



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS
LABORATÓRIO DE ENSAIOS TOXICOLÓGICOS – LABETOX
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM

**ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS PRÉ-
CLÍNICOS COM *Zizyphus joazeiro* Mart.**

**JOÃO PESSOA/PB
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS
LABORATÓRIO DE ENSAIOS TOXICOLÓGICOS – LABETOX
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS PRÉ-
CLÍNICOS COM *Zizyphus joazeiro* Mart.**

ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM

**JOÃO PESSOA/PB
2012**

ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM

**ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS PRÉ-
CLÍNICOS COM *Zizyphus joazeiro* Mart.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

E79e *Estevam, Ethiene Castellucci.*
 Ensaio farmacológico e toxicológico pré-clínico com
 Zizyphus joazeiro Mart / Ethiene Castellucci Estevam.-- João
 Pessoa, 201.
 113f. : il.
 Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
 Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
 1. Produtos naturais. 2. Zizyphus joazeiro. 3. Inflamação.
 4. Cicatrização. 5. Toxicidade dérmica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS PRÉ-
CLÍNICOS COM *Zizyphus joazeiro* Mart.**

ETHIENE CASTELLUCCI ESTEVAM

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB
Examinador interno

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB
Examinador interno

Prof. Dr^a. Ivone Antonia de Souza
Departamento de Antibióticos/UFPE
Examinadora externa

Prof^a. Dr^a. Jane Sheila Higinio
Departamento de Farmácia/UFPE
Examinadora externa

“Ainda que eu falasse línguas,
As dos homens e as dos anjos, se eu não tivesse o amor,
Seria como sino ruidoso
Ou como címbalo estridente.

Ainda que eu tivesse o dom da profecia,
O conhecimento de todos os mistérios
E de toda a ciência;
Ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas,
Se não tivesse o amor, eu não seria nada.

Ainda que eu distribuísse
Todos os meus bens aos famintos,
Ainda que entregasse
O meu corpo às chamas,
Se não tivesse o amor
Nada disso me adiantaria.

O amor é paciente,
O amor é prestativo; não é invejoso, não se ostenta,
Não se incha de orgulho.
Nada faz de inconveniente,
Não procura seu próprio interesse,
Não se irrita, não guarda rancor.

Não se alegra com a injustiça,
Mas se regozija com a verdade.

Tudo desculpa, tudo crê,
Tudo espera, tudo suporta.

O amor jamais passará.
As profecias desaparecerão,
As línguas cessarão,

A ciência também desaparecerá.

Pois o nosso conhecimento é limitado,
Limitada é também a nossa profecia.

Mas, quando vier a perfeição,
Desaparecerá o que é limitado.

Quando eu era criança,
Falava como criança,
Pensava como criança,
Raciocinava como criança.
Depois de adulto,
Deixei o que era próprio de criança.

Agora vemos como em espelho e de maneira confusa;
Mas depois veremos face a face,
Agora o meu conhecimento é limitado,
Mas depois conhecerei
Como sou conhecido.

Agora, portanto, permanecem
Estas três coisas:
A fé, a esperança e o amor.
A maior delas, porém, é o amor”

Dedico este trabalho aos meus pais Edna e Sebastião e aos meus queridos “nonos” Júlia e Symbolo. Vocês são meu exemplo diário de que quando se tem amor no coração, nunca se desiste diante das dificuldades da vida. São o exemplo de que o amor incondicional nos faz levantar todos os dias em busca de algo melhor. Levantar e lutar por aqueles que amamos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai e criador do Universo, por me conceder a oportunidade de viver; à Nossa Senhora, Mãe Santíssima, a Quem recorro nos momentos de desespero e sempre me concede seu colo carinhoso e consolador; a Jesus, nosso irmão de luz maior, por ter nos dado o exemplo de vida, por nos cobrir com seu amor supremo.

Aos anjos de luz que sempre guiam meus passos, nunca me deixam só, por mais que eu ache que esteja, por me intuírem e fortalecerem. Por colocarem pessoas e oportunidades em meu caminho, por me protegerem e perdoarem meus muitos momentos de ingratidão.

À natureza, laboratório de Deus, por ser fonte de substâncias milagrosas.

Aos meus pais Edna e Sebastião e ao meu amado nono Symbolo, por todo o apoio, amor incondicional, pelos sacrifícios feitos para que eu pudesse sempre ter o melhor. Por não deixarem meus sonhos morrerem e acreditarem em mim, muito mais do que eu mesma acredito. Não tenho como para agradecer e uso aqui as palavras da música para simbolizar essa gratidão: “Eu tenho tanto pra lhes falar; mas com palavras não sei dizer. Como é grande, o meu amor por vocês.”

A minha noninha Júlia, sempre dedicada a mim, sempre amorosa. Eu sei que mesmo não estando mais aqui fisicamente, você sempre esteve presente ao meu lado em espírito e tem sido meu anjo guardião.

Aos meus tios e padrinhos Regina e Rogério pelo carinho e apoio. Por se orgulharem de mim e depositarem fé na pessoa que sou. Sei que não sou do tipo que demonstra abertamente os sentimentos, mas amo vocês do fundo do coração.

A todos de minha família distante fisicamente e sempre presente em coração. Família adorada, base da minha existência, meu porto seguro. Obrigada pelo amor e carinho. Obrigada por ser a minha família!

À minha orientadora Prof^a Margareth Formiga, me apoiar, aconselhar estar sempre disposta a ajudar aqueles que a procuram. Por sempre encontrar alguns minutos para me dar atenção, mesmo com tantas ocupações. Por ser um exemplo de profissionalismo e humanidade para mim. Obrigada por confiar em mim.

À Cláudia Sampaio de Andrade Lima do DBR/UFPE pelo fornecimento do extrato.

Às amigas Clélia e Aldeíde, companheiras de toxicologia, por compartilharem comigo incertezas e sucessos. Por seu apoio e amizade.

A Rayanne Vilarim e Alisson Macário com quem compartilhei momentos tensos, horas de cansaço e instantes de gargalhadas no laboratório. Por todo o auxílio na realização destes experimentos, pela troca de idéias e pela amizade.

A Kelly Ribeiro Sá e Carolina Bassetto Benato (e meu sobrinho postigo Lucas). Vocês me ofertaram o tipo de amizade que eu pensava que não encontraria. A amizade que compartilha momentos bons e ruins, que aconselha, se preocupa e respeita.

Aos colegas Narlize, Igara, Wylly, Heloína, Vanine, Adriana, Camila, Vivianne, Egberto, Guilherme e Josué. Nós lutamos, sofremos e somos vencedores.

À Kardilandia Mendes e a Queiroz, por tanto apoio e boa vontade, na realização das análises hematológicas e bioquímicas.

Aos sempre orientadores, mestres e amigos Ana Maria Mendonça e Francisco Amancio, que me abriram as portas do fascinante mundo da pesquisa, pelos ensinamentos, apoio e torcida.

Ao Prof Adalberto Coelho, sempre pronto a ensinar e aconselhar com doçura.

Aos colegas da FASER, Sócrates, Nathália, Eduardo, Gregório, Thaís Josy, Raline, Ana Karina, Valderi, Liliane. Pelo apoio, paciência e torcida.

Aos alunos e ex-alunos, Mariana Mangueira, Andressa, Laís, Almaísa, Juberlita, Tércia, Patyanne, Priscila, Sly, Fernanda, Mário, João Paulo, Jozi, Josy e tantos outros, por sua alegria, compreensão e torcida.

Ao Prof Reinaldo Nóbrega de Almeida, por ser um exemplo de profissionalismo.

Às Profas Edeltrudes de Oliveira Lima e Ivone Antonia de Souza por seus conselhos valiosos.

A Bernadete Helena pela amizade e pelos ensinamentos.

A Fátima Peixoto por seu carinho de mãe, seus conselhos, seu ombro amigo e sua alegria.

À Tânia Maria Alves e Carol Manguiera, da secretaria da pós-graduação, por seus conselhos, seu auxílio e atenção.

À José Crispim Duarte e a seu Luís, pelo auxílio, conselhos e cuidado com os animais de experimentação.

À minha cachorrinha Maya, por seu amor puro e verdadeiro.

Gostaria também de agradecer aos animais de experimentação, pelos quais tenho grande respeito e que deram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

Meu agradecimento sincero a todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que não por isso deixam de ser importantes por terem de alguma forma contribuído para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço às pessoas que tentaram me prejudicar e tantas vezes até conseguiram, porque acabaram por contribuir para que eu me tornasse uma pessoa mais forte e até um ser humano melhor.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a percentagem de contração das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas.	51
TABELA 2: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a área (em cm ²) das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas.	52
TABELA 3- Microrganismos isolados das feridas experimentalmente induzidas em ratos e submetidas a diferentes tratamentos.	55
TABELA 4- Efeito da administração v. o. de diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a variação da espessura da pata no modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos fêmeas.	56
TABELA 5- % de inibição do edema induzido por carragenina na pata de camundongos fêmeas tratados por v. o. com diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> .	57
TABELA 6- Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a migração de Leucócitos Totais e PMNL na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos.	59
TABELA 7- Escore do edema observado no dorso de ratos após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z joazeiro</i>	62
TABELA 8- Escore do eritema observado no dorso de ratos após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z joazeiro</i>	62
TABELA 9 – Peso corporal médio (em gramas) por rato, machos e fêmeas, 7 e 14 dias após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z joazeiro</i> .	63
TABELA 10 - Consumo médio diário de água (em ml) por ratos, machos e fêmeas, 7 e 14 dias após aplicação cutânea de 1000mg/Kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	63
TABELA 11 - Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por ratos fêmeas, 7 e 14 dias após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	64
TABELA 12 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	66
TABELA 13 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	67
TABELA 14 – Peso dos órgãos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	71
TABELA 15 - Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por rato, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	72

TABELA 16 - Consumo médio diário de água (em ml) por rato, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	73
TABELA 17 - Peso corporal médio (em gramas) de ratos fêmeas, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	75
TABELA 18 - Peso corporal médio (em gramas) de ratos fêmeas, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	76
TABELA 19 - Efeito da aplicação cutânea durante 21 dias de EE de <i>Z. joazeiro</i> sobre a temperatura corporal (em °C) de ratos Wistar.	77
TABELA 20 - Efeito da aplicação cutânea durante 21 dias de EE de <i>Z. joazeiro</i> sobre a glicemia capilar (em mg/dl) de ratos Wistar.	78
TABELA 21 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	79
TABELA 22 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	84
TABELA 23 - Peso dos órgãos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da pele humana	20
FIGURA 2: Esquema com a sequência de eventos do processo inflamatório.	22
FIGURA 3: Etapas do processo cicatricial de feridas cutâneas	27
FIGURA 4: <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.: aspecto geral, partes aéreas, folhas e frutos.	35
FIGURA 5: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a percentagem de contração das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas, nos dias 5 e 7.	52
FIGURA 6: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a área (em cm ²) das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas, nos dias 5 e 7.	53
FIGURA 7: Efeito da administração v. o. de diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a variação da espessura da pata no modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos fêmeas.	57
FIGURA 8: Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a migração de leucócitos na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos.	59
FIGURA 9: Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de <i>Z joazeiro</i> sobre a migração de PMNL na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos.	60
FIGURA 10: Consumo médio diário de água (em mL) por ratos fêmeas após 7 e 14 da aplicação cutânea de 1000 mg/Kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	64
FIGURA 11: Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por ratos fêmeas após 7 e 14 da aplicação cutânea de 1000 mg/Kg de EE de <i>Z. joazeiro</i> .	64
FIGURA 12: Contagem de eritrócitos no sangue de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/Kg de EE de <i>Z joazeiro</i> .	67
FIGURA 13: Valor de hemoglobina de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/Kg de EE de <i>Z joazeiro</i> .	68
FIGURA 14: Valor de hematócrito de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/Kg de EE de <i>Z joazeiro</i> .	68
FIGURA 15: Possíveis mecanismos de permeação de fármacos através da pele.	69

FIGURA 16: Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por ratos machos durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	73
FIGURA 17: Consumo médio diário de água (em ml) por ratos fêmeas durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	74
FIGURA 18: Consumo médio diário de água (em ml) por ratos machos durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de <i>Z. joazeiro</i> .	74
FIGURA 19: Valores de creatinina no soro de ratos fêmeas após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	80
FIGURA 20: Valores de triglicerídeos no soro de ratos fêmeas após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	80
FIGURA 21 : Valores de creatinina no soro de ratos machos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	81
FIGURA 22: Contagem de plaquetas em ratos machos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de <i>Z. joazeiro</i> durante 21 dias.	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ALT- Alanina Amino Transferase

AST- Aspartato Amino Transferase

CHCM- Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

cm-centímetros

dl-decilítros

Z. joazeiro – *Zizyphus joazeiro*

mm³-milímetros cúbicos

EE- Extrato Etanólico Bruto

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetracético

e.p.m.-erro padrão da média

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

IL-interleucinas

kg-quilogramas

LABETOX- Laboratório de Ensaios Toxicológicos

mg-miligramas

ml-mililitros

PMNL-Leucócitos Polimorfonucleares

RDC-Resolução da Diretoria Colegiada

rpm- rotações por minuto

RE –Resolução Específica

TNF-Fator de Necrose Tumoral

UI-unidades internacionais

VCM- Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	19
1.1. A PELE	19
1.2. INFLAMAÇÃO	21
1.3. FERIDAS E CICATRIZAÇÃO	25
1.4.TOXICOLOGIA DE COSMÉTICOS	29
1.5.TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS	30
1.6. <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.	34
 2.OBJETIVOS	 39
2.1.OBJETIVO GERAL	39
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
 3.MATERIAL E MÉTODOS	 41
3.1.LOCAL DA PESQUISA	41
3.2.MATERIAL BOTÂNICO	41
3.3.ANIMAIS	41
3.4.APARELHAGEM	42
3.5.OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>Zizyphus joazeiro</i>	42
3.6.AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE DE FERIDAS CUTÂNEAS	42
3.6.1.MODELO DE FERIDA POR EXCISÃO	42
3.6.2.AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DAS FERIDAS	43
3.7.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	44
3.7.1.EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	44
3.7.2.PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA	45
3.8.AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA	45
3.8.1.TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	45
3.8.2.CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS	46
3.8.3.PESO CORPORAL	47

3.8.4.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE	47
3.8.5.ESTUDO MACROSCÓPICO DOS ÓRGÃOS	47
3.8.6.TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÔNICA	47
3.8.7.TEMPERATURA	48
3.8.8.GLICEMIA	48
3.8.9.CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS	48
3.8.10.PESO CORPORAL	49
3.8.11.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE	49
3.8.12.ESTUDO MACROSCÓPICO DOS ÓRGÃOS	49
3.9.ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	 51
4.1.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE FERIDAS CUTÂNEAS E AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE FERIDAS	51
4.2.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA: EDEMA DE PATA E PERITONITE INDUZIDOS POR CARRAGENINA	56
4.3.TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E SUBCRÔNICA	61
 5.CONCLUSÕES	 89
 REFERÊNCIAS	 91
 ANEXOS	 108

RESUMO

ESTEVAM, E. C. **Ensaio farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos com *Zizyphus joazeiro* MART.** (Tese). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2012.

Zizyphus joazeiro Mart. é uma planta da família *Rhamnaceae*, popularmente conhecida como “juazeiro” ou “juá”, sendo suas folhas e cascas tradicionalmente empregadas pela população do nordeste do Brasil como febrífuga, antiinflamatória, no tratamento de problemas gástricos, doenças de pele e como agente de limpeza dos cabelos e dentes. A ampla utilização desta espécie vegetal pela população com fins medicinais justifica a investigação toxicológica farmacológica como segurança e eficácia para sua aplicação. Neste sentido foi proposto um estudo de sua atividade cicatrizante em feridas cutâneas excisionais experimentalmente induzidas tratadas com concentrações de 5, 10 e 20 mg/ml de extrato e ação antiinflamatória através dos modelos de edema de pata e peritonite induzida por carragenina, além de uma avaliação toxicológica pré-clínica aguda e subcrônica, com duração de 21 dias do extrato etanólico das cascas do caule de *Z joazeiro* nas doses de 4, 8 e 16 mg/kg após aplicação cutânea. Nos modelos animais avaliados, *Z joazeiro* demonstrou atividade positiva sobre a cicatrização de feridas com melhora de sinais clínicos. Nas doses de 35 e 175 mg/kg administradas durante 7 dias, reduziu o edema de pata e a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal após estímulo promovido por carragenina. Os resultados obtidos através de ensaios toxicológicos, mostraram que o extrato é levemente irritante para a pele na dose de 1000 mg/kg e é capaz de induzir alterações na ingestão de água e alimentos. Quando aplicado durante 21 dias nas doses de 4, 8 e 16mg/kg, a planta causou descamação da pele no local de aplicação, alterou a ingestão de água, alimentos e peso corporal em machos e fêmeas tratados com a maior dose. Foram constatadas alterações nos níveis de creatinina em ambos os sexos, triglicerídeos e plaquetas em machos. Apesar de ter sido considerada uma espécie vegetal com propriedades dermatocósméticas e de baixa toxicidade por via dérmica, o uso tópico deve ser realizado com cautela.

Palavras-chave: *Zizyphus joazeiro*, inflamação, cicatrização, toxicidade dérmica

ABSTRACT

ESTEVA, E. C. **Pharmacological and toxicological preclinical assays with *Zizyphus joazeiro* Mart.** (Thesis). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2012.

Zizyphus joazeiro Mart. is a plant of the Rhamnaceae family, popularly known as "juazeiro" or "juá", and its leaves and bark are traditionally used by the population of northeastern Brazil as a febrifuge, antiinflammatory, in the treatment of stomach problems, skin diseases and as a hair and teeth cleaning. The wide use of this plant species for medicinal purposes by the population justifies pharmacological and toxicological studies to ensure the safety and efficacy of its use. In this sense, a study of its healing activity in experimentally induced excisional skin wounds and anti-inflammatory action through the models of paw edema and peritonitis induced carrageenan and a toxicological preclinical acute and subchronic, lasting 21 days of the ethanol extract of stem bark of *Z. joazeiro* after dermal application were proposed. In animal models assessed, *Z. joazeiro* demonstrated positive activity on wound healing, improving their clinical signs. At doses of 35 and 175 mg/kg administered for 7 days, the paw edema and leukocyte migration into the peritoneal cavity after stimulation promoted by carrageenan were reduced. The results obtained through toxicological tests show that the extract is slightly irritating to skin at a dose of 1000 mg/kg, and is capable of inducing changes in water and food intake. When applied for 21 days at doses of 4, 8 and 16mg/kg, the plant caused flaking of the skin application site, changed the water and, food intake and body weight in males and females treated with the higher dose. Changes were found in creatinine levels in both sexes, triglycerides and platelet counts in males. Despite being considered a species with dermatocosmetic properties and low dermal toxicity, its continued use by the population should be done cautiously.

Keywords: *Zizyphus joazeiro*, inflammation, wound healing, dermal toxicity

CAPÍTULO I

1.INTRODUÇÃO

1.1. A PELE

A pele é o maior órgão do corpo, tanto em peso quanto em área de superfície, atua na proteção e eliminação, além de ser um órgão sensorial, que recebe e conduz estímulos. Apresenta múltiplas funções, entre as quais, protege o organismo contra a perda de água por evaporação (dessecação) e contra o atrito. Atua fazendo a manutenção da temperatura corporal, pois através das suas terminações nervosas, está em comunicação constante com o ambiente; por meio dos seus vasos, glândulas e tecido adiposo. Possui a capacidade de impedir invasão de microorganismos, regular a pressão sanguínea e proteger contra raios ultravioleta. Suas glândulas sudoríparas participam da termorregulação e da excreção de várias substâncias (CHARLET, 1996; SAMPAIO; RIVITTI, 2001; STEVENS; LOWE, 2001; IRION, 2005; YOUNG et al, 2007).

Anatomicamente, a pele humana pode ser descrita como um órgão estratificado com duas camadas principais de tecido, a epiderme e a derme e uma terceira camada, o tecido subcutâneo (Figura 1). A derme subjacente contém uma variedade de tipos celulares, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos inseridos em uma densa trama de tecido conectivo. Acima da derme e separada dela por uma membrana basal, a epiderme é composta principalmente de camadas de queratinócitos, onde as células do estrato córneo ou corneócitos, são banhadas por um envelope rico em proteínas (STEVENS; LOWE, 2001; YOUNG et al, 2007; PROW et al, 2011).

A epiderme é a camada mais externa da pele, que abrange as células epiteliais escamosas estratificadas, sendo elas o estrato córneo, basal, camada espinhosa e a camada granulosa (STEVENS; LOWE, 2001; REMINGTON, 2004; IRION, 2005).

O estrato córneo por ser o mais superficial é o mais importante para a cosmética. A derme apresenta função protetora e de sustentação, sendo o local onde se formam as glândulas sebáceas e folículos pilosos. Apresenta ainda fibras colágenas, elásticas e reticulíneas. A derme tem a importante função de nutrir a epiderme, pois esta exige uma constante reposição de nutrientes necessários para manter a atividade mitótica. Descrevem-se na derme duas camadas, de limites

pouco distintos, que são a: papilar, superficial, e a reticular, mais profunda (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; REMINGTON, 2004; IRION, 2005).

A camada subcutânea de gordura que serve como amortecedor para a derme e a epiderme. Nesta camada se encontram fibras colágenas provenientes da derme que cruzam entre as células gordurosas acumuladas, fornecendo uma conexão entre as camadas superficiais da pele e da camada subcutânea (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; STEVENS; LOWE, 2001; REMINGTON, 2004).

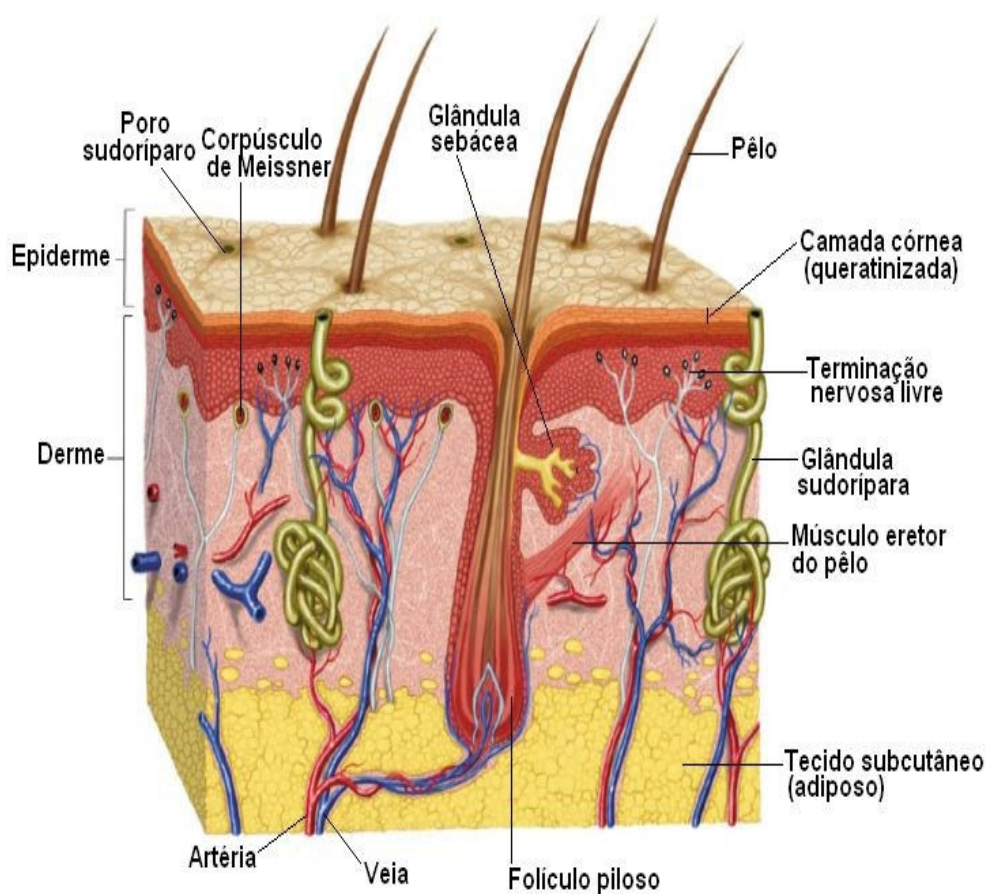


FIGURA 1: Estrutura da pele humana
(Fonte: WILLIAMS et al, 2000)

A barreira da pele humana começa seu desenvolvimento no útero durante o primeiro trimestre com a estratificação da epiderme. A formação do vernix (substância gordurosa que recobre a pele do feto) no 3º trimestre contribui para os passos finais da maturação da barreira. A maturação das células epidérmicas ocorre continuamente durante todo o processo, enquanto o estrato córneo bem como as ondulações dermo-epidérmicas se torna visível na 34ª semana gestacional.

