em sua maioria apresentam propriedades bioativas, sendo que os flavonóides, ácidos fenólicos e polifenóis representam as principais classes integrantes do grupo dos compostos fenólicos. Na nossa determinação, os flavonoides representam a maioria dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *Passiflora cincinnata*.

A determinação da atividade antioxidante, quando avaliada através do método de captura do radical livre DPPH, demonstrou a necessidade de 0,022 g de extrato para capturar grama (g) de DPPH, estando esse valor associado à quantidade de DPPH restante e ao grau de descoloração. Quando estimada pelo método que avalia a capacidade de uma amostra reduzir o teor de ferro (FRAP), o EHFPC utilizou 0,023g de extrato para reduzir grama (g) de sulfato ferroso. Os métodos apresentaram correlação significativa, demonstrando uma efetiva atividade antioxidante do EHFPC, mesmo seguindo metodologias diferentes.

A atividade antioxidante do EHFPC pode estar relacionada à sua composição fitoquímica, pela presença de metabólitos secundários que reconhecidamente

apresentam atividade antioxidante, tais como taninos e flavonoides, que podem atuar sequestrando ou mesmo inibindo a atuação dos radicais livres quando submetidos a análises *in vitro*, sugerindo a possibilidade de diferentes mecanismos responsáveis por esta potencialidade (Martins, 2013). A observação de uma relação linear entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenois totais presentes na amostra, indica que os compostos fenólicos são os principais componentes responsáveis pela capacidade antioxidante verificada para o extrato (Rudnicki *et al.*, 2007).

As investigações etnofarmacológicas de plantas com potencialidade antioxidante costumam ser realizadas com espécies que exibem propriedades antiúlceras e antiinflamatória. Estes distúrbios têm em comum a geração de estresse oxidativo, entre outros fatores, pela atividade aumentada de células fagocitárias nas áreas lesionadas. A atividade antioxidante de compostos vegetais em nível gástrico tem atraído interesse, em função da forte evidência de que o processo oxidativo está envolvido nos mecanismos de diversas patologias que acometem o estômago, incluindo a ulcerogênese (Carvalho, 2004; Repetto & Llessuy, 2004; Jesus, 2009).

Adicionalmente, avaliamos a toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. e observamos que em todas as doses administradas, após duas e até as quatro primeiras horas de observação, os animais apresentaram sonolência e diminuído reflexo exploratório no campo aberto (quando comparados ao grupo controle, o qual foi administrado volume semelhante aos grupos em teste, de solução salina a 0,9%). Tais observações indicam que o EHFPC apresenta atividades de ação central, tais como efeitos ansiolítico e hipnótico-sedativo (dados não mostrados). Este resultado é consistente com os dados obtidos em estudos com outras espécies do gênero *Passiflora*, relatados no levantamento de atividades farmacológicas deste gênero, realizado por Gosmann *et al.*, (2011).

Durante os 14 dias de observação, nenhuma morte foi registrada e, ao final do experimento, após autópsia, mudanças significativas ou lesões nas vísceras dos animais não foram notificadas (dados não mostrados).

Quando considerados os parâmetros bioquímicos, hematológicos e sinais físicos gerais, o EHFPC não apresentou toxicidade, quando em administração única oral (dados não mostrados). Provensi (2007), constatou que a administração do extrato aquoso de *Passiflora alata*, em doses repetidas, na concentração de 300 mg/kg, v. o., denota para as mesmas análises, toxicidade leve.

Além destes parâmetros, acompanhou-se a evolução do peso corporal dos animais e seus órgãos (cérebro, coração, pulmões, baço, fígado e rins), nos quais o EHFPC não induziu mudanças significativas quando comparadas com o grupo controle. Mudanças nestes parâmetros são indicadores de reações adversas, tal como a variação do peso corpóreo dos animais, que não deve oscilar em mais do que 10% do seu peso no início do experimento. O consumo de ração também foi avaliado, não sofrendo alteração após administração do EHFPC e durante os 14 dias de observação (dados não mostrados). Este também é um importante parâmetro no estudo da segurança de um produto com propósitos terapêuticos (Raza *et al.*, 2002; Teo *et al.*, 2002; Iversen *et al.*, 2003; Mota *et al.*, 2008).

A fisiopatologia da úlcera gástrica tem sido explicada pelo desequilíbrio entre os fatores agressivos (ácido clorídrico, etanol, *Helicobacter pylori*, drogas esteroidais e não-esteroidais, dentre outros) e protetores (secreção de muco, fluxo sanguíneo, regeneração celular, prostaglandinas e fatores de crescimento epidérmico) do estômago. As espécies reativas de oxigênio, principalmente os radicais hidroxila, desempenham

um papel importante na indução dos danos oxidativos das mucosas em todos os tipos de úlceras (Lima *et al.*, 2006; Das *et al.*, 1997; Eswaran *et al.*, 2010; Mota *et al.*, 2008).

A úlcera péptica tem o seu tratamento medicamentoso conduzido através da inibição da secreção ácida gástrica pelos antagonistas H<sub>2</sub>, inibidores da bomba de prótons (tais como o omeprazol) e antimuscarínicos, bem como pelo tratamento ácido-independente, através do uso de sucralfato e bismuto (Andrade *et al.*, 2007).

A atividade antiulcerogênica do EHFPC foi avaliada através da administração oral de etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina, que avaliam a capacidade que estas drogas têm de proteger a mucosa gástrica, tornando estas técnicas adequadas à investigação de produtos naturais com atividade antiúlcera (Mota *et al.*, 2008).

Nas lesões causadas por etanol absoluto, o EHFPC apresentou percentual de inibição na ordem de 65,11%, 29,19% e 19,50%, respectivamente nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg, enquanto o grupo tratado com omeprazol, na concentração de 30 mg/kg, apresentou como percentual de inibição, 45,12%, existindo, portanto, diferença de aproximadamente 20% (19,99%) entre a dose preconizada para o fármaco de escolha indicado no tratamento das úlceras pépticas (omeprazol) e a dose de 50 mg/kg do EHFPC (Figura 1 / Tabela 2). Estes dados sugerem que os compostos com atividade antioxidante presentes na espécie em estudo podem atuar neste modelo experimental, produzindo efeitos antiulcerogênicos.

O etanol é metabolizado pelo corpo e libera radicais livres (ânion superóxido e hidroperóxido). Tem-se discutido que radicais livres estão envolvidos nos mecanismos de ulceração aguda e crônica na mucosa gástrica. Além disso, distúrbios na secreção gástrica, alterações na permeabilidade, diminuição do muco e produção de radicais livres são observados após a administração de etanol. (Pihan *et al.*, 1987; Salim, 1990; Andrade *et al.*, 2007).

A solubilização dos constituintes do muco no estômago, induzida pela presença de etanol aumenta o fluxo de sódio e potássio no lúmen, aumenta a liberação de pepsina e diminui os níveis de DNA, RNA e proteínas, deixando a mucosa desprotegida, lesionando o tecido. O ácido clorídrico (HCl) aprofunda a necrose do tecido, aumentando ainda mais a lesão (Robert *et al.*, 1979; Singh *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2010). A presença de ácido clorídrico (HCl) na solução de etanol acelera o progresso da ulcerogênese e aumenta a lesão gástrica (Singh *et al.*, 2008).

A administração oral de solução de etanol acidificado por HCl ao grupo controle produz claramente lesões com características hemorrágicas, com grandes manchas lineares de necrose e edema da mucosa (Hiruma-Lima *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados, o EHFPC (50, 100 e 200 mg/kg, v. o.) reduziu significativamente a lesão na mucosa gástrica, quando comparada ao grupo que foi administrado solução salina a 0,9%, apresentando valores percentuais de área lesionada, respectivamente de:  $17,41 \pm 1,34$ ;  $11,56 \pm 1,50$ ;  $18,91 \pm 1,17$  e  $27,14 \pm 1,57$ . O EHFPC promoveu maior proteção na dose de 100 mg/kg quando comparada ao grupo salina 0,9% ( $11,56 \pm 1,50$  EHFPC vs.  $27,14 \pm 1,57$  Salina 0,9%), com o percentual de inibição do EHFPC 100 mg/kg correspondendo a 57,40%. O controle positivo (omeprazol) demonstrou diferença significativa quando comparado ao EHFPC 100 mg/kg ( $17,70 \pm 1,19$  Omeprazol vs.  $11,56 \pm 1,50$  EHFPC 100 mg/kg), com percentual de inibição no valor de 34,78% (Figura 2 / Tabela 3).

Os resultados demonstram a atividade do EHFPC, especialmente na concentração de 100 mg/kg, tanto quando comparado ao controle positivo (omeprazol),

quanto ao controle negativo (salina 0,9%), sugerindo a presença de atividade gastroprotetora do extrato.

**Figura 1: Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.** Os mesmos foram tratados com salina (0,9%, 0,1 mL/10 g; v. o.) e EHFPC (50, 100, 200 mg/kg, v. o.) ou omeprazol (30 mg/Kg, v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam o agente indutor: etanol<sub>abs</sub> (0,2 mL/v.o.). Após uma hora, os animais foram anestesiados, sacrificados e as imagens dos estômagos foram submetidas à análise no programa *ImageJ*. Cada grupo representa a média de seis animais. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA). 1:  $p < 0,05$ ; 2:  $p < 0,01$  e 3:  $p < 0,001$ . a: grupo salina 0,9%; d: grupo EHFPC 100; e: grupo EHFPC 200.

**Tabela 2: Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto expresso em média ± erro padrão e percentuais de inibição.**

Grupo	% de área lesionada	% de inibição
Controle (salina 0,9%)	16,51 ± 1,90	-
Omeprazol 30 mg/Kg	9,06 ± 0,98 (a <sub>2</sub> )	45,12%
50 mg/Kg	5,76 ± 0,57 (a <sub>3</sub> /d <sub>1</sub> /e <sub>2</sub> )	65,11%
100 mg/Kg	11,69 ± 0,86	29,19%
200 mg/Kg	13,29 ± 0,98	19,50%

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) onde <sup>1</sup>  $p < 0,05$ , <sup>2</sup>  $p < 0,01$  e <sup>3</sup>  $p < 0,001$ . a: grupo salina 0,9%; d: grupo EHFPC 100 ; e: grupo EHFPC 200.

**Figura 2: Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.** Os mesmos foram tratados com salina (0,9%, 0,1 mL/10 g; v. o.) e EHFPC (50, 100, 200 mg/Kg, v. o.) ou omeprazol (30 mg/Kg, v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam o agente indutor: etanol <sub>acid.</sub>(0,2 mL/animal, de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 60%, v. o.). Após uma hora, os animais foram anestesiados, sacrificados e as imagens dos estômagos foram submetidas à análise no programa *ImageJ*. Cada grupo representa a média de seis animais. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA). 1: p < 0,05; 2: p < 0,01 e 3: p < 0,001. a: grupo salina 0,9%; b: grupo omeprazol 30; c: grupo EHFPC 50; e: grupo EHFPC 200.

**Tabela 3:** Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado expresso em média ± erro padrão e percentuais de inibição.

Grupo	% de área lesionada	% de inibição
Controle (salina 0,9%)	27,14 ± 1,57	-
Omeprazol 30 mg/Kg	17,70 ± 1,19 (a <sub>3</sub> )	34,79%
50 mg/Kg	17,41 ± 1,34 (a <sub>3</sub> )	35,85%
100 mg/Kg	11,56 ± 1,50 (a <sub>3</sub> /b <sub>1</sub> /c <sub>1</sub> /e <sub>2</sub> )	57,40%
200 mg/Kg	18,91 ± 1,17 (a <sub>2</sub> )	30,32%

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) onde <sup>1</sup> p < 0,05, <sup>2</sup>p < 0,01 e <sup>3</sup> p < 0,001. a: grupo salina 0,9%; b: grupo omeprazol 30; c: grupo EHFPC 50; e: grupo EHFPC 200.



Antiinflamatórios não estenoidais (AINES), tais como a indometacina, possuem a habilidade de causar ulceração gastroduodenal, pela capacidade destes agentes suprimirem a síntese de prostaglandinas que, no estômago, desempenham um papel protetor, estimulando a secreção de muco e bicarbonato, mantendo o fluxo sanguíneo, regulando a renovação celular e o reparo da mucosa. Portanto, a inibição as síntese de prostaglandinas pelos AINES culmina com o aumento as susceptibilidade da mucosa a danos e, conseqüentemente, ulceração gastroduodenal (Wallace, 2001; Hayllar & Bjarnason, 1995; Barros *et al.*, 2008).

Neste protocolo, em que as úlceras gástricas são induzidas pela indometacina, o grupo controle positivo (omeprazol) alcançou a pontuação de  $4,77 \pm 0,90$  scores, correspondendo a um percentual de inibição de 51,17%. O EHFPC apresentou o seu melhor resultado na concentração de 100 mg/kg, obtendo scores no valor de  $6,00 \pm 0,44$  e percentual de inibição em 38,58% (Figura 3 / Tabela 4). Portanto, o EHFPC não se mostrou capaz de proteger tão eficazmente a mucosa gástrica das lesões ulcerativas quanto o omeprazol, mas mostra significância quando comparada ao grupo controle negativo (salina 0,9%), que obteve pontuação de  $9,77 \pm 0,87$  scores.

Barros (2008) explica que a atuação de ácidos fenólicos pode promover uma redução significativa nos danos à mucosa gástrica, sugerindo o possível envolvimento de prostaglandinas e/ou muco no efeito antiulcerogênico do extrato.

Na análise do teste de barreira, os grupos 50 mg/kg, v.o. e 50 mg/kg v.ip., obtiveram as seguintes porcentagens de proteção: 30,70% e 47,40%, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado apenas com salina 0,9%. O EHFPC, nas diferentes vias de administração, apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo salina (Figura 4 / Tabela 5). Houve diferença significativa entre as vias de administração, onde o grupo tratado com administração pela via intraperitoneal exerceu melhor atividade gastroprotetora, confirmando que o EHFPC não tem a sua atividade estabelecida sobre a pressuposta proteção gástrica através de barreira física.

**Figura 3: Efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.** Os mesmos foram pré-tratados com salina (0,9%, 0,1mL/10g, v.o.) e EHFPC (50, 100, 200 mg/Kg, v.o.) ou omeprazol (30mg/Kg, v.o.). Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam o agente indutor: indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Após três horas da administração do indutor, os animais recebem um pós-tratamento. Após seis horas da administração do agente indutor os animais foram anestesiados, sacrificados e as imagens dos estômagos foram submetidas a análise no programa *ImageJ*. Cada grupo representa a média de seis animais. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA). 2:  $p < 0,01$  e 3:  $p < 0,001$ . a: grupo salina 0,9%; c: grupo EHFPC 50.

**Tabela 4:** Efeito do EHFPC no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição.

Grupo	Pontuação	% de inibição
Controle (salina 0,9%)	9,77 $\pm$ 0,87	-
Omeprazol 30 mg/Kg	4,77 $\pm$ 0,90 (a <sub>3</sub> )	51,17%
50 mg/Kg	8,44 $\pm$ 0,37 (b <sub>2</sub> )	13,68 %
100 mg/Kg	6,00 $\pm$ 0,44 (a <sub>2</sub> )	38,58 %
200 mg/Kg	7,11 $\pm$ 0,51	27,22 %

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) onde <sup>2</sup>  $p < 0,01$  e <sup>3</sup>  $p < 0,001$ . a: grupo salina 0,9%; c: grupo EHFPC 50.

---

#### EHFPC

**Figura 4: Efeito do teste de barreira, ao avaliar a administração intraperitoneal em relação a oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.** Os animais foram tratados com salina (0,9%, 0,1 mL/10 g; v.o. e v.ip.) e EHFPC (50 mg/kg, v.o. e v.ip.). Após uma hora dos tratamentos, os animais do grupo via oral receberam o agente indutor: etanol <sub>acid.</sub>(0,2 mL/animal, de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 60%, v.o.) e o grupo via intraperitoneal após meia hora. Após uma hora da indução dos respectivos grupos, os animais foram anestesiados, sacrificados e as imagens dos estômagos foram submetidas a análise no programa *ImageJ*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA).

**Tabela 5: Efeito do teste de barreira física, ao avaliar administração intraperitoneal em relação a oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado, expresso em média  $\pm$  erro padrão e percentuais de inibição.**

Grupo	% de área lesionada	% de inibição
Controle (salina 0,9%)	26,41 $\pm$ 1,09	-
50 mg /kg/v.o.	18,30 $\pm$ 0,88 (a <sub>3</sub> )	30,70%
50 mg /kg/v.ip.	13,89 $\pm$ 0,73(a <sub>3</sub> ,b <sub>2</sub> )	47,40%

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), avaliados pela análise de variância (ANOVA) onde <sup>2</sup> p < 0,01 e <sup>3</sup> p < 0,001. a: grupo salina 0,9%; b: grupo EHFPC 50mg/kg, v.o.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo mostram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. apresenta atividade gastroprotetora contra os danos induzidos por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina, possivelmente intermediada pelos compostos fenólicos e potencial antioxidante presentes na espécie. O teste de barreira física confirma a atividade sistêmica do extrato. Entretanto, estudos mais específicos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesta atividade. *Passiflora cincinnata* Mast. não demonstrou toxicidade aos animais tratados oralmente com as doses testadas, garantindo assim a segurança para a pesquisa da atividade antiulcerogênica.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos o apoio financeiro advindo do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, através da CAPES, FUNCAP e CNPQ. A realização desta pesquisa contou com o apoio da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri e do Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal – LFQM e do Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte.

## REFERÊNCIAS

- Agra, M. F. (1982) Contribuição ao estudo das plantas medicinais na Paraíba. *Ciência e Cultura*. 33: 64-66.
- Agra, M. F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: *Editora União*, 1996.
- Agra, M. F.; Freitas, P. F. de; Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisons in Northeast of Brazil. *Rev bras Farmacogn*. 17(1): 114-140.
- Andrade, S. F. de; Lemos, M.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Cechinel-Filho, V.; Niero, R. (2007). Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*. 113:252-257.
- Arvouet-Grand, B.; Vennat, A.; Pourrat, P. (1994). Legret Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 49:462-468.
- Barros, M. P; Lemos, M.; Maistro, E. L.; Leite, M. F.; Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Andrade, S. F. (2008). Evaluation of antiulceractivity of the mains phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 120:372-377.
- Bernacci, L. C.; Meletti, L. M. M.; Soares-Scott, M. D.; Passos, I. R. S. (2005). Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds) *Maracujá germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*. 559-568.
- Carvalho, J. C. T. (2004). Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. *Tecmedd*. Ribeirão Preto-SP.
- Coleta, M.; Batista, M. T.; Campos, M. G.; Carvalho, R.; Cotrim, M. D.; Lima, T. C. & Cunha, A. P. (2006). Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytotherapy Research*. 20(12):1067-1073.
- Correia, R. C.; Araújo, F. P. de; Araújo, J. L. P. (2010). MARACUJÁ (*Passiflora cincinnata*) – alternativa para o incremento da fruticultura de sequeiro no semiárido brasileiro. *Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 21, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais. Natal: SBF.
- Das, D.; Bandyopadhyay, D.; Bhattacharjee, M.; Banerjee, R.K.; (1997). Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 23:8-18
- Dewanto, X.; Wu, K. K.; Adom, R.; Liu, H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3010-3014.