Acredita-se que neste momento a maturação da barreira está quase completa e a epiderme fetal começa a funcionar como barreira (NIKOLOVSKI et al, 2008).

O estrato córneo representa a principal barreira física da pele e, por isso, para que uma substância permeie a pele, a difusão através deste estrato é o passo limitante. Inversamente, este mesmo estrato córneo é também a principal barreira para a difusão da água para fora da pele (PROW et al, 2011).

Assim como os outros tecidos do organismo, a pele está sujeita ao desenvolvimento de inúmeras condições patológicas. Deste modo, diversos fatores que vão desde alterações na maturação celular, danos à membrana basal epidérmica ou destruição de melanócitos resultam nas chamadas “doenças da pele”.

Além desses distúrbios, a pele também está sujeita a irritações provocadas por agentes ambientais, já que possui células especializadas no reconhecimento e processamento de antígenos monitorando o ambiente na superfície epidérmica, estando ativas nas doenças inflamatórias da pele como a dermatite de contato (YOUNG et al, 2007).

1.2. INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais ou invasão por agentes infecciosos. Suas características clínicas foram descritas há aproximadamente 2000 anos sendo listados como os sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor (hipertermia) e dor (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Em resposta a injúria ou infecção, as células especializadas de primeira linha, leucócitos (neutrófilos polimorfonucleares e eosinófilos) migram para as regiões lesadas com o objetivo de neutralizar e eliminar estes estímulos danosos. Então inicia-se a síntese de mediadores pró-inflamatórios como eicosanóides, citocinas, moléculas de adesão celular e óxido nítrico entre outros (Figura 2). Se essa seqüência de passos for rigorosamente seguida, a inflamação aguda se resolverá sem causar dano excessivo ao tecido e retornando ao estado de normalidade (SERHAN, et al, 2007).

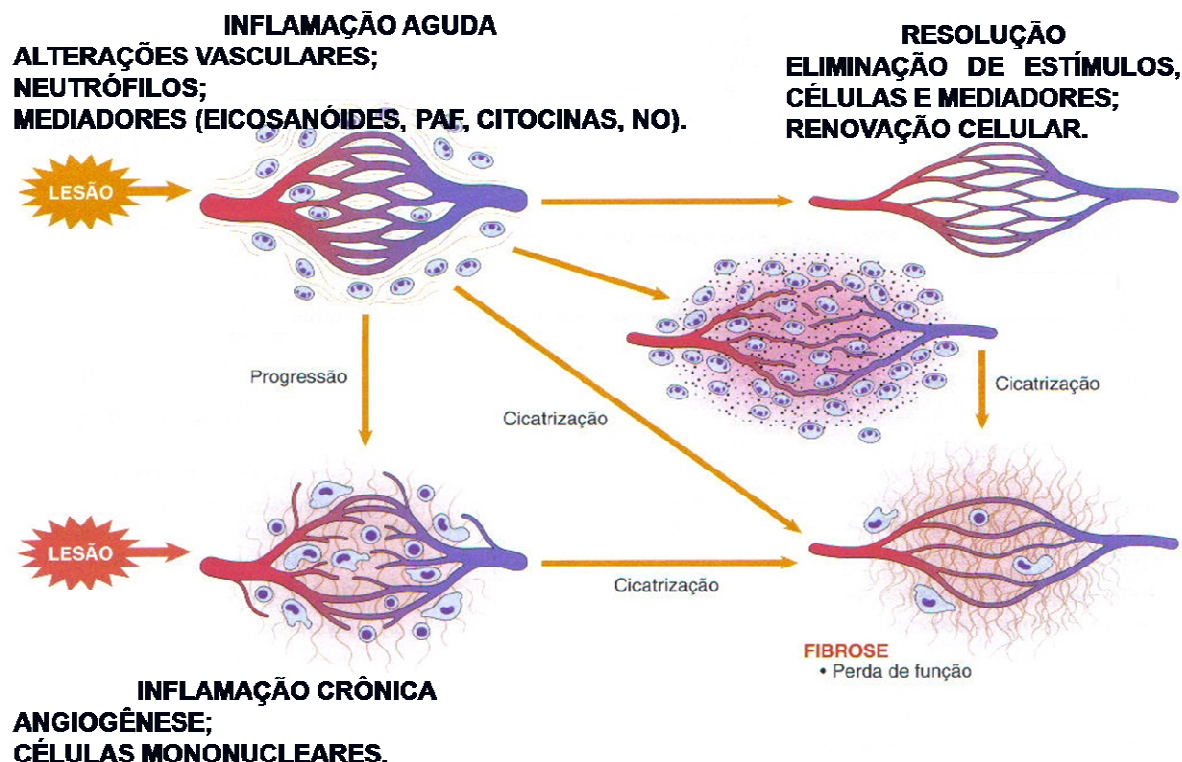


FIGURA 2: Esquema com a sequência de eventos do processo inflamatório.
(Adaptado de ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 2005)

Os sinais clínicos da inflamação surgem em decorrência dos diversos estímulos e mediadores liberados durante o processo. Assim, a dor é uma função fisiológica que pode ser definida como uma sensação desagradável, de intensidade variável, decorrente da reação em relação a lesões reais ou potenciais. A febre geralmente acompanha o conjunto de eventos da resposta inflamatória, principalmente na reação da fase aguda e a hiperemia é mediada principalmente por IL-1 e TNF, além de outras substâncias pró-inflamatórias como as prostaglandinas que são provenientes da metabolização do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (CROSTEIN, 2002; RANG et al, 2003).

A ciclooxigenase (COX) é uma prostaglandina-endoperóxido sintase, que cataliza a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Até o momento foram descobertas três isoformas de COX: COX-1, constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, é responsável por várias funções fisiológicas como, proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, fluxo sanguíneo renal e homeostase vascular; COX-2, cuja expressão é induzida por uma variedade de estímulos incluindo a exposição a fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor, carcinógenos e endotoxinas; COX-3, cuja função acredita-se estar

relacionada aos mecanismos centrais de dor e febre (LEE et al, 2003; PRAVEEN-RAO; KNAUS, 2008).

Durante o processo inflamatório, o RNAm e a atividade protéica para COX-1 não sofre alterações, entretanto, ocorre uma intensa elevação nos níveis de COX-2 levando a produção aumentada de prostanóides (RAO; KNAUS, 2008).

Prostanóides (PGs) são produtos finais do metabolismo dos ácidos graxos produzidos via COX. PGs são conhecidos como importantes mediadores fisiológicos e patológicos implicados em uma variedade de quadros clínicos como inflamação, dor, febre, câncer, glaucoma, disfunção sexual masculina, osteoporose, doença cardiovascular e asma (ABRAMOVITZ; METTERS, 1998).

A síntese de prostanóides tem início a partir da liberação de ácido araquidônico (AA) livre dos fosfolipídeos de membrana, uma reação catalizada pela ativação enzimática da fosfolipase A2 (PLA2). A liberação de AA livre é seguida pela conversão a prostaglandina G2 (PGG2), pela atividade ciclooxygenase da enzima COX, e então a prostaglandina H2 (PGH2) pela atividade peroxidase. PGH2, é a matriz que permite a formação de todas as prostaglandinas, incluindo tromboxano A2 (TXA2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2) e prostaglandina I2 (PGI2) (LEE et al, 2003).

O ácido araquidônico também pode ser convertido a leucotrienos (LTs) pela ação da enzima lipooxygenase-5. LT-C4, LT-D4 e LT-E4 são potentes broncoconstritores, enquanto LT-B4 é quimiotático para leucócitos e desempenha importante papel no desenvolvimento de úlceras gastrointestinais por contribuir com o processo inflamatório (GADDI; CICERO; PEDRO, 2004).

Outro mediador envolvido no processo inflamatório é o óxido nítrico (NO). O acúmulo de leucócitos e sua ativação levam à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como ânion superóxido (O_2^-) e NO, respectivamente. O NO é formado a partir da oxidação do nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). Existem pelo menos três isoformas bem definidas dessas enzimas: NOS neuronal (NOS_n ou NOS I), primeiramente descrita nos neurônios; NOS induzida (NOS_i ou NOS II) presente em leucócitos ativados e NOS endotelial (NOS_e ou NOS III) primeiramente descrita em células endoteliais (BENJAMIM, 2001)

Dentre seus vários efeitos, o NO é uma molécula com atividade vasodilatadora e citotóxica, sendo parte do arsenal microbida utilizado pelos

leucócitos. Macrófagos ativados apresentam atividade microbicida intracelular por mecanismos dependentes de NO (BENJAMIM, 2001).

A resposta inflamatória aguda é um mecanismo protetor auto-limitado. Em resposta a lesões ou infecções, respostas inflamatórias excessivas ou descontroladas podem levar a desordens crônicas. Mediadores pró-inflamatórios derivados dos neutrófilos, incluindo leucotrienos e prostaglandinas são formados na fase inicial da resposta aguda inflamatória contida que acaba sendo amplificada (SERHAN et al, 2011).

Existem diversas condições clínicas em que ocorre uma inflamação crônica persistente sem que exista uma infecção crônica. Este é o caso da maioria das doenças inflamatórias imunomediadas como a artrite reumatóide, a asma e a psoríase. E nestas condições, os agentes antiinflamatórios clássicos podem apenas aliviar os sintomas sem, no entanto, alterar o curso da doença (SERHAN, et al, 2007).

Os principais agentes antiinflamatórios estão representados pelos glicocorticóides e pelos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). Estes últimos incluem vários agentes que pertencem a classes químicas diferentes e apresentam três efeitos principais: modificação da resposta inflamatória (antiinflamatório), redução de alguns tipos de dor (analgésico) e redução da temperatura (antipirético). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da ciclooxigenase (COX) e conseqüente inibição na síntese de prostaglandinas e tromboxanos (RANG et al, 2003).

Os glicocorticóides são a terapia mais efetiva no controle de longa duração de condições inflamatórias crônicas como asma, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, além de tratar doenças severas de pele. Exercem seus efeitos por ação inibitória na transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas 4, 5 e 8 (IL-4, IL-5 e IL-8) e fator estimulante de colônias para granulócitos-macrófagos (GM-CSF). São capazes ainda de diminuir a produção de prostanóides e a ação das células T auxiliares, atividade de neutrófilos e macrófagos, entre outras ações (ADCOCK, 2001; ADCOCK; CARAMORI, 2001; BIDDIE; CONWAY-CAMPBELL; LIGHTMAN, 2011).

Entretanto, o uso prolongado de altas doses de glicocorticóides acarreta diversos efeitos indesejáveis e potencialmente sérios relacionados aos sistemas

musculoesquelético, endócrino, cardiovascular, trato gastrointestinal e sistema nervoso central (MONGHADAM-KIA; WERTH, 2010).

A terapia antiinflamatória atual objetiva controlar os sinais cardinais da inflamação, antagonizando ou bloqueando mediadores pró-inflamatórios chave que são liberados no início de uma resposta inflamatória aguda (SERHAN et al, 2007).

Os primeiros AINEs utilizados eram conhecidos por inibir ambas as isoformas de COX e seus efeitos adversos no trato gastrointestinal foram atribuídos a inibição das prostaglandinas gastroprotetoras produzidas pela via da COX-1. Foram então dirigidos esforços para o desenvolvimento de inibidores seletivos da COX-2 na intenção de desenvolver antiinflamatórios superiores e agentes analgésicos com efeitos adversos reduzidos em comparação aos AINEs tradicionais (RAO; KNAUS, 2008).

Dentro deste contexto, é de fundamental importância a busca por substâncias que possam promover os mediadores da resolução da inflamação sendo assim homeostáticos e modulatórios em suas ações e, portanto melhor toleradas pelo organismo e possuindo maior eficácia (SERHAN et al, 2007).

1.3. FERIDAS E CICATRIZAÇÃO

As feridas são interrupções da integridade cutâneo-mucosa e resultam dos desequilíbrios e agravos da saúde das pessoas. Podem ser classificadas quanto ao agente causador em incisa ou cortante; contusa; lacerada; perfurante; penetrante; escoriação; térmica ou queimadura; patológica; iatrogênica, amputação. Quanto à etiologia são classificadas em ferida aguda ou crônica (IRION, 2005).

A cicatrização de feridas é o processo pelo qual um tecido lesado é restaurado tão próximo quanto possível de seu estado normal, dependendo principalmente da habilidade de reparação do tecido, estado geral de saúde do mesmo e do tipo e extensão da lesão (NAYAK et al, 2006).

Muitos eventos bioquímicos e celulares estão envolvidos neste processo que resulta da resposta tecidual à lesão e dos quais depende a qualidade da cicatriz formada. O processo de reparação tecidual é didaticamente dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação e reepitelização e por fim, contração

da ferida com deposição de matriz extracelular e remodelação (JIMENEZ; RAMPY, 1999; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Logo após o tecido ser lesionado, uma cobertura primária composta por fibrina restabelece a hemostase e fornece um ambiente para que as plaquetas secretem fatores de crescimento (FCs), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC). Estes mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos, os quais secretam diversos fatores específicos que orquestram as fases seguintes do processo de reparação tecidual (IRION, 2005).

A cicatrização de feridas cutâneas pode ser dividida em dois tipos, tomando como base sua natureza: cicatrização por primeira intenção, que ocorre em ferimentos com margens opostas como em uma incisão cirúrgica limpa e não infectada e cicatrização por segunda intenção, que ocorre em ferimentos com margens separadas em que houve perda mais excessiva de células e tecidos e o processo de reparação é mais complicado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A cura de feridas profundas é uma série complicada e ordenada de eventos que normalmente levam a um resultado estrutural e anatomicamente aceitável. A iniciação deste processo é sinalizada por um insulto aos tecidos, devido a um trauma não intencional, tal como, abrasões, escoriações, queimaduras, injúrias hipotérmicas, isquemia ou outras numerosas etiologias, ou por um defeito que foi planejado como uma incisão cirúrgica ou piercing. A sequência que se segue leva ao reparo e restauração do sítio em questão. Numerosos fatores de crescimento e tipos celulares estão envolvidos (RIVERA; SPENCER, 2007).

Após uma injúria tecidual, três fases que se sobrepõem podem ser distinguidas (Figura 3): uma fase inflamatória, caracterizada pela infiltração de neutrófilos e macrófagos; uma fase proliferativa, dominada pela deposição de colágeno e angiogênese, e uma fase de maturação, envolvendo a resolução da inflamação e a maturação da cicatriz (DOVI; LI-KE; DIPIETRO, 2003).

Os processos envolvidos na cicatrização de feridas são epitelização, contração e deposição de tecido conectivo. O envolvimento de cada fase varia dependendo do tipo, localização e fatores ambientais influenciando a ferida. A epitelização é o processo onde os queratinócitos migram para as camadas mais baixas da pele e se dividem. A contração é o processo contração tecidual, diminuindo ou fechando a ferida (SUMITRA; MANINKANDAN; SUGUNA, 2005). Em seguida ocorre deposição de tecido conectivo.

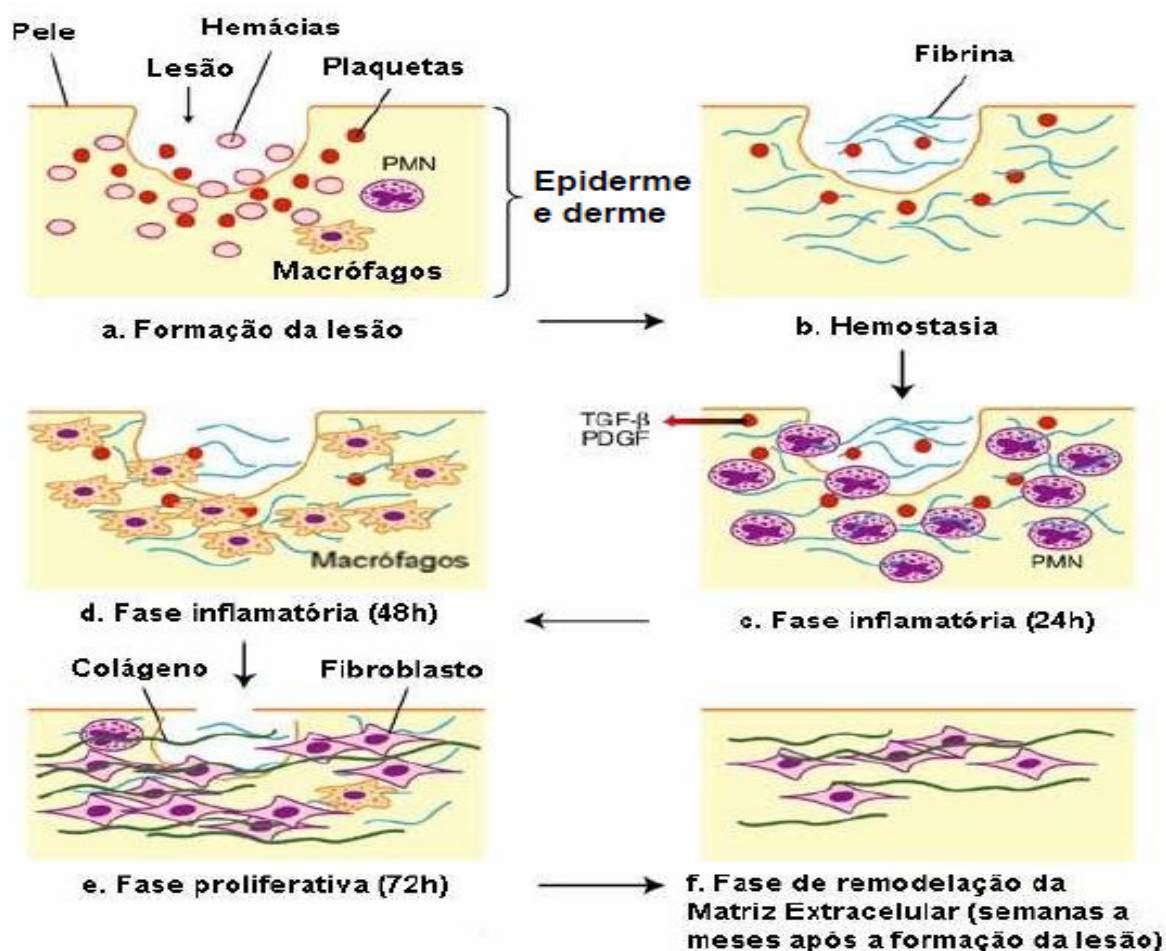


FIGURA 3: Etapas do processo cicatricial de feridas cutâneas
(Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine, 2003)

A célula responsável pela contratura tecidual fibrótica é o miofibroblasto que tem um fenótipo caracterizado por produção excessiva de colágeno da matriz extracelular (ECM) e força tênsil (HINZ; GABBIANI, 2010).

Depois da injúria, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos contráteis e secretórios que contribuem para o reparo tecidual durante a cicatrização da ferida, mas que podem reduzir drasticamente a função do órgão quando a contração e a matriz extracelular se tornarem excessivos. Logo após a lesão, os fibroblastos se tornam ativos para migrar para dentro do tecido lesado e sintetizar componentes de ECM por citocinas localmente liberadas das células inflamatórias e células residentes ou células epiteliais malignas. Outro importante estímulo para esta transição fenotípica é a alteração do microambiente mecânico, já que os fibroblastos intactos são bastante tensionados por ligações cruzadas com ECM e esta estrutura protetora é perdida na injúria. Deste modo, os fibroblastos adquirem fibras de

tensão contrátil que são primeiramente compostas por actinas citoplasmáticas, caracterizando os protomiofibroblastos (HINZ et al, 2007).

Como parte da fase inflamatória, uma maciça infiltração de neutrófilos que atinge seu pico um dia após a injúria, na região subepidérmica no leito da ferida, pode ser observada. Os neutrófilos iniciam a migração em questão de minutos após a injúria e acredita-se que sua função é combater invasões por microrganismos e limpar os debris celulares, protegendo o hospedeiro da infecção. Durante este processo, os neutrófilos secretam uma bateria de substâncias bioativas, como proteases e espécies reativas de oxigênio que podem levar a sérias lesões teciduais (DOVI; LI-KE; DIPIETRO, 2003).

Fatores locais e sistêmicos podem influenciar o processo cicatricial, uma vez que o mesmo pode ser modificado pelo estado nutricional do indivíduo, sua condição metabólica, condição circulatória, fatores mecânicos, extensão da lesão, presença de corpos estranhos e infecção (CARVALHO, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A causa mais importante de atraso de cicatrização é a infecção (KUMAR et al, 2005). A infecção compromete a reepitelização e as feridas não cicatrizam enquanto estiverem clinicamente infectadas, já que todo material estranho resultante do processo inflamatório precisa ser removido do leito das feridas para que isto aconteça (BERGSTROM et al., 1995). Além disso, a pele possui a função de barreira protetora frente a todos os tipos de fatores externos que possam ser prejudiciais ao organismo e um diagnóstico imediato e um tratamento eficaz previnem dermatoses e, em situações extremas, a sepse que pode ocasionar morte do indivíduo (BIKOWSKI, 1998).

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio produzem dano tecidual e desempenham importante papel na lesão do tecido. Isto é particularmente encontrado durante as desordens do tecido conectivo como fibrose, bem como durante a cicatrização. Neste contexto, alguns antioxidantes como curcumina e vitamina E tem sido reportados por minimizar o dano oxidativo tecidual (SUMITRA, MANINKANDAN, SUGUNA, 2005).

Os objetivos da farmacologia da cicatrização de feridas são estudar a influência de diversas medidas no manejo das feridas e realizar uma triagem das substâncias que promovam a cicatrização (NAYAK et al, 2006).

Vários materiais têm sido usados até agora e afetam a cicatrização de diferentes formas. Entretanto, pesquisas intensas nesta área ainda não encontraram um agente eficaz tanto do ponto de vista da cicatrização, quanto do ponto de vista econômico, que pudesse abreviar a longa hospitalização dos pacientes após cirurgias ou outras lesões (NAYAK et al, 2006).

1.4.TOXICOLOGIA DE COSMÉTICOS

Cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores ou protegê-lo ou mantê-los em bom estado (CHORILLI et al, 2009).

Do ponto de vista dermatológico, os cosméticos podem ser agrupados como: cosméticos de cuidado com a pele (agentes hidratantes e de limpeza); cosméticos de cuidado com o cabelo (shampoos, colorações para cabelo, agentes modeladores); cosméticos de cuidado com a face (formulações faciais, pós, sombras, máscara, batons); cuidado com as unhas (esmaltes, removedores); produtos de fragrância (desodorantes, pós-barba, perfumes) e protetores contra radiação UV (NIGAM, 2009).

A implementação da política de cosmetovigilância é de extrema importância como forma de garantir ao usuário a segurança e eficácia dos produtos, bem como facilitar o acesso a relatos sobre problemas de uso, defeitos de qualidade, efeitos indesejáveis, além de ser uma maneira de proibir e/ou coibir o uso indiscriminado de substâncias que podem se apresentar tóxicas (CHORILLI et al, 2009).

Vários efeitos adversos a cosméticos podem ocorrer na forma de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, absorção percutânea, irritação da pele, irritação ocular, sensibilização e fotosensibilidade da pele, mutagenicidade, genotoxicidade, fototoxicidade e fotoirritação. Deste modo, muitos métodos são aplicados para estudar o comportamento tóxico de substâncias usadas em cosméticos. Estudos *in vivo* são principalmente aplicados para investigar o perfil toxicológico de um ingrediente cosmético quando aplicado a um animal por uma rota de exposição (tópica, oral, inalatória) similar àquela da exposição humana. Eles permitem a

determinação do NOAEL (nível de efeito adverso não observável), e também efeitos adversos de altas exposições (NIGAM, 2009).

Tais medidas são imprescindíveis como forma de evitar tanto reações adversas relativamente simples, como irritação da pele, vermelhidão, queimaduras, lacrimejamento, visão embaçada, hipersensibilidade e queda de cabelo, quanto reações mais complexas, como risco de aparecimento de câncer na boca, nas narinas, no pulmão, no sangue e na cabeça, que podem ser decorrentes da inalação e exposição prolongada a produtos que apresentam, por exemplo, formaldeído em concentração inadequada (CHORILLI et al, 2007b).

A avaliação da segurança de produtos cosméticos envolve o conhecimento de muitas áreas, incluindo o uso (e o mau uso) do produto pelo consumidor, os métodos de teste e as concentrações máximas permitidas das matérias primas nos produtos (CHORILLI et al, 2009).

As desordens da pele estão entre as principais doenças para as quais a medicina tradicional é utilizada em larga escala. Há poucas localidades do mundo onde não haja ninguém que não conheça uma planta local capaz de ser aplicada em uma queimadura ou ferida recente. A prática tradicional de tratar topicamente as condições dermatológicas com remédios derivados de plantas data de culturas do antigo Egito e permanece vital hoje em culturas civilizadas (TESHOME et al, 2008). É com base nestas considerações que a avaliação toxicológica de espécies vegetais popularmente utilizadas por aplicação cutânea merece atenção.

1.5. TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação quanto na cura de enfermidades. Sua utilização como recurso terapêutico é baseada na cultura popular, constituindo um emprego predominantemente empírico. Apesar disso, elas continuam a ser usadas pela população e não foram substituídas pelos fármacos sintéticos por vários motivos, como sua eficácia, o custo elevado dos medicamentos alopáticos convencionais e a falta de acesso aos mesmos. Tal valorização das plantas medicinais impulsionou a busca de informações comprovadas cientificamente sobre sua segurança e eficácia terapêutica (COSTA, 1994; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES et al., 2000).

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. A Organização Mundial de Saúde (OMS) no início da década de 1990 divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Tal constatação se deve ao fato de que existem obstáculos básicos para utilização da medicina alopática pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares até a obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos somados com a facilidade de obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização por populações dos países em desenvolvimento. Ainda hoje nas regiões mais pobres do Brasil e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al, 2002; VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas medicinais da flora nativa são utilizadas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes, essas plantas são inclusive empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Estima-se que existam aproximadamente 500 mil espécies de plantas no mundo. Destas, o Brasil possui cerca de 120 mil, tomando a posição de país com a maior cobertura vegetal do globo terrestre. Deste modo, uma questão a ser considerada é a crescente utilização de plantas medicinais e fitoterápicos como componentes alternativos ou complementares da terapêutica medicamentosa (FRANÇA et al, 2007)

Gurib-Fakim (2006) afirma que entre compostos químicos extraídos de plantas superiores utilizados na medicina mundial, 74% são utilizados com os mesmos propósitos ou com propósitos similares àqueles da planta da qual são derivados. Isto mostra a importância da etnobotânica, já que a maioria dos compostos secundários oriundos de plantas e empregados na medicina moderna foram primeiramente descobertos através de investigações etnobotânicas.

A Organização Mundial de Saúde classificou 252 drogas como medicamentos básicos e essenciais e dentre estas, 11% são exclusivamente originárias de plantas

e um número significativo é de fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais (RATES, 2001).

A planta possui um laboratório químico único no qual as células vegetais utilizando substâncias químicas simples e fontes de energias naturais, conseguem sintetizar substâncias complexas e fundamentais para a vida do homem, sendo que existem dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o desenvolvimento da planta: metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos e metabólitos secundários, resultantes da biossíntese dos metabólitos primários, como os compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides e saponinas, cuja função fisiológica associa-se à defesa da planta contra agentes externos, ou seja, doenças, pragas, radiação solar, entre outros (CASTELLANO, 1981; MONTANARI, 2002; DOURADO, 2006).

Alguns metabólitos secundários possuem reconhecida importância comercial, pois são biologicamente ativos e, como muitos deles possuem propriedades terapêuticas importantes, são considerados princípios ativos para vários medicamentos, tais como a digoxina, a quinina, a morfina e o ácido salicílico (MARASCHI; VERPOORTE, 1999).

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA, medicamento fitoterápico é um produto obtido empregando exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança sejam validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (RDC nº 14/2010).

Apesar de muitas plantas serem usadas há séculos e serem obviamente “naturais”, a percepção popular de que este atributo sozinho garante segurança é tão ingênua quanto a suposição de que seu tempo de uso comprova sua eficácia (TALALAY; TALALAY, 2001). É neste contexto que a percepção popular de que produtos naturais não apresentam toxicidade surge, uma vez que o aparecimento de efeitos tóxicos do produto é apenas ligado ao seu uso quando os efeitos ocorrem imediatamente após a administração (FÉRES *et al.*, 2006).

No entanto, é preciso lembrar que um remédio pode ser transformado em veneno através da interferência de diversos fatores relacionados tanto à condição de exposição ao produto utilizado como dose, frequência de uso e / ou exposição e forma farmacêutica quanto ao organismo usuário como idade, sexo, raça e estados fisiopatológicos (AMARAL; BARCIA, 2003). Sendo assim, parece que o grande

problema está associado ao uso inadequado dos produtos, já que os efeitos maléficos ou benéficos dos medicamentos dependem inicialmente, de sua forma de utilização (MARIZ, 2007).

A crença na “naturalidade inócua” dos fitoterápicos e plantas medicinais não é facilmente contradita, uma vez que as comprovações científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos indesejáveis relacionado ao uso das espécies vegetais medicinais, raramente chegam ao alcance de seus usuários atendidos nos serviços de saúde pública (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como sua interação com outras drogas, inclusive com medicamentos alopáticos, ocorrem comumente (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Por fim, deve-se levar em consideração o fato de que as plantas medicinais são misturas de substâncias químicas e quando estudos toxicológicos com misturas químicas de qualquer origem são realizados, faz-se necessário reconhecer que diferentes tipos de interações entre os constituintes dessa mistura e o organismo animal podem ocorrer (FERON; GROTEN, 2002), o que demonstra a complexidade de ações que podem ser induzidas por estas plantas e sua dificuldade de interpretação.

Todos os produtos derivados de plantas usados como drogas devem ser avaliados para segurança e eficácia por métodos idênticos àqueles usados para novos compostos sintéticos. Esta prática inclui avaliação pré-clínica de segurança e eficácia, estudos controlados de fase clínica (placebo – controlados, randomizados, duplo – cegos, estatisticamente validados) com consentimento dos participantes da pesquisa e a exigência de que tais estudos sejam conduzidos de acordo com regulamentações federais (TALALAY; TALALAY, 2001).

No Brasil, a Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, determina que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (Toxicologia pré-clínica e Toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica (Farmacologia pré-clínica e Farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde-CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o “Guia

para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, que é normatizado pela Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004.

Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de Toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para Registro e renovação de registro de fitoterápicos. De acordo com este guia, deverão ser realizados ensaios para avaliação de Toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas), ensaios para avaliação de Toxicidade de doses repetidas (avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas) e estudos sobre Genotoxicidade (devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos).

Em nosso país, o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é uma prática realizada por milhares de brasileiros, sendo influenciada por fatores sociais, econômicos e culturais. Frente a esta realidade, faz-se necessária a adoção de medidas que visem a ampliação das pesquisas e propiciem o uso seguro das plantas medicinais.

1.6. *Zizyphus joazeiro* Mart

Zizyphus joazeiro Mart (Figura 4), é uma das poucas árvores respeitadas pelo homem da caatinga. Trata-se de uma árvore frondosa de porte mediano pertencente à família *Rhamnaceae*, perenifólia, heliófita e seletiva higrófito que cresce em tabuleiros áridos e pedregosos. Seu profundo sistema radicular permite retirar água do subsolo para manter-se verde mesmo durante o período de estiagem. Possui flores pequenas amarelo-esverdeadas e fruto drupáceo com caroço grande envolto por polpa branca e mucilagínosa (TRIGUEIRO, 1981, LORENZI, 1992; BARBOSA-FILHO, 1997; CARVALHO, 2007).

Popularmente conhecida como juazeiro, joazeiro, joá, juá-espinho ou laranjeira-de-vaqueiro, é nativa da região nordeste do Brasil (Piauí até o norte de Minas Gerais) especialmente das caatingas e campos abertos do polígono da seca. Cresce lentamente, conserva-se sempre verde e pode viver mais de 100 anos. Pode atingir mais de 10 metros de altura e possui ramos tortuosos protegidos por espinhos (LORENZI; ABREU MATOS, 2002; LORENZI, 2002; VIEIRA, 2007).

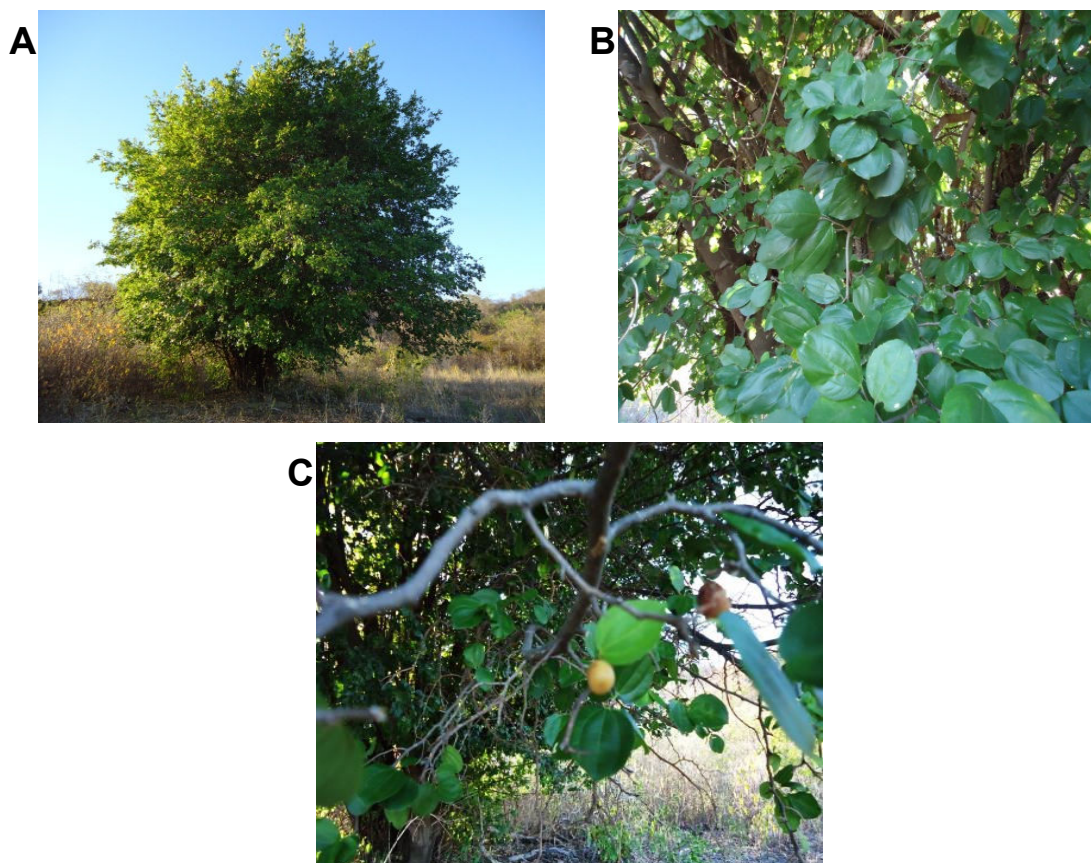


FIGURA 4- *Zizyphus joazeiro* Mart.: A) aspecto geral, B) partes aéreas e C) folhas e frutos (Foto cedida por: RABÊLO, 2012)

A madeira é utilizada em construções rurais, marcenaria, para lenha, confecção de moirões e de carvão. A árvore proporciona sombra, além de possuir qualidades ornamentais, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo em geral, especialmente na arborização de ruas e jardins (VIEIRA, 2007).

Seus frutos são comestíveis, ricos em vitamina C, sendo consumidos in natura ou utilizados para fazer geléias, além de serem utilizados como alimento do gado na época da seca. O suco do fruto é utilizado para tratar a pele acneica, e limpar e amaciar a pele do rosto (VIEIRA, 2007; CAVALCANTI et al, 2011).

Da casca retiram-se as raspas, ricas em saponinas com valor detergente para diferentes serviços de limpeza nos lares, também sendo popularmente utilizadas como tratamento de dermatoses, sangramento gengival, cicatrizante de feridas, agente de limpeza dos cabelos e dos dentes, tônico capilar e anti-seborréia. Por via oral, o produto de sua maceração é indicado para dispepsia, indigestão, e tratamento de febres das mais diversas origens e como antiinflamatório. Suas folhas são preparadas na forma de xarope para o tratamento de bronquite, tosse e úlceras

gástricas (BARBOSA-FILHO, 1997; LORENZI; ABREU MATOS, 2002; OLIVEIRA et al, 2007; ALBUQUERQUE et al, 2007; CARVALHO, 2007; SANTOS, 2009).

Quanto à composição química, é citada a presença dos triterpenóides ácido betulínico e lupeol, do alcalóide anfibina-D além de grande riqueza em saponinas, os jujubosídeos (LORENZI; ABREU MATOS, 2002).

Estudos realizados com o extrato aquoso das cascas do caule da planta demonstraram sua atividade antipirética por via oral em coelhos (NUNES et al, 1987), além de uma atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, um dos causadores das placas dentais sendo, por isso, largamente empregado na fabricação de cremes dentais (DINIZ et al, 2006).

Barros et al. (1970), em uma triagem farmacológica realizada com diversas plantas brasileiras, relatam que os extratos etanólico e aquoso de *Z. joazeiro* apresentaram ação espasmogênica em duodeno de coelho e íleo de cobaia, promoveram a contração do músculo reto abdominal de sapo e efeito estimulante do coração de sapo.

Trigueiro (1981) utilizando o extrato etanólico das cascas do caule de *Z. joazeiro* determinou uma DL50 de 600 mg/kg por via intraperitoneal em camundongos, sem, no entanto verificar a ocorrência de mortes no tratamento via oral até a dose máxima de 2000 mg/Kg. Porém, uma avaliação toxicológica pré-clínica realizada em nosso laboratório demonstrou que um extrato etanólico de *Z. joazeiro* quando administrado por via oral a camundongos machos e fêmeas é capaz de reduzir o percentual de neutrófilos circulantes, o que pode indicar uma atividade desta espécie sobre células do sistema imunológico (ESTEVAM et al, 2008).

Outras espécies do gênero *Zizyphus* demonstraram atividades antiinflamatória e analgésica (BORGI et al, 2007), além de apresentaram ação gastroprotetora em ratos, a qual foi atribuída a efeito antissecretor e estimulante de prostaglandinas (SHAH et al, 1997; WASHIDA et al, 2007).

O amplo emprego dessa planta nas práticas caseiras da medicina, odontologia e cosmética aplicadas pela população, é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos químicos e farmacológicos, visando seu melhor aproveitamento (LORENZI; ABREU MATOS, 2002).

Através da observação dos dados da literatura verificou-se que poucos estudos têm sido feitos acerca das atividades farmacológicas de *Z. joazeiro* com

respeito a suas indicações populares de uso, justificando assim, uma avaliação de sua possível atividade farmacológica e de sua toxicidade por via tópica.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Realizar ensaios e farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos com o extrato etanólico da casca do caule de *Zizyphus joazeiro*.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade cicatrizante de feridas cutâneas do extrato etanólico de *Z. joazeiro*;
- Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato em modelos animais de inflamação aguda;
- Realizar ensaio toxicológico pré-clínico agudo em roedores pela via cutânea;
- Realizar ensaio toxicológico pré-clínico sub-crônico em roedores pela via cutânea.

CAPÍTULO III

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL DA PESQUISA

As atividades desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.2. MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizadas as cascas do caule de *Z. joazeiro*, coletadas na cidade de Passira, estado de Pernambuco cuja identificação botânica foi realizada no Herbário UFP Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, onde uma excisata encontra-se depositada sob o número de registro 48.432.

3.3. ANIMAIS

Camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), linhagem Swiss pesando entre 25-35 g e ratos *Ratus norvegicus* albinos (machos e fêmeas nulíparas e não grávidas), linhagem Wistar pesando entre 180-280 g todas procedentes do Biotério Prof. Thomas George da UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Purina tipo pellets e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso.

Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho, por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba sob o n° de protocolo 0808/09.

3.4. APARELHAGEM

- ✓ Analisador bioquímico automático – Cobas Mira Plus® - Roche Diagnostic System/Suíça - para determinações bioquímicas no soro;
- ✓ Analisador hematológico celular automático – ABX Vet ABC® - Horiba/França - para determinação dos parâmetros hematológicos. Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio Olympus®/Japão.
- ✓ Glicosímetro Accu-Check® Performa Roche®/Suíça - monitor de glicemia com tiras reativas
- ✓ Termômetro digital, modelo MC – 3BC®, OMRON/China.

3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Zizyphus joazeiro*

O Extrato Etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* foi fornecido pela Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima do Laboratório de Biofísica Química, Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

As cascas do caule secas e pulverizadas foram submetidas a uma extração inicial utilizando-se hexano. Após filtração foram obtidos o Extrato Hexânico Bruto e um resíduo, sendo este último submetido à maceração em etanol a 70%. O extrato resultante foi concentrado a vácuo em rota-evaporador até a secura, fornecendo o Extrato Etanólico (EE).

3.6. AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE DE FERIDAS CUTÂNEAS

3.6.1. MODELO DE FERIDA POR EXCISÃO

De acordo com a técnica de Morton e Malon (1972), ratos fêmeas foram divididos em grupos experimentais (n=6) e anestesiados por via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (70 mg/kg). Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido à tricotomia da região dorsal e posterior antissepsia utilizando álcool a 70%. Com auxílio de um molde vazado (diâmetro de 2,0 cm), a pele foi demarcada com caneta dermatográfica. A ferida

cutânea foi produzida com o auxílio de tesoura e pinça, sendo seccionado um fragmento cutâneo correspondente ao círculo marcado até a exposição da fáscia muscular. A hemostasia do ferimento foi realizada com gaze embebida em soro fisiológico e compressão bidigital.

As 3 concentrações do extrato (5, 10 e 20 mg/ml), veículo de diluição do extrato (salina estéril) ou pomada cicatrizante padrão a base de fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol (Fibrase[®] Pfizer[®]) foram aplicados topicamente duas vezes ao dia durante 14 dias, após limpeza das feridas com soro fisiológico e algodão. O tratamento foi iniciado 24 horas após o ato operatório. As feridas tratadas não foram ocluídas, permanecendo expostas ao ar.

Os animais foram acompanhados diariamente através da medida das lesões com auxílio de um paquímetro e de observações clínicas do reparo da lesão, referindo-se às alterações manifestadas, tais como: presença ou não de edema, exsudato, crosta e coloração da ferida.

A redução da área da lesão foi calculada pela equação formulada por Prata, Haddad e Gondenberg (1988): $A = \pi.R.r$, onde “A” representa a área (cm²); “R”, o raio maior; “r”, o raio menor.

O grau de contração das feridas foi calculado por equação proposta por Ramsey et al. (1995): $\text{Porcentagem de contração} = 100 \times (F_0 - F_A) / F_0$, onde F_0 representa a área original da ferida e F_A representa a área no momento da avaliação.

3.6.2.AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS FERIDAS

No 7º dia após a indução das feridas e antes da primeira aplicação diária do extrato, veículo ou padrão, as feridas foram limpas com soro fisiológico estéril e a crosta foi cuidadosamente descolada com auxílio de pinça esterilizada. Um swab estéril de algodão foi levemente friccionado sobre o leito da ferida e imediatamente colocado em tubo contendo solução salina estéril.

Imediatamente após as coletas, o material foi semeado em placas de Petri contendo Agar sangue (Difco[®]), Agar MacConkey (Oxoid[®]) e em tubos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco[®]). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 35±2°C durante 24 horas (BÜRGER et al, 2003).

Após a incubação, foi avaliado o crescimento de colônias, realizada coloração de Gram e isolamento em ágar Brolacin ou MacConkey (Oxoid®) para que se procedesse a identificação das bactérias encontradas através de provas bioquímicas.

3.7.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

3.7.1.EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Este teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Winter; Risley e Nuss (1962). Camundongos fêmeas foram divididos em grupos (n=7) recebendo os seguintes tratamentos por via oral durante 6 dias: veículo ou 3 diferentes doses do extrato (7, 35 e 175 mg/Kg). No sétimo dia, após jejum de 12 horas, os animais receberam os mesmos tratamentos anteriormente citados e foi formado outro grupo de animais que recebeu por via oral o antiinflamatório padrão indometacina (Sigma Aldrich®) na dose de 10 mg/kg. Logo em seguida foi medida a espessura da pata do animal (tempo zero). Após 60 minutos foi induzido o processo inflamatório pela administração de 0,05mL de carragenina λ (Sigma Aldrich®) a 1% na região subplantar da pata posterior direita de cada animal. A espessura da pata foi medida nas 4 horas posteriores com intervalos constantes de 60 minutos com auxílio de um paquímetro.

Os resultados são apresentados como a variação da espessura da pata (cm) em relação a espessura basal e a porcentagem de inibição de edema foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (SAÉNZ et al, 1998):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(N_t - N_0)_{\text{controle}} - (N_t - N_0)_{\text{grupo tratado}}}{(N_t - N_0)_{\text{controle}}} \times 100$$

onde N_t é igual à espessura da pata em um dado tempo e N_0 é igual a espessura da pata no tempo zero.

3.7.2. PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

O método de indução de peritonite em camundongos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Getting et al (1997) e Carvalho et al (1999). Camundongos fêmeas foram divididos em grupos (n=7) e receberam os seguintes tratamentos por via oral durante 6 dias: veículo ou 3 diferentes doses do extrato (7, 35 e 175 mg/kg). No sétimo dia, após jejum de 12 horas, os animais receberam os mesmos tratamentos anteriormente citados e foi formado outro grupo de animais que recebeu por via oral o antiinflamatório padrão indometacina na dose de 10 mg/kg.

Uma hora após os tratamentos, 0,25mL de carragenina (1% em salina) foram administrados por via intraperitoneal constituindo-se como agente flogístico. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico, sendo injetados na cavidade peritoneal 3mL de salina heparinizada (10UI/mL). A contagem de leucócitos totais e leucócitos polimorfonucleares (PMNL) foi realizada em câmara de Neubauer com amostras de salina recuperadas e diluídas em solução de Turk.

Os resultados foram expressos como número de leucócitos/mL e a porcentagem de inibição da migração de leucócitos de acordo com Mendes et al (2010): % de inibição = $(1-T/C) \times 100$, onde C representa a contagem de leucócitos no grupo controle e T a contagem nos grupos tratados. As alterações em PMNL foram calculadas pela seguinte equação (GUPTA et al, 2005): contagem de PMNL nos grupos tratados/contagem de PMNL no grupo controle x 100.

3.8. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DÉRMICA

3.8.1. TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Este teste foi realizado em ratos seguindo metodologia preconizada pela Organization for Economic Cooperation and Development - OECD (OECD nº 402, 1987; OECD nº 404, 2002). Grupos de ratos, sendo 6 machos e 6 fêmeas, foram submetidos a tricotomia da região dorsal e 24 horas após, foi aplicada no local amostra do extrato diluído na dose de 1000 mg/kg ou o veículo de diluição do extrato. Em seguida, a região foi coberta com gaze e protegida usando um adesivo plástico não irritante. Após o tratamento foram observados os efeitos gerais

apresentados pelos animais experimentais nos intervalos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias seguintes, seguindo protocolo experimental (Anexo 1) descrito por Almeida *et al* (1999).