- Dhawan, K., Kumar, S.; Sharma, A. (2001). Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, 78:165-170.
- Djahanguiri, B.; Scand, J. (1969). *Gastroenterology*, v. 4(3):265-257.
- Emperaire, L. La Caatinga du sud-est du Piauí (Brésil): Étude Ethnobotanique. Paris: *Éd Recherche sur les civilisations*. 135p. 1983.
- Eswaran, M. B.; Surendran, S.; Vijayakumar, M.; Ojha, S. K.; Rawat, A. K. S.; Rao, Ch. V. (2010). Gastroprotective activity of *Cinnamomum tamala* leaves on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 128:537-540.
- Fernandes, H. B.; Silva, F. V.; Passos, F. F. B.; Bezerra, R. D. S.; Chaves, M. H.; Oliveira, F. A.; Oliveira, R. C. M. (2010). Gastroprotective effect of the ethanolic extract of *Parkia platycephala* Benth. leaves against acute gastric lesion models in rodents. *Biol Res*. 43:451-457.
- Gosmann, G.; Provensi, G.; Comunello, L. N.; Rates, S. M. K. (2011). Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Biociências*. 9(1): 88-89.
- Hayllar, J.; Bjarnason, I. (1995). NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. *Lancet*. 346:521-522.
- Hiruma-Lima, C. A.; Batista, L. M.; Almeida, A. B. A.; Magri, L. P.; Santos, L. C.; Vilegas, W.; Brito, A. R. M. S. (2009). Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). Ethnopharmacological communication. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:406-409.
- Holbik, M., Krasteva, S., Mayer, N., Kählig, H., Krenn, L. (2010). Apparently no sedative benzoflavone moiety in Passiflorae herba. *Planta Medica*, 76(7):662-664.
- Iversen, P. O.; Nicolaysen, G. (2003). Water-for life. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 123:3402-3405.
- Jesus, Z. Z. T. de.; Lima, J. C. S.; Silva, R. M. da.; Espinosa, M. M.; Martins, D. T. O. (2009). Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento –MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(1A):130-139.
- Kill, L. H. P.; Siqueira, K. M. M.; Araujo, F. P.; Trigo, S. P. M.; Feitoza, E. A.; Lemos, I. B. (2010). Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina (Pernambuco, Brasil). *Oecologia Australis*, Rio de Janeiro. 14(1): 115-127.
- Lapa, A. J; Souccar, C. S; Lima-Landman, M. T. R; Castro, M. S. A; Lima, T. C. M. (2008). *Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais*. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole.
- Lawinsky, P. R. (2010). *Caracterização Morfológica, Reprodutiva e Fenológica de Passiflora alata Curtis e Passiflora cincinnata Mast*. Dissertação (Mestrado em

Melhoramento Genético Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – Bahia. 134f.

Lessa, A. O. (2011). *Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial para processamento da polpa de frutas de maracujá das espécies silvestres (Passiflora setecia DC, Passiflora cincinnata Mast)*. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga – Bahia – Brasil, 83f.

Lima, Z. P.; Severi, J. A.; Pellizzon, C. H.; Brito, A. R. M. S.; Solis, P. N.; Cáceres, A.; Girón, L. M.; Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A. (2006). Can the aqueous decoction of mango flowers be used as antiulcer agent? *Journal of Ethnopharmacology*. 106:29–37.

Malone, M. H. (1977). Pharmacological Approaches to Natural Products Screening and Evaluation. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Edited by Wagner, H. and Wolff, P. – p.23-53; Spriger-Verlag, Berlin.

Martins, A. O. B. P. B. (2013). *Identificação do perfil químico e avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de Astronium fraxinifolium Schott e Spreng. (Gonçalavo)*. 94p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE.

Matos, F. J. A. (1989). *Plantas Mediciniais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Vol. II. Fortaleza: IOCE.

Meletti, L. M. M.; Furlani, P. R.; Álvares, V.; Soares-Scott, M. D.; Bernacci, L. C.; Filho, J. A. A. (2002). Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. *O Agrônomo*, Campinas. 54(1):30-33.

Meletti, L. M.; Soares-Scott, M. D.; Bernacci, L. C. (2005). Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27(2):268-272.

Mizui, T; Doteuchi, M. (1987). Effect of polyamines on acidific ethanol-induced gastric lesion in rats. *Jpn Pharmacol*. 33:939-945.

Mota, K. S. L.; Pita, J. C. L. R.; Estevam, E. C.; Medeiros, V. M.; Tavares, J. F.; Agra, M. F.; Diniz, M. F. F. M.; Silva, M. S.; Batista, L. M. (2008). Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3):441-446.

Nurit-Silva, K.; Agra, M. F.; Baracho, G. S. (2002) Estudo etnomedicinal e farmacobotânico comparativo entre *Passiflora foetida* L. e *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). *Rev Bras Farm*. 83(1-4):51-55.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline 425: *Acute Oral Toxicity: Modified Up-and-Down Procedure*, 2008.

- Pihan, G.; Regillo, C.; Szabo, S. (1987). Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosa injury. *Digestive Diseases and Sciences*. 32:1395-1401.
- Provinsi, G. (2007). *Investigação da atividade ansiolítica de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae)*. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 135f.
- Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA. (2002). *Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice*. *Scientia Pharmaceutica* 70: 135-145.
- Repetto, M. G.; Llessuy, S. F. (2004). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz J Med Biol Res* 35:523-534.
- Robert, A.; Nezamis, J. E.; Lancaster, C.; Hauchar, A. J. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*. 77:433-443.
- Rudnicki, M.; Oliveira, M. R.; Pereira, T. V.; Reginatto, F. H.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F. (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*.100(2):719-724.
- Rufino, M. S. M; Alves, R. E; Brito, S. E; Morais, M, S; Sampaio, C. G; Pérez-Jiménez, J; Saura-Calixto, D. F. (2007). *Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre*. Embrapa. Julho.
- Rufino, M. S. M; Alves, R. E; Brito, S. E; Morais, M, S; Sampaio, C. G; Pérez-Jiménez, J; Saura-Calixto, D. F. (2006).*Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela método de redução de ferro (FRAP)*. Embrapa. Dezembro.
- Salim, A. S. (1990). Removing oxygen derived free radicals stimulates healing of ethanol induced erosive gastritis in the rat. *Digestion*. 47:24-28.
- Singh, S.; Khajuria, A.; Teneja, S. C.; Khajuria, R. K.; Singh, J.; Johri, R. K.; Qazi, G. N. (2010). The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. *Phytomedicine*. 15:408-415.
- Singleton, V. L. R; Orthofer, R; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152–178.
- Teo S., Stirling D.; Thomas S.; Hoberman, A.; Kiorpes, A.; Khetani, V. (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of d methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicology*. 179:183-196.
- Vanderplanck, J. (2000). *Passion flowers*. 3. ed., Cambridge: The MIP Press, 224p.
- Wallace, J. L. (2001). Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med*. 110:19-23.



Zinkievich, J. M. S; George, S; Jha, J; Nandi, E. R.A. Levine. (2010). 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*. 37:654-661.

Zucarelli, V. (2007). *Germinação de sementes de Passiflora cincinnata Mast.: Fases, Luz, Temperatura e Reguladores Vegetais*. 111p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

**Anexo A** - Imagens do efeito da administração oral do EHFPC sobre as lesões gástricas induzidas por diferentes agentes indutores.

### **Etanol Absoluto**

Salina 0,9%      Omeprazol      EHFPC 50mg/kg      EHFPC 100mg/kg      EHFPC 200mg/kg

### **Etanol Acidificado**

Salina 0,9%      Omeprazol      EHFPC 50mg/kg      EHFPC 100mg/kg      EHFPC 200mg/kg

### **Indometacina**

Salina 0,9%      Omeprazol      EHFPC 50mg/kg      EHFPC 100mg/kg      EHFPC 200mg/kg

### **Teste de Barreira Física**



Salina 0,9%      EHFPC 50mg/kg, v.o.      EHFPC 50mg/kg, v.ip.

Anexo B– Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CAMPUS CARIRI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

ANÁLISE de PROJETO						
Nº de protocolo	10/2012					
Nome do projeto	Avaliação do Perfil Químico, Toxicológico e Farmacológico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de Passiflora cincinnata MAST					
Pesquisador Responsável	Ana Luiza de Albuquerque Siebra					
Situação	Aprovado	X	Reprovado		Pendente	
Data da primeira análise			Data do parecer final	15	03	2013

PARECER

Na qualidade de Relator, designado para examinar parecer pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará no Cariri CEUA/UFC/CARIRI, ratifico a manifestação, que conclui na APROVAÇÃO, do projeto acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos

Observação: O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa à CEUA

Barbalha - CE, 15 de março de 2013

Francisco Maurício Teles Freire  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

## *Capítulo 2*

---

CLAE e avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.

Este capítulo está formatado para publicação na revista Phytotherapy Research

---

## CLAE e avaliação da atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.

Ana Luiza de Albuquerque Siebra<sup>1</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup>, Larissa Rolim de Oliveira<sup>1</sup>, Gerlânia de Oliveira Leite<sup>1</sup>, David de Carvalho Siebra<sup>2</sup>, Aline Augusti Bolignon<sup>3</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>3</sup>, Irwin Rose Alencar Menezes<sup>4</sup>, Marta Regina Kerntopf<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Aluna do Mestrado em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato-CE, Brasil. E-mail: [analu\\_farm@yahoo.com.br](mailto:analu_farm@yahoo.com.br); [anitaoliveira24@yahoo.com.br](mailto:anitaoliveira24@yahoo.com.br); [larissarolim.ufcg@hotmail.com](mailto:larissarolim.ufcg@hotmail.com);

<sup>2</sup>Professor Universidade Federal do Ceará Campus Cariri, Faculdade de Medicina, UFC. Barbalha – CE, Brasil. [david.siebra@hotmail.com](mailto:david.siebra@hotmail.com)

<sup>3</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria – RS, Brasil. [alinebolignon@hotmail.com](mailto:alinebolignon@hotmail.com).

<sup>4</sup> Professor DSc Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato-CE, Brasil. [irwinalencar@yahoo.com.br](mailto:irwinalencar@yahoo.com.br); [martakerntopf@yahoo.com.br](mailto:martakerntopf@yahoo.com.br).

\*Corresponding author:

Ana Luiza de Albuquerque Siebra. Departamento de Química Biológica. Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato (CE), Brasil. Endereço: Rua Cel. Antônio Luis, 1161, Pimenta, CEP: 63105-00. Fone:+55 (88) 3102 1212; Fax: +55 (88) 3102 1291. E-mail: [analu\\_farm@yahoo.com.br](mailto:analu_farm@yahoo.com.br)

### RESUMO

*Passiflora cincinnata* Mast é utilizada tradicionalmente na medicina popular brasileira, especialmente na região Nordeste. O presente estudo investigou o teor de ácidos fenólicos e flavonoides através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC), obtido pela maceração das folhas secas em solução hidroalcoólica 1:1. A atividade cicatrizante de lesões cutâneas induzidas no dorso de camundongos foi avaliada através da mensuração da velocidade de fechamento das feridas (Vff) e do percentual de contração (%C) das mesmas. Através de CLAE identificou-se a quercetina, dentre outros, como sendo o componente majoritário do EHFPC. A Vff mostrou-se maior no grupo tratado com EHFPC, quando comparado aos grupos controles (Natrosol e Dexametasona). O %C foi maior no grupo tratado com EHFPC, com 99,54% e os controles demonstraram perfis semelhantes, com 75,22% e 74,70%, respectivamente. O presente estudo concluiu que o EHFPC apresenta atividade cicatrizante, provavelmente induzida por sua composição química que confere à espécie propriedades antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante.

*Keywords:* *Passiflora cincinnata* Mast., atividade cicatrizante, dexametasona, CLAE, flavonoides, quercetina

### INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular, objetivando o reparo tecidual. Desta forma, o tratamento de feridas busca o fechamento rápido da lesão, de forma a se obter cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (Singer e Clark, 1999; Mendonça e Coutinho-Netto, 2009). Constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, envolvendo inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação, surgindo como resposta tecidual às lesões, sejam induzidas por traumatismo ou por procedimentos cirúrgicos (Carrico *et al.*, 1984; Garros *et al.*, 2006).

Mesmo com a predominância de substâncias sintéticas no arsenal terapêutico para o tratamento de feridas, nos últimos anos têm-se verificado a retomada da valorização de práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como populares ou não científicas, inclusive a lenta reincorporação de plantas medicinais como alternativa ou complemento terapêutico (Garros *et al.*, 2006).

Durante séculos tem-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças dermatológicas, principalmente aquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução. (Raskin *et al.*, 2002; Hsu, 2005; Parente *et al.*, 2009).

As várias espécies de *Passiflora*, além dos seus valores exóticos e ornamentais, podem vir a ser fontes úteis de novas moléculas que poderão ser potentes fitofármacos no futuro (Dhawan *et al.*, 2004).

A família Passifloraceae é composta por cerca de 19 gêneros e 530 espécies, com distribuição tropical e subtropical, especialmente na América e África. Desses

gêneros, quatro ocorrem no Brasil, com cerca de 130 espécies, que se destaca como o maior produtor mundial de maracujá, sendo a região Nordeste a principal produtora, responsável por 44% da produção, com ênfase para os estados da Bahia, Ceará e Sergipe. As pesquisas com maracujazeiros estão direcionadas às espécies cultivadas, tais como *Passiflora edulis*. Entretanto, existem várias espécies silvestres de maracujazeiros com potencial agrônômico que não têm recebido atenção da pesquisa, como por exemplo, *Passiflora cincinnata* Mast., espécie de ocorrência espontânea na região semi-árida do Nordeste brasileiro (Bernacci, 2003a; Ferreira, 2005; Agriannual, 2006; Araújo *et al.*, 2008).

Conhecida popularmente como maracujá-do-mato, *Passiflora cincinnata* Mast. é descrita como uma espécie nativa da caatinga, utilizada com fins nutricionais, medicinais e ornamentais, sendo empregada também como fonte de genes em programas de melhoramento genético (Bernacci *et al.*, 2003b; Kill *et al.*, 2010; Zucarelli, 2007; Vanderplanck, 2000; Meletti *et al.*, 2002; Lawinsky, 2010). Em levantamento realizado por Agra *et al.*, 2007, no Nordeste brasileiro, esta espécie tem sido relatada pelos nativos, como indicada no tratamento de doenças venéreas e hemorroidas. O infuso de toda a planta é indicado no tratamento de inflamações e insônias, (Agra, 1982), como sedativo, hipotensivo e antigripal (Empereire, 1983). Folhas e frutos são indicados contra hipertensão, tosses, inflamações e como calmante (Agra, 1996; Nurit-Silva *et al.*, 2002).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (Matos, 1989).

Pesquisas a respeito da atuação farmacológica das plantas medicinais na cicatrização, em sua maioria, não especificam sobre quais fases desse processo a atividade foi evidenciada (Krishnan, 2007; Parente *et al.*, 2009). Desta forma, a análise da cinética dos eventos biológicos envolvidos no processo de cicatrização em resposta a novas substâncias farmacológicas é importante para o desenvolvimento de produtos terapêuticos eficientes, capazes de estimular a cicatrização (Alborova *et al.*, 2007; Barreto *et al.*, 2013).

A proposta deste trabalho fundamenta-se na avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. na cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em camundongos, além da determinação, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dos constituintes majoritários da referida espécie, no sentido de investigar em qual fase do processo cicatricial exerce sua ação.

## **METODOLOGIA**

**Material botânico.** Folhas da espécie *Passiflora cincinnata* Mast. foram coletadas no município de Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado pela Sra. Ana Moraes Mendonça, e uma exsicata está depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob o número de tombo: HCDAL 8097.

**Preparo do extrato.** O material vegetal colhido foi transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de sanidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas), lavado e submetido à secagem natural até que o excesso de umidade fosse extraído, e o



material pudesse ser manuseado. A seguir foi triturado, a fim de aumentar a sua superfície de contato com o material solvente a ser utilizado no processo de maceração. A massa obtida foi submersa em uma solução hidroalcoólica (1:1), por um período de 72 horas. O extrato foi filtrado e em seguida concentrado em evaporador rotativo e banho-maria. Após este processo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. foi congelado e encaminhado ao processo de liofilização.

**Análise Cromatográfica.** A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi a técnica utilizada para a quantificação dos ácidos fenólicos gálico, clorogênico, elágico e cafeico, e dos flavonoides quercetina, quercitrina, rutina, campferol, catequina e epicatequina, identificados diante da comparação entre o seu tempo de retenção e do espectro de absorção de UV, com o uso dos padrões comerciais, seguindo a metodologia de Laghari *et al.* (2011). Todas as operações cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente e triplicata.

**Animais.** Foram utilizados 24 camundongos *Swiss (Mus musculus)*, com massa corpórea entre 20-30 g, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados no Biotério da Faculdade de Medicina – UFC Cariri, em conformidade com as normas e procedimentos em biossegurança aplicada para biotérios. Os animais foram mantidos, em dupla, em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha irradiada, que foi trocada três vezes por semana. A temperatura ambiente foi mantida em torno de  $23 \pm 2$  °C. O fotoperíodo foi controlado para prover luz durante 12 horas diárias (6:00 às 18:00 horas). Tiveram livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®). Todos os procedimentos seguiram as normas de utilização de animais, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, protocolado sob o número: 10/2012.

**Delineamento experimental.** Após período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas (dois animais/gaiola), e divididos em três grupos: Grupo Natrosol, em que as lesões nos animais foram tratadas topicamente com gel de Natrosol; Grupo EHFPC 10%, onde as lesões foram tratadas topicamente com gel do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast., na concentração de 100 mg/g e o Grupo Dexametasona, no qual as lesões foram tratadas topicamente com gel à base de Dexametasona, na mesma concentração do grupo EHFPC.