No dia seguinte à aplicação, a gaze foi retirada com cuidado e o local de aplicação da substância foi deixado exposto para observação diária da presença de edema e eritema durante 14 dias, classificando seu grau em escores segundo o protocolo padrão da OECD nº 404 (2002), descrito abaixo:

- Eritema: - sem eritema=0
 - muito leve (quase imperceptível)=1
 - moderado a severo=3
 - severo (aspecto em “carne viva”) ou formação de escara=4
- Edema: - sem edema=0
 - muito leve=1
 - leve (borda bem definida)=2
 - moderado (aproximadamente 1mm)=3
 - severo (mais de 1mm) excedendo a área de exposição ao produto=4

O índice de irritação primária (PII) foi calculado pela divisão da soma dos escores de edema e eritema pelo número de sítios teste multiplicado pelos dias de observação, sendo uma substância considerada levemente irritante quando $PII < 2$, moderadamente irritante se $2 < PII < 5$ e severamente irritante se $PII > 5$ (TESHOME et al, 2008)..

3.8.2.CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS

Foi avaliado o consumo de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, desde a 24^a hora e até 14 dias após a administração da dose. A ração foi colocada diariamente e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração. Quanto ao consumo de água, foram colocadas mamadeiras graduadas cheias e, no dia seguinte, registrado o volume de água ingerido pelos animais.

3.8.3.PESO CORPORAL

A pesagem dos animais foi realizada diariamente. Para os cálculos de evolução da curva ponderal foram computados os pesos no fim de cada semana.

3.8.4.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE SANGUE

Após os 14 dias de observação, os animais foram anestesiados com xilazina e ketamina para que fossem coletadas amostras de sangue, através de punção cardíaca, de todos os animais, machos e fêmeas, do grupo tratado com extrato etanólico de *Z. joazeiro* e do grupo controle. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA K3 para avaliação dos parâmetros hematológicos (hemograma e contagem das plaquetas) e em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas de uréia, creatinina, transaminases AST e ALT, triglicerídios, ácido úrico, proteínas totais e albumina, sendo observado um jejum de 12 horas antes da coleta de sangue.

3.8.5.ESTUDO MACROSCÓPICO DOS ÓRGÃOS

Quatorze dias após o tratamento, 50% dos ratos dos grupos experimental e controle foram sacrificados por dose letal de anestésicos. Os órgãos foram examinados macroscopicamente em busca de alterações e em seguida foi realizada ressecção de fígado, rins, coração e baço para pesagem.

3.8.6.TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÔNICA

O estudo toxicológico foi realizado segundo guia da OECD nº 410 (1981), utilizando ratos Wistar.

Os animais foram divididos em cinco grupos de 10 animais. Cada grupo foi composto por 6 machos e 6 fêmeas, submetidos a tricotomia da região dorsal no dia anterior ao início do tratamento.

Foram aplicadas 3 doses (4, 8 e 16 mg/kg) do extrato diariamente na pele por um período de 21 dias, mantendo-se um grupo como controle (tratado apenas com o veículo de diluição do extrato).

A tricotomia foi realizada semanalmente e após aplicação do extrato, o local foi coberto com gaze protegida usando um adesivo cirúrgico hipoalergênico.

Foram avaliados os efeitos da administração de EE, sobre a temperatura, glicemia, consumo de água e alimentos, evolução ponderal, parâmetros hematológicos, bioquímicos, sendo realizado ainda exame macroscópico dos órgãos dos animais em estudo.

3.8.7.TEMPERATURA

Para medida da temperatura corporal foi utilizado um termômetro digital modelo MC – 3BC[®] – ORON/China, cujo termosensor foi lubrificado com vaselina e introduzido pelo reto (atingindo o cólon), semanalmente em todos os animais, durante todo o período de tratamento.

3.8.8.GLICEMIA

Durante o período de tratamento, foram avaliados semanalmente os níveis glicêmicos dos animais da seguinte forma: os ratos foram imobilizados em contentores plásticos e uma gota de sangue foi coletada na veia caudal e analisada em fita reativa para dosagem de glicemia. A leitura foi efetivada em monitor de glicemia Accu-Check[®] Performa (Roche[®]), sendo observado jejum prévio de 12 horas.

3.8.9.CONSUMO DE ÁGUA E ALIMENTOS

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, em ambos os sexos, durante os 21 dias tratamento. Foram colocadas mamadeiras graduadas cheias e, no dia seguinte, registrado o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente nas caixas e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração.

3.8.10.PESO CORPORAL

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para cálculo da dose administrada. Para os cálculos de evolução da curva ponderal foram computados os pesos no fim de cada semana.

3.8.11.AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO SANGUE

Após 21 dias, no término do experimento para avaliação da toxicidade sub-crônica, foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial, de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratados com EE e do grupo controle. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA K3 para avaliação dos parâmetros hematológicos (hemograma e contagem das plaquetas) e em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas de glicose, uréia, creatinina, transaminases AST e ALT, colesterol, triglicerídios, ácido úrico, proteínas totais e albumina, sendo observado um jejum de 12 horas antes da coleta de sangue.

3.8.12.EXAME MACROSCÓPICO DOS ÓRGÃOS

Trinta por cento dos animais de cada grupo tratado com o EE e do grupo controle foram sacrificados por dose letal de anestésicos. Os órgãos foram examinados macroscopicamente em busca de alterações em seguida foi realizada a ressecção de fígado, rins, coração e baço para pesagem.

3.9.ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos e toxicológicos foram expressos como média $\pm$ desvio ou erro padrão da média, sendo submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós teste de Dunnett, Teste t de Student e Mann Whitney. O nível de significância mínimo permitido foi de $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE DE FERIDAS CUTÂNEAS E AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DAS FERIDAS

As tabelas 1 e 2, bem como as Figuras 5 e 6 mostram os resultados obtidos na percentagem de contração e na área de feridas por excisão experimentalmente induzidas no dorso de ratos e tratadas com EE.

TABELA 1: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de *Z. joazeiro* sobre a percentagem de contração das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA seguido pelo Teste “t” de Student, [#]p<0,05 em relação ao grupo padrão.

GRUPO	DIAS						
	3	5	7	9	11	13	15
Controle	10,75 $\pm$ 5,42	24,04 $\pm$ 7,86	45,46 $\pm$ 7,70	75,25 $\pm$ 6,08	85,12 $\pm$ 3,09	88,00 $\pm$ 3,01	90,67 $\pm$ 2,65
Padrão	5,88 $\pm$ 2,37	9,46 $\pm$ 4,02	24,14 $\pm$ 8,17	52,13 $\pm$ 15,80	72,97 $\pm$ 9,71	80,63 $\pm$ 7,30	83,97 $\pm$ 5,51
5 mg/mL	14,72 $\pm$ 4,87	24,43 $\pm$ 4,05 [#]	35,84 $\pm$ 3,46	74,01 $\pm$ 4,62	82,75 $\pm$ 5,01	88,12 $\pm$ 3,24	92,83 $\pm$ 1,06
10 mg/mL	15,30 $\pm$ 3,56	24,82 $\pm$ 4,20 [#]	47,59 $\pm$ 2,01 [#]	77,08 $\pm$ 2,31	85,88 $\pm$ 2,95	90,67 $\pm$ 2,71	93,63 $\pm$ 1,96
20 mg/mL	8,17 $\pm$ 3,54	19,13 $\pm$ 4,76	33,55 $\pm$ 6,03	64,39 $\pm$ 5,70	81,18 $\pm$ 3,73	88,63 $\pm$ 2,99	91,30 $\pm$ 2,67

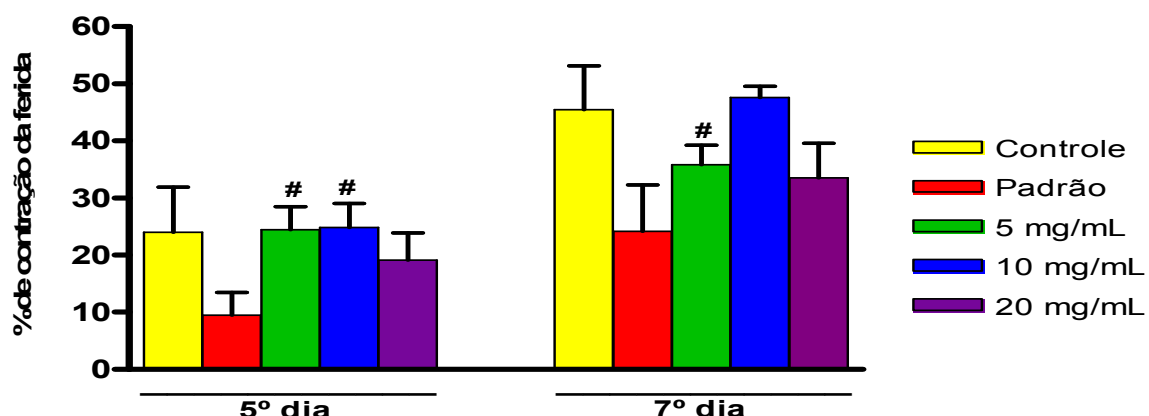


FIGURA 5: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de *Z. joazeiro* sobre a percentagem de contração das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas, nos dias 5 e 7. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA seguido pelo Teste “t” de Student, [#]p<0,05 em relação ao grupo padrão.

TABELA 2: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de *Z. joazeiro* sobre a área (em cm²) das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA seguido pelo Teste “t” de Student, [#]p<0,05 em relação ao grupo padrão.

GRUPO	DIAS						
	3	5	7	9	11	13	15
Controle	2,87 $\pm$ 0,14	2,38 $\pm$ 0,24	1,71 $\pm$ 0,24	0,77 $\pm$ 0,19	0,48 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,08
Padrão	3,08 $\pm$ 0,17	2,94 $\pm$ 0,18	2,43 $\pm$ 0,29	1,50 $\pm$ 0,49	0,84 $\pm$ 0,30	0,60 $\pm$ 0,22	0,50 $\pm$ 0,17
5 mg/mL	2,70 $\pm$ 0,15	2,37 $\pm$ 0,12 [#]	2,01 $\pm$ 0,10	0,81 $\pm$ 0,14	0,54 $\pm$ 0,15	0,37 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,03
10 mg/mL	2,71 $\pm$ 0,15	2,36 $\pm$ 0,13 [#]	1,64 $\pm$ 0,06 [#]	0,71 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,06
20 mg/mL	2,93 $\pm$ 0,14	2,59 $\pm$ 0,19	2,08 $\pm$ 0,18	1,11 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,11	0,35 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,08

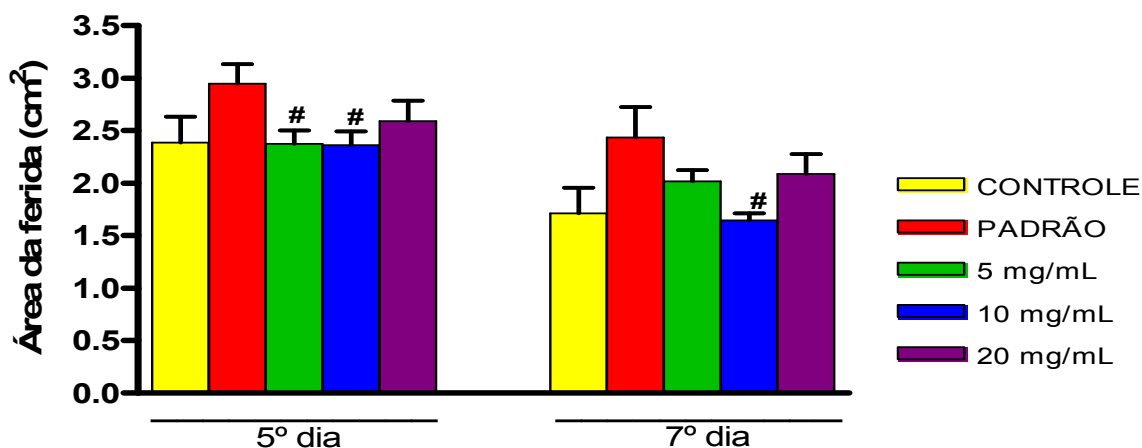


FIGURA 6: Efeito da administração tópica de diferentes concentrações de EE de *Z. joazeiro* sobre a área (em cm²) das feridas experimentalmente induzidas em ratos fêmeas, nos dias 5 e 7. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA seguido pelo Teste “t” de Student, #p<0,05 em relação ao grupo padrão.

Não houve qualquer alteração significativa em relação ao grupo controle, no que diz respeito ao processo cicatricial, entretanto, em dois momentos (dias 5 e 7) o extrato demonstrou atividade cicatrizante significativamente superior ao grupo tratado com a pomada padrão.

No entanto, é preciso levar em conta que o padrão possuía em sua composição as enzimas fibrinolisa e desoxirribonuclease, além do antimicrobiano cloranfenicol. De modo geral, compostos enzimáticos são utilizados em muitos tipos de curativos, mas seu papel mais efetivo é o de auxiliar no debridamento das lesões. Este tipo de curativo é indicado para feridas com presença de tecido desvitalizado, necrose úmida ou seca, feridas exsudativas, colonizadas ou não por bactérias, promovendo o debridamento químico através da desintegração de fibrina e DNA, granulação e epitelização e reduzindo o excesso de exsudato e odor da ferida (MANDELBAUM; Di SANTIS; MANDELBAUM, 2003; FRANCO; GONÇALVES, 2008; SMANIOTTO et al, 2010).

Há muita controvérsia quanto à ação de enzimas proteolíticas como potencializadoras do processo de reparação de feridas, sendo que sua finalidade acaba sendo a de diminuir a formação crostosa e a necrose do tecido colágeno (MANDELBAUM; Di SANTIS; MANDELBAUM, 2003; HOYAMA et al, 2005). A diminuição da formação de crosta pela pomada padrão foi constatada neste trabalho, entretanto nos grupos controle e tratados com EE nas concentrações de 5 e 10 mg/Kg, houve redução mais rápida das áreas das feridas

Quanto as observações clínicas diárias referentes ao reparo da lesão, os animais tratados apresentaram menor grau de edema, ausência de hemorragia e as feridas com leve exsudação de cor amarelo-claro e aspecto límpido que desapareceu em cerca de 3 dias. Sinal leve de dor foi constatado apenas no 1º dia após a indução das feridas e uma primeira crosta de coloração avermelhada surgiu no 3º dia. As feridas apresentavam aspecto mais limpo do que aquelas dos grupos controle e padrão.

Em contrapartida, os animais que receberam apenas soro fisiológico como tratamento, apresentaram hemorragia, exsudato sanguinolento, sinais de dor intensa até o 5º dia e a pele do dorso bastante hiperemiada. Já as feridas do grupo tratado com a pomada padrão, não tinham crosta visível até o 6º dia e as lesões foram bastante exsudativas, de aspecto enegrecido e mais “sujo”, quando comparadas às dos grupos teste.

Apesar de não haver diferença significativa em relação à contração das feridas entre os grupos teste, controle e padrão, as diferenças nos aspectos clínicos das lesões podem indicar alguma interferência do extrato sobre células ou mediadores químicos do processo inflamatório.

Uma investigação realizada por Cruz *et al.* (2007), comprovou uma significativa atividade antifúngica da infusão do caule da espécie frente aos patógenos *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi*, o que valida o uso popular da mesma no tratamento de micoses.

Apesar de sua atividade antifúngica *in vitro* comprovada, as culturas bacterianas das feridas induzidas no dorso de ratos revelaram a presença de contaminação em todas as amostras, com exceção de 2 animais do grupo tratado com a pomada padrão contendo cloranfenicol (Tabela 3).

TABELA 3: Microrganismos isolados das feridas experimentalmente induzidas em ratos e submetidas a diferentes tratamentos.

Microrganismos	Nº de isolados (%) por Grupos				
	Salina	Fibrase	5mg/ml	10mg/ml	20mg/ml
<i>Citrobacter diversus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)
<i>Enterobacter spp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)	0 (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (33,33)	0 (0)	2 (33,33)	2 (33,33)	2 (33,33)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)	0 (0)	1 (16,66)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (0)	1 (16,66)	1 (16,66)	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)	0 (0)	0 (0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (33,33)	1 (16,66)	1 (16,66)	2 (33,33)	1 (16,66)
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	2 (33,33)	2 (33,33)	0 (0)	1 (16,66)	0 (0)
Espécie não identificada	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,66)
Sem crescimento bacteriano	0 (0)	2 (33,33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Os resultados mostram ação do cloranfenicol no controle de microrganismos gram negativos, mas também demonstram que o uso tópico deste antimicrobiano não foi 100% eficaz no controle da contaminação bacteriana.

Com relação ao EE de *Z. joazeiro*, não foi observada ação antimicrobiana, entretanto pode-se verificar uma diminuição na percentagem de gram positivos isolados, o que sugere alguma ação inibitória do extrato sobre tais microrganismos.

A presença de pus e odor fétido abaixo da crosta, no leito da ferida foi registrada em 3 animais (2 do grupo tratado com 5 mg/ml e 1 do grupo tratado com 20mg/ml) no 7º dia. Três dias após remoção das crostas e aplicação do extrato diretamente sobre o leito, os sinais clínicos de infecção desapareceram completamente.

O surgimento de sinais clínicos de infecção nas feridas de apenas 3 animais, pode ser considerado consequência da alta resistência às infecções pós-operatórias apresentadas por ratos (*Rattus norvegicus*) citada por Rahal et al (2001).

Mesmo não impedindo a contaminação bacteriana, o aspecto mais limpo das lesões dos animais tratados com extrato vegetal, sugere que concentrações mais elevadas do extrato e sua associação com um agente desbridante talvez pudessem acelerar o processo cicatricial e impedir a infecção das feridas.

4.2.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA: EDEMA DE PATA E PERITONITE INDUZIDOS POR CARRAGENINA

Nas Tabelas 4 e 5 e na Figura 7 podem ser visualizados os efeitos do tratamento durante 7 dias do extrato de *Zizyphus joazeiro* sobre a espessura da pata de camundongos no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Houve redução significativa da espessura da pata de animais que receberam as doses de 35 e 175 mg/Kg de EE, que não diferiu estatisticamente dos valores obtidos com o tratamento pelo antiinflamatório padrão Indometacina.

TABELA 4: Efeito da administração v. o. de diferentes doses de EE de *Z joazeiro* sobre a variação da espessura da pata no modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos fêmeas. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

GRUPOS	HORAS			
	1	2	3	4
Controle (Água)	0,14 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,17	0,22 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,03
Indometacina (10mgKg)	0,06 $\pm$ 0,01*	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01***	0,08 $\pm$ 0,01**
7 mg/Kg	0,12 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02
35 mg/Kg	0,08 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,03*	0,13 $\pm$ 0,03*
175 mg/Kg	0,06 $\pm$ 0,02*	0,12 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,01*	0,14 $\pm$ 0,01*

TABELA 5: Percentual (%) de inibição do edema induzido por carragenina na pata de camundongos fêmeas tratados por v. o. com diferentes doses de EE de *Z joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

GRUPOS	HORAS			
	1	2	3	4
Controle (Água)	-	-	-	-
Indometacina (10mgKg)	43,65*	42,82*	61,34***	66,29**
7 mg/Kg	0	0	13,99	13,91
35 mg/Kg	32,94	28,06	45,25*	48,36*
175 mg/Kg	45,88*	16,02	33,79*	42,26*

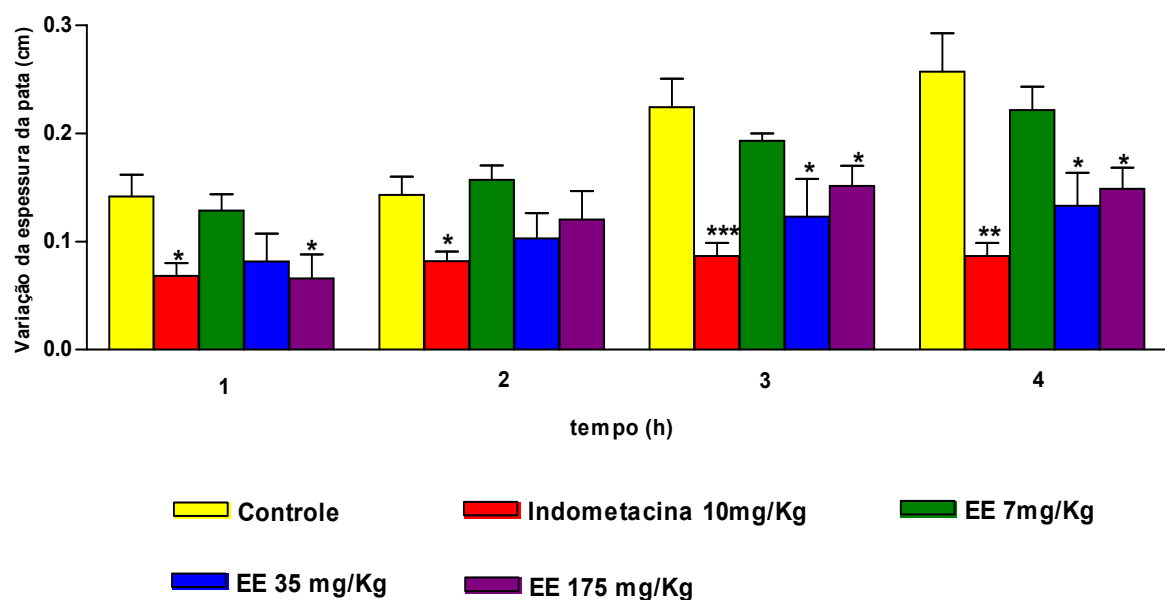


FIGURA 7: Efeito da administração v. o. de diferentes doses de EE de *Z joazeiro* sobre a variação da espessura da pata no modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos fêmeas. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo animal largamente empregado para a triagem de compostos anti-inflamatórios e tem sido frequentemente utilizado para avaliar o efeito anti-edematogênico de produtos naturais. Este modelo exhibe alto grau de reprodutibilidade. Em ratos, a resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada por ser bifásica com marcante formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e bradicinina na 1ª. fase, que é subsequentemente sustentada pela liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (2ª. fase) com pico em 3 horas, produzido pela isoforma induzida de COX (COX-2) e Óxido Nítrico Sintase (iNOS) (MENDES et al, 2010).

O tratamento com EE inibiu a formação do edema de pata induzido por carragenina em camundongos a partir da 3ª hora do experimento, num quadro similar àquele observado por Germanò et al (2008) com o extrato de *Pteleopsis suberosa*, sugerindo que o efeito na 2ª fase da inflamação deve estar relacionado com a inibição da liberação de prostaglandinas.

Dentre os constituintes químicos de *Z. joazeiro*, foram encontrados triterpenos como os ácidos alifitólico, oleanólico, ursólico, ácido betulínico e seus derivados e ebelin-lactona. Além disso, foram isoladas agliconas derivadas de saponinas como as jujubogeninas (derivadas dos jujubosídeos) e as joazeirogeninas (derivadas dos joazeirosídeos), além de grande riqueza de saponinas em sua forma original e do alcalóide anfibina-D (TSCHESCHE et al., 1981; HIGUCHI et al., 1984; BARBOSA-FILHO et al., 1985; SOARES et al., 1998; SCHUHLY et al., 1999; SCHUHLY et al., 2000).

Há um grande número de relatos de que várias saponinas triterpênicas isoladas de plantas produzem uma inibição da inflamação no teste de edema de pata (GERMANÒ, 2008). Estudos realizados com outras espécies do gênero *Zizyphus* demonstraram atividades antiinflamatória e analgésica (BORGI; GHEDIRA; CHOUCANE, 2007), além de ação antinociceptiva via mecanismos centrais e periféricos (ADZU et al, 2001).

Os resultados da avaliação da ação do EE de *Z. joazeiro* sobre a migração de leucócitos totais de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal no modelo da peritonite induzida por carragenina em camundongos podem ser observados na Tabela 6 e nas Figuras 8 e 9.

TABELA 6: Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de *Z joazeiro* sobre a migração de Leucócitos Totais e PMNL na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, **p<0,01.