**Procedimento cirúrgico.** Para todos os procedimentos dolorosos e/ou situações de estresse, foi administrada anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), por via intramuscular. 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), seguida de demarcação e incisão da área da ferida, com *punch* de biópsia estéril de seis milímetros com lâmina cortante na borda, que se estendeu até a fáscia muscular. Os tratamentos foram aplicados imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma vez ao dia, com auxílio de hastes plásticas estéreis.

**Tratamento das feridas.** As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 15 dias. A cada nova reposição do tratamento, as lesões foram lavadas com solução fisiológica a 0,9% para a 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 quanto ao 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 gaze estéreis, para que as áreas das feridas fossem registradas fotograficamente, nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós-cirúrgico. Em seguida, incisões

abrangendo a área da lesão e a pele íntegra, de dois milímetros, foram realizadas em dois animais de cada grupo, a cada dia de análise, e encaminhadas para análise histopatológica. Após tratamento, os animais seguiram para recuperação em suas respectivas gaiolas, devidamente higienizadas.

**Formulação do gel de EHFPC a 10% (100 mg/g), para uso tópico na atividade cicatrizante.** Gel de natrosol: Dissolveu-se o nipagim - nome comercial de metilparabeno - em água aquecida a 70°C, e aos poucos foi adicionando o natrosol – hidroxietilcelulose - sob agitação lenta e constante, até a dissolução completa. Logo após esse processo, o material foi resfriado a 40°C, intercalando com um repouso e adicionando o Germall - Imidazolidinil. Ao final do preparo, o gel apresentou as seguintes características: gel transparente, incolor ou levemente amarelado, com pH variando entre 5 e 6. Gel de EHFPC a 10% : O extrato foi diluído em água, e a este foi incorporado o gel de natrosol, aos poucos, através de uma homogeneização sincronizada, a fim de se obter a concentração final de 100mg/g.

**Percentual de Contração da ferida (%C).** As feridas de cada animal foram fotografadas digitalmente a uma distância fixa de 40 cm (Nikon D90 SLR Digital com lente Nikon 18-105 mm VR) a 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a indução do ferimento. As fotografias digitais das feridas cutâneas foram transferidas para um computador e convertidas para o formato de arquivo *Joint Photographic Experts Group File Format* (JPEG). Estas imagens foram processadas e utilizadas para medir a área da ferida utilizando o *Software Image J 1.3.1* (NIH, Estados Unidos). A área média das feridas foi expressa como uma porcentagem da área inicial (dia 0), utilizando a equação:

$$\%C = 100 * (Ad0 - Ada) / Ad0$$

onde, Ad0 = área da ferida no dia 0 e Ada = área da ferida no dia da análise.

**Mensuração da velocidade de cicatrização de feridas cutâneas (VCFc).** A velocidade de cicatrização de feridas cutâneas foi calculada usando a equação:

$$VCFc = \%C / dac$$

onde, dac é o dia de análise da cicatrização da ferida e %C é o percentual de cicatrização da ferida. A VCFc foi expressa em cm<sup>2</sup>/dia.

**Análise estatística.** Os resultados da atividade cicatrizante estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A avaliação estatística dos dados foi realizada usando a análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste de múltipla comparação de Newman Keuls.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A quantificação de compostos através do emprego da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 257 nm para o ácido gálico, 280 nm para a catequina e epicatequina, 325 nm para os ácidos clorogênico, elágico e caféico, e 365 para a quercetina, quercitrina, campferol e rutina. Os picos foram confirmados por cromatografia comparando o seu tempo de retenção com os de padrões de referência e pelos espectros de DAD (200 a 600 nm). Curva de calibração para o ácido gálico:  $Y = 12540x + 1198,5$  ( $r = 0,9997$ ); ácido clorogênico:  $Y = 13057x + 1356,1$  ( $r = 0,9999$ ), ácido cafeico:  $Y = 12965x + 1288,4$  ( $r = 0,9991$ ), ácido elágico:  $Y = 15173x + 1185,5$  ( $r = 0,9994$ ); catequina:  $Y = 13542x + 1267,3$  ( $r = 0,9996$ ), epicatequina:  $Y = 14258x + 1529,7$  ( $r = 0,9991$ ); rutina:  $Y = 14756x + 1198,7$  ( $r = 0,9993$ ), a quercetina:  $Y = 15071x + 1241,6$  ( $r = 0,9985$ ); quercitrina:  $Y = 11691x + 1353,0$  ( $r = 0,9989$ ) e o campferol:  $Y = 13077x + 1241,9$  ( $r = 0,9998$ ).

Os valores estão representados em porcentagens, sendo a quercetina (pico 9) o componente majoritário do EHFPC, seguido dos demais compostos, em ordem decrescente: ácido cafeico (pico 4), epicatequina (pico 6), ácido clorogênico (pico 3), rutina (pico 7), ácido gálico (pico 1), ácido elágico (pico 5), quercetina (pico 8), catequina (pico 2) e campferol (pico 10) (Figura 1, Tabela 1).

O flavonoide quercetina, componente majoritário do EHFPC, é um antioxidante geralmente encontrado nos alimentos na forma glicosilada. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção. A atividade antioxidante efetiva deve-se às suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos conferindo, assim, proteção aos tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A atividade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2\text{-}\bullet$ ), que são espécies altamente reativas, e envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Os flavonoides possuem, ainda, propriedades estabilizadoras da membrana, o que pode afetar alguns processos do metabolismo intermediário. A quercetina sequestra radicais de oxigênio ( $\bullet\text{OH}$  e  $\text{O}_2\text{-}\bullet$ ), inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica. O radical hidroxil e o ânion superóxido estão envolvidos no dano tecidual por iniciarem a peroxidação lipídica e desrupção da matriz intersticial. É conhecida também por suas propriedades quelante e estabilizadora do ferro (Crespy *et al.*, 1999; Kandaswami, 1994; Galati *et al.*, 2002; Kahraman *et al.*, 2003; Behling *et al.*, 2004).

Os flavonoides encontrados em *Passiflora* são do tipo C-glicosídeos, que são pigmentos polifenólicos abundantes em plantas, possuindo atividade biológica e interesse quimiotaxonômico, sendo também frequentemente utilizadas como “marcadores” na análise de medicamentos fitoterápicos (Qimin *et al.*, 1991; Bokstaller e Schmidt, 1997; Pereira e Vilegas, 2000).

Os flavonoides possuem vários efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e vasodilatadora. Promovem a inibição da peroxidação lipídica e reduzem o risco de doenças cardiovasculares, efeitos estes relacionados à sua atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais livres em organismos vivos. (Hollman e Katan, 1997; Hollman e Katan, 1999; Havsteen, 1983; Hollman *et al.*, 1996; Cook e Samman, 1996; Zeraik *et al.*, 2010). Segundo Volpi e Bergonzini (2006), os flavonoides e os ácidos fenólicos também apresentam atividades antibacteriana, antiviral e antioxidante.

É importante destacar que a fração flavonoídica está sujeita a variações no seu conteúdo, influenciada, por exemplo, pela época da colheita do material vegetal, a parte da planta que constitui a droga, o local do cultivo e a metodologia de análise empregada (Pereira e Vilegas, 2000). Esta informação pode explicar, por exemplo, a grande variedade de compostos fenólicos e flavonoídicos relatados no levantamento realizado por Gosmann *et al.*, (2011), que destaca a composição química e aspectos farmacológicos de algumas espécies de *Passiflora*, relacionando-os com as atividades antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante confirmadas em diversos experimentos. Neste estudo, a análise macroscópica do dorso dos camundongos tratados mostrou a evolução do reparo tecidual do ferimento cutâneo, ausência de hemorragia e secreção purulenta nos diferentes tratamentos (Natrosol, Dexametasona e EHFPC), e nos diferentes tempos de observação (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós-operatório). Durante o processo de cicatrização, houve exsudação e formação de crostas a partir do terceiro dia de tratamento até o último dia, nos grupos tratados com Natrosol e Dexametasona. No grupo tratado com EHFPC, crostas delicadas e exsudato apareceram discretamente no início da observação e o processo de epitelização evidenciou-se a partir do nono dia de análise. Houve evolução para tecido de maturação e crescimento de pelos ao redor da

incisão em todos os animais (Figura 2). As avaliações clínicas diárias indicaram adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para a ingestão de ração e água, em ambos os grupos.

O processo de cicatrização acontece naturalmente, até o restabelecimento da homeostase do tecido lesionado, a menos que fatores de risco, tais como infecções e reação inflamatória excessiva comprometam o processo de reparação (Lopes *et al*, 2005). A crosta é considerada uma cobertura natural para proteger as feridas contra bactérias e como auxílio na regeneração epitelial. Entretanto, têm-se notado que feridas sem crosta cicatrizam mais rapidamente, uma vez que fluidos podem se acumular em baixo destas e favorecer infecções. A crosta também pode interferir na cicatrização, evitando o processo de contração da ferida (Novato *et al*, 2000). Na prática, quando uma ferida é feita experimentalmente, independentemente da sua forma, as forças elásticas na pele adjacente irão aumentar consideravelmente a área da lesão, originando, assim, a forma correspondente das linhas de tensão locais (Montandon *et al.*, 1977 *apud* Lopes *et al.*, 2005).

A figura 3 ilustra a velocidade de fechamento das feridas ( $\text{cm}^2/\text{dia}$ ) em função do tempo (dias) das lesões após os diferentes tratamentos (Natrosol, Dexametasona e EHFPC). Os dados indicam que a velocidade de fechamento é crescente nos três primeiros dias para o grupo tratado com Natrosol e EHFPC. No grupo tratado com Dexametasona, observa-se o aumento do tamanho da lesão e, conseqüentemente, a diminuição da velocidade de fechamento, que se torna mais evidente na observação da lesão ao sexto dia de tratamento. Ao 6º dia, o grupo tratado com EHFPC destaca-se quando comparado aos demais, mostrando diferenças estatisticamente significantes, inclusive no 9º e 12º dias de tratamento, evidenciando o potencial cicatrizante do EHFPC. No 9º, 12º e até o 15º dias de observação, os grupos tratados com Natrosol e

Dexametasona exibiram comportamentos (estatísticos) semelhantes, com a velocidade de fechamento das feridas significativamente inferior ao grupo tratado com EHFC.

A comparação do percentual de contração das feridas mostrada na Tabela 2, corrobora com os dados da velocidade de fechamento das feridas. É interessante destacar as diferenças do percentual de contração no último dia de observação, no qual os grupos Natrosol e Dexametasona exibem percentuais semelhantes, de 75,22% e 74,70% respectivamente, e o grupo tratado com EHFPC apresenta percentual de contração de 99,54%.

A recuperação da arquitetura e da funcionalidade do tecido lesionado envolve a sobreposição de processos complexos, tais como inflamação, contração da ferida, angiogênese, deposição de matriz e remodelação tecidual. Todos estes eventos são integrados e ocorrem durante as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação no processo de cicatrização de feridas (Velnar *et al.*, 2009).

Segundo McGrath e Simon (1983), a cicatrização da ferida apresenta três fases: a primeira, denominada pré-exponencial e que dura em média dois dias, é caracterizada pelo aumento da área da ferida, como consequência da retração das margens cutâneas. Após este período, a área começa a regredir rapidamente e em seguida, mais lentamente, constituindo a segunda fase, chamada exponencial. A última fase (pós-exponencial) finaliza a contração e assim, a cicatrização da ferida.

A reação inflamatória promove a exsudação de células leucocitárias que fagocitam e destroem agentes lesivos, resíduos tissulares e tecido necrótico, sendo necessária para a boa resposta da reparação tecidual (Mandelbaum *et al.*, 2003). Embora fundamental para a sinalização ativa de células de reparo e de síntese proteica, a concentração excessiva de espécies reativas de oxigênio promove elevada atividade



inflamatória. O processo de reposição volêmica produz radicais livres que levam danos adicionais aos tecidos lesionados (Barbosa *et al.*, 2007).

Os glicocorticoides, dentre eles a dexametasona, prejudicam o processo de cicatrização provavelmente pelo decréscimo da proliferação celular, da neovascularização e da produção de matriz extracelular. Relata-se também retardo no afluxo de neutrófilos e fibroblastos. Atribui-se ainda aos corticosteroides a supressão da fase inflamatória da cicatrização (Ehrlich, Hunt, 1968; Fässler *et al.*, 1996; Pierce, Mustoe, 1989; Leibovich, Ross, 1975 *apud* Tenius *et al.*, 2007). Estas informações justificam a diminuição da velocidade de fechamento das feridas observada no grupo tratado com Dexametasona, especialmente nos primeiros dias de análise, correspondentes à fase inflamatória do processo de cicatrização.

Por outro lado, o acúmulo de líquido inflamatório é indesejável, uma vez que limita a capacidade das células reparadoras migrarem para o interior da ferida, aumentando o risco de infecção. Uma reação inflamatória exacerbada pode prejudicar o processo de reparo por promover edema e quantidade excessiva de exsudato, que favorecem a deiscência, o crescimento bacteriano e a inibição da proliferação de fibroblastos e da deposição de colágeno (Cotran *et al.*, 2009).

O tratamento foi realizado até o 14º dia de pós-operatório pois, ao 15º dia de observação, as feridas do grupo tratado com EHFPC encontravam-se quase que em sua totalidade cicatrizadas, com fechamento total dos bordos, ao mesmo tempo em que as lesões dos grupos tratados com Natrosol e Dexametasona ainda necessitavam de tempo para a resolução do processo cicatricial.

A diminuição da área lesionada ocorre por mecanismo de contração e movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro, com o intuito de

diminuir a área a ser recoberta pelo epitélio em proliferação, caracterizando a cicatrização por segunda intenção (Oliveira, 2008).

A maior velocidade de fechamento das feridas observada entre o 7º e o 14º dia de pós-operatório se justifica por este período corresponder à fase de fibroplasia da cicatrização, com a presença de fibroblastos e miofibroblastos (responsáveis pela contração da ferida), que são um tipo especializado de células formada por fibroblastos que sofreram alterações fenotípicas e passaram a produzir proteínas contráteis de actina e miosina, constituindo a maior população de células encontradas no tecido de granulação maduro (Rudolph, 1992).

Alguns estudos confirmam a atividade cicatrizante de espécies de *Passiflora*, como mostrado no trabalho de Gonçalves-Filho e colaboradores (2006), em que o cataplasma feito com folhas de *Passiflora edulis* é utilizado como cicatrizante, para tratar infecções e inflamações cutâneas no interior do Brasil. O extrato hidroetanólico desta mesma espécie, quando administrado na cavidade peritoneal de ratos no perioperatório, influenciou favoravelmente a cicatrização de gastrorrafias (Da Silva *et al.*, 2006), laparotomias medianas (Gomes *et al.*, 2006) e anastomoses colônicas (Bezerra *et al.*, 2006). O extrato hidroetanólico de *Passiflora edulis* aplicado topicamente não apresentou efeito significativo sob aspecto macroscópico, mas microscopicamente induziu o aumento na colagenização e proliferação de fibroblastos em feridas cutâneas dorsais em ratos (Garros *et al.*, 2006).

A ação do EHFPC no processo de cicatrização pode ser explicada pela sua composição rica em compostos fenólicos, que são substâncias com atividades farmacológicas em plantas e que são utilizadas para melhorar a eficácia do processo de cicatrização em feridas e úlceras. Agem como antioxidantes, combatendo os radicais

livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, além de possuírem atividade antiinflamatória (Vieira *et al.*, 2008).

## **CONCLUSÃO**

A análise do processo de cicatrização, sob os pontos de vista clínico e macroscópico, permitiu concluir que o uso do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em camundongos, por promover reação inflamatória menos intensa e maior velocidade de fechamento das feridas, quando comparado aos grupos tratados com gel de Natrosol e Dexametasona, o que pode ser explicado pela atividade antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante desta espécie, através de seus metabólitos secundários de origem fenólica e flavonoídica, caracterizados neste estudo através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho recebeu o apoio do CNPQ e FUNCAP.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Agra MF, Freitas PF de, Barbosa-Filho JM. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisons in Northeast of Brazil. *Rev bras farmacogn* **17** (1): 114-140.
- Agra MF. 1982. Contribuição ao estudo das plantas medicinais na Paraíba. *Ciência e Cultura*. **33**: 64-66.
- Agra MF. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: Editora União, 1996.
- Agriannual 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2006, 359-365.
- Alborova A, Lademann J, Meyer L, Kramer A, Patzelt A, Sterry W, Antoniou C. 2007. Application of laser scanning microscopy for the characterization of wound healing. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip 2*, Doc **37**.
- Araújo FP, Silva N, Queiroz MA. 2008. Divergência entre acessos CE *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. *Rev Bras Frutic* **30** (3): 723-730.
- Barbosa E, Moreira EAM, Faintuch J, Pereira MJ. 2007. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. *Rev. Nutr* **20** (6): 693- 702.
- Barreto RSS, Albuquerque-Júnior, RLC, Pereira-Filho RN, Quintans JSS, Barreto AS, DeSantana JM, Santana-Filho VJ, Santos MRV, Bonjardim LR, Araújo AAS, Quintans-Júnior L. 2013. Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **23** (2): 310-319.
- Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MLP. 2004. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim Nutr* **15** (3): 285-292.
- Bernacci LC, Meletti LMM, Soares-Scott M D, Passos IRS 2003b. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Eds) *Maracujá* germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 559-568.
- Bernacci LC. Passifloraceae. In: Wanderley ML, Shepherd GJ, Giuliett AM, Melhem TS (Coord.). 2003a. Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: *FAPESP* **3**: 247-248.
- Bezerra, J.A., Campos, A.C., Vasconcelos, P.R., Nicareta, J.R., Ribeiro, E.R., Sebastião, A.P., Urdiales, A.I., Moreira, M. e Borges, A.M., 2006. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *ActaCirúrgica Brasileira*, 21(3), 16-25.
- Bokstaller S, Schmidt PC. 1997. A comparative study on the content of passionflower flavonoides and sesquiterpenes from valerian root extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. *Pharmazie* **52** (7): 552-557.

Carrico, TJ, Mehrhof AI Jr, Cohen IK. 1984. Biology of wound healing. *Surg Clin North Am* **44** (4): 721-733.

Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem* **7**: 66-76.

Cotran, RS, Kumar V, Collins T. 2009. Robbins patologia funcional e estrutural. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan **1252p**.

Crespy V *et al.*, 1999. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* **277**: 120- 126.

Da Silva, J.R.S., Campos, A.C.L., Ferreira, L.M., Aranha-Junior, A.A., Thiede, A., Zago-Filho, L.A., Bertoli, L.C., Ferreira, M., Trubian, P.S., Freitas, A.C.T., 2006. Efeito do extrato da *Passiflora edulis* na cicatrização de gastrorrafias em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21(suplemento 2), 50-58.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* **94**: 1-23.