GRUPOS	Leucócitos Totais/mm ³	% de inibição da migração leucocitária	PMNL/mm ³	% de alteração em PMNL
Controle (Água)	2717,00 $\pm$ 544,50	-	1850,00 $\pm$ 716,90	-
Indometacina (10mg/kg)	1100,00 $\pm$ 80,62**	59,51**	366,00 $\pm$ 100,60*	19,82*
7 mg/Kg	1729,00 $\pm$ 237,00	36,37	942,90 $\pm$ 225,00	50,96
35 mg//Kg	1192,00 $\pm$ 238,50**	56,61**	390,00 $\pm$ 100,50*	21,08*
175 mg/Kg	1858,00 $\pm$ 253,10	31,61	1050,00 $\pm$ 101,70	56,75

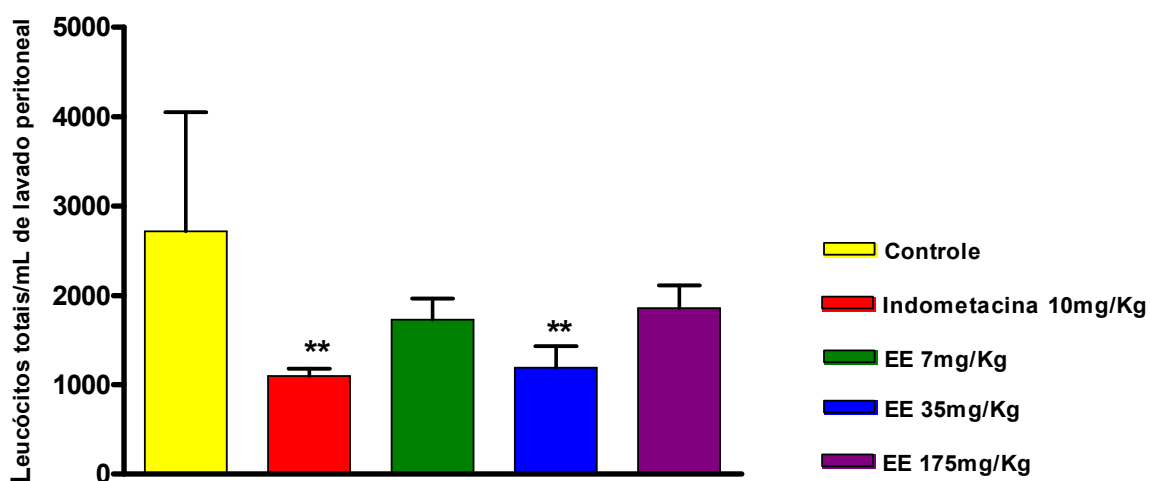


FIGURA 8: Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de *Z joazeiro* sobre a migração de leucócitos na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, **p<0,01.

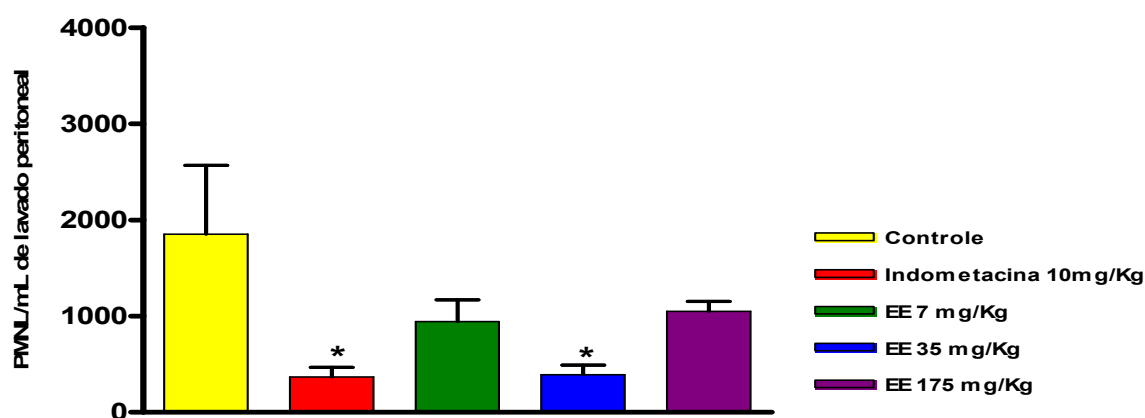


FIGURA 9: Efeito da administração v.o. durante 7 dias de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* sobre a migração de PMNL na exsudação peritoneal induzida por carragenina em camundongos. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=7). ANOVA/Dunnett, * $p < 0,05$.

Através da observação destes resultados, verifica-se que o extrato de *Z. joazeiro* na dose de 35 mg/kg é capaz de inibir a migração leucocitária para a cavidade peritoneal sob o estímulo da carragenina. Estes dados corroboram aqueles obtidos no modelo do edema de pata.

A agregação de leucócitos no sítio de inflamação é um evento fundamental no processo inflamatório. A migração de células ocorre como resultado de vários processos diferentes, incluindo adesão e mobilidade celular (GUPTA et al, 2005). Usando a carragenina como estímulo, é possível produzir uma resposta inflamatória aguda depois de 4 horas na cavidade peritoneal de ratos, com um grande número de polimorfonucleados no exsudato (CARVALHO et al, 1999).

É importante ressaltar que apesar da diminuição na migração de leucócitos totais induzida pelo tratamento durante 7 dias com EE, não houve redução compatível do número de polimorfonucleares no exsudato peritoneal, o que pode indicar ação sobre outras células participantes do processo inflamatório.

Ainda assim, pode-se sugerir que constituintes de *Z. joazeiro*, como triterpenos e saponinas, são capazes de diminuir a síntese de vários mediadores inflamatórios envolvidos na migração celular, caracterizando um efeito antiinflamatório relatado pela população e confirmado pelos modelos de edema de pata e peritonite induzida por carragenina.

4.3. TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA E SUBCRÔNICA

Os animais que receberam 1000 mg/kg de EE na região dorsal, apresentaram diminuição da ambulação nos tempos 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após a administração que permaneceu por um período de 24 horas após a retirada da semi oclusão. Foi constatada também leve piloereção que durou até o 7º dia após o tratamento nos machos, sinal este não apresentado pelos animais do grupo controle.

Estes sinais provavelmente estavam associados ao efeito irritante do extrato, já que os ratos tratados demonstraram dor ao toque, que se mostrou intensa nos 2 primeiros dias a partir da aplicação do produto e da colocação da semi oclusão, tornando-se leve até desaparecer completamente no 7º dia. Além disso, a pele do dorso de machos e fêmeas apresentava coloração amarelada, ressecamento e descamação no local de aplicação do extrato.

O estresse ou a dor aguda fazem com que estes animais vocalizem e briguem entre si, sendo observada também piloereção. Ocorre perda de peso e desidratação, pois o animal não comerá e nem beberá. É observada perda do comportamento exploratório e adoção de postura arqueada (RIVERA, 2010).

Edema e hiperemia (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) também foram avaliados através de escores e estas manifestações foram mais duradouras nos animais tratados com EE de *Z. joazeiro*. O índice de irritação primária (PII) calculado foi igual a 1,35 para os machos e 1,13 para fêmeas, sendo o EE classificado como levemente irritante.

A hipersensibilidade é um dos efeitos indesejáveis mais comuns causados pelo uso de plantas medicinais. Ela pode variar de uma dermatite temporária até um choque anafilático. São muito comuns dermatites provocadas pelo contato com a planta, sendo que este efeito tem sido provocado em grande parte, por cosméticos que apresentam na sua formulação, extratos de plantas ou substâncias isoladas de fonte vegetal (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

TABELA 7- Escore do edema observado no dorso de ratos após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student . *p<0,05.

GRUPOS	DIAS					
	1	2	3	4	7	14
Machos						
Controle	0.66 $\pm$ 0.21	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tratado	1.00 $\pm$ 0.00	0.83 $\pm$ 0.16*	0.50 $\pm$ 0.22	0.16 $\pm$ 0.16	0.16 $\pm$ 0.16	0.00 $\pm$ 0.00
Fêmeas						
Controle	1.00 $\pm$ 0.31	0.80 $\pm$ 0.20	0.80 $\pm$ 0.20	0.20 $\pm$ 0.20	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Tratado	1.00 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.25	1.00 $\pm$ 0.25	0.83 $\pm$ 0.30	0.16 $\pm$ 0.16

TABELA 8- Escore do eritema observado no dorso de ratos após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student . *p<0,05.

GRUPOS	DIAS					
	1	2	3	4	7	14
Machos						
Controle	1.50 $\pm$ 0.34	0.83 $\pm$ 0.16	0.33 $\pm$ 0.21	0.33 $\pm$ 0.21	0.16 $\pm$ 0.16	0.00 $\pm$ 0.00
Tratado	1.83 $\pm$ 0.16*	1.66 $\pm$ 0.21*	1.16 $\pm$ 0.16*	1.00 $\pm$ 0.00*	1.00 $\pm$ 0.00*	1.00 $\pm$ 0.00*
Fêmeas						
Controle	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.24	0.00 $\pm$ 0.00
Tratado	1.66 $\pm$ 0.21	1.33 $\pm$ 0.21	1.16 $\pm$ 0.16	1.16 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.25	0.50 $\pm$ 0.22

Apesar do fato de o extrato ser considerado irritante, ainda que de forma leve, o surgimento do eritema não pode ser atribuído apenas a este efeito, mas também ao efeito da oclusão, já que esta é conhecida por desencadear a fase I ou evento vascular de uma resposta inflamatória. A ocorrência da fase II ou o evento celular do processo inflamatório não foi evidenciado nestes resultados, desde que não houve alterações observáveis na morfologia da pele (TESHOME et al, 2008).

Não houve qualquer alteração na evolução ponderal de ratos machos e fêmeas tratados topicamente com o extrato na dose de 1000 mg/kg em comparação aos seus respectivos grupos controle. Os resultados são vistos na Tabela 9.

TABELA 9 – Peso corporal médio (em gramas) por rato, machos e fêmeas, 7 e 14 dias após a aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.

SEMANAS	GRUPOS							
	Machos				Fêmeas			
	Controle		Tratado		Controle		Tratado	
	Variação de Peso	Peso Total	Variação de Peso	Peso Total	Variação de Peso	Peso Total	Variação de Peso	Peso Total
1 ^a	25,50	194,50	23,58	206,00	-9,00	197,80	-18,00	178,20
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,45	8,64	1,67	4,96	18,35	2,81	4,19	6,19*
2 ^a	38,00	232,50	32,92	239,00	18,00	199,60	37,00	215,20
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,63	9,80	3,62	5,45	17,46	3,07	4,13	5,37*

Os machos que receberam o extrato apresentaram ingestão de água e alimentos semelhante à do grupo controle, enquanto que as fêmeas tratadas tiveram sua ingestão de água reduzida na 1^a semana em relação a seu controle. Em relação ao consumo de alimentos, as fêmeas reduziram a ingestão de ração na 1^a semana e aumentaram o consumo na 2^a semana, quando comparado ao grupo controle. Os resultados são apresentados na Tabelas 10 e 11 e Figuras 10 e 11.

TABELA 10 - Consumo médio diário de água (em mL) por ratos, machos e fêmeas, 7 e 14 dias após aplicação cutânea de 1000mg/Kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05.

SEMANAS	GRUPOS			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1 ^a	43,05 $\pm$ 1,68	37,77 $\pm$ 3,29	30,00 $\pm$ 4,00	12,78 $\pm$ 5,23*
2 ^a	42,78 $\pm$ 2,81	44,44 $\pm$ 2,34	30,67 $\pm$ 2,56	34,16 $\pm$ 1,81

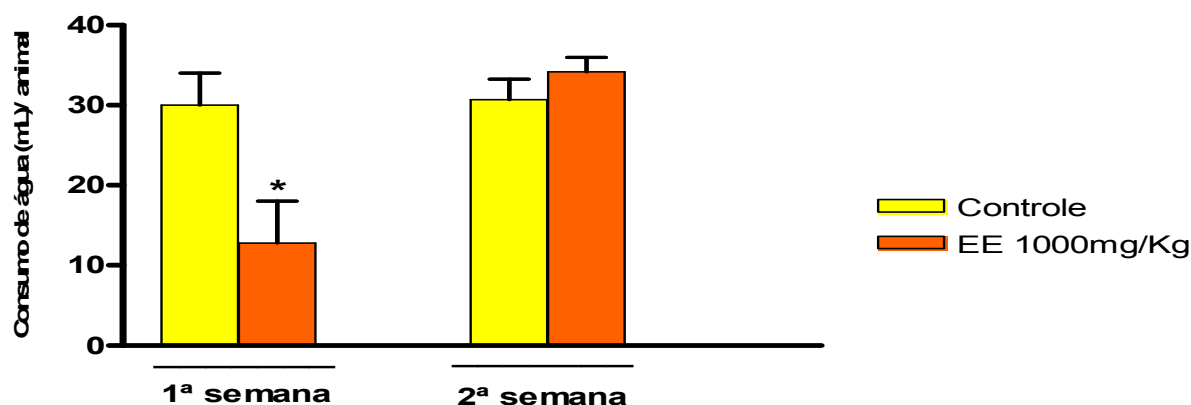


FIGURA 10: Consumo médio diário de água (em ml) por ratos fêmeas após 7 e 14 da aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05.

TABELA 11 - Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por rato, 7 e 14 dias após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05 e **p<0,01.

SEMANAS	GRUPOS			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1ª	23,55 $\pm$ 0,47	24,47 $\pm$ 2,34	18,52 $\pm$ 1,53	10,04 $\pm$ 2,49*
2ª	24,68 $\pm$ 1,38	24,99 $\pm$ 0,82	16,14 $\pm$ 1,43	24,33 $\pm$ 0,98**

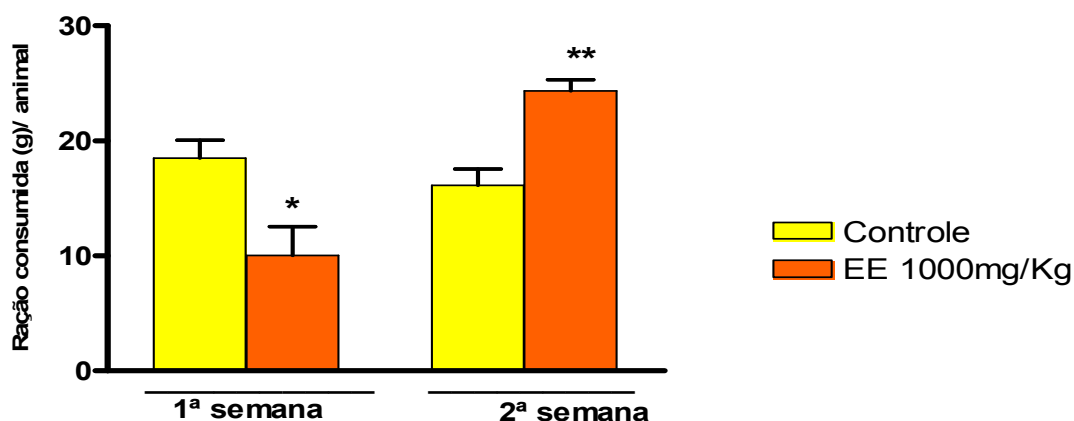


FIGURA 11: Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por ratos fêmeas após 7 e 14 da aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05.

É interessante notar que com a variação na ingestão de alimentos apresentada pelas fêmeas tratadas com EE, houve alteração correspondente em seu peso corporal.

A avaliação do consumo de água e alimentos durante estudos toxicológicos é utilizada como indicador de interferência das substâncias teste sobre o metabolismo (MUKINDA; SYCE, 2007).

Entretanto, as alterações na ingestão de água e alimentos poderiam ser atribuídas ao incômodo provocado pelo efeito irritante do extrato mais do que por um efeito sistêmico, uma vez que na 2ª semana após o tratamento, o consumo de água foi normalizada e a quantidade de ração consumida aumentou ao mesmo tempo em que os sinais de dor, edema e eritema tenderam a diminuir.

Agentes tóxicos podem afetar fígado, rins, coração e outros órgãos importantes, interferindo em suas funções fisiológicas. Estes efeitos podem ser detectados e/ou quantificados por medidas de atividade enzimática em tecidos e fluidos corporais, na intenção de avaliar por funções normalmente esperadas destes órgãos (ex.: excreção de produtos como uréia e creatinina) e também por determinar sua habilidade de filtrar e reabsorver substâncias necessárias ao corpo como os eletrólitos (TESHOME et al, 2008).

Após 14 dias da aplicação de EE de *Z. joazeiro*, nenhuma alteração foi constatada nos parâmetros bioquímicos de machos ou fêmeas (Tabela 12). Isto mostra a ausência de efeitos tóxicos induzidas pelo extrato quando aplicado por via cutânea.

TABELA 12 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05.

Parâmetro (unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Uréia (mg/dL)	43,67 $\pm$ 7,26	40,83 $\pm$ 2,60	36,80 $\pm$ 2,08	57,67 $\pm$ 10,81
Creatinina (mg/dL)	0,60 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,03
Triglicerídeos (mg/dL)	76,17 $\pm$ 12,43	68,17 $\pm$ 11,10	51,60 $\pm$ 9,15	63,33 $\pm$ 8,20
Ácido úrico (mg/dL)	1,41 $\pm$ 0,32	0,88 $\pm$ 0,22	0,96 $\pm$ 0,13	1,48 $\pm$ 0,27
AST (U/I)	141,8 $\pm$ 20,58	112,7 $\pm$ 18,85	94,80 $\pm$ 8,87	144,30 $\pm$ 43,06
ALT (U/I)	41,67 $\pm$ 2,61	36,83 $\pm$ 1,27	41,40 $\pm$ 4,17	45,50 $\pm$ 1,82
Proteínas Totais (g/dL)	6,48 $\pm$ 0,35	6,58 $\pm$ 0,41	7,12 $\pm$ 0,33	7,31 $\pm$ 0,22
Albumina (g/dL)	3,06 $\pm$ 0,11	3,26 $\pm$ 0,10	3,64 $\pm$ 0,06	3,66 $\pm$ 0,21
Globulinas (g/dL)	3,60 $\pm$ 0,40	3,12 $\pm$ 0,37	2,93 $\pm$ 0,93	2,40 $\pm$ 0,16

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostram as alterações estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos de fêmeas tratadas com 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*, especificamente na série vermelha e em índices hematimétricos, com número reduzido de eritrócitos e diminuição de hemoglobina e hematócrito. (Figuras 12, 13 e 14). Não foram encontradas alterações hematológicas nos machos tratados.

TABELA 13 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student. *p<0,05 **p<0,01.

Parâmetro (unidade)	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,61 $\pm$ 0,40	9,18 $\pm$ 0,19	10,35 $\pm$ 0,19	9,55 $\pm$ 0,16*
Hemoglobina (g/dL)	14,13 $\pm$ 0,43	13,75 $\pm$ 0,25	14,64 $\pm$ 0,26	13,30 $\pm$ 0,19**
Hematócrito (%)	45,55 $\pm$ 1,85	44,10 $\pm$ 1,10	46,34 $\pm$ 0,94	42,37 $\pm$ 0,39**
VCM (μ^3)	47,17 $\pm$ 0,70	47,83 $\pm$ 0,54	44,08 $\pm$ 0,48	44,30 $\pm$ 0,49
HCM (μg)	14,73 $\pm$ 0,18	14,95 $\pm$ 0,20	14,14 $\pm$ 0,05	13,95 $\pm$ 0,18
CHCM (%)	31,15 $\pm$ 0,35	31,32 $\pm$ 0,27	31,56 $\pm$ 0,26	31,38 $\pm$ 0,26
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,33 $\pm$ 0,49	4,58 $\pm$ 0,47	3,16 $\pm$ 0,36	3,981 $\pm$ 0,34
Neutrófilos (%)	29,17 $\pm$ 1,35	31,50 $\pm$ 0,88	25,60 $\pm$ 2,29	29,83 $\pm$ 1,49
Eosinófilos (%)	0,66 $\pm$ 0,21	0,50 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,44	0,66 $\pm$ 0,21
Linfócitos (%)	62,50 $\pm$ 1,87	61,50 $\pm$ 1,56	69,40 $\pm$ 2,04	64,50 $\pm$ 1,38
Monócitos (%)	7,66 $\pm$ 1,33	6,33 $\pm$ 0,71	3,60 $\pm$ 0,67	5,00 $\pm$ 0,44
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	1170,70 $\pm$ 45,21	859,08 $\pm$ 153,13	994,60 $\pm$ 268,36	1076,20 $\pm$ 49,03

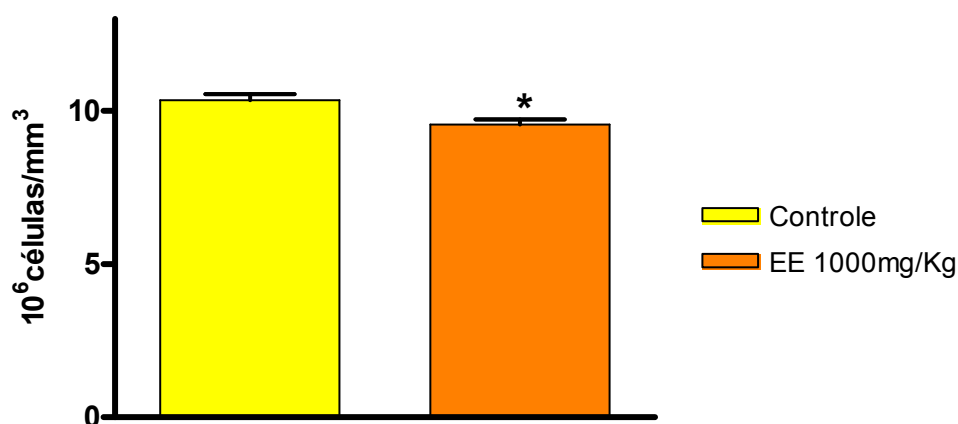


FIGURA 12: Contagem de eritrócitos no sangue de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. *p<0,05.

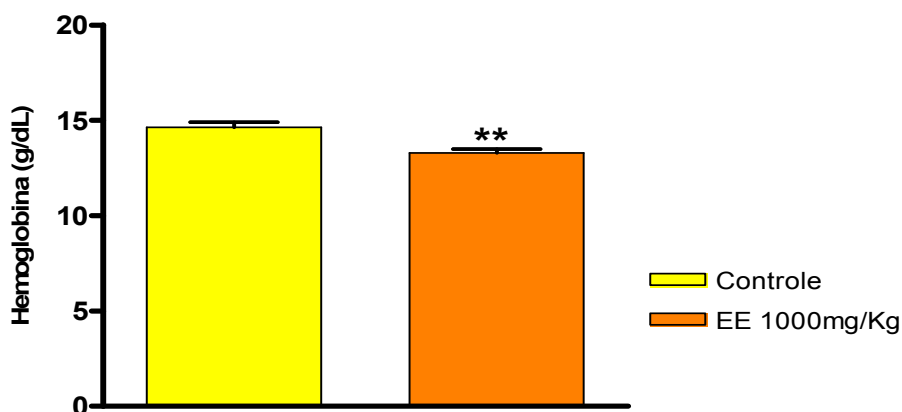


FIGURA 13: Valor de hemoglobina de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. **p<0,01.

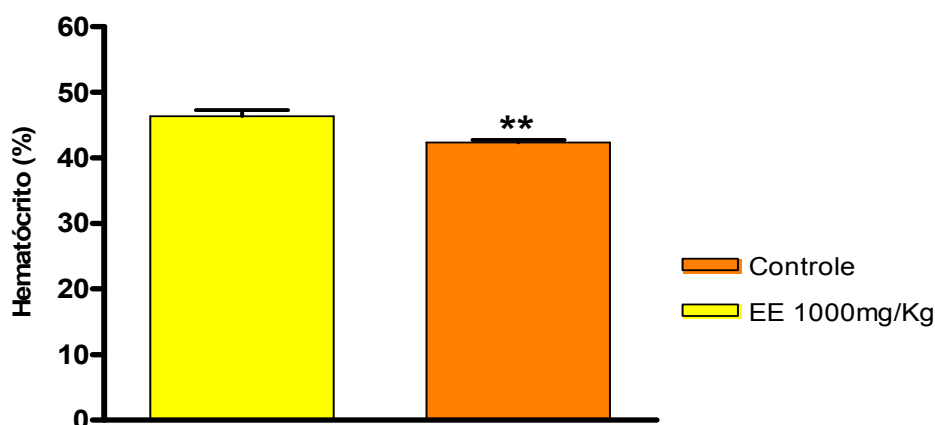


FIGURA 14: Valor de hematócrito de ratos fêmeas após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=5). Teste “t” de Student. **p<0,01.

Os resultados da análise hematológica, embora não sejam clinicamente significativos, apresentando-se dentro dos parâmetros de normalidade citados por Harkness e Wagner (1993) e Diniz (2000), podem ter sido induzidos pelo extrato, o que sugere absorção percutânea do mesmo. A absorção percutânea é definida como o movimento de uma substância química aplicada à superfície da pele para o sistema circulatório. Se uma substância sob investigação tiver penetrado através do estrato córneo dentro das camadas profundas da pele, deverá ser considerada como tendo sido absorvida (NIGAM, 2009).

Os possíveis mecanismos de permeação de um fármaco pela pele são (Figura 15): transcelular (entre os lipídeos do estrato córneo), intracelular (pelos

lipídeos do estrato córneo) e a transpendicular (através de glandular e folículos) (CHORILLI et al, 2007).

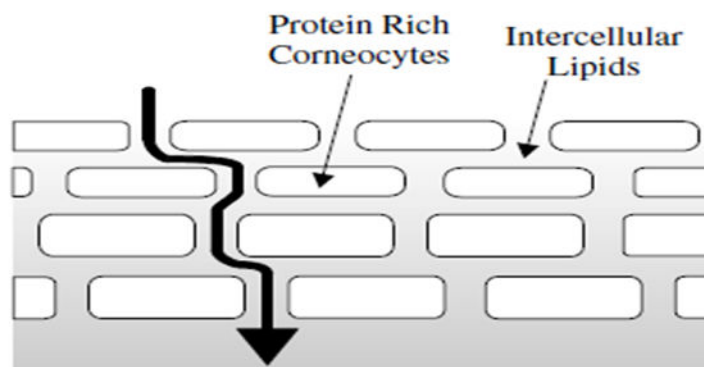


FIGURA 15: Possíveis mecanismos de permeação de fármacos através da pele.
Fonte: HODGSON, 2004

Para que qualquer composto topicamente aplicado possa entrar na corrente sanguínea, é necessário que atravesse três diferentes camadas da pele: derme, epiderme e a gordura subcutânea. Certos compostos, após a absorção percutânea podem se ligar em parte a albumina sérica em sítios de inflamação. Esta ligação, presumivelmente inativa, protege a substância da biotransformação e não permite sua liberação para os vasos sanguíneos. No entanto, por tratar-se de ligação reversível, o complexo proteína-ligante serve como um reservatório local, que libera lentamente o produto para a circulação (VIJAYARAGHAVAN et al, 2005).

Esta poderia ser a explicação para o fato de que em trabalho anterior realizado por Estevam (2008) o extrato administrado por via oral em camundongos tenha causado alterações hematológicas principalmente na série branca, em contraste com as alterações na série vermelha observadas no presente estudo.

Em condições normais, a permeação de substâncias na pele é muito difícil, dependendo não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também do seu comportamento quando colocado em um veículo farmacêutico e da afecção da pele (CHORILLI et al, 2007).

Em geral, aumentar a hidratação do tecido, parece aumentar a liberação transdérmica de promotores hidrofílicos e lipofílicos. A pele humana também contém uma mistura umectante e higroscópica de aminoácidos, os quais retêm água dentro do estrato córneo ajudando a manter a flexibilidade da pele. O mecanismo pelo qual a água aumenta a liberação transdérmica de fármacos ainda não foi esclarecido,

mas acredita-se que a água livre no interior do tecido poderia alterar a solubilidade de um permeante no estrato córneo por causar intumescimento e deslocamento do grupo cabeça polar da bicamada lipídica,, modificando a partição do veículo permeante dentro da membrana (CHORILLI et al, 2007).

Estudos mostram que a água é distribuída dentro do estrato córneo adulto hidratado de maneira não homogênea, concentrando-se dentro de corneócitos e lacunas. Os compostos hidratantes naturais, encontrados em altas concentrações no extrato córneo e dentro dos corneócitos são higroscópicos e agem como umectantes muito eficientes. A função da barreira da pele e o transporte da água através da pele envolvem uma complexa interação de múltiplos fatores como a maturidade e hidrofiliidade dos corneócitos, quantidade e fase dos lipídeos, densidade dos apêndices, relevo da superfície, bem como extensão da trajetória da difusão (NIKOLOVSKI et al, 2008).

Agentes de limpeza da pele permanecem no corpo por um período de tempo muito curto e raramente causam reações adversas significativas, contudo hidratantes aumentam as propriedades higroscópicas da pele e altas concentrações destas substâncias podem causar irritação e esfoliação. Produtos clareadores despigmentadores, como a hidroquinona, são agentes largamente prescritos, entretanto, com registro de potencial mutagenicidade e ocronose, tendo por este motivo, provocado um crescente interesse em produtos herbais alternativos e agentes farmacêuticos despigmentadores como o ácido kójico e o ácido azelaico (NIGAM, 2009).

Quando a administração de um produto por via cutânea destina-se à obtenção apenas de uma ação tópica, exige-se a retenção do fármaco na pele, com pequeno ou inexistente fluxo através dela (SATO et al, 2007) e o grande objetivo da aplicação cutânea de extratos da espécie *Z. joazeiro*, é seu efeito dermatocosmético como agente clareador, amaciante e tratamento em doenças de pele. Entretanto, foram constatados efeitos sistêmicos relacionados à sua administração em ratos.

Formulações transdérmicas empregam surfactantes para permitir a permeação de moléculas de drogas através do estrato córneo e as saponinas constituem um vasto grupo de glicosídeos surfactantes ocorrendo em plantas, sendo caracterizadas por sua capacidade de formar poros em membranas, sendo usadas como potencializadores de permeação percutânea (SAPRA; JAIN; TIWARY, 2009).

A atividade hemolítica das saponinas, induzindo toxicidade em vários animais não tem seu mecanismo de ação completamente esclarecido, mas acredita-se que esteja correlacionado a suas propriedades anfífilas, interagindo com lipídios de membrana formando complexos insolúveis com colesterol, levando a formação de poros e permeabilização de membranas (GAUTHIER et al, 2009).

Este efeito permeabilizante de membranas celulares é provavelmente o responsável pela absorção do extrato através da pele e também de seu efeito sobre parâmetros hematológicos. A ação hemolítica pode ter provocado a redução de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina.

Nenhuma diferença foi constatada entre o peso dos órgãos dos animais tratados e dos animais dos grupos controle (dados mostrados na Tabela 14). O exame macroscópico das vísceras (fígado, pulmões, rins, baço e coração) não revelou anormalidades em relação à coloração, morfologia e consistência.

TABELA 14 – Peso dos órgãos (em gramas) de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de 1000 mg/kg de EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). Teste “t” de Student.

ÓRGÃOS	GRUPOS			
	Machos		Fêmeas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Baço	0,78 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,02
Coração	1,11 $\pm$ 0,10	0,97 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,02
Fígado	11,4 $\pm$ 0,50	12,12 $\pm$ 1,14	10,20 $\pm$ 0,11	10,38 $\pm$ 0,35
Rins	2,27 $\pm$ 0,22	2,09 $\pm$ 0,14	1,88 $\pm$ 0,03	2,02 $\pm$ 0,12

Os resultados obtidos após avaliação toxicológica aguda dérmica com a espécie vegetal *Zizyphus joazeiro*, demonstram ausência de toxicidade sistêmica, o que torna o uso da planta seguro para a população, uma vez que a mesma tem indicação de uso tópico para tratamento de diferentes doenças de pele e como produto cosmético. Apesar disto, uma avaliação toxicológico sub-crônica foi realizada, visto que cosméticas costumam ser aplicados na pele de maneira repetida.

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins

terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Plantas medicinais são agentes xenobióticos, ou seja, compostos estranhos ao organismo humano, que apresentam produtos de biotransformação potencialmente tóxicos e deste modo, não possuem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados ao seu uso, mas também efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, podendo levar a um quadro clínico severo e por vezes fatal (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A determinação de doses para estudos farmacológicos e toxicológicos de plantas medicinais é bastante problemática, uma vez que a população quase nunca utiliza unidades de medida em sua preparação, frequentemente empregando termos como “um punhado”, algumas folhas e/ou cascas”. Por esta razão, considerou-se como referência, a orientação de preparação citada por Taylor (2005), em que a dose de uso popular estaria entre 7 e 8 mg/kg de peso corpóreo ao dia.

As tabelas 15 e 16 e gráficos 16, 17 e 18, apresentam respectivamente o consumo médio de ração e água por animal durante as semanas de tratamento continuado com EE de *Z. joazeiro*.

TABELA 15 - Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por rato, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01.

SEMANAS	GRUPOS			
	Controle	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
FÊMEAS				
1^a	20,33 $\pm$ 0,66	19,05 $\pm$ 0,72	18,71 $\pm$ 0,34	18,73 $\pm$ 0,36
2^a	19,67 $\pm$ 0,28	19,17 $\pm$ 0,65	17,70 $\pm$ 0,88	17,84 $\pm$ 0,56*
3^a	20,92 $\pm$ 0,61	20,59 $\pm$ 0,87	20,51 $\pm$ 0,77	19,17 $\pm$ 0,69
MACHOS				
1^a	26,64 $\pm$ 3,79	23,00 $\pm$ 3,43	22,85 $\pm$ 3,33	21,51 $\pm$ 3,36
2^a	31,49 $\pm$ 1,43	24,85 $\pm$ 2,81	26,73 $\pm$ 1,07*	24,98 $\pm$ 1,02**
3^a	33,88 $\pm$ 2,26	28,69 $\pm$ 1,67	27,86 $\pm$ 1,79	26,89 $\pm$ 1,72*

TABELA 16 - Consumo médio diário de água (em ml) por rato, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

SEMANAS	GRUPOS			
	Controle	4mg/kg	8mg/kg	16mg/kg
FÊMEAS				
1^a	34,40 $\pm$ 1,01	27,97 $\pm$ 2,08**	33,08 $\pm$ 1,30	27,02 $\pm$ 0,72**
2^a	30,35 $\pm$ 0,88	28,45 $\pm$ 0,52	29,16 $\pm$ 0,67	27,14 $\pm$ 1,04*
3^a	33,52 $\pm$ 1,68	30,23 $\pm$ 2,70	32,14 $\pm$ 1,29	27,85 $\pm$ 1,30*
MACHOS				
1^a	47,99 $\pm$ 1,83	41,19 $\pm$ 2,14*	42,02 $\pm$ 2,48	35,95 $\pm$ 1,27***
2^a	48,00 $\pm$ 2,87	42,14 $\pm$ 1,60	41,54 $\pm$ 2,47	36,78 $\pm$ 2,30**
3^a	48,86 $\pm$ 2,71	43,09 $\pm$ 1,64	45,59 $\pm$ 3,53	40,24 $\pm$ 1,87*

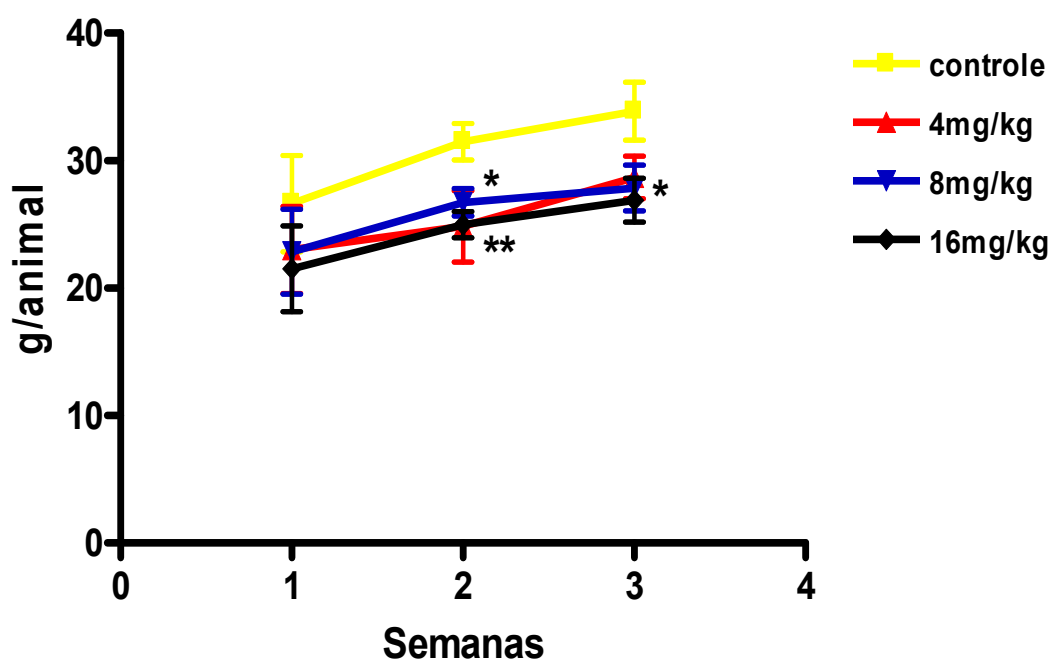


FIGURA 16: Consumo médio diário de alimentos (em gramas) por ratos machos durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01

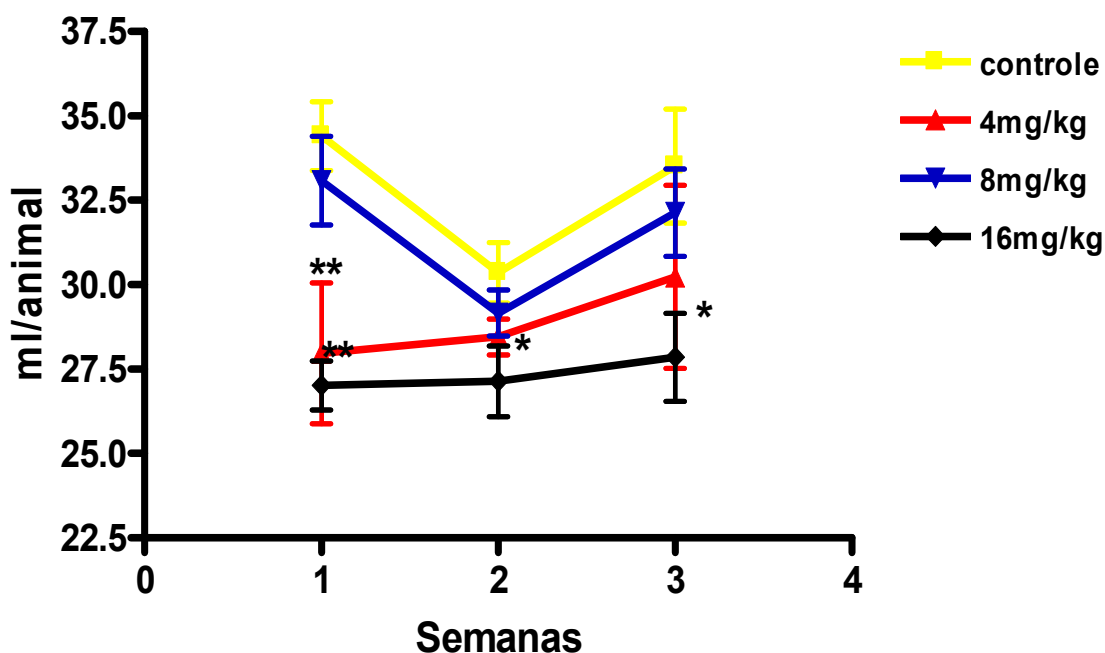


FIGURA 17: Consumo médio diário de água (em ml) por ratos fêmeas durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. * $p<0,05$ ** $p<0,01$

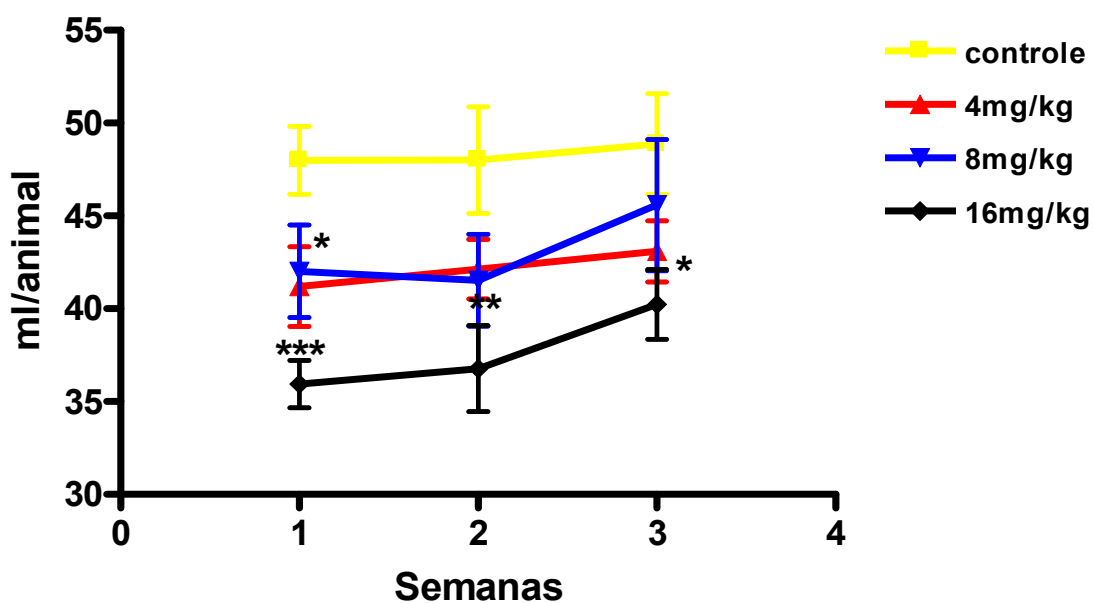


FIGURA 18: Consumo médio diário de água (em ml) por ratos machos durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,0001$

Pode-se observar que houve redução no consumo de alimentos dos machos tratados com as doses de 8mg/kg (2ª semana) e 16mg/kg (2ª e 3ª semanas), enquanto que as fêmeas reduziram seu consumo de alimentos apenas durante a 2ª semana no grupo que recebeu a dose de 16mg/kg de extrato.

Com relação à ingestão de água, tanto machos quanto fêmeas tratados com as doses de 4mg/kg (na 1ª semana) e 16mg/kg (nas 3 semanas) beberam menos água do que seus respectivos grupos controle.

O consumo de água e alimentos como relatado anteriormente, no ensaio toxicológico agudo, são importantes parâmetros no estudo da segurança de um produto utilizado com finalidade terapêutica (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003), bem como a avaliação da evolução do peso corporal, cujas alterações são um importante indicador de efeitos colaterais (RAZA et al, 2002; TEO et al, 2002) .

As variações no peso corporal de ratos que receberam tratamento dérmico sub-crônico com extrato de *Z joazeiro* são apresentadas nas tabelas 17 e 18, nas quais podemos constatar que machos e fêmeas tratados com a maior dose (16mg/kg) de EE tiveram o peso corporal reduzido em comparação aos controles.

TABELA 17 - Peso corporal médio (em gramas) de ratos fêmeas, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

SEMANAS	GRUPOS	Peso Total	Variação de Peso
FÊMEAS			
1ª	Controle	255,00 $\pm$ 5,33	-4,66 $\pm$ 2,15
	4mg/kg	239,80 $\pm$ 8,05	-2,33 $\pm$ 3,63
	8 mg/kg	242,30 $\pm$ 5,59	-5,16 $\pm$ 2,19
	16mg/kg	217,80 $\pm$ 3,79***	-14,50 $\pm$ 2,81*
2ª	Controle	255,50 $\pm$ 4,46	0,50 $\pm$ 3,85
	4mg/kg	239,70 $\pm$ 8,65	-0,16 $\pm$ 1,70
	8 mg/kg	241,70 $\pm$ 7,03	-0,66 $\pm$ 4,28
	16mg/kg	215,70 $\pm$ 3,19***	4,66 $\pm$ 6,41
3ª	Controle	255,8 $\pm$ 3,92	0,33 $\pm$ 4,21
	4mg/kg	241,70 $\pm$ 7,54	2,00 $\pm$ 1,69
	8 mg/kg	242,20 $\pm$ 5,49	0,50 $\pm$ 2,27
	16mg/kg	216,50 $\pm$ 4,44***	0,83 $\pm$ 3,19

TABELA 18 - Peso corporal médio (em gramas) de ratos fêmeas, durante as 3 semanas de aplicação cutânea de diferentes doses do EE de *Z. joazeiro*. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

SEMANAS	GRUPOS	Peso Total	Variação de Peso
MACHOS			
1^a	Controle	351,40 $\pm$ 8,15	7,20 $\pm$ 10,51
	4mg/kg	327,30 $\pm$ 7,99	-12,33 $\pm$ 2,67
	8 mg/kg	339,80 $\pm$ 6,43	-2,833 $\pm$ 3,04
	16mg/kg	304,70 $\pm$ 4,68***	-2,16 $\pm$ 4,31
2^a	Controle	371,80 $\pm$ 9,05	20,40 $\pm$ 3,20
	4mg/kg	345,70 $\pm$ 11,85	18,33 $\pm$ 4,89
	8 mg/kg	349,30 $\pm$ 4,66*	9,50 $\pm$ 3,96
	16mg/kg	312,00 $\pm$ 6,26***	5,66 $\pm$ 3,92*
3^a	Controle	381,80 $\pm$ 9,10	10,00 $\pm$ 3,80
	4mg/kg	353,80 $\pm$ 12,75	8,16 $\pm$ 2,07
	8 mg/kg	361,70 $\pm$ 5,60	12,33 $\pm$ 4,75
	16mg/kg	317,30 $\pm$ 7,15***	7,00 $\pm$ 2,01

A redução no peso corporal pode ser considerada conseqüência da diminuição na ingestão de ração e esta diminuição no consumo de ração também deve ter reduzido a ingestão de água. As alterações seriam, portanto, um efeito colateral do tratamento, seja por absorção percutânea do extrato e sua interferência com o metabolismo ou por sua ação irritante sobre a pele, causando dor e estresse.

A temperatura corporal dos animais também foi avaliada e os valores obtidos são apresentados na tabela 19.

TABELA 19 - Efeito da aplicação cutânea durante 21 dias de EE de *Z. joazeiro* sobre a temperatura corporal (em °C) de ratos Wistar. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05.

DIAS	GRUPOS			
	CONTROLE	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
FÊMEAS				
0	36,93 $\pm$ 0,20	36,95 $\pm$ 0,19	36,13 $\pm$ 0,22	37,13 $\pm$ 0,36
10	37,22 $\pm$ 0,42	37,52 $\pm$ 0,24	37,20 $\pm$ 0,25	37,82 $\pm$ 0,14
20	36,37 $\pm$ 0,27	36,63 $\pm$ 0,28	36,62 $\pm$ 0,33	37,00 $\pm$ 0,14
MACHOS				
0	36,42 $\pm$ 0,32	35,35 $\pm$ 0,23	35,70 $\pm$ 0,36	35,17 $\pm$ 0,24
10	36,36 $\pm$ 0,84	36,23 $\pm$ 0,57	35,45 $\pm$ 0,50	36,03 $\pm$ 0,35
20	34,64 $\pm$ 0,38	36,07 $\pm$ 0,23*	35,90 $\pm$ 0,28*	35,58 $\pm$ 0,29

A febre tem ação sobre diferentes funções da resposta imune, sendo capaz de promover a aceleração da quimiotaxia de neutrófilos e da secreção de substâncias antibacterianas, aumento da produção e das ações antiviral e antitumoral dos interferons e estimulação das fases de reconhecimento e sensibilização da resposta imunológica, resultando em interação mais eficiente entre macrófago e linfócito T (VOLTARELLI, 1994).

Nunes et al (1987) relataram que o extrato aquoso das cascas do caule de *Z. joazeiro* demonstrou atividade antipirética por via oral em coelhos com febre induzida por LPS de *Escherichia coli*.