Ehrlich HP, Hunt TK. 1968. The effects of cortisone and anabolic steroids on the tensile strength of healing wounds. *Ann Surg* **167**: 324-328.

Empereire L. La Caatinga du sud-est du Piauí (Brésil): Étude Ethnobotanique. Paris: Éd Recherche sur les civilisations. **135p**. 1983.

Fässler, R., Sasaki, T., Timpl, R., Chu, M.L., Werner, S., 1996. Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res* **222**, 111-116.

Ferreira FR. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF. 2005. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. **2**: 41-51.

Galati G *et al.* 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* **177**: 91- 104.

Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB, Oliveira RM, Arruda ECM. 2006. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira* **21** (3): 55-63.

Giesbrecht, P.C.P. 2011. Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência Animal do Centro Universitário Vila Velha. Vila Velha, ES. 62f.

Gomes, C.S., Campos, A.C.L., Torres, O.J.M., Vasconcelos, P.R.L., Moreira, A.T.R., Tenório, S.B., Tâmbara, E.M., Sakata, K., Júnior, H.M. & Ferrer, A.L.S., 2006. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21(suplemento 2), 7-14.

- Gonçalves-Filho, A., Torres, O.J.M., Campos, A.C.L, Tâmbara-Filho, R., Rocha, L.C.A., Thiede, A., Lunedo, S.M.C., Barbosa, R.E.A., Bernhardt, J.A., Vasconcelos, P.R.L., 2006. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21(suplemento 2), 1-6.
- Gosmann G, Provensi G, Comunello LN, Rates SMK. 2011. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Biociências*. **9**(1): 88-89.
- Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharm* **32**:1141-1148.
- Hollman PC, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* **37**: 937-942.
- Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* **57**: 43-46.
- Hollman PCH, Katan MB. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* **51**: 305-310.
- Hsu S. 2005. Green tea and the skin. *Journal of American Academy of Dermatology* **52**: 1049-1059.
- Kahraman A *et al.* 2003. Protective effect of quercetina on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Nephrol* **16** (2): 219-224.
- Kandaswami C, Middleton EJR. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv Exp Med Biol* **366**: 351-376.
- Kill LHP, Siqueira KMM, Araujo FP, Trigo SPM, Feitoza EA, Lemos IB. 2010. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina (Pernambuco, Brasil). *Oecologia Australis* **14** (1): 115-127.
- Krishnan P. 2007. The scientific study of herbal wound healing therapies: current state of play. *Current Anesthesia & Critical Care* **7**: 21-27.
- Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A. 2011. Determinação de ácidos fenólicos livres e atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de frutos e folhas de *Chenopodium album*. *Food Chemistry* **126**: 1850-1855.
- Lawinsky PR. 2010. Caracterização Morfológica, Reprodutiva e Fenológica de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora cincinnata* Mast. **134f**. *Dissertação* (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – Bahia.
- Leibovich, S.J., Ross, R., 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* **78**, 71-100.
- Lopes GC, Sanches ACC, Nakamura CV, Dias-Filho BP, Hernandez L, Mello JCP. 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and

*Stryphnodendron obovatum* Benth on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **9**: 265-272.

Mandelbaum, SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHSA. 2003. Cicatrization: current and auxiliary resources – Part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **78** (4): 393-410.

Matos FJA. 1989. *Plantas Mediciniais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. Vol. II. Fortaleza: IOCE.

McGrath MH, Simon RF. 1983. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. *Plastic and Reconstructive Surgery* **72** (1): 66 – 72.

Meletti LMM, Furlani PR, Álvares V, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Filho JAA. 2002. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. *O Agrônomo* **54** (1): 30-33.

Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. 2009. Aspectos celulares da cicatrização. Review. *A Bras Dermatol* **84** (3): 257-262.

Montandon D, D'andiras G, Gabbiani G. 1977. The mechanism of wound contraction and epithelialization. In: Oliveira AF. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. UFERSA, Mossoró –RN – Brasil. 2008.

Novato DA. Tratamento de ferida uma contribuição ao ensino de enfermagem [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

Nurit-Silva K, Agra MF, Baracho GS. 2002. Estudo etnomedicinal e farmacobotânico comparativo entre *Passiflora foetida* L. e *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). *Rev Bras Farm* **83** (1-4): 51-55.

Oliveira AF. 2008. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. UFERSA, Mossoró –RN – Brasil.

Parente LML Silva MSB, Lino-Júnior RS, Paula JR, Trevenzol LMF, Zatta DT, Paulo NM. 2009. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. *Rev Bras Pl Med* **11** (4): 383-391.

Pereira CAM, Vilegas JHY. 2000. Review: Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Rev Bras Pl Med* **3** (1): 1-12.

Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Gramates, P., Deuel, T.F., 1989. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 2229-2233.

- Qimin L, Heuvel VD, DeLorenzo O, Corthout J, Pieters LAC, Vlietinck AJ, Claeys M. 1991. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonóides isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). *Journal of Chromatography* **562** (1/2): 435-446.
- Raskin L et al. 2002. Plants and human health in the twentyfirst century. *Trends in Biotechnology* **20** (12): 522-531.
- Rudolph R, Van Der Berg J, Ehrlich HP. Wound contraction and scar contracture. In: Cohen K, Diegelmann RF, Lindblad WJ. *Wound healing, biochemical and clinical aspects*. WB Saunders **p. 96**. 1992.
- Singer AJ, Clark R. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**: 738-746.
- Tenius FP, Ioshii, SO, Biondo-Simões MLP, 2007. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *An Bras Dermatol* **82** (2): 1411-149.
- Vanderplanck J. 2000. *Passion flowers*. 3. ed., Cambridge: The MIP Press **224p**.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research* **37**: 1528-1542.
- Vieira, A.P., Santos, N.R., Borges, J.H.S, Vincenzi, M.P.A., Schmitz, W.O., 2008. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Semina. Ciências Biológicas e da Saúde* 29 (suplemento 1), 65-74.
- Volpi N, Bergonzini G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **42**: 354-361.
- Zeraik ML, Pereira CAM, Zuin VG, Yariwake JH. 2010. Maracujá: um alimento funcional? *Revista Brasileira de Farmacognosia* **20** (3): 459-471.
- Zucarelli V. 2007. Germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.: Fases, Luz, Temperatura e Reguladores Vegetais. **111p**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.



**Tabela 1:** Flavonoides e ácidos fenólicos determinados por CLAE no extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.

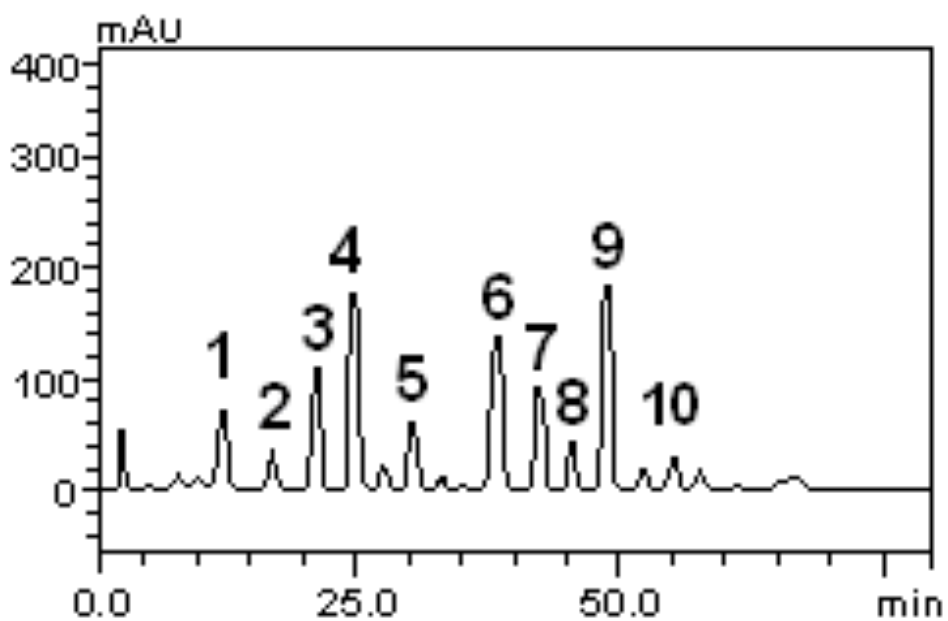
<b>Compostos</b>	<b>Percentual</b>
<b>Ácido gálico (P1)</b>	0,45 ± 0.02 a
<b>Catequina (P2)</b>	0,21 ± 0.01 b
<b>Ácido clorogênico (P3)</b>	0,72 ± 0.03 c
<b>Ácido caféico (P4)</b>	1,09 ± 0.02 d
<b>Ácido elágico (P5)</b>	0,41 ± 0.01 a
<b>Epicatequina (P6)</b>	0,83 ± 0.03 e
<b>Rutina (P7)</b>	0,69 ± 0.04 c
<b>Quercitrina (P8)</b>	0,35 ± 0.01 b
<b>Quercetina (P9)</b>	1,18 ± 0.02 d
<b>Camferol (P10)</b>	0,15 ± 0.01 f

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

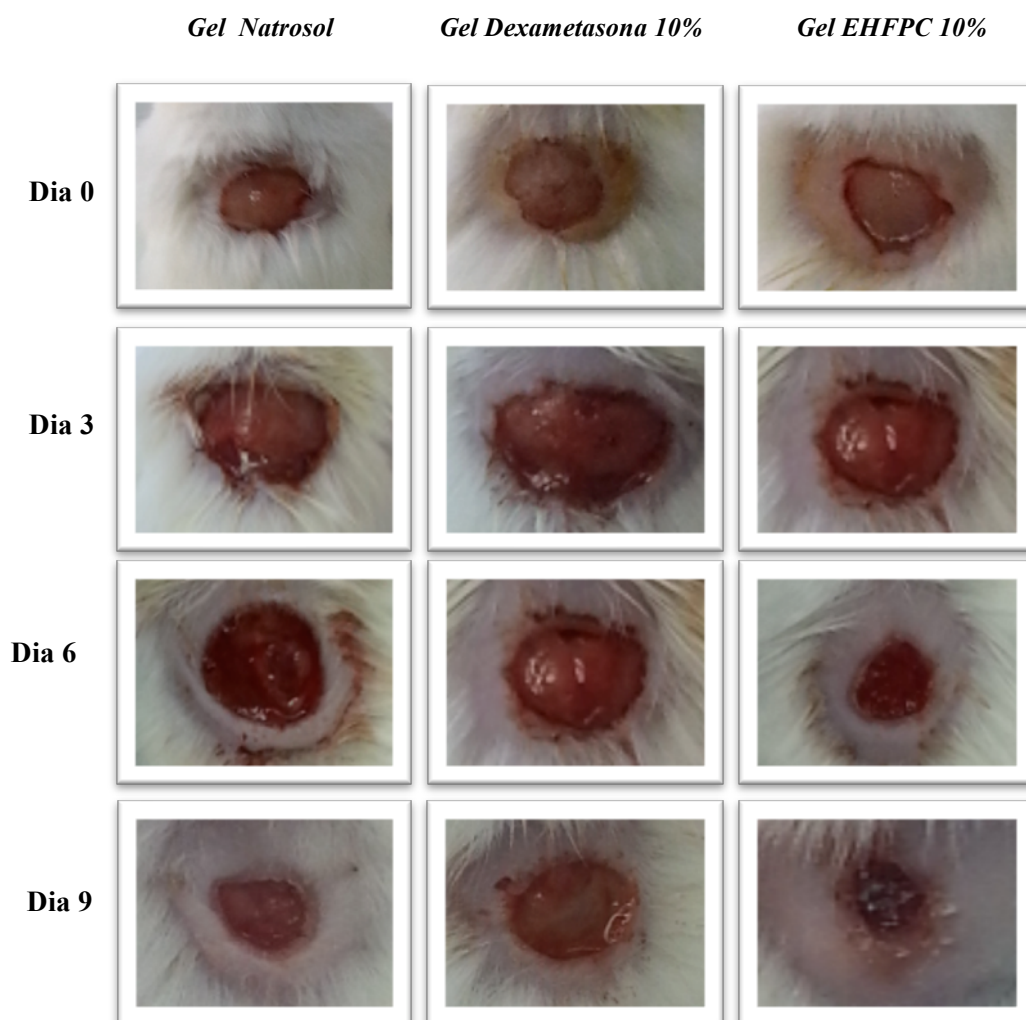
**Tabela 2:** Comparação do percentual de contração das feridas nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 após tratamento com gel de natrosol, gel do EHFPC 10% e gel de dexametasona 10%. Cada grupo representa a média de oito animais. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), avaliados pela análise de variância (ANOVA).

<b>Dia</b>	<b>Natrosol</b>	<b>EHFPC</b>	<b>Dexametasona</b>
<b>0</b>	0%	0%	0%
<b>3</b>	12,61% $\pm$ 6,25	13,93% $\pm$ 9,53	- 2,91% $\pm$ 10,69
<b>6</b>	14,10% $\pm$ 3,43	21,79% $\pm$ 13,59	- 17,14% $\pm$ 11,81
<b>9</b>	39,68% $\pm$ 5,24	72,64% $\pm$ 6,84	32,31% $\pm$ 7,89
<b>12</b>	65,52% $\pm$ 2,96	88,83% $\pm$ 3,07	53,12% $\pm$ 7,73
<b>15</b>	75,22% $\pm$ 1,44	99,54% $\pm$ 0,30	74,70% $\pm$ 5,69

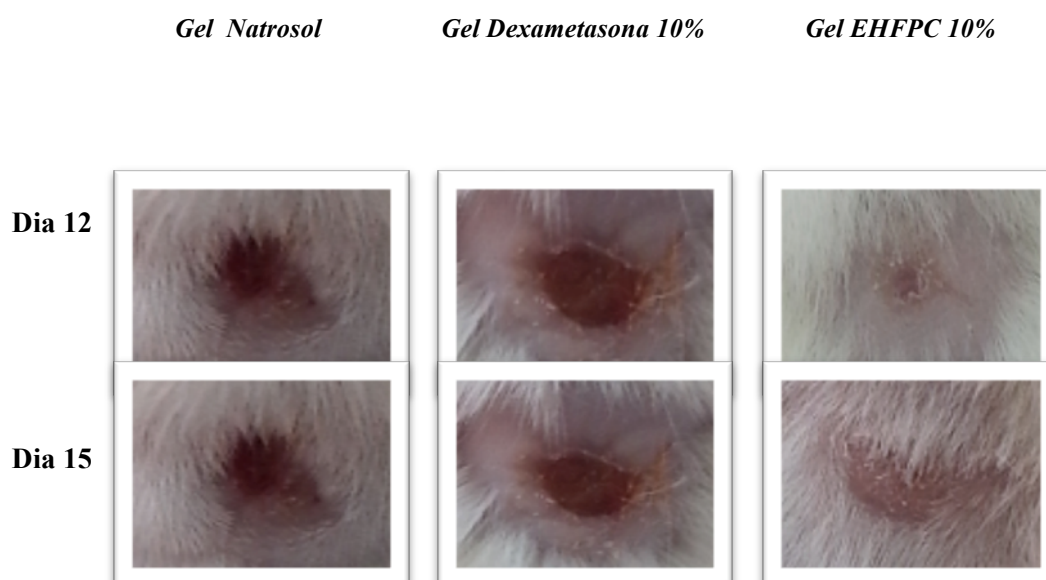
**Figura 1:** Cromatografia líquida de alta eficiência do perfil de fenois totais e flavonoides do extrato hidroalcoólico de *Passiflora cincinnata* Mast. Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), quercetina (pico 9) e campferol (pico 10).



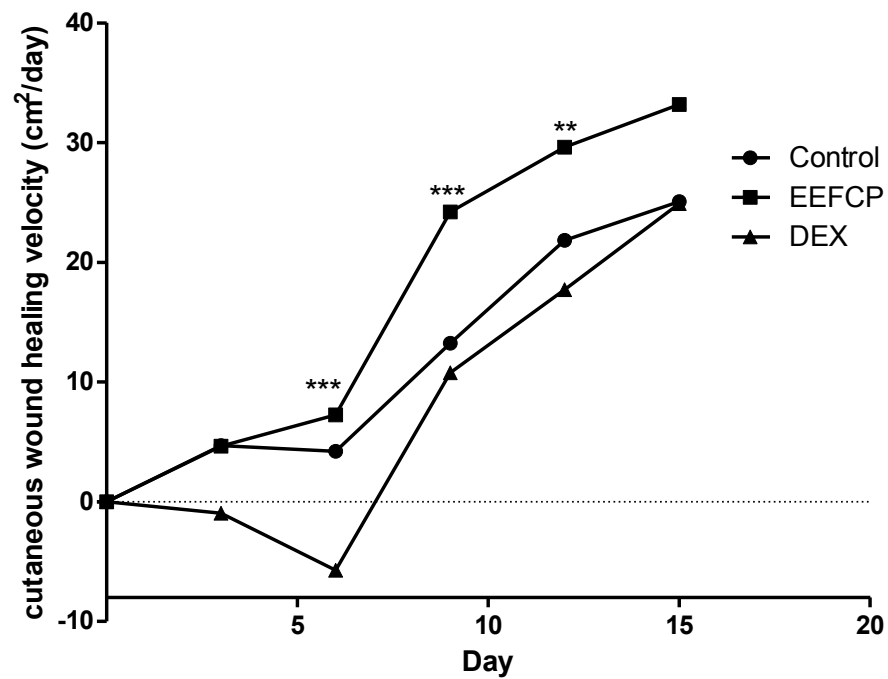
**Figura 2:** Efeitos do gel de EHFPC 10%, Gel de Natrosol e Gel de Dexametasona 10% no processo de cicatrização nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós cirúrgico. Imagens obtidas após debridamento e higienização das lesões.



**Figura 2 (cont.):** Efeitos do gel de EHFPC 10%, Gel de Natrosol e Gel de Dexametasona 10% no processo de cicatrização nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós cirúrgico. Imagens obtidas após debridamento e higienização das lesões.



**Figura 3:** Velocidade fechamento das feridas (cm<sup>2</sup>/dia) dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 após tratamento diário com gel de natrosol, gel do EHFPC 10% e gel de dexametasona 10%. \*\*\* p < 0,001 ; \*\* p < 0,01



## *Capítulo 3*

---

Atividade antimicrobiana e caracterização fitoquímica dos  
extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast.  
(maracujá-do-mato)

Este capítulo está formatado para publicação na Revista Cubana de Plantas Medicinais

---

## Correspondência referente à submissão

O artigo está sendo apreciado e aguarda parecer.