No entanto, a temperatura colônica dos animais tratados por via dérmica apresentou-se aumentada em machos tratados com 4 e 8mg/kg no 20º dia após o início do experimento. Esta alteração apesar de estatisticamente significativa, não foi considerada clinicamente importante, uma vez que se encontrava dentro dos parâmetros normais relatados por Harkness e Wagner (1993). Isto indica que o extrato não exerce efeitos sobre o centro de regulação térmica corporal em animais normotérmicos.

Outras espécies do gênero *Zizyphus*, a exemplo de *Zizyphus spina-christi*, possuem atividade antidiabética mediada pela liberação de insulina via bloqueio de canais de K_{ATP} nas membranas das células pancreáticas β (ABDEL-ZAHER *et al.*, 2005). Com a finalidade de avaliar interferências de *Z. joazeiro* nos níveis glicêmicos

dos animais tratados, dosagens de glicemia capilar foram realizadas na 1ª e 2ª semana do experimento (Tabela 20)

TABELA 20- Efeito da aplicação cutânea durante 21 dias de EE de *Z. joazeiro* sobre a glicemia capilar (em mg/dl) de ratos Wistar. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=3). Kruskal Wallis/Dunn.

DIAS	GRUPOS			
	CONTROLE	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
FÊMEAS				
0	79,67 $\pm$ 9,82	86,00 $\pm$ 8,18	96,00 $\pm$ 11,04	89,67 $\pm$ 10,87
10	67,00 $\pm$ 2,08	54,67 $\pm$ 3,75	68,00 $\pm$ 4,58	62,00 $\pm$ 5,00
20	72,67 $\pm$ 3,18	68,33 $\pm$ 8,95	76,00 $\pm$ 4,04	67,67 $\pm$ 6,36
MACHOS				
0	74,67 $\pm$ 3,52	74,33 $\pm$ 2,72	75,33 $\pm$ 6,11	72,67 $\pm$ 1,45
10	75,67 $\pm$ 3,28	63,33 $\pm$ 3,52	69,67 $\pm$ 1,33	68,00 $\pm$ 5,13
20	74,00 $\pm$ 4,16	73,33 $\pm$ 9,13	74,33 $\pm$ 8,87	60,67 $\pm$ 2,96

Não ocorreu nenhuma alteração nos valores glicêmicos dos animais dos grupos experimentais, demonstrando que espécie estudada ou não possui ação hipoglicemiante ou não exerce efeito sobre ratos normoglicêmicos.

A tabela 21 e os gráficos 19, 20 e 21, mostram os resultados das dosagens bioquímicas após ensaio subcrônico dérmico com EE de *Z joazeiro*.

TABELA 21- Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01.

PARÂMETROS (unidades)	GRUPOS			
	Controle	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
FÊMEAS				
Glicose (mg/dL)	131,00 $\pm$ 8,21	98,20 $\pm$ 11,24*	123,00 $\pm$ 11,96	120,50 $\pm$ 5,24
Uréia (mg/dL)	39,17 $\pm$ 1,64	37,60 $\pm$ 2,37	41,83 $\pm$ 2,61	43,17 $\pm$ 1,04
Creatinina (mg/dL)	0,54 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02**
Colesterol Total (mg/dL)	65,00 $\pm$ 6,33	63,00 $\pm$ 3,34	65,33 $\pm$ 4,86	57,50 $\pm$ 4,34
Triglicerídeos (mg/dL)	61,50 $\pm$ 4,50	102,0 $\pm$ 15,33**	77,67 $\pm$ 4,85*	52,33 $\pm$ 7,43
Ácido úrico (mg/dL)	1,56 $\pm$ 0,31	2,84 $\pm$ 0,71	1,46 $\pm$ 0,19	1,36 $\pm$ 0,22
AST (U/l)	118,70 $\pm$ 19,00	178,60 $\pm$ 49,58	101,30 $\pm$ 11,55	129,80 $\pm$ 14,74
ALT (U/l)	55,33 $\pm$ 3,36	58,00 $\pm$ 5,71	51,00 $\pm$ 5,41	54,17 $\pm$ 3,52
Proteínas Totais (g/dL)	6,68 $\pm$ 0,17	6,58 $\pm$ 0,18	6,66 $\pm$ 0,08	6,68 $\pm$ 0,13
Albumina (g/dL)	3,11 $\pm$ 0,11	3,06 $\pm$ 0,08	3,13 $\pm$ 0,05	3,05 $\pm$ 0,04
MACHOS				
Glicose (mg/dL)	92,80 $\pm$ 2,33	93,83 $\pm$ 6,01	106,70 $\pm$ 9,88	124,70 $\pm$ 12,44*
Uréia (mg/dL)	32,80 $\pm$ 2,31	34,67 $\pm$ 2,24	32,17 $\pm$ 1,24	33,83 $\pm$ 0,90
Creatinina (mg/dL)	0,60 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,02*	0,45 $\pm$ 0,03*
Colesterol Total (mg/dL)	46,80 $\pm$ 4,56	53,67 $\pm$ 4,78	42,33 $\pm$ 5,74	54,00 $\pm$ 2,63
Triglicerídeos (mg/dL)	100,80 $\pm$ 13,52	103,00 $\pm$ 8,40	77,83 $\pm$ 5,98	101,70 $\pm$ 11,17
Ácido úrico (mg/dL)	0,88 $\pm$ 0,16	1,06 $\pm$ 0,14	1,01 $\pm$ 0,18	1,20 $\pm$ 0,11
AST (U/l)	123,80 $\pm$ 9,16	146,20 $\pm$ 17,35	137,20 $\pm$ 13,18	150,00 $\pm$ 18,55
ALT (U/l)	49,00 $\pm$ 3,56	60,83 $\pm$ 10,66	57,67 $\pm$ 3,27	57,00 $\pm$ 3,07
Proteínas Totais (g/dL)	6,32 $\pm$ 0,18	6,35 $\pm$ 0,12	5,98 $\pm$ 0,17	6,36 $\pm$ 0,10
Albumina (g/dL)	2,84 $\pm$ 0,05	2,81 $\pm$ 0,04	2,78 $\pm$ 0,07	2,90 $\pm$ 0,08

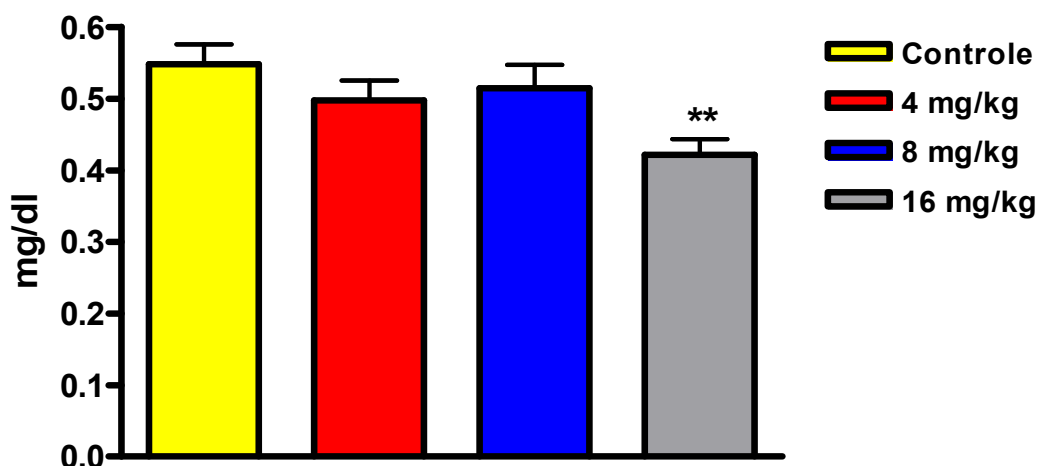


FIGURA 19: Valores de creatinina no soro de ratos fêmeas após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. ANOVA/Dunnett. ** $p < 0,01$.

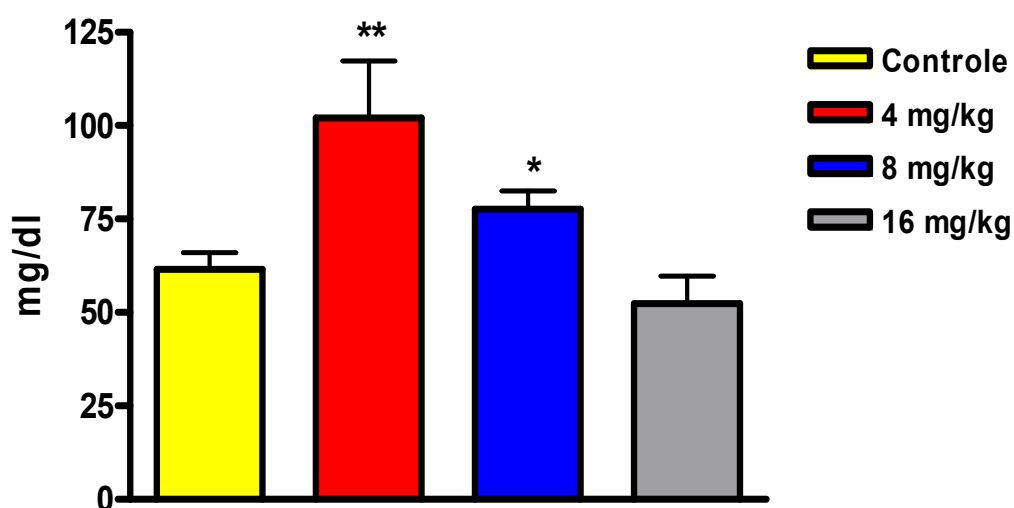


FIGURA 20: Valores de triglicerídeos no soro de ratos fêmeas após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. ANOVA/Dunnett. ** $p < 0,01$.

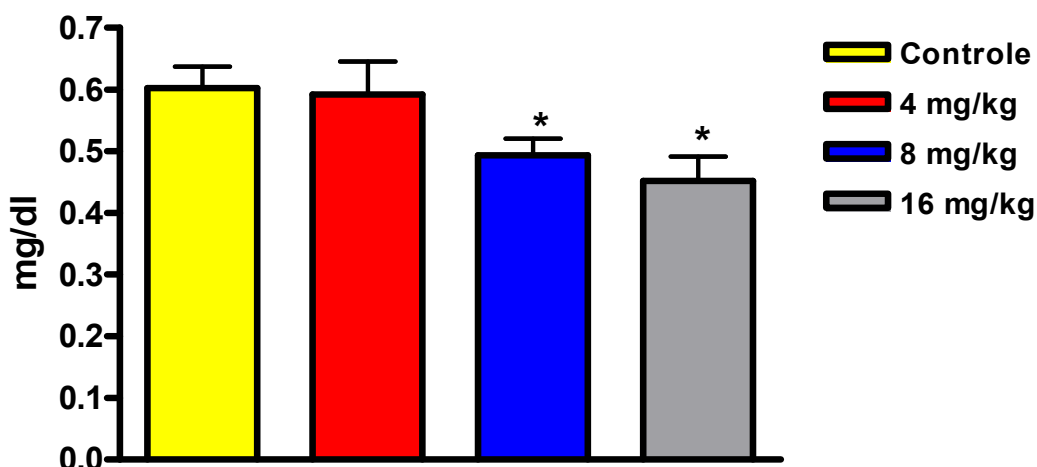


FIGURA 21 : Valores de creatinina no soro de ratos machos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. ANOVA/Dunnett. * $p < 0,05$

Analisando a Tabela 21 pode-se perceber que houve alterações significativas nos níveis de glicose e creatinina, tanto em machos quanto em fêmeas dos grupos tratados e elevação de triglicerídeos nas fêmeas tratadas com as doses de 4 e 8mg/kg.

Em relação à glicemia, resultados contraditórios foram obtidos, diminuição em fêmeas e elevação em machos. Tal contradição poderia estar relacionada às diferenças no metabolismo de machos e fêmeas, entretanto, por terem sido observadas em apenas uma dose (4mg/kg em fêmeas e 16mg/kg em machos) e pelo fato de os valores ainda estarem dentro dos padrões de normalidade reportados por Diniz (2000), estes achados foram considerados desprovidos de qualquer significado clínico. Além disso, nenhuma alteração foi constatada na avaliação da glicemia capilar.

A diminuição na creatinina sanguínea pode estar relacionada a um efeito sistêmico do extrato, uma vez que foi observada em animais de ambos os sexos, nos machos tratados com 8 e 16mg/kg e nas fêmeas que receberam 16mg/kg de EE por via dérmica.

A creatinina é formada como resultado da desidratação não enzimática da creatina muscular. A creatina é sintetizada primariamente no fígado e liberada para a corrente sanguínea de onde é ativamente captada pelo músculo e outros tecidos. O músculo contém aproximadamente 98% do pool total de creatina corporal, dos quais 60 a 70% existem como fosfocreatina e o restante como creatina livre. A fosforilação da creatina-fosfato no músculo gera como produto metabólico a creatinina que é

livremente filtrada pelos rins e excretada através da urina. Fatores como massa muscular, idade e quantidade de carne ingerida na dieta podem alterar a produção de creatinina (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1992; RAVEL, 1997; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

Os níveis séricos de creatinina dependem da massa muscular corporal, ou seja, das reservas corporais de creatina. Deste modo, a massa muscular total é o principal determinante do tamanho do pool de creatina e, portanto, da produção de creatinina. A deficiência alimentar de proteínas leva a um balanço nitrogenado negativo e perda de massa muscular, diminuindo a produção de creatinina (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1992; RAVEL, 1997).

A redução do consumo de ração e conseqüente diminuição no peso corporal podem explicar as alterações observadas nas concentrações séricas de creatinina.

Nafiu et al (2011) e Pendota et al (2010) encontraram redução na creatinina sanguínea de ratos tratados com extratos vegetais de *Cochlospermium planchonii* e *Hippobromus pauciflorus*, respectivamente, porém atribuíram tal efeito a uma ação estimulante das espécies sobre o clearance renal e interferência com o metabolismo de creatinina.

Deve-se levar em consideração também o fato de que certos fármacos podem causar redução nas dosagens de creatinina. Este é o caso dos glicocorticóides que aumentam a Taxa de Filtração Glomerular (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1992).

As duas principais fontes de triglicerídeos são as plasmáticas e as exógenas, ou seja, a gordura oriunda da alimentação. Os triglicerídeos da dieta são absorvidos pelo intestino delgado, secretados no sistema linfático e entram na circulação sistêmica como quilomícrons. Nos capilares dos tecidos adiposo e muscular, estes quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase em ácidos graxos livres. Os quilomícrons remanescentes são tomados pelo fígado e metabolizados a lipoproteínas ricas em colesterol. O fígado secreta triglicerídeos na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). (PEJIC; LEE, 2006; YUAN; AL-SHALI; HEGELE, 2007).

Hipertrigliceridemia é definida como uma concentração anormal de triglicerídeos no sangue. A hipertigliceridemia primária é o resultado de várias alterações genéticas levando ao metabolismo desordenado de triglicerídeos, enquanto que as causas secundárias são adquiridas como, dieta rica em gorduras, obesidade, diabetes, hipotireoidismo e certas medicações como os corticosteróides,

os antiretrovirais, alguns psicotrópicos e a isotretinoína (YUAN; AL-SHALI; HEGELE, 2007).

Segundo Pendota et al (2010), elevações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos podem ser consequência de lipólise acelerada. Esta poderia ser a causa das alterações observadas em fêmeas tratadas com EE, uma vez que este achado foi associado a diminuição de peso corporal.

Outra hipótese a ser considerada é de que, embora não possa ser considerado um quadro clínico de hipertrigliceridemia, a alteração nos triglicerídeos poderia ser resultado da interferência do extrato com o metabolismo das fêmeas, mesmo que o tratamento tenha sido cutâneo.

Efeitos sistêmicos decorrentes da aplicação tópica de fármacos não são incomuns. O ácido 13-cis-retinóico, conhecido como isotretinoína, é amplamente utilizado em dermatologia para o tratamento da acne. Esta substância é capaz de induzir diversos efeitos indesejáveis que variam de alterações mucocutâneas, depressão, teratogenicidade e elevação de triglicerídeos séricos. Tais efeitos são relatados com a administração oral da isotretinoína, entretanto, não há consenso sobre a ausência de efeitos tóxicos após sua aplicação tópica (KRAUTHEIM; GOLLNICK, 2003; LAYTON, 2009).

Os dados obtidos após avaliação hematológica de animais tratados durante 3 semanas com EE de *Z. joazeiro* são apresentados na Tabela 22 e Figura 22.

TABELA 22- Parâmetros hematológicos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=6). ANOVA/Dunnett. *p<0,05 **p<0,01.

PARÂMETROS (unidades)	GRUPOS			
	Controle	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
	FÊMEAS			
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,73 $\pm$ 0,26	8,75 $\pm$ 0,19	8,63 $\pm$ 0,19	8,33 $\pm$ 0,22
Hemoglobina (g/dL)	13,28 $\pm$ 0,23	12,96 $\pm$ 0,26	12,73 $\pm$ 0,29	12,92 $\pm$ 0,31
Hematócrito (%)	44,52 $\pm$ 1,17	44,02 $\pm$ 0,66	43,83 $\pm$ 1,09	43,85 $\pm$ 1,12
VCM (μ^3)	51,17 $\pm$ 1,01	50,20 $\pm$ 0,48	51,00 $\pm$ 0,51	52,67 $\pm$ 0,80
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	15,23 $\pm$ 0,32	14,80 $\pm$ 0,15	14,60 $\pm$ 0,15	15,52 $\pm$ 0,24
CHCM (%)	29,87 $\pm$ 0,39	29,42 $\pm$ 0,22	29,13 $\pm$ 0,14	29,47 $\pm$ 0,12
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,26 $\pm$ 0,89	4,38 $\pm$ 0,32	3,86 $\pm$ 0,56	3,30 $\pm$ 0,12
Neutrófilos (%)	27,00 $\pm$ 2,64	31,60 $\pm$ 3,93	27,50 $\pm$ 3,64	25,33 $\pm$ 1,43
Eosinófilos (%)	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,24	0,16 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00
Linfócitos (%)	71,00 $\pm$ 2,43	64,60 $\pm$ 3,80	69,67 $\pm$ 4,05	71,83 $\pm$ 1,13
Monócitos(%)	2,00 $\pm$ 0,36	3,40 $\pm$ 0,87	2,66 $\pm$ 0,61	2,83 $\pm$ 0,60
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	597,50 $\pm$ 13,72	622,20 $\pm$ 28,35	583,66 $\pm$ 58,86	609,83 $\pm$ 15,41
	MACHOS			
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,04 $\pm$ 0,09	9,09 $\pm$ 0,19	9,41 $\pm$ 0,20	9,56 $\pm$ 0,24
Hemoglobina (g/dL)	13,38 $\pm$ 0,28	13,18 $\pm$ 0,11	13,02 $\pm$ 0,28	13,65 $\pm$ 0,22
Hematócrito (%)	46,58 $\pm$ 0,80	43,84 $\pm$ 0,82	46,75 $\pm$ 1,35	44,98 $\pm$ 1,17
VCM (μ^3)	48,40 $\pm$ 0,74	49,00 $\pm$ 0,51	49,50 $\pm$ 0,56	49,50 $\pm$ 0,42
HCM ($\mu\mu\text{g}$)	14,76 $\pm$ 0,22	13,82 $\pm$ 0,26*	14,32 $\pm$ 0,20	14,52 $\pm$ 0,19
CHCM (%)	30,48 $\pm$ 0,28	28,25 $\pm$ 0,63*	29,07 $\pm$ 0,20**	29,32 $\pm$ 0,15**
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,38 $\pm$ 0,90	8,50 $\pm$ 0,66	8,53 $\pm$ 0,78	7,45 $\pm$ 0,38
Neutrófilos (%)	31,00 $\pm$ 3,59	30,67 $\pm$ 2,48	32,67 $\pm$ 2,01	35,83 $\pm$ 2,96
Eosinófilos (%)	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,34	0,16 $\pm$ 0,16	0,16 $\pm$ 0,16
Linfócitos (%)	62,80 $\pm$ 3,87	64,17 $\pm$ 2,31	62,17 $\pm$ 1,85	59,67 $\pm$ 2,66
Monócitos(%)	6,20 $\pm$ 0,86	4,66 $\pm$ 0,55	5,00 $\pm$ 0,68	4,33 $\pm$ 0,76
Plaquetas($10^3/\text{mm}^3$)	837,00 $\pm$ 76,90	812,66 $\pm$ 46,07	651,83 $\pm$ 7,25*	660,33 $\pm$ 16,47*

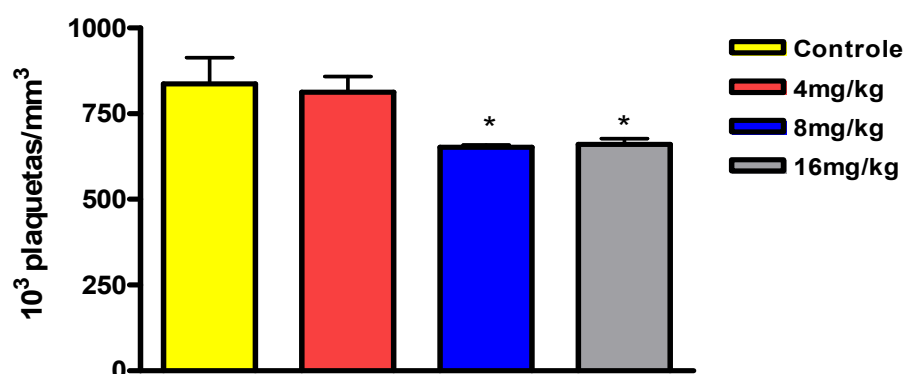


FIGURA 22: Contagem de plaquetas em ratos machos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. ANOVA/Dunnett. * $p < 0,05$

O extrato de *Z. joazeiro* quando aplicado diariamente durante 21 dias não exerceu qualquer efeito sobre os parâmetros hematológicos de ratos fêmeas. Entretanto, HCM, CHCM e plaquetas dos machos encontravam-se alterados quando comparados com o grupo controle.

Apesar de reduzidos, HCM e CHCM quando analisados de maneira isolada não apresentam valor diagnóstico e, portanto estas alterações não podem ser considerados como indicadores de toxicidade sendo desprovidos de qualquer significado clínico.

No que se refere à diminuição de plaquetas, os valores apresentados são considerados normais quando confrontados com aqueles obtidos por Diniz (2000). Contudo, a literatura relata trombocitopenia causada por diferentes drogas, como resultado da interação das mesmas com glicoproteínas da membrana das plaquetas ou indução da formação de anticorpos capazes de reconhecer plaquetas como antígenos (KENNEY; STACK, 2009).

Vários estudos relatam que a classe das saponinas possui atividade sobre plaquetas, inibindo sua agregação e adesividade, causando lise e supressão da síntese de células sanguíneas (FRANCIS et al, 2002; OLAS et al, 2005; JIMOH et al, 2008). Deste modo, não se pode descartar a possibilidade de *Z. joazeiro* ter sido responsável pela alteração na contagem de plaquetas.

Assim como no ensaio toxicológico agudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada quando o peso dos órgãos dos animais tratados foi comparado ao dos animais dos grupos controle (dados mostrados na

Tabela 23) e o exame macroscópico de fígado, pulmões, rins, baço e coração não revelou qualquer anormalidade em relação à coloração, morfologia e consistência.

TABELA 23- Peso dos órgãos de ratos Wistar albinos após aplicação cutânea de diferentes doses de EE de *Z. joazeiro* durante 21 dias. Valores expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=3). Mann Whitney/ Dunn.