----- Forwarded message -----

From: **Francisco J. Morón Rodríguez** <[moron@infomed.sld.cu](mailto:moron@infomed.sld.cu)>

Date: 2013/5/1

Subject: [RCPM] Envío recibido

To: Henrique Coutinho Henrique <[hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)>

Henrique Coutinho Henrique:

Gracias por enviarnos su manuscrito "Atividade antimicrobiana e caracterização fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato)" a Revista Cubana de Plantas Medicinales. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/author/submission/58>

Nombre de usuario/a: hdmcoutinho

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Francisco J. Morón Rodríguez

Revista Cubana de Plantas Medicinales

Revista Cubana de Plantas Medicinales

<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla>

--

Este mensaje le ha llegado mediante el servicio de correo electrónico que ofrece Infomed para respaldar el cumplimiento de las misiones del Sistema Nacional de Salud. La persona que envía este correo asume el compromiso de usar el servicio a tales fines y cumplir con las regulaciones establecidas

Infomed: <http://www.sld.cu/>

--

HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO, PhD

link to CV Lattes:

<http://lattes.cnpq.br/3199766197573928>

LABORATORY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

DEPART. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

UNIVERSITY OF REGION OF CARIRI - URCA

AV. CEL ANTONIO LUIZ, 1161.

CRATO (CE), BRAZIL.

CEP:63000-000.



**Atividade antimicrobiana e caracterização fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato)**

**Antimicrobial activity and phytochemical characterization of hydroalcoholic extracts of *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato)**

**Actividad antimicrobiana y caracterización fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato)**

**Ana Luiza de Albuquerque Siebra<sup>1</sup>([analu\\_farm@yahoo.com.br](mailto:analu_farm@yahoo.com.br)), Larissa Rolim de Oliveira<sup>1</sup> ([larissarolim.ufcg@hotmail.com](mailto:larissarolim.ufcg@hotmail.com)), Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup> ([anitaoliveira24@yahoo.com.br](mailto:anitaoliveira24@yahoo.com.br)), Rosimeire Sabino Albuquerque<sup>2</sup> ([rosi\\_sabino87@hotmail.com](mailto:rosi_sabino87@hotmail.com)), Nadghia Figueiredo Leite<sup>2</sup> ([nadghia.fl@hotmail.com](mailto:nadghia.fl@hotmail.com)), José Galberto Martins da Costa<sup>3</sup> ([galberto.martins@urca.br](mailto:galberto.martins@urca.br)), David de Carvalho Siebra<sup>4</sup> ([david.siebra@hotmail.com](mailto:david.siebra@hotmail.com)), Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>([hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)), Irwin Rose Alencar Menezes<sup>1</sup> ([irwinalencar@yahoo.com.br](mailto:irwinalencar@yahoo.com.br)), Marta Regina Kerntopf<sup>1</sup> ([martakerntopf@yahoo.com.br](mailto:martakerntopf@yahoo.com.br))**

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

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

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

<sup>4</sup> Universidade Federal do Ceará - Campus Cariri, Barbalha (CE), Brasil.

\*Corresponding author:

Henrique DM Coutinho. Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato (CE), Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax: +55(88)31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A família Passifloraceae é bastante utilizada na fitoterapia. *Passiflora cincinnata* Mast (maracujá do mato) apresenta resistência a doenças e pragas, longevidade, adaptação a condições climáticas e uma grande concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda inexploradas.

**OBJETIVOS:** O presente estudo objetivou a caracterização fitoquímica e a investigação da atividade antimicrobiana e modulatória dos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas (folhas, haste, cascas, polpa e sementes) de *Passiflora cincinnata* Mast.

**MÉTODOS:** Os extratos foram preparados por maceração em solução hidroalcoólica. Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados pelo método da diluição em caldo frente à linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e a atividade moduladora de antibióticos verificada em relação à cepa clinicamente isolada de *Pseudomonas aeruginosa* 04, a partir de concentração subinibitória. Os antibióticos testados foram: amicacina, gentamicina, ampicilina, benzilpenicilina potássica e oxacilina. A identificação dos compostos (prospecção fitoquímica) foi determinada por mudanças de coloração e formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

**RESULTADOS:** Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica, sendo a concentração inibitória mínima sempre maior ou igual a 1024 µg/mL. Na modulação de antibióticos, polpa e cascas apresentaram resposta significativa frente ao aminoglicosídeo amicacina, resultando em sinergismo, e atualmente, o extrato das cascas alterou o

fenótipo de *P. aeruginosa* de resistente para sensível. O extrato da polpa também potencializou o efeito dos betalactâmicos benzilpenicilina potássica e oxacilina. Caules, sementes e folhas não expressaram atividades modulatórias. A prospecção fitoquímica qualificou os metabólitos secundários: taninos condensados, flobacênicos, flavonas, flavononóis, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcaloides .

**CONCLUSÕES:** O efeito combinado dos extratos hidroalcoólicos da polpa e das cascas de *P. cincinnata* Mast. aos antibióticos constitui uma nova possibilidade terapêutica na elaboração de um fármaco com multi-drogas.

**Palavras-chave:** *Passiflora cincinnata* Mast., atividade antimicrobiana, plantas medicinais

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Passifloraceae is widely used in herbal medicine. *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato), is resistant to pests and diseases, has longevity, adaptability to climatic conditions and higher concentration of chemicals for the pharmaceutical industry and other potential are almost totally unexplored.

**OBJECTIVES:** This study aimed to investigate the phytochemical characterization, antimicrobial and modulatory activity of hydroalcoholic extracts of the aerial parts (leaves, stem, peel, pulp and seeds) of *Passiflora cincinnata* Mast.

**METHODS:** The extracts were prepared by maceration in hydroalcoholic solution. The Minimum Inhibitory Concentration tests were performed by the broth dilution method against the strain of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and modulating activity of antibiotics checked against the clinically isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa* 04, at the subinhibitory concentration. The antibiotics tested were: amikacin, gentamicin, ampicillin, oxacillin and benzylpenicillin potassium. The identification of compounds

(phytochemical) was determined from the changes in color and formation of precipitates after addition of specific reagents.

**RESULTS:** The extracts showed no antimicrobial activity of clinical relevance, and the minimum inhibitory concentrations were always greater than or equal to 1024µg/mL. In modulation of antibiotics, pulp and peel showed significant response against the aminoglycoside amikacin, resulting in synergism, and currently, the extract from the peel altering the phenotype of *P. aeruginosa* resistant to sensitive. The pulp extract also potentiated the effect of beta-lactam oxacillin and benzylpenicillin potassium. Stems, seeds and leaves no expressed modulatory activities. The phytochemical qualified the secondary metabolites: tannins, flobacênicos, flavones, flavononóis, flavonols, xanthonas, chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catechins and alkaloids.

**CONCLUSIONS:** The combined effect of hydroalcoholic extracts of peel and pulp from *P. cincinnata* Mast. with antibiotic therapy constitutes a new therapeutic possibility in developing a drug with multi-drug.

Keywords: *Passiflora cincinnata* Mast., antimicrobial activity, medicinal plants

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** Família Passifloraceae es ampliamente utilizado en la medicina herbal. *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato) es resistente a las plagas y enfermedades, tiene longevidad, capacidad de adaptación a las condiciones climáticas y una alta concentración de productos químicos para la industria farmacéutica y otros potenciales casi totalmente inexplorado.

**OBJETIVOS:** Este estudio tuvo como objetivo investigar la caracterización fitoquímica y la actividad antimicrobiana y moduladora de extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas (hojas, tallo, corteza, pulpa y semillas) de *Passiflora cincinnata* Mast.

**MÉTODOS:** Los extractos se prepararon por maceración en una solución de agua-alcohol. Las pruebas de concentración inhibitoria mínima se realizaron

por el método de dilución en caldo frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y modular la actividad de los antibióticos controladas contra la cepa clínicamente aislado de *Pseudomonas aeruginosa* 04, a partir de la concentración subinibitória. Los antibióticos se probaron: amikacina, gentamicina, ampicilina, oxacilina y bencilpenicilina potásica. La identificación de los compuestos (fitoquímicos) se determina a partir de los cambios en el color y la formación de precipitados después de la adición de reactivos específicos.

**RESULTADOS:** Los extractos no mostraron actividad antimicrobiana de relevancia clínica, y la concentración mínima inhibitoria siempre mayor que o igual a 1024µg/mL. La modulación de los antibióticos, pulpa y la corteza mostraron respuesta significativa contra el aminoglucósido amikacina, lo que resulta en sinergismo, y en la actualidad, el extracto de la corteza de alterar el fenotipo de *P. aeruginosa* resistente a la sensible. El extracto de pulpa también potenció el efecto del beta-lactámicos oxacilina y bencilpenicilina potásica. Los tallos, las semillas y las hojas no se realizo actividades moduladoras expresadas. La prospección fitoquímica se ha clasificado los siguientes metabolitos secundarios: taninos, flobacênicos, flavonas, flavononóis, flavonoles, xantonas, chalconas, auronas, flavanones, leucoantocianidina, catequinas y alcaloides.

**CONCLUSIONES:** El efecto combinado de extractos hidroalcohólicos de cáscara y pulpa de *Passiflora cincinnata* Mast. con antibióticos ofrece nuevas posibilidades terapéuticas en el desarrollo de un fármaco con múltiples fármacos.

**Palabras clave:** *Passiflora cincinnata* Mast, actividad antimicrobiana, plantas medicinales

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande diversidade em sua flora. Existem inúmeros estudos etnobotânicos sobre o uso de espécies vegetais com fins fitoterápicos há centenas de anos por comunidades tradicionais para curar enfermidades variadas.<sup>1</sup> Acreditando-se nos costumes populares, por muitas vezes as

plantas medicinais substituem os medicamentos sintéticos sem nenhuma comprovação científica sobre os seus reais efeitos.<sup>2</sup>

A família Passifloraceae destaca-se dentre a flora brasileira, por ser bastante utilizada na fitoterapia. Dentre os gêneros, se destaca o *Passiflora*, que pode ser encontrado na Ásia, África e Américas, havendo mais de 500 espécies dispersas na América do Sul e, dentre estas, 370 são exclusivamente encontradas nas Américas. O gênero *Passiflora* é o mais encontrado em todo o país. O maracujá é um fruto pertencente ao gênero e este nome popular é dado a todas as mais de 120 espécies (encontradas e nativas) do Brasil.<sup>2</sup>

Do ponto de vista etnofarmacológico, as espécies deste gênero são frequentemente utilizadas pela população como sedativo e ansiolítico.<sup>3-8</sup> Além de suas ações neurofarmacológicas, o chá das folhas também é usado tradicionalmente como analgésico, anti-espasmódico, anti-asmático, anti-térmico e anti-inflamatório.<sup>3,4,9</sup>

*Passiflora cincinnata* é uma das espécies descritas com sendo não cultivadas, mas que tem oferecido contribuições importantes ao melhoramento genético, por apresentar resistência a doenças ou a pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado e maior concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda inexploradas<sup>10</sup>.

O infuso de toda a planta é indicado no tratamento de inflamações e insônias,<sup>11</sup> como sedativo, hipotensivo e antigripal.<sup>12</sup> As folhas e os frutos são indicados contra hipertensão, tosse e inflamações e como calmante.<sup>13,14</sup>

Muitas espécies de *Passiflora* são descritas como drogas oficiais em farmacopéias de vários países do mundo, incluindo a *Passiflora alata* Curtis, e a *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, inseridas oficialmente como fitoterápicos na farmacopéia brasileira<sup>15-17</sup>. Apesar dos extratos do gênero *Passiflora* serem utilizados como alternativa tecnológica moderna na fabricação de produtos intermediários da indústria farmacêutica, existem poucas investigações a respeito das propriedades farmacológicas, como antimicrobianas e quanto à

composição fitoquímica da espécie em estudo, a *Passiflora cincinnata* Mast., justificando a execução deste estudo.

A bactéria *P. aeruginosa* é um dos principais microorganismos causadores de infecção nosocomial em hospitais brasileiros.<sup>18</sup> Por ser frequente, é responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Encontra-se amplamente distribuída no meio ambiente e é capaz de sobreviver por longos períodos em ambientes adversos, além de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos,<sup>19,20</sup> que são compostos naturais ou sintéticos com capacidade de inibir o crescimento ou eliminar fungos e bactérias.<sup>21</sup> São os metabólitos secundários dos produtos naturais que, em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente patógenos.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização fitoquímica, associada à investigação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas (folhas, haste, cascas, polpa e sementes) de *Passiflora cincinnata* Mast. bem como a avaliação comparativa da atividade modulatória da associação extrato/antibiótico frente à cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa* 04, uma vez que esses microorganismos representam uma grande ameaça à saúde pública.

## MÉTODOS

Folhas, hastes e frutos (casca, polpa e sementes) de *Passiflora cincinnata* Mast. foram coletados no município de Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado pela Sra. Ana Morais Mendonça, e uma exsicata está depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob número de tombo: HCDAL 8097.

O material vegetal colhido foi transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de sanidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas), lavado e submetido à secagem natural até que o excesso de umidade fosse

extraído, e o material pudesse ser manuseado, de acordo com as suas características físicas, sendo triturado, a fim de aumentar a sua superfície de contato com o material solvente a ser utilizado no processo de maceração. A massa obtida foi submersa em uma solução hidroalcoólica (1:1), por um período de 72 horas. O extrato foi filtrado e em seguida concentrado em evaporador rotativo e banho-maria. Após este processo, os extratos foram congelados e encaminhados ao processo de liofilização.<sup>22</sup>

A atividade antimicrobiana foi verificada a partir de microorganismos catalogados em coleções (cepas especificadas) do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba, conforme detalhado: bactéria (padrão): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e bactéria (multirresistente): *P. aeruginosa* 04.

Os antibióticos utilizados foram das classes dos aminoglicosídeos: amicacina e gentamicina e betalactâmicos: ampicilina, benzilpenicilina potássica e oxacilina, todos com concentração inicial de 5000µg/mL, dissolvidos em água estéril.

O método utilizado foi o da microdiluição em caldo. Para se chegar à concentração de 1024µg/mL a ser utilizada nos testes, inicialmente uma alíquota de cada extrato (0,010g) foi diluída em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de se obter concentração final de 100mg/mL, que em seguida foi diluída em água destilada e estéril. O inóculo foi diluído em BHI 10%, chegando-se a uma concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Foram distribuídos 100µL do BHI e inóculo em cada poço de uma placa contendo 96 poços, e em seguida, procedeu-se a microdiluição seriada com a solução de 100µL dos extratos, variando nas concentrações de 512 a 8µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 35°C.<sup>23</sup> A revelação da concentração inibitória mínima (CIM) bacteriana foi feita utilizando-se resazurina. A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração em que nenhum crescimento é observado<sup>24</sup>, sendo determinada pelo método de microdiluição em caldo descrito por Javadpour *et al.* (1996)<sup>23</sup>.

No teste de modulação de drogas, utilizou-se o método proposto por Coutinho (2008),<sup>25</sup> onde as soluções dos extratos foram testadas a partir de uma concentração sub-inibitória (MIC/8). Foram distribuídos 100µL de uma solução contendo BHI 10%, inóculo e extratos em cada poço no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100µL da droga foi misturado ao primeiro poço, procedendo



a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de aminoglicosídeos e betalactâmicos variavam gradualmente de 5000 a 1,22µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas à 35°C<sup>23</sup>, sendo revelação obtida a partir da utilização de resazurina.

A identificação dos compostos (prospecção fitoquímica) que resultam do metabolismo secundário dos extratos de folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de *P. cincinnata*, Mast. foi realizada a partir das mudanças de coloração e formação de precipitados após a adição de reagentes específicos, seguindo a metodologia proposta por Matos (1997).<sup>22</sup>

## RESULTADOS

Os extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de *P. cincinnata* Mast. não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica contra a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 15442 utilizada no experimento, sendo a concentração inibitória mínima sempre maior ou igual a 1024µg/mL.

Na identificação do potencial modulador de antibióticos, os extratos demonstraram respostas distintas: polpa e cascas apresentaram resposta significativa frente ao aminoglicosídeo amicacina, resultando em sinergismo, e atualmente, o extrato das cascas alterou o fenótipo de *P. aeruginosa* de resistente para sensível de acordo com o ponto de corte para a amicacina que, segundo a NCCLS 2005<sup>24</sup>, apresenta resistência para valores de CIM  $\geq 32$  (associação bactéria+amicacina = 39,02) e sensibilidade para resultados de CIM com valores  $\leq 16$  (associação bactéria + amicacina + extrato =  $< 1,22$ ). O extrato da polpa também potencializou o efeito dos betalactâmicos benzilpenicilina potássica e oxacilina. Hastes, sementes e folhas não expressaram atividades modulatórias frente aos aminoglicosídeos e betalactâmicos testados (Tabela 1).

A prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de *P. cincinnata* Mast. permitiu qualificar as seguintes classes de metabólitos secundários: taninos condensados, flobabênicos, flavonas, flavononois, flavonois, xantonas,

chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcaloides , como evidenciado na Tabela 2.

## DISCUSSÃO

Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre os organismos, frequentemente apresentam atividades biológicas relevantes.<sup>26</sup> Estudos referentes à composição química de diversas espécies do gênero *Passiflora* evidenciam, principalmente, alcaloides e flavonoides como seus principais metabólitos secundários. Entretanto, outras substâncias como saponinas, glicosídeos cianogênicos, esteroides, lignanas, ácidos graxos, maltol, aminoácidos e taninos são citados com frequência na literatura.<sup>27-29</sup>

Os flavonoides são particularmente importantes para o controle de qualidade dos fitoterápicos pois, através deles, é possível identificar muitas espécies de *Passiflora*,<sup>30</sup> demonstrando a relevância desta classe de metabólitos na composição da espécie em estudo. Dentre as diversas funções atribuídas aos flavonoides, destaca-se a capacidade de conferir proteção à espécie contra insetos, fungos e bactérias, além de atividade antioxidante,<sup>26</sup> todos fatores que colaboram com a característica de muitas espécies ditas silvestres dentro do gênero *Passiflora* (inclusive *P. cincinnata* Mast), de apresentarem melhor resistência ao ataque de pragas, e maior facilidade de cultivo.<sup>31</sup>

Estudos apontam que os flavonoides apresentam atividades relevantes e diversificadas,<sup>32</sup> dentre as quais, a atividade antimicrobiana.<sup>33</sup> Esta ocorre provavelmente por sua habilidade em formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular de algumas bactérias, ou ainda ao caráter lipofílico destes ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microorganismos.<sup>34,35</sup>

As habilidades conferidas pela presença de compostos fenólicos na composição dos extratos da polpa e das cascas de *Passiflora cincinnata* Mast., sugerem a capacidade de alteração fenotípica e moduladora de antibióticos quando testados frente à cepa multirresistente de *P. aeruginosa* 04, sendo os

principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* em hospitais brasileiros: a produção de metalobetalactamases, perda de porina e a superexpressão de bombas de efluxo, o que pode explicar os altos índices de resistência a aminoglicosídeos, por exemplo. A emergência de isolados com estas características é preocupante e promove impacto clínico, especialmente pela escassez de terapias efetivas no tratamento de infecções por este patógeno.<sup>18</sup>

Portanto, a sugestão de um efeito combinado dos extratos hidroalcoólicos da polpa e das cascas de *P. cinnamomum* Mast. aos antibióticos com perfil de sensibilidade diminuído ou mesmo resistente, constitui uma nova possibilidade terapêutica na elaboração de um fármaco com multi-drogas. Para tanto, são necessários estudos fitoquímicos mais aprofundados no sentido de identificar, quantificar e isolar os principais metabólitos secundários provavelmente envolvidos na condução da potencialização da atividade da amicacina, benzilpenicilina potássica e oxacilina.

## REFERÊNCIAS

1. Sandes Arr, DI Blasi G. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia*. 2000.13: 28-32.
2. Barbosa PR. Estudo da Ação Psicofarmacológica de Extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims. Dissertação (Mestrado). 2006. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma - Santa Catarina: 79
3. Pio Correa, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978: 4324.
4. Sacco JC. Passifloráceas In: REITZ, R., Itajaí: (Ed) Flora Ilustrada Catarinense, 1980, 1: 258.
5. Oga S, de Freitas Pcd, Silva Acg, Hanada S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med*. 1984.50: 303-6.
6. Hickey M, King C. 100 Families of flowering plants. Cambridge University Press: Cambridge, 1988:130-3.
7. Mowrey D. Herbal tonic therapies. Keats Publishing Incorporation. 1992: 478.
8. Lorenzi H, Matos FJ. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 1: 371-4.
9. Seaforth CE, Adamns CD, Sylvester YA. Guide for Medicinal Plants of Trinidad & Tobago. London: Commonwealth Secretariate, Marlborough House, Pall Mall, 1983.
10. Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos, I R Da S. Melhoramento Genético do Maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F.G.; Junqueira NTV, Braga MF. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: EMBRAPA – Cerrados, 2005: 187-210.
11. Agra MF. Contribuição ao estudo das plantas medicinais na Paraíba. *Ciência e Cultura*. 1982; 33: 64-6.
12. Emperaire L. La Caatinga du sud-est du Piauí (Brésil): Étude Ethnobotanique. Paris: Éd Recherche sur les civilisations, 1983: 135.

13. Agra MF. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: Editora União, 1996.
14. Nurit-Silva K, Agra MF, Baracho GS. Estudo etnomedicinal e farmacobotânico comparativo entre *Passiflora foetida* L. e *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). Rev Bras Farm. 2002.83(1-4): 51-55.
15. Farmacopéia Brasileira. *Passiflora alata*, Ait, *Passifloraceae*. Maracujá. 1977. 3rd edn. Andrei: São Paulo: 839-840.
16. ANVISA, 2010. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)
17. Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos CD, Schenkel EP. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. Phytochem Anal, 2012. 23(3):232-239.
18. Neves P.R., Mamizuka, E. M., Levy, C. E., & Lincopan, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. J Bras Patol Med Lab. 2011. 47(4): 409-420.
19. Gales AC, Reis, AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. Eur j clin microbial infect dis. 2001.39: 183-190.
20. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T. Corção, G. *Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water. Rev Soc Bras Med Trop. 2008. 41(5): 470-473.
21. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas. Quim Nova. 2010. 33(3): 667-679.
22. Matos, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
23. Javadpour MM, Juban MM, LO WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, Mclaughlin ML. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. J Med Chem.1996. 39: 107-3113.

24. NCCLS. National Comitee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005.
25. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior. Enhancement on the antibiotic activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008.54: 328-330.
26. Simões CMO, Schenkel EP, Gossmann G, Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 6 ed. Porto Alegre: Ed- UFSC, 2010. p: 467-495
27. Alonso JR. *Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas*. ISIS Ediciones S. R. L. 1998. p. 350-354.
28. Reginatto F, Kauffman C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2001. 12: 32-36.
29. Paris F, Petry RD, Reginatto F ; Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro J, Kapczinzki F, Ortega GG, Schenkel EP. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta farm bonaer.* 2002. 21(1): 05-08.
30. Quercia V, Turcheto L, Pierini N, Cuozzo V, Percaccio G, Identification and determination of vitexina and isovitexin in *Passiflora incarnata* extracts. *J. Chrom. Amsterdam*, 1978. 161: 396-402.
31. Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF. (Ed.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: EMBRAPA, 2005. 187-210.
32. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol Cent Biol Reprod.* 2008. 27:1/2: 33-39.
33. Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY, Dionéia CRO. Atividade antimicrobiana dos flavonóides e esteroides isolados de duas espécies de *Chromolaena*. *Bras Cienc Farm.* 2003. 30(4): 403-408.

34. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fuyiwara S, Ohyam M, Takasa T, Linuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol.,1996. 50: 27-34.
35. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999. 12(4): 564-581.

Tabela 1: Atividade moduladora dos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.

Antibióticos	C	Fl	C	Ht	C	Cc	C	Pp	C	St
Amicacina	9,76	9,76	312,5	312,5	39,06	< 1,22	4,88	<1,22	312,5	312,5
Gentamicina	1,22	1,22	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Ampicilina	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5	156,25	156,25	312,5	312,5
Benzilpenicilina	2500	2500	2500	2500	2500	2500	≥5000	1250	1250	1250
Oxacilina	1250	1250	625	625	625	625	2500	625	2500	2500

C – controle; Fl – extrato das folhas; Ht – extrato das hastes; Cc – extrato das cascas; Pp – extrato da polpa;  
St – extrato das sementes.



Tabela 2: Classes de metabólitos secundários identificados nos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, cascas, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.

<b>CLASSES</b>	<b>Folhas</b>	<b>Hastes</b>	<b>Cascas</b>	<b>Polpa</b>	<b>Sementes</b>
Fenóis	-	-	-	-	-
Taninos condensados	+	+	+	+	-
Flobacênicos	+	+	+	+	-
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	-	-
Flavonas	+	+	+	+	+
Flavonois	+	+	+	+	+
Flavononois	+	+	+	+	+
Xantonas	+	+	+	+	+
Chalconas	+	+	+	+	+
Auronas	+	+	+	+	+
Flavanonas	+	+	+	+	+
Leucoantocianidinas	+	-	+	+	+
Catequinas	+	-	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	+

(+) – presença; (-) – ausência.

# *Capítulo 4*

---

Potenciação da atividade antibiótica por

*Passiflora cincinnata* Mast.

Este capítulo está formatado para publicação no Journal of Medicinal Food

---

## **Potenciação da atividade antibiótica por *Passiflora cincinnata* Mast.**

Ana Luiza de Albuquerque Siebra<sup>1</sup>; Larissa R. Oliveira<sup>1</sup>; Anita O.B.P.B. Martins<sup>1</sup>;  
David de Carvalho Siebra<sup>2</sup>; Rosimeire Sabino Albuquerque<sup>3</sup>, Nadghia Figueiredo  
Leite<sup>3</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>4</sup>; Henrique D.M. Coutinho<sup>3</sup>, Irwin Rose Alencar  
Menezes<sup>1</sup>, Marta R. Kerntopf<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Center of Biological Sciences and Health, University of the Region of Cariri, Crato;* <sup>2</sup> *University Federal of Ceará, Campus Cariri, Barbalha, Ceará;* <sup>3</sup> *Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University of Region of Cariri, Crato, Ceará.* <sup>4</sup> *Laboratory of Research in Natural Products, Center of Biological Sciences and Health, University of the Region of Cariri, Crato, Ceará.*

\*Autor correspondente:

Ana Luiza de Albuquerque Siebra. Departamento de Química Biológica. Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato (CE), Brasil. Endereço: Rua Cel. Antônio Luis, 1161, Pimenta, CEP: 63105-00. Fone:+55 (88) 3102 1212; Fax: +55(88)31021291. E-mail: analu\_farm@yahoo.com.br

## RESUMO

A pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos oriundos de plantas é alternativa interessante à resistência microbiana. Muitos extratos de plantas e seus constituintes fitoquímicos são conhecidos por apresentarem atividades antimicrobianas. *Passiflora cincinnata* Mast (maracujá do mato) apresenta resistência a doenças e pragas, longevidade, adaptação a condições climáticas e maior concentração de componentes químicos destinados à indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda inexploradas. Neste estudo, investigamos o potencial antimicrobiano e modulador de antibióticos dos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata*. Os extratos foram preparados por maceração em solução hidroalcoólica. Os testes de Concentração Inibitória Mínima foram realizados pelo método da diluição em caldo e as linhagens testadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11105. A atividade moduladora de antibióticos foi verificada frente às cepas clinicamente isoladas de *S. aureus* 03 e *E. coli* 08, em concentração subinibitória. Os antibióticos testados foram: amicacina, gentamicina, ampicilina, benzilpenicilina potássica e oxacilina. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica, sendo a CIM sempre maior ou igual a 1024µg/mL. A cepa de *S. aureus* 03 apresentou 13 eventos, enquanto a cepa de *E. coli* 08 apresentou apenas 04 eventos. Dentro os eventos ocorridos, 14 foram atividade sinérgica potencializando o efeito dos antibióticos e apenas 03 eventos apresentaram atividade antagônica à ampicilina. Os extratos hidroalcoólicos são potenciais agentes antimicrobianos, quando associados a fármacos pouco utilizados no tratamento *in vivo*, podendo surgir como uma nova arma terapêutica, dando sobrevida aos antibióticos.

**Palavras-chave:** *Passiflora*, atividade antimicrobiana, plantas medicinais, modulação de antibióticos, fitoterápicos.

## INTRODUÇÃO

A história da humanidade, do ponto de vista médico, pode ser considerada como uma luta contra as doenças infecciosas. No início do século 21, a ocorrência de infecções bacterianas resistentes a drogas tornou-se comum e a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana tem se espalhado para novas áreas clínicas.<sup>1,2</sup> Neste contexto, produtos naturais oriundos de plantas são alternativas interessantes a este problema, uma vez que muitos extratos e seus constituintes fitoquímicos são conhecidos por apresentarem atividades antimicrobianas.<sup>3</sup> Nos últimos anos, vários estudos têm sido direcionados, em diferentes países, com o intuito de demonstrar esta eficácia.<sup>4-6</sup>

Os microbiologistas clínicos têm dois motivos para estarem interessados em extratos vegetais com atividade antimicrobiana: em primeiro lugar, é muito provável que os fitoquímicos encontrem o seu lugar em meio ao arsenal de antimicrobianos, uma vez que os cientistas sabem que a vida útil efetiva de qualquer antibiótico é limitada. Em segundo lugar, o público está cada vez mais consciente dos problemas com a prescrição e uso indevido de antibióticos tradicionais. Um grande número de compostos de plantas (muitas vezes de natureza confiável) está prontamente disponível, sem necessitar de prescrição médica, em drogarias e lojas de alimentos naturais, sendo a auto-medicação com estas substâncias um fato comum. O uso de extratos vegetais como outra forma de tratamento médico, tem ganhado popularidade desde a década de 90.<sup>7</sup>

A família Passifloraceae destaca-se dentre a flora brasileira, por ser bastante utilizada na fitoterapia, e o gênero *Passiflora* é o mais encontrado no país. Maracujá é um fruto

pertencente ao gênero e este nome popular designa as mais de 120 espécies (encontradas e nativas) do Brasil.<sup>8</sup>

*Passiflora cincinnata* Mast. é uma das espécies silvestres do gênero que tem grande potencial para o consumo *in natura*, para a produção de suco concentrado e utilização como alimento funcional. As características de alto rendimento comercial, assim como a presença de compostos fitoquímicos, têm motivado um grande interesse no desenvolvimento de pesquisas, além da exploração diversificada, uma vez que as características fitoquímicas evidenciadas para a espécie em estudo são interessantes para a indústria de alimentos que busca desenvolvê-los com substâncias bioativas para atender às exigências do consumidor, e que também são interessantes para a indústria farmacêutica<sup>9</sup> que tem tido, apesar de seu constante esforço, dificuldades em encontrar ou desenvolver novas drogas efetivas, com a urgência com que elas se fazem necessárias.<sup>10</sup>

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano e modulador de antibióticos dos extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *Passiflora cincinnata* Mast., frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Folhas, hastes e frutos (epicarpo, polpa e sementes) foram coletados no município de Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado, e uma exsicata está depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Ceará, Brasil, sob o número de tombo: HCDAL 8097.

O material vegetal colhido foi transportado ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM – URCA, onde foi selecionado de acordo com o grau de sanidade visual (ausência de danos mecânicos e manchas fúngicas), lavado e submetido à secagem natural até que o excesso de umidade fosse extraído, e o material pudesse ser manuseado, de acordo com as suas características físicas, e triturado, a fim de aumentar a sua superfície de contato com o material solvente a ser utilizado no processo de maceração. A massa obtida foi submersa em uma solução hidroalcoólica (1:1), por um período de 72 horas. O extrato foi filtrado e em seguida concentrado em evaporador rotativo e banho-maria. Após este processo, os extratos foram congelados e encaminhados ao processo de liofilização.<sup>11</sup>

Foram utilizados isolados clínicos oriundos do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba, conforme detalhado: bactérias (padrões): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11105 e bactérias (multirresistentes): *S. aureus* 03 e *E. coli* 08. Os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina e os betalactâmicos ampicilina, benzilpenicilina potássica e oxacilina, foram utilizados na concentração inicial de 5000µg/mL. Todas as drogas foram dissolvidas em água estéril.

O método utilizado foi o da microdiluição em caldo. Para se chegar à concentração de 1024µg/mL a ser utilizada nos testes, inicialmente uma massa de cada extrato (0,010g) foi diluída em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para atingir a concentração de teste de 100mg/mL, que em seguida foi diluída em água destilada e estéril. O inóculo foi diluído em BHI (*Brain Heart Infusion*) 10%, chegando-se a uma concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Foram distribuídos 100µL do BHI e inóculo em cada poço de uma placa contendo 96

poços, e em seguida, procedeu-se a microdiluição seriada com a solução de 100µL dos extratos, variando nas concentrações de 512 a 8µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37°C.<sup>12</sup> A revelação da concentração inibitória mínima (CIM) bacteriana foi feita utilizando-se resazurina. A CIM foi definida como sendo a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado de acordo com a NCCLS.<sup>13</sup>

No teste de modulação de drogas, utilizou-se o método proposto por Coutinho<sup>14</sup> onde as soluções dos extratos foram testadas a partir de uma concentração sub-inibitória (MIC/8). Foram distribuídos 100µL de uma solução contendo BHI 10%, inóculo e extratos em cada poço no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100µL da droga foi misturado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de aminoglicosídeos e betalactâmicos variavam gradualmente de 5000 a 1,22µg/mL.

## **RESULTADOS**

Os extratos hidroalcoólicos das folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes de *P. cinnata* Mast. não apresentaram atividade antimicrobiana de relevância clínica contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 11105 utilizadas no experimento, sendo a concentração inibitória mínima sempre maior ou igual a 1024µg/mL .

Nos testes de modulação de antibióticos, as cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 03 e *Escherichia coli* 08 foram testadas (frente à associação de uma concentração subinibitória dos extratos) com antibióticos das classes dos



aminoglicosídeos e betalactâmicos, e apresentaram resultados significativos, quando comparados à atividade isolada dos fármacos, de acordo com o perfil de resistência das cepas utilizadas (Tabela 1).

Analisando-se o número de eventos de redução da CIM ocasionados pela associação moduladora, pôde-se observar que a cepa de *S. aureus* 03 apresentou 13 eventos de redução da CIM, enquanto a cepa de *E. coli* 08 apresentou apenas 04 eventos, levando-se em consideração todos os extratos, associados às duas classes de antimicrobianos testadas (Figura1). É importante ressaltar que dentre os 17 eventos ocorridos, 14 foram atividades sinérgicas ao efeito esperado pelo antibiótico e apenas 03 eventos apresentaram atividade antagônica ao efeito do antimicrobiano ampicilina, sempre com a cepa de *S. aureus* 03, com os extratos de hastes, epicarpo e sementes de *P. cincinnata* (Tabelas 2-6).

A análise comparativa proferida entre as classes de antimicrobianos testadas mostra que os antibióticos betalactâmicos sobressaem-se aos aminoglicosídeos em número de eventos sinérgicos e também em número de eventos antagônicos (Tabela 7).

## **DISCUSSÃO**

Ensaio fitoquímico anteriormente realizado com os extratos hidroalcoólicos das partes aéreas (folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes) estabeleceram que *P. cincinnata* possui as seguintes classes de metabólitos secundários: taninos condensados, flobabênicos, flavonas, flavononóis, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcaloides. Estes, por serem fitoconstituintes oriundos do metabolismo secundário dos vegetais, que quase sempre

agem na defesa do mesmo contra patógenos, podem apresentar atividades biológicas interessantes.<sup>15</sup>

Ensaio biológicos utilizando combinações isoladas revelam que os flavonoides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário.<sup>16</sup> A atividade demonstrada nos ensaios *in vitro* realizados com os extratos hidroalcoólicos de *P. cinnamata* evidencia uma provável ação dos compostos fenólicos presentes em todas as partes, confirmando a atividade antimicrobiana atribuída a esta classe de metabólitos secundários. A associação de produtos naturais a antibióticos pode exercer atividade direta contra muitas espécies bacterianas, modulando ou mesmo aumentando a atividade de um antibiótico específico, invertendo a resistência natural das bactérias. A potencialização da atividade ou a reversão da resistência aos antimicrobianos, permite a classificação destes compostos como modificadores da atividade antibiótica<sup>3</sup>. O uso de extratos torna-se interessante por estes apresentarem baixa possibilidade dos microorganismos adquirir resistência à sua ação, uma vez que são misturas complexas, o que dificulta a adaptabilidade microbiana.<sup>17</sup>

*Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de doenças infecciosas em humanos, associadas a origens comunitárias e hospitalares, variando desde infecções menores da pele, a infecções graves, tais como pneumonia e septicemia.<sup>18,19</sup> Nos últimos anos, a emergência de cepas virulentas resistentes a vários antibióticos, tais como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e estafilococos resistentes à meticilina (MRS), representa um grande problema a nível mundial.<sup>19,20</sup> Historicamente, a resistência às penicilinas penicilinase-estáveis tem sido denominada “resistência à meticilina”. No caso de *S. aureus* resistente à oxacilina e estafilococos coagulase-

negativos (MRS), outros agentes  $\beta$ -lactâmicos / inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefens e carbapenens, podem parecer ativos *in vitro*, mas são clinicamente ineficazes. Os resultados para estas drogas devem ser relatados como resistentes, ou não devem ser relatados. Isso se deve ao fato de que a maioria dos casos relatados de infecções por MRS não têm respondido adequadamente à terapia com  $\beta$ -lactâmicos, ou porque ainda não foram apresentados dados clínicos relevantes documentando a eficácia clínica desses agentes nestas condições.<sup>21</sup>

A cepa de *S. aureus* 03 utilizada nos experimentos modulatórios da associação de aminoglicosídeos ou betalactâmicos aos extratos hidroalcoólicos de *P. cinnamomum* é classificada como MRSA, com perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados. A evidência modulatória apresentada pelos extratos, especialmente frente aos antimicrobianos oxacilina e benzilpenicilina, não é capaz de alterar o fenótipo desta cepa de resistente a sensível, mas denota a diminuição da CIM necessária para impedir o crescimento do patógeno. O número de eventos é relevante, especialmente por se repetir em pelo menos 10 atividades sinérgicas, em todas as associações entre extratos e antimicrobianos deste teste.

Considerando-se que as bactérias Gram-positivas possuem parede celular quimicamente menos complexa e com menor teor lipídico do que as bactérias Gram-negativas,<sup>22</sup> sugere-se que a estrutura de *S. aureus* (bactéria Gram-positiva) pode contribuir como fator facilitador da atividade sinérgica dos extratos hidroalcoólicos de *P. cinnamomum* aos aminoglicosídeos e betalactâmicos. Estudos mostram que a inibição do crescimento de *S. aureus* pode estar associada à habilidade dos flavonoides se complexarem com a parede celular bacteriana, promovendo o rompimento de suas membranas.<sup>7</sup> Portanto, a associação de produtos naturais a antibióticos favorece a desintegração das membranas celulares bacterianas através da complexação dos agentes associados a esta estrutura.

O efeito antagônico observado pelos extratos de hastes, cascas e sementes, quando associados à ampicilina, pode-se explicar pela mistura de compostos presentes em extratos brutos, que possuem quantidades elevadas de metabólitos, podendo diminuir os efeitos das substâncias ativas.<sup>23</sup>

O surgimento de cepas MRS como patógenos humanos significativos, e sua crescente prevalência em infecções nosocomiais aumentam a necessidade de identificar e limitar a sua disseminação. A detecção de *Staphylococcus* resistentes à meticilina é complexa porque existem dificuldades em identificá-los com precisão, especialmente porque a resistência é frequentemente heterogênea e sua expressão é afetada por diferentes fatores.<sup>24</sup> Esforços contínuos para compreender as mudanças epidemiológicas de *S. aureus* em humanos e animais são necessários, não somente para o tratamento antimicrobiano adequado e eficaz ao controle da infecção, mas também para o acompanhamento da evolução das espécies.<sup>25</sup>

*E. coli* é uma bactéria gram-negativa não esporulada, anaeróbia facultativa, encontrada na microbiota intestinal, sendo o microrganismo predominante do trato gastrointestinal. As bactérias gram-negativas mostram-se com muitos recursos de resistência, como a produção de betalactamases, que inativam antibióticos que são resistentes à ação da maior parte das enzimas bacterianas.<sup>26</sup> Mesmo existindo uma grande variedade de mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, um dos mais importantes é a produção de betalactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos relacionados, tornando-os inativos. Entre estes, destaca-se a produção de betalactamases de espectro ampliado (*Extended-Spectrum Betalactamase* - ESBL), principalmente em algumas espécies de bactérias gram-negativas.<sup>27</sup> O primeiro relato de cepas produtoras de ESBL ocorreu em Frankfurt, na Alemanha, em 1983, onde enzimas do tipo SHV foram isoladas de *Klebsiella*

*pneumoniae* e *Escherichia coli*. A análise destas cepas demonstrou que a resistência devia-se à produção de uma betalactamase plasmidial transferível, derivada de SHV-1, sendo denominada de SHV-2.<sup>28</sup>

Cepas produtoras de ESBL geralmente são multirresistentes, e enterobactérias produtoras de ESBL têm sido isoladas com maior frequência em amostras procedentes de pacientes hospitalizados, mas podem ser encontrados também em amostras de origem comunitária.<sup>29</sup>

Apesar da aparente sensibilidade *in vitro* a vários antimicrobianos, pacientes com infecções por cepas produtoras de ESBL podem não responder à terapia com betalactâmicos. Geralmente estas cepas exibem co-resistência a aminoglicosídeos, devendo o uso destes agentes ser baseado no antibiograma.<sup>28</sup>

Comparando-se os resultados obtidos na modulação de *Escherichia coli*, percebe-se uma diferença de susceptibilidade quanto aos resultados observados na modulação com *S. aureus*, explicado pelas diferenças existentes na composição de suas membranas. A membrana externa das bactérias Gram-negativas apresenta uma barreira resistente à penetração de vários agentes antimicrobianos, possuindo também, um espaço periplasmático com enzimas capazes de inativar alguns antibióticos<sup>10</sup> podendo ser esta a justificativa pela diferença na vulnerabilidade apresentada pelos microorganismos, uma vez que a atividade modulatória com *S. aureus* apresentou 13 eventos de redução da CIM entre sinergismo e antagonismo, frente aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos e betalactâmicos, enquanto a modulação dos extratos de *P. cinnamomum* aos mesmos antimicrobianos contra a cepa multirresistente produtora de ESBL de *E. coli* 08, mostrou eficácia em apenas 04 eventos e somente para os extratos de folhas, polpa e sementes, todos com atividade sinérgica. Hastes e epicarpo não produziram efeito algum quando comparados aos controles.

A multirresistência característica de bactérias gram-negativas ocorre pelo acúmulo na resistência plasmidial ou por genes translocadores, associados a uma barreira de membrana externa de baixa permeabilidade, com um conjunto eficiente de bombas de efluxo (capazes de bombear para fora da bactéria mais de um tipo de droga), combinados a vários mecanismos específicos de resistência.<sup>29</sup> Além disso, a susceptibilidade das células bacterianas aos antibióticos pode ser afetada por seus estados fisiológicos. Uma consequência importante deste fenômeno é a descoberta de células “persistentes”, revelando que mesmo altas concentrações de antibióticos não matam toda a população bacteriana, deixando para trás uma população resistente, que é geneticamente idêntica às células susceptíveis.<sup>30</sup>

Concluimos, portanto, que os resultados do presente estudo indicam que os extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* têm potencial como agente antibacteriano, quando associados a fármacos pouco eficazes no tratamento de diversas patologias humanas, mas que são frequentemente utilizados pela população em geral, modificando o seu perfil de ação, através da diminuição da CIM ao crescimento bacteriano, podendo surgir como uma nova arma terapêutica, potencializando os fármacos das classes dos aminoglicosídeos e betalactâmicos, que são pouco eficientes no tratamento de infecções causadas por cepas do tipo MRSA e ESBL.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho recebeu o apoio financeiro das agências: CNPQ e FUNCAP.

## **DECLARAÇÃO DE INTERESSE DOS AUTORES**

Não há conflito de interesses.

**Tabela 1.** Origem das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria / Origem	Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> 03 Escara	Cefadroxil / Cefalexina / Cefalotina / Oxacilina / Penicilina / Ampicilina / Amoxicilina / Moxifloxacina / Ciprofloxacina / Levofloxacina / Ampicilina + Sulbactam / Amoxicilina + Ácido Clavulânico / Eritromicina / Claritromicina / Azitromicina / Clindamicina / Mupirocina
<i>Escherichia coli</i> 08 Urocultura	Ceftriaxona / Cefalotina / Cefalexina / Cefadroxil / Cefepime / Ciprofloxacina / Levofloxacina / Ampicilina + Sulbactam

**Tabela 2:** Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i> 03		<i>Escherichia coli</i> 08	
	Controle	+ EHFPC	Controle	+ EHFPC
Amicacina	312,5	312,5	156,25	39,06
Gentamicina	312,5	78,125	39,06	39,06
Ampicilina	156,25	156,25	312,5	312,5
Benzilpenicilina	2500	625	2500	2500
Oxacilina	2500	625	≥ 5000	2500

\*EHFPC: extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast.

**Tabela 3:** Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i> 03		<i>Escherichia coli</i> 08	
	Controle	+ EHSPC	Controle	+ EHSPC
Amicacina	625	625	78,125	78,125
Gentamicina	625	625	312,5	312,5
Ampicilina	78,125	312,5	312,5	312,5
Benzilpenicilina	≥ 5000	1250	≥ 5000	2500
Oxacilina	2500	625	2500	2500

\*EHSPC: extrato hidroalcoólico das sementes de *Passiflora cincinnata* Mast.

**Tabela 4:** Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico das hastes de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i> 03		<i>Escherichia coli</i> 08	
	Controle	+ EHHPC	Controle	+ EHHPC
Amicacina	625	625	78,125	78,125
Gentamicina	625	625	312,5	312,5
Ampicilina	78,125	312,5	312,5	312,5
Benzilpenicilina	2500	625	2500	2500
Oxacilina	2500	625	2500	2500

\*EHHPC: extrato hidroalcoólico das hastes de *Passiflora cincinnata* Mast.

**Tabela 5:** Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico do epicarpo de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos.

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i> 03		<i>Escherichia coli</i> 08	
	Controle	+ EHEPC	Controle	+ EHEPC
Amicacina	312,5	312,5	78,125	78,125
Gentamicina	625	625	312,5	312,5
Ampicilina	78,125	312,5	312,5	312,5
Benzilpenicilina	2500	625	2500	2500
Oxacilina	2500	625	2500	2500

\*EHEPC: extrato hidroalcoólico do epicarpo de *Passiflora cincinnata* Mast.

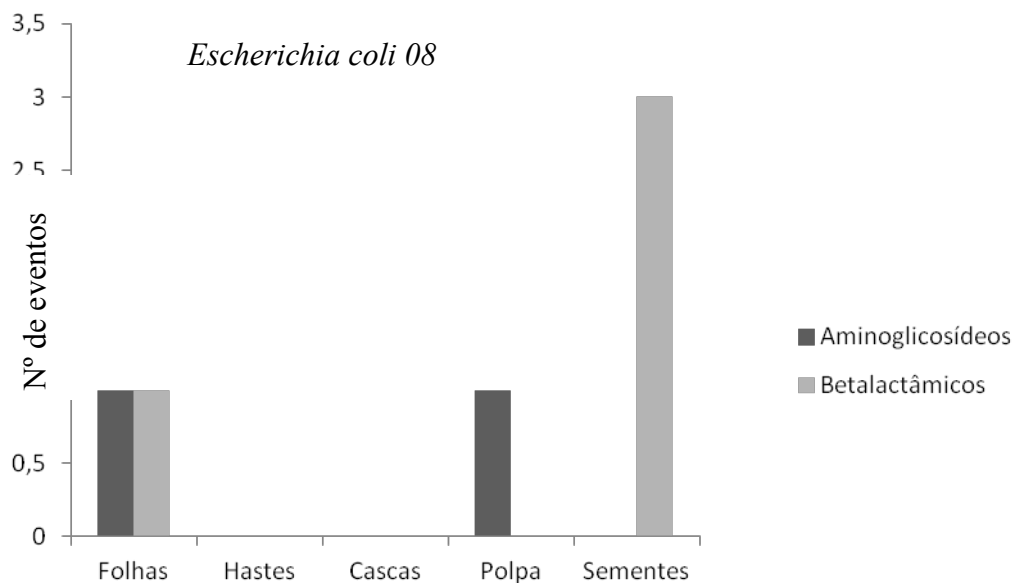
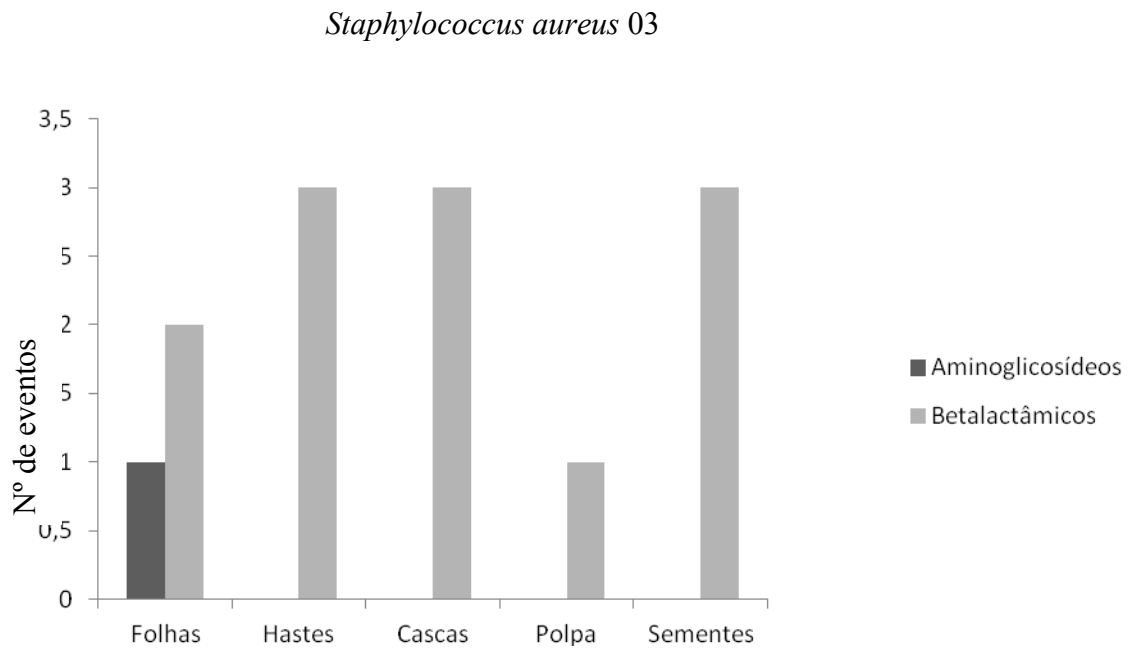
**Tabela 6:** Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico da polpa de *Passiflora cincinnata* Mast. em combinação com aminoglicosídeos e betalactâmicos

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i> 03		<i>Escherichia coli</i> 08	
	Controle	+ EHPpC	Controle	+ EHPpC
Amicacina	312,5	312,5	78,125	19,531
Gentamicina	312,5	312,5	39,06	39,06
Ampicilina	156,25	156,25	625	625
Benzilpenicilina	2500	625	2500	2500
Oxacilina	2500	2500	2500	2500

\*EHPpC: extrato hidroalcoólico da polpa de *Passiflora cincinnata* Mast.



**Figura 1:** Comparação do número de eventos moduladores dos extratos de *P. cinnamomum* quando em associação a aminoglicosídeos e betalactâmicos, frente às cepas de *S. aureus* 03 e *E. coli* 08.



**Tabela 7.** Estudo comparativo da atividade de fármacos antimicrobianos das classes farmacológicas dos aminoglicosídeos e betalactâmicos quando em associação aos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de *P. cincinnata*, sobre seus efeitos sinérgicos e antagônicos.

Antimicrobianos	<i>S. aureus</i> 03	<i>E. coli</i> 08	Total
<b>AMINOGLICOSÍDEOS</b>			
Amicacina	0	2 sinergismos	2
Gentamicina	1 sinergismo	0	1
<b>BETALACTÂMICOS</b>			
Ampicilina	3 antagonismos	0	3
Benzilpenicilina	5 sinergismos	1 sinergismo	6
Oxacilina	4 sinergismos	1 sinergismo	5
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>	<b>04</b>	<b>17</b>

## REFERENCES

1. Harbarth S, Samore, MH: Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis* 2005;11:794-801.
2. Chin YP, Tsui KC, Chen MC, Wang CY, Yang CY, Lin YL: Bactericidal activity of soymilk fermentation broth by *in vitro* and animal models. *J Med Food* 2012;15(6): 520-526.
3. Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP: Potentiating effect of *Mentha avensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo*. 2009a;23:287-290.
4. Gibbons S: Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep*. 2004;21:263-277.
5. Gurib-Fakim A: Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006;27:1-93.
6. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima OE, Falcão-Silva VS, Junior-Siqueira JP: *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. *Pharm Biol*. 2009b;47:1056–1059.
7. Cowan MM: Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4): 564-581.

8. Barbosa PR: Estudo da Ação Psicofarmacológica de Extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims. Dissertação (Mestrado). 2006. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma - Santa Catarina: 79.
9. Wondraceck DC: Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujá do cerrado com base no perfil de carotenoides. Dissertação (Mestrado). 2009. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília - Distrito Federal: 101.
10. Vermelho AB, Bastos MCF, Branquinha M: Bacteriologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.
11. Matos FJA: Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
12. Javadpour MM, Juban MM, LO WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML: De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. J Med Chem. 1996;39: 107-3113.
13. NCCLS. National Comitee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard,

6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005.

14. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior: Enhancement on the antibiotic activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008;54: 328-330.

15. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2010.

16. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT: Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol Cent Biol Reprod*. 2008;27:1/2: 33-39.

17. Daferera DJ, Ziogas BN & Polissiou MG: The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop. Protection*. 2003;22: 39-44.

18. Archer GL, Climo MW: *Staphylococcus aureus* bacteremia – consider the source. *N. Engl. J. Med*. 2001;344:55–56. *In*: Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific

proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol.* 2013;155(10): 1-46.

19. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol.* 2013;155(10): 1-46.

20. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:275–286. *In:* Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol.* 2013;155(10): 1-46.

21. CLSI/NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards document M100-S15. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005.

22. Loguercio AP, Battistin A, Vargas ACDE, Henzel A, Witt NM: Atividade antibacteriana do extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciênc Rural. 2005;35:371-376.
23. Peitz C, Cúnico MM, Miguel OG, Miguel MD, Kerber VA: Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). Rev bras farmacogn. 2003;13:61-65.
24. Chambers HF: Methicilin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997;10:781-791.
25. Stefani S, Chung DR, Lindsay JÁ, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, MacKenzie FM: Meticilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. International Journal of Antimicrobial Agents. 2012;39:273-282.
26. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger P C, Winn WC: Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6ª. Edição. Editora Guanabara Koogan. 2008.
27. Francisco W, Jea AHY: Resistência a b-lactamases por presença de ESBL. Disponível em: <[www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm](http://www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm)>. Acesso em:

- 15 nov. 2009. *In*: Martins AC, Picoli SU: Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. J Bras Patol Med Lab, 2011;47 (4): 421-426.
28. Sousa-Júnior MA, Ferreira ES, Conceição GC: Betalactamase de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. NewsLab, 2004;(63):152-174.
29. Nikaido H: Multidrug resistance in bacteria. Annu Rev Biochem. 2009;78:119-146.
30. Tikhonova EB, Devroy VK, Lau SY, Zgurskaya HI: Reconstitution of the *Escherichia coli* macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB. Mol Microbiol 2007;63:895–910.



# *Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

- A prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas (folhas, hastes, epicarpo, polpa e sementes) de *Passiflora cincinnata* revelou a presença dos seguintes compostos, derivados do metabolismo secundário: taninos condensados, flobabênicos, flavonas, flavononois, flavonois, xantonas, auronas, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas e alcaloides.
- A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* Mast. (EHFPC) quantificou os seguintes compostos: quercetina, ácido cafeico, epicatequina, ácido clorogênico, rutina, ácido gálico, ácido elágico, quercitrina, catequina e campferol. A determinação do teor de fenois totais e flavonoides no EHFPC confirma a presença destas classes de metabólitos.
- O EHFPC demonstrou atividade antioxidante.
- Os extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* não demonstraram atividade sob o ponto de vista clínico. Entretanto, quando avaliados em associação a fármacos antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos e betalactâmicos, os extratos mostraram atividade modulatória sinérgica e antagônica.
- A avaliação da toxicidade aguda do EHFPC revelou que o extrato não apresenta toxicidade nas doses testadas. A dose letal média do EHFPC por via oral é maior que 2000 mg/kg.
- O EHFPC mostrou atividade gastroprotetora nos modelos clássicos de indução de úlceras gástricas. Porém, o teste de barreira física descartou a possibilidade desta proteção se dar por impedimento físico causado pelo extrato, uma vez que este também demonstrou atividade gastroprotetora quando administrado intraperitonealmente.

- O EHFPC apresentou atividade cicatrizante de lesões cutâneas induzidas no dorso de camundongos, quando administrado topicamente (gel a 10%) e comparado aos controles.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. Contribuição ao estudo das plantas medicinais na Paraíba. **Ciência e Cultura**. 33: 64-66. 1982.
- AGRA, M. F. **Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns**. João Pessoa: Editora União, 1996.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17: 114-140. 2007.
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. de. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição**. 19 (2). 2006.
- ARAÚJO, F. P.; KIILL, L. H. P.; SIQUEIRA, K. M. M. Maracujá do mato: alternativa agroindustrial para o Semi-Árido. **Embrapa CPATSA**, Petrolina, PE. Folder. 2006.
- ARAÚJO, F. P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no Semi-Árido brasileiro**. Tese (Doutorado) apresentada à Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Botucatu – SP – Brasil. 94f. 2007.
- ARVOUET-GRAND, B.; VENNAT, A.; POURRAT, P. Legret Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **Journal de Pharmacie de Belgique**. 49: 462–468. 1994.
- BARBOSA, P. R. **Estudo da Ação Psicofarmacológica de Extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims**. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma - Santa Catarina – Brasil. 79f. 2006.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, MS, 2009.
- CERVI, A. C. Estudo das passifloras brasileiras: o subgênero *Dysosmioides* Killip do gênero *Passiflora* L. para o Brasil. **Estudos de Biologia**. 45: 91-11. 2000.
- CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**. 45(1): 1-92. 1997.
- CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. & BERNACCI, L. C. Passifloraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000182>. (Acesso em: 01/11/2012). 2010.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**. 54: 328-330, 2008.

DEWANTO, X.; WU, K. K.; ADOM, R. H.; LIU. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 3010–3014. 2002.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 230p. 1996.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND, J. **Gastroenterology**. 4: 265-257, 1969.

EMPERAIRE, L. La Caatinga du sud-est du Piauí (Brésil): Étude Ethnobotanique. Paris: **Éd Recherche sur les civilisations**, 135p. 1983.

GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A. A.; QUEIROZ, L. P. (eds.). *Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro*. Primeira Edição. Volume 1. Instituto do Milênio do Semi-Árido, **Associação Plantas do Nordeste**, Recife, PE. 488p. 2006.

JACQUES, A. C. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. TUPY**; Dissertação apresentada à Universidade federal de Pelotas, Rio Grande do Sul – Brasil Julho, 2009.

JAVADPOUR, M. M.; LO, W. C.; 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**. 39: 3107-3113. 1996.

KIILL, L. H. P.; SIQUEIRA, K. M. M.; ARAÚJO, F. P.; TRIGO, S. P. M.; FEITOZA, E. A.; LEMOS, I. B. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* Mast (Passifloraceae) na região de Petrolina (Pernambuco – Brazil). **Oecologia Australis**. 14 (1): 115-127. 2010.

KILLIP, E. P. The american species of Passifloraceae. **Publications of the Field Museum of Natural History, Botanical Series**, 19: 1-613. 1938.

LAGHARI, A. H.; MEMON, S.; NELOFAR, A.; KHAN, K. M.; YASMIN, A.; Determinação de ácidos fenólicos livres e atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir de frutos e folhas de *Chenopodium album*. **Food Chemistry**. 126: 1850-1855. 2011.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais**. Porto Alegre: Metrópole. 2008.

LESSA, A. O. **Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial para processamento da polpa de frutos de maracujá das espécies silvestres (*Passiflora setacea* DC, *Passiflora cincinnata* Mast.)**. Dissertação

(Mestrado) apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Itapetinga – Bahia – Brasil. 83f. 2011.

LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P. (Eds.). Maracujá: produção e qualidade na passicultura. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, BA. 396 p. 2004.

MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. Systematics. Pp 27-31. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. (eds). *Passiflora: passionflowers of the world*. **Portland, Timber Press**. 2004.

MACHADO, M. C. **Desenvolvimento de mudas de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) em diferentes níveis de sombreamento. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade do Sudoeste da Bahia**. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Vitória da Conquista – Bahia – Brasil. 55f. 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V.; GRYNBERG, N. E.; ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. 25 (3): 429-438, 2002.

MALONE, M. H. Pharmacological Approaches to Natural Products Screening and Evaluation. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. **Edited by Wagner, H. and Wolff, P.** – p.23-53; Springer-Verlag, Berlin, 1977.

MALTA, J. R. A.; DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G. Das plantas medicinais aos fitoterápicos – Abordagem multidisciplinar. **PET – Farmácia/CAPES UFPB**. 1999.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza. **Editora da Universidade Federal do Ceará**, 2009.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. Fortaleza. **Editora da Universidade Federal do Ceará**, 1998.

MELETTI, L.M.M. Propagação de Frutíferas tropicais (coord.) – **Guaíba Agropecuária**, 239p. 2000.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. Da S. **Melhoramento Genético do Maracujá: passado e futuro**. In: FALEEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. **Planaltina: EMBRAPA – Cerrados**. 55-78. 2005.

MENNEN, L. I.; WALKER, R.; BENNETEAU-PELISSERO, C.; SCALBERT, A. Risks and safety of polyphenol consumption. **American Journal of Clinical Nutrition**. 81 (1): 326S-329S. 2005.

MIZUI, T; SHIMONO, N; DOTEUCHI, M. **Japanese Journal Pharmacology**. 44: 43-50, 1987.

NCCLS. National Comitee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard,

6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2008.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**. 1(1): 33-46. 2001.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas**, 6(3): 194-226. 2006.

NURIT-SILVA, K.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Estudo etnomedicinal e farmacobotânico comparativo entre *Passiflora foetida* L. e *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**. 83 (1/4): 51-55. 2002.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline 425: **Acute Oral Toxicity: Modified Up-and-Down Procedure**. 2008.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (eds). Maracujá Germoplama e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados**. 141-158, 2005.

OLIVEIRA-JÚNIOR, M. X. **Caracterização dos frutos do maracujazeiro-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.) e superação de dormência de sementes**; Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2008.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**. 77: 433-443. 1979.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, S. E.; MORAIS, M. S.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, D. F. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela método de redução de ferro (FRAP). **Embrapa**. Dezembro, 2006 .

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, S. E.; MORAIS, M. S.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, D. F. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre. **Embrapa**. Julho, 2007.

RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F. Evolução das pesquisas na cultura do maracujazeiro. **Toda Fruta**, 2004. Portal de Fruticultura. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/>> Acesso em: 16/05/2013.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 14(4): 455-462. 2006.

SINGLETON, V. L. R.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 299: 152-178. 1999.

VASCONCELO, J.; VIEIRA, J. G. P.; VIEIRA, E. P. P. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**. 7(1). 2009.



VEIGA-JÚNIOR, V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**. 28 (3): 519-528. 2005.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**. 23(2): 141-149. 2008.

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujá do cerrado com base no perfil de carotenóides**. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

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**. 37: 654-661. 2010.

# *Anexos*

# ANEXOS

## Anexo A: Cópia do documento de autorização para coleta da espécie vegetal, emitida pelo SIBIO.



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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 32140-1	Data da Emissão: 30/01/2012 09:00
Dados do titular	
Nome: Ana Luiza de Albuquerque Siebra	CPF: 010.487.934-35
Título do Projeto: BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOGNÓSTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	
Nome da Instituição: Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa científica	01/2012	06/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, de populações do grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	Solicitar permissão dos proprietários das áreas de pesquisa. Enviar a sede da UC um via do relatório final dos resultados da pesquisa.
---	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CRATO	CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Passifloraceae

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 37391884



Página 1/3

**Anexo B:** Cópia do documento de identificação da espécie, emitido pelo Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri.



Herbário Caririense Dárdano de Andrade – Lima  
Universidade Regional do Cariri - URCA

## FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DE HERBÁRIO

Remetente: \_\_\_\_\_ Nº 01.2012

**HERBÁRIO CARIENSE DARDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)**

Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)

**Universidade Regional do Cariri - URCA**

Departamento de Ciências Biológicas

Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161

Campo do Pimenta - Crato - CE

CEP: 63.105-100

Destinatário: \_\_\_\_\_ Data: 14.05.2012

**Laboratório de Farmacologia**

Ana Luiza Sierra

Nº Amostras: 01

Tipo de Operação: Número de Herbário

### IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

	NºHCDAL	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL	ASSINATURA
01	8097	Maracujá-do-mato	Passifloraceae	<i>Passiflora cf. cincinnata</i> Mast.	Ana Moraes Mendonça	

Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva  
Responsável do HCDAL

Herbário Caririense Dárdano de Andrade - Lima / Universidade Regional do Cariri - URCA

Rua Cel. Antônio Luiz, 1161 - Pimenta - CEP: 63.105-100 - Crato/CE

Tel: (88) 3102 1212 – Fax: 3102 1291

E-mail: herbario@urca.br

**Anexo C:** Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais, autorizando a execução do projeto de Mestrado.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CAMPUS CARIRI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

ANÁLISE de PROJETO							
Nº de protocolo	10/2012						
Nome do projeto	Avaliação do Perfil Químico, Toxicológico e Farmacológico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de Passiflora cincinnata MAST						
Pesquisador Responsável	Ana Luiza de Albuquerque Siebra						
Situação	Aprovado	X	Reprovado		Pendente		
Data da primeira análise				Data do parecer final	15	03	2013

PARECER

Na qualidade de Relator, designado para exarar parecer pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará no Cariri - CEUA/UFC/CARIRI, ratifico a manifestação, que conclui na APROVAÇÃO, do projeto acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos

Observação: O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa à CEUA.

Barbalha - CE, 15 de março de 2013

Francisco Maurício Teles Freire  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

# *Produção Científica*

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

O projeto de mestrado possibilitou a formação multidisciplinar com estudos nas seguintes áreas: química, farmacologia e microbiologia dos produtos naturais, bem como o desenvolvimento e participação em atividades complementares para aprofundar e enriquecer o conhecimento e a formação do profissional;

### Artigo Publicado

- Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. Francisco E. B. Júnior, Dayanne R. de Oliveira, Elizângela B. Bento, Laura H. I. Leite, Daniele O. Souza, **Ana Luiza A. Siebra**, Renata S. Sampaio, Anita O.P.B. Martins, Andreza G. B. Ramos, Saulo R. Tintino, Luiz J. Lacerda-Neto, Patrícia R. L. Figueiredo, Larissa R. Oliveira, Cristina K. S. Rodrigues, Valterlúcio S. Sales, Francisco R. S. D. N. Figueiredo, Emmily P. Nascimento, Alef B. Monteiro, Érica N. Amaro, José G. M. Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Irwin R. A. de Menezes, and Marta R. Kerntopf. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013. ID: 579346.

### Artigos submetidos em Revistas Científicas

- "Atividade antimicrobiana e caracterização fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-mato)". **Ana Luiza de Albuquerque Siebra**, Larissa Rolim de Oliveira, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, Rosimeire Sabino Albuquerque, Nadghia Figueiredo Leite, José Galberto Martins da Costa, David de Carvalho Siebra, Henrique Douglas Melo Coutinho, Irwin Rose Alencar Menezes, Marta Regina Kerntopf. Revista Cubana de Plantas Medicinales.
- "Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in rodents.," by Francisco Brito-Júnior, Dayanne Oliveira, Elizângela Bento, Laura Hévila Inocência Leite, Daniele Souza, **Ana Luiza**

**Siebra**, Renata Sampaio, Anita Pereira, Andreza Ramos, Saulo R. Tintino, Luiz Lacerda-Neto, Patrícia R.L. figueiredo, Larissa Oliveira, Cristina Rodrigues, Valter Sales.

- “Actividad antibacteriana y moduladora de *Cecropia pachystachya* – Trécul. Daniele Oliveira SOUZA, Saulo Relison TINTINO, Valterlúcio Santos SALES, Fernando Gomes FIGUEREDO, Laura Hévila INOCÊNCIO, **Ana Luiza de Albuquerque SIEBRA**, Cristina Kelly de Souza RODRIGUES, Larissa Rolim DE OLIVEIRA, Antônia Priscila PEREIRA, Maria Flaviana Bezerra MORAIS BRAGA, Cícero Francisco Bezerra FELIPE, José Galberto MARTINS DA COSTA, Henrique Douglas Melo CUITINHO, Irwin Rose Alencar DE MENEZES & Marta Regina KERNTOPF. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas.

#### **Resumos publicados em Anais de Congressos**

- “Antimicrobial activity “*in vitro*” of the hydroalcoholic extract of leaves *Passiflora cincinnata* Mast. Passifloraceae”. **Siebra, A.L.A.**, Oliveira, L.R., Braga, M.F.B.M, Kerntopf, M.R., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A, Costa, J.G.M., Guedes, M.M., Andrade, T.A., Coutinho, T.S., Balbino, E. Em: 6<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMrdChem 2012. Canela – RS – Brasil, 28 a 31 de outubro de 2012.
- “Antidepressant activity of the hydroalcoholic extract of *Annona muricata* in mice”. **Siebra, A.L.A**, Kerntopf, M.R., Souza, D.O., Rodrigues, C.K.S, Sales, V.S., Fernandes, C.N., Souza, H.H.F, Coutinho, H.D.M, Menezes, I.R.A, Felipe, CFB. Em: VIII Brazilian Symposium on Pharmacognosy and I International Symposium on Pharmacognosy, 18 a 22 de abril de 2012, Ilhéus – Bahia – Brasil.
- “Avaliação do perfil químico do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex.Spreng. (goncalavo)” Pereira, A.O.B., Sampaio, R.S,



Siebra, A. L. A; Souza, D.O; Kerntopf, M.R., Menezes, I.R.A.; Em: Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutraceuticos (3ISMNP) e na III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, 14- 19 de outubro de 2012, Centro de Convenções de Sergipe, em Aracaju.

### **Participações em eventos científicos**

- I International Symposium of Pharmacognosy, 18-22 de abril de 2012-Ilhéus-BA-Brasil.
- 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem. 28 a 31 de outubro de 2012 – Canela – RS – Brasil.
- Curso Tópicos avançados de Farmacologia de Produtos Naturais, 22-26 de outubro de 2012-Crato-CE-Brasil.
- Curso Teórico em Modelos Experimentais em Psicofarmacologia, de 25 a 29 de junho de 2012, na Universidade Regional do Cariri – URCA.
- Short-Course: Innovative Medicinal Chemistry in the Academic Laboratory, 31 de outubro de 2012.
- Workshop on GPCRS – Novartis, 28 de outubro de 2012.
- Mini-Course: Evidence-based practice: natural products. VIII Brazilian Symposium on Prarmacognosy and I International Symposium on Pharmacognosy, 18 a 22 de abril de 2012, Ilhéus – Bahia – Brasil.
- I Jornada de Farmácia do Cariri/FJN. Intitulada como: Farmacêutico Generalista e as Múltiplas Perspectivas de Atuação Profissional. 22 a 26 de novembro de 2011. Juazeiro do Norte – Ceará – Brasil.
- Workshop Escrita Científica, Promovido pelo Grupo de Pesquisa Tecnologias da informação e comunicação, narratividade, sociedade e identidades plurais – UFC

em conjunto com o Grupo de Pesquisa LASAMEC – FSP – USP. 7 e 8 de outubro de 2011. Barbalha – Ceará – Brasil.

### **Mini-cursos / Palestras ministradas**

- Diagnóstico do Diabetes Mellitus e suas complicações através de análises bioquímicas (teoria e prática), na XV Semana de Enfermagem da Universidade Regional do Cariri – SENURCA. 21 a 26 de maio de 2012.
- Técnica de Coleta de Sangue, na I Jornada de Farmácia do Cariri/FJN. Intitulada como: Farmacêutico Generalista e as Múltiplas Perspectivas de Atuação Profissional. 22 a 26 de novembro de 2011. Juazeiro do Norte – Ceará – Brasil.

### **Disciplinas Cursadas**

- Bioestatística (3 créditos);
- Biologia da conservação (4 créditos);
- Química dos produtos naturais (4 créditos);
- Seminários I (2 créditos);
- Ação dos produtos naturais sobre o sistema nervoso (2 créditos);
- Docência do ensino superior (2 créditos);
- Farmacologia dos produtos naturais (4 créditos);
- Seminários II (2 créditos);
- Técnicas de análise microbiana (2 créditos);
- Dissertação I (6 créditos);
- Dissertação II (6 créditos).