GRUPOS	PESO DOS ÓRGÃOS (g)			
	BAÇO	CORAÇÃO	FÍGADO	RINS
FÊMEAS				
CONTROLE	0,52 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,06	7,39 $\pm$ 0,30	2,08 $\pm$ 0,10
4 mg/kg	0,63 $\pm$ 0,12	0,88 $\pm$ 0,03	8,65 $\pm$ 1,11	2,16 $\pm$ 0,16
8 mg/kg	0,50 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,00	7,08 $\pm$ 0,55	2,00 $\pm$ 0,21
16 mg/kg	0,49 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,04	6,41 $\pm$ 0,26	1,81 $\pm$ 0,03
MACHOS				
CONTROLE	0,69 $\pm$ 0,02	1,33 $\pm$ 0,13	9,13 $\pm$ 0,29	2,86 $\pm$ 0,12
4 mg/kg	0,53 $\pm$ 0,07	1,41 $\pm$ 0,05	9,40 $\pm$ 0,56	2,56 $\pm$ 0,04
8 mg/kg	0,72 $\pm$ 0,00	1,23 $\pm$ 0,08	8,90 $\pm$ 0,35	2,64 $\pm$ 0,04
16 mg/kg	0,54 $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,05	7,86 $\pm$ 0,04	2,68 $\pm$ 0,04

Observações clínicas dos animais também foram realizadas diariamente. Algumas alterações no aspecto da pele, no local de aplicação do extrato foram registradas, como também mudanças no comportamento dos ratos de ambos os sexos e que não foram observadas nos grupos controle.

Após o início do tratamento os ratos passaram a vocalizar e demonstrar postura arqueada. Além disso, as fêmeas apresentavam-se irritadas, brigando entre si.

Com relação à pele tratada, pequenas e finas crostas amareladas surgiram no local de aplicação. A formação destas crostas era seguida por descamação da pele. A aplicação diária provocava a repetição deste fenômeno a cada dois dias.

Alterações comportamentais após aplicação dérmica de um extrato vegetal foi relatado por Bras et al (2011) com a espécie *Schinus molle* var. *aroeira* L. que foi capaz de induzir efeitos estimulantes em ratos, além de leve irritação dérmica.

As saponinas presentes no extrato de *Z. joazeiro*, por seu efeito permeabilizante de membranas, deve ter sido capaz de destruir os corneodesmossomas. Os corneócitos são mantidos unidos por corneodesmossomas e a eventual degradação destas junções por enzimas proteolíticas leva a descamação (PROW et al, 2011).

A descamação da pele induzida pelo tratamento, alterando o estrato córneo, provavelmente permitiu a absorção de constituintes capazes de provocar os efeitos sistêmicos observados nos animais.

Alterações nas propriedades de barreira da pele podem ser decorrentes de diferentes patologias, como a dermatite atópica e a psoríase. Considera-se que nanopartículas seriam capazes de penetrar estas lesões eficientemente devido ao estrato córneo modificado, inflamação e renovação aumentada de queratinócitos (PROW et al, 2011).

Segundo Velasco et al (2004), peeling químico ou quimioesfoliação consiste na aplicação de um ou mais agentes cáusticos ou queratolíticos à pele produzindo uma destruição controlada da epiderme e sua reepitelização, sendo utilizadas para tanto, substâncias como os alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos como o ácido salicílico, ácido tricloroacético, ácido azelaico e tretinoína. Este tratamento é indicado para acne, fotoenvelhecimento, rugas, cicatrizes, manchas e queratose.

Os efeitos observados após aplicação dérmica do extrato etanólico de *Z. joazeiro* são compatíveis com aqueles induzidos por substâncias utilizadas para peeling químico, confirmando relatos da medicina popular que indicam a planta como um cosmético capaz de reduzir manchas de pele e acne (DINIZ et al, 2006; CARVALHO, 2007).

CAPÍTULO V

5.CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos através da realização de ensaios toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos com o extrato etanólico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart, pode-se concluir que:

- ❖ A aplicação do extrato sobre feridas excisionais experimentalmente induzidas melhorou os aspectos clínicos da ferida e impediu o surgimento de sinais de infecção;
- ❖ O extrato de *Z. joazeiro* apresentou ação antiinflamatória nas doses de 35 e 175 mg/kg nos modelos animais de inflamação utilizados neste trabalho, validando assim, sua indicação popular de uso;
- ❖ O extrato apresenta ação levemente irritante após aplicação única sobre a pele de ratos na dose de 1000 mg/kg;
- ❖ No que diz respeito a efeitos tóxicos sistêmicos após aplicação tópica única, o extrato não causou alterações clinicamente significativas sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e hematológicos;
- ❖ A aplicação diária do extrato sobre a pele de ratos interferiu com a ingestão de água e alimentos, com o peso corporal e com o comportamento dos animais, além de alterar parâmetros bioquímicos;
- ❖ O extrato etanólico de *Z. joazeiro* Mart. dérmicamente aplicado tem ação dermatocósmética e baixa toxicidade, entretanto o uso tópico da planta em preparações caseiras pela população de forma contínua deve ser feito com cautela.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER A. O.; SALIM S. Y.; ASSAF M. H.; ABDEL-HADY R. A. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 101, p. 149-138, 2005.
- ABRAMOVITZ, M.; METTERS, K. M. Prostanoid receptors. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v.33, p. 223-231, 1998.
- ADCOCK, I. M. Glucocorticoid regulated Transcription Factors. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**. v. 14, p. 211-219, 2001.
- ADCOCK, I.; CARAMORI, G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. **Immunology and Cell Biology**, v.79, p.376-384, 2001.
- ADZU B.; AMOS S.; WAMBEBE C.; GAMANIEL K. Antinociceptive activity of *Zizyphus spina-crhisti* root bark extract. **Fitoterapia**, v. 72, p. 344-350, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and Magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76-91, 2007.
- ALMEIDA R. N.; FALCÃO A. C. G. M.; DINIZ R. S. T.; QUINTANS-JUNIOR D. J.; POLARI R. M.; BARBOSA-FILHO J. M.; AGRA M. F.; DUARTE J. C.; FERREIRA C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 80(3/4), p. 72-76, 1999.
- AMARAL, D. A.; BARCIA, S. A. D. Intoxicações por Medicamentos. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo: editora Atheneu, 2ª Edição, 2003.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, v.13(2), p.85-102, 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M.; TRIGUEIRO, J. A.; CHERIYAN, U. O.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. **Journal of Natural Products**, v. 48(1), p. 152-153, 1985.

BARROS G. S. G.; MATOS F. J. A.; VIEIRA J. E. V.; SOUSA M. P.; MEDEIROS M. C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 22, p. 116-122, 1970.

BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina: Ribeirão Preto**, v.34, p.18-26, 2001.

BERGSTROM, N.; ALLMAN, R. M.; ALVAREZ, O. M.; BENNETT, C. E.; CARLSON, C. E.; FRANTZ, R. A.; GARBER, S. L.; GOSNELI, D.; JACKSON, B. S.; KAMINSKI, M. V.; KEMP, M. G.; KROSKOP, T. A.; LEWIS, V. L.; MAKLEBUST, J.; MARGOLIS, D. L.; MARVEL, R. M.; REGER, S. I.; RODEHEAVER, G. T.; SALCIDO, R.; XAKELLIS, G. C.; YARKONY, G. M.; Pressure ulcer treatment: quick reference guide for clinicians. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 22-44, 1995.

BIDDIE, S. C.; CONWAY-CAMPBELL, B. L.; LIGHTMAN, S. L. Dynamic regulation of glucocorticoid signaling in health and disease. **Rheumatology Advance**, 2011. Disponível em: [10.1093/rheumatology/ker215](https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker215) Acesso em 10/01/2012.

BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n.1, p. 197-206, 1999.

BORGI, W.; GHEDIRA, K.; CHOUCANE, N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. **Fitoterapia**, v. 78, p. 16-19, 2007.

BRAS, C.; GUMILAR, F.; GANDINI, N.; MINETTI, A.; FERRERO, A. Evaluation of acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* var. areira L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1450-1456, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde .Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 de abril de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE”.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BÜRGER, M. E.; GHEDINI, P. C.; DORIGONI, P. A.; GRAÇA, D. L.; BALDISSEROTTO, B.; ALMEIDA, C. E.; CASSOL, R; MATOS, R. S.; FROES, L. F.; ZACHIA, R. A. Cicatrização de feridas cutâneas em ratos tratados com pomada caseira à base de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.5 (2), p.91-97, 2003.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** Dissertação de Mestrado / USP, São Carlos - SP, 2002.

CARVALHO, P. E. R. **Circular Técnica 139: Joazeiro, *Zizyphus joazeiro*.** Embrapa Florestas, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; SERTIÉ, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K.. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethopharmacology**, v. 64, p. 127–133, 1999.

CASTELLANO, O. **Introdução à Fitoterapia.** Serviço de Arte Gráfica da Coordenadoria de Atividades Culturais - USP – São Paulo, 1981.

CAVALCANTI, M. T.; SILVEIRA, D. C.; FLORÊNCIO, I. M.; FEITOSA, V. A.; ELLER, S. C. W. Obtenção da farinha do fruto do juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) e

caracterização físico-química. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6(1), p.220-224, 2011.

CHARLET, E. **Cosmética para Farmacêuticos**. Royo, Editorial Acribia, 1996.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R.N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88 (1), p. 7 –13, 2007a.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, 26 (1), p.144 – 54, 2007b.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. . **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30 (1), p.19 –30, 2009.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, v.1, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 5ª Edição, 1994.

CROSTEIN, B.N., Cicloxygenase-2-selective inhibitors: Translating pharmacology into clinical utility. **Cleveland Journal of Medicine**, v. 69, supl. I, p. 13-19, 2002.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M. R.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.409-412, 2007.

DINIZ, M. F. M. **Ensaio Toxicológicos Pré-clínicos com as folhas de Cissampelos sympodialis EICHEL**. [Tese]. João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 2000.

DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MALTA JÚNIOR, A.; MOURA, M. D. **Memento de Plantas Medicinais**, Editora Universitária-UFPB, 2ª Edição, p.79-81, 2006.

DOVI, J.V.; HE, LI-KE; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p.448-455, 2003.

ESTEVAM, E. C.; **Avaliação da toxicidade pré-clínica das cascas do caule de Zizyphus joazeiro Mart. em camundongos.** [Dissertação] João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 2008.

FERON, V. J.; GROTEN, T.P.; Toxicological evaluation of chemical mixtures. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 825–839, 2002.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61(2), p.201-208, 2008.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.35(3), p.203-206, 2008.

GADDI, A.; CICERO, A. F. G.; PEDRO, E. J. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.38, p.201-212, 2004.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane- type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2002-2008, 2009.

GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; BIASINI, T.; MIANO, T. C. ; BRACA, A.; DE LEO, M.; DE PASQUALE, R.; SANOGO, R. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p. 271-275, 2008.

GUPTA, M.; MAZUMDER, R.; KUMAR, S.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; SELVEN, V. T. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models, **Journal of Ethopharmacology**, v.98, p. 267–273, 2005.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. Editora Roca, 3ª edição, São Paulo, 1993.

HIGUCHI, R.; KUBOTA, S.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; SINGH, J. P.; SHAH, A.H. Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. **Phytochemistry**. v. 23(11), 2597-2600, 1984.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. **F1000 Biology Reports**, 2:78, 2010. <http://f1000.com/reports/b/2/78> Acesso em: 01/08/2011.

HINZ, B.; PHAN, S. H.; THANNICKAL, V. J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. **The American Journal of Pathology**, v.170(6), p. 1807-1816, 2007.

HOYAMA, E.; SCHELLINI, S. A.; PELLIZON, C. H.; MARQUES, M. E. A.; PADOVANI, C. R.; ROSSA, R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80(4), p. 369-374, 2005.

GETTING, S. J.; FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; MEDICIS, R.; LUSSIER, A.; WOLIZTKY, B. A.; MARTINS, M. A.; PERRETTI, M. Molecular determinants of monosodium urate crystal-induced murine peritonitis: a role for endogenous mast cells and a distinct requirement for endothelial-derived selectins. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283 (1), p. 123-130, 1997.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 1 – 93, 2006.

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water for life. **Tidsskrift for den Norske Lægeforening**, v.123, p.3402-3405, 2003.

JIMENEZ, P. A.; RAMPY, M. A. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. **Journal of Surgical Research**, v. 81, p. 238 – 242, 1999.

JIMOH, O. R.; OLAORE, J.; OLAYAKI, L. A.; OLAWAPO, A. BILIAMINU, S. A. Effects of aqueous extract of *Ocimum gratissimum* on haematological parameters of Wistar rats. **Biokemistri**, v.20(1), p.33-37, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª edição, 2004.

KENNEY, B.; STACK, G. Drug-induced thrombocytopenia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.133, p.309-314, 2009.

KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H. P. M. Transdermal penetration of topical drugs used in the treatment of acne. **Clinical Pharmacokinetics**, v.42, p.1287-1304, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: **ROBBINS e COTRAN – PATOLOGIA**, Editora Saunders Elsevier, 7ª edição, p. 49-89, Rio de Janeiro, 2005.

LAYTON, A. The use of isotretinoin in acne. **Dermato-Endocrinology**, v.1(3), p.162-169, 2009.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.193, p.294-306, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora do Instituto Plantarum, , p.384, Nova Odessa, 1992.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Editora do Instituto Plantarum, p. 396-397, São Paulo, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRÍA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25(3), p.429-438, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78(5), p. 525-542, 2003.

MARASCHI, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, v. 10, p. 24-28, 1999.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** [Tese]. João Pessoa: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), 2007.

MCCHESENEY, J. D. Biological diversity, chemical diversity, and search for new pharmaceuticals. In: **M.J. BALICK, E. ELISABETSKY E S. A. LAIRD. Medicinal Resources of the Tropical Forest – Biodiversity and its importance to human health**, Columbia University Press, p. 11-17, New York, 1996.

MENDES, S.S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p. 391-397, 2010.

MONGHADAM-KIA, S.; WERTH, V. P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. **International Journal of Dermatology**, v.49(3), p.239-248, 2010.

MORTON, J. J. P.; MALONE, M. H. Evaluation of vulnerary activity by an open wound procedure in rats. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**; v. 196, p. 117 – 126, 1972.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 138-144, 2007.

NAFIU, M. O.; AKANJI, M. A.; YAKUBU, M. T. Effect of aqueous extract of *Cochlospermum planchonii* rhizome on some kidney and liver functional indices of albino rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.8(1), p.22-26, 2011.

NAYAK, S.; NALABOTHU, P.; SANDIFORDI, S.; BHOGADI, V.; ADOGWA, A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**; 6:12, 2006. www.biomedcentral.com/1472-6882/6/12/prepub Acesso em 30/01/2009.

NIGAM, P.K. Adverse reactions to cosmetic and methods of testing. **Indian Journal of Dermatology, Venereology an Leprology**, v.75(1), p.10-19, 2009.

NIKOLOVSKI, J.; STAMATAS, G. N.; KOLLIAS, N.; WIEGAND, B. C. Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128, p. 1728-1736, 2008.

NUNES, P. H. M.; MARINHO, L. C.; NUNES, M. L. R. L.; SOARES, E. O. Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* MART. (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; v. 20, p. 599-601, 1987.

OECD/OCDE - Acute dermal irritation/ corrosion. In: **Guideline for the Testing of Chemicals nº 404**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 2002.

OECD/OCDE - Repeated dose dermal toxicity : 21/28 day study. In: **Guideline for the Testing of Chemicals nº 410**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 1981.

OECD/OCDE - Acute dermal toxicity. In: **Guideline for the Testing of Chemicals nº 402**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 1987.

OLAS, B.; WACHOVICZ, B.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Inhibition of blood platelet adhesion and secretion by different phenolics from *Yucca schidigera* Roezl. bark. **Nutrition**, v.21(2), p.199-206, 2005.

OLIVEIRA, R. L. C.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 132, p. 189-206, 2007.

PRAVEEN-RAO, P. N.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.11(2), p.81-110, 2008.

PEJIC, R. N.; LEE, D. T. Hypertriglyceridemia. **The Journal of the American Board and Family Medicine**, v.19(3), p.310-316, 2006.

PENDOTA, S. C.; YAKUBU, M. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Effect of administration of aqueous extract of *Hippobromus pauciflorus* leaves in male Wistar rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.7(1), p.40-46, 2010.

PERRONE, R. D.; MADIAS, N. E.; LEVEY, A. S. Serum creatinine as na index of renal function: new insights into old concepts. **Clinical Chemistry**, v.38(10), p.1933-1953, 1992.

PRATA, M.; HADDAD, C. GONDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** , v. 3, p. 43-48, 1988.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M. T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advance Drug Delivery Reviews**, v.63, p.470-491, 2011.

RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; BLESSA, E. P.; IWABE, S.; CROCCI, A. J. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Ciência Rural**, v.31(6), p.1007-1011, 2001.

RAMSEY, D. T.; POPE, E. R.; WAGNER-MANN, C.; BERG, J .N. J.; SWAIN, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 941-949, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, Editora Churchill Livingstone Elsevier, 5ª edição, Rio de Janeiro, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39 (5), p. 603-613, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.**, Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 6ª Edição, 1997.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v.70, p.135-145, 2002.

REMYINGTON, J. P.; Medicação Tópica. In: **A ciência e a prática da farmácia**. 20ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

RIVERA, E. A. B. Analgesia, anestesia e eutanásia em roedores, lagomorfos, cães e suínos. In: **FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Editora EDIPUCRS, p.198-216, Porto Alegre, , 2010.

RIVERA, A. E.; SPENCER, J. M. Clinical aspects of full-thickness wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 39-48, 2007.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**, Colômbia: Premier. 1, 1997.

SAÉNZ, M. T.; GRACIA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A. Antiinflammatory activity and acute toxicity of *Anredera leptostachys*. **Phytomedicine**, v. 5, p. 195-198, 1998.

SAMPAIO, S. A.P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F. M.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19(1B), p.321-324, 2009.

SAPRA, B.; JAIN, S; TIWARY, A. K. Effect of *Asparagus racemosus* extract on transdermal delivery of carvedilol: a mechanistic study. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v.10(1), p. 199-210, 2009.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43(2), p.195-203, 2007.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFSC e UFRGS, 1ª edição, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, 1999.

SHAH, A. H.; KHAN, Z. A.; BAIG, M. Z. A.; QURESHI, S.; AL-BEKAIRI, A. M. Gastroprotective effects of pretreatment with *Zizyphus sativa* fruits against toxic damage in rats. **Fitoterapia**, v. LXVIII (3), p. 226-234, 1997.

SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; CALIS, I.; STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**. v. 65(8), p. 740-743, 1999.

SCHUHLY W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. Novel Triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. **Helvetica Chimica Acta**. v. 83, p. 1509-1513, 2000.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEALL, L. A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N.; KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N. Novel anti-inflammatory – pro-resolving mediators and their receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 11(6), p.629-647, 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKI, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 18 (3), p. 385-405, 2004.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18(4), p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. In: **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 2000.

SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico de feridas – curativos. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 89(3/4), p. 137-141, 2010.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, 1996.

SUMITRA, M.; MANINKANDAN, P.; SUGUNA, L. Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.87, p. 566-573, 2005.

SOARES, F. P.; RONCONI, C. A. V.; CUNHA, E. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. D.; BRAZ-FILHO, R. Four known triterpenoids isolated from three brazilian plants: ¹H and ¹³C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry** v. 36(8), p. 608-614, 1998.

TALALAY, P.; TALALAY, P. The importance of Using Scientific Principles in the Development of Medicinal Agents from Plants. **Academic Medicine**. v. 76(3), p. 238-247, 2001.

TAYLOR, L. **The healing power of rainforest herbs**, 2005. Disponível em: www.rain-tree.com/juazeiro.htm Acesso em 15/04/2007

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of dimethylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v.179, p.183-196, 2002.

TESHOME, K.; GEBRE-MARIAM, T.; ASRES, K.; PERRY, F.; ENGIDAWORK, E. Toxicity Studies on Dermal Application of Plant Extract of *Plumbago zeylanica* Used in Ethiopian Traditional Medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 236-248, 2008.

TRIGUEIRO, J. A. **Contribuição ao estudo químico e farmacológico de *Zizyphus joazeiro* Mart**. Dissertação de mestrado em produtos naturais, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ UFPB, João Pessoa-PB, 1981.

TSCHESCHE, R.; SHAH, A. H.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; RADLOFF, M. V.; ECKHARDT, G. Alkaloids of Rhamnaceae- Part 33. **Pharmazie**, v. 36, p. 511, 1981.

VELASCO, M. V. R.; OKUBO, F. R.; RIBEIRO, M. E.; STEINER, D.; BEDIN, V. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79(1), p.91-99, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28(3), p.519-528, 2005.

VIEIRA, J. D. **Resposta técnica**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2007. Disponível em: www.sbrt.ibcit.br Acesso em 07/07/2008.

VIJAYARAGHAVAN, R.; KULKAMI, A.; PANT, S. C.; KUMAR, P.; LAKSHMANA RAO, P.V.; GUPTA, N.; GAUTAM, A.; GANESAN, K. Differential toxicity of sùlfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous and oral routes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.202, p. 180-188, 2005.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina: Ribeirão Preto**, v.22(1/2), p.7-48, 1994.

WASHIDA, B.; ABDERRAHMAN, B.; NABIL, C. Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 228-231, 2007.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as na assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111,p. 544-547, 1962.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v.80(3), p.1107-1213, 2000.

YOUNG, B.; LOUISE, J.S.; STEVENS, A.; HETH, J.W. **Wheater – Histologia Funcional**. Rio de Janeiro: editora Elsevier Churchill Livinstone, 5ª Edição, 2007

YUAN, G.; AL-SHALI, K. Z.; HERGELE, R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. **Canadian Medical Association Journal**, v.176(8), p.1113-11120, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1: Modelo de protocolo empregado para Triagem Farmacológica Comportamental (ALMEIDA, 2006).

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Artigo publicado e artigo submetido



Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves

Kelly Samara de Lira Mota, João Carlos Lima Rodrigues Pita, Ethiene Castellucci Estevam, Viviane Marcelino Medeiros, Josean Fecchine Tavares, Maria de Fátima Agra, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Marcelo Sobral da Silva, Leônia Maria Batista*

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Prof. Delby Fernandes de Medeiros", Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, 58051-970 João Pessoa-PB, Brazil

RESUMO: "Avaliação da toxicidade e atividade antiulcerogênica do extrato etanólico das folhas de *Maytenus obtusifolia* Mart." *Maytenus obtusifolia* é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras graves, inflamações gerais e câncer. Apesar da importância etnofarmacológica desta espécie, nenhum estudo foi realizado para avaliar a sua toxicidade e atividade antiulcerogênica. Neste estudo, nós avaliamos a toxicidade e propriedade antiulcerosa do extrato etanólico das folhas de *Maytenus obtusifolia* (MO-EtOH). O MO-EtOH (10-1000 µg/mL) mostrou baixa toxicidade para as larvas de *A. salina* com CL_{50} maior que 1000 µg/mL. O MO-EtOH (2000 mg/kg, p.o.) não alterou o peso corporal e peso dos órgãos dos camundongos, mas foi observado um aumento no consumo de água dos machos e uma diminuição do consumo alimentar das fêmeas. Durante o estudo não foram observadas mortes e nem alterações macroscópicas nos órgãos dos camundongos. MO-EtOH (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e lansoprazol (30 mg/kg) reduziram significativamente o índice ulcerativo para $65,58 \pm 8,74$, $43,00 \pm 9,53$, $15,50 \pm 7,56$, $54,75 \pm 8,88$ e $36,13 \pm 9,55$, respectivamente, em comparação com salina $82,13 \pm 12,48$. Em conclusão, o MO-EtOH apresentou baixa toxicidade e atividade antiulcerogênica, o que confirma o uso popular de *M. obtusifolia*.

Unitermos: *Maytenus obtusifolia*, Celastraceae, *Artemia salina*, toxicidade aguda oral, atividade antiulcerogênica.

ABSTRACT: *Maytenus obtusifolia* is used in folk medicine for the treatment of serious ulcers, general inflammations and cancer. Despite of the ethnopharmacological importance of this species, no study was conducted to evaluate its toxicity and antiulcerogenic activity. In this study, we evaluated the toxicity and antiulcerogenic property of the ethanol extract of the leaves of *Maytenus obtusifolia* (MO-EtOH). The MO-EtOH (10-1000 µg/mL) showed low toxicity for larvae of *A. salina* with LC_{50} higher than 1000 µg/mL. The MO-EtOH (2000 mg/kg, p.o.) did not change the body and organs weight of the mice, but it was observed an increase in the water consumption of males and a decrease in the food consumption of females. During the study no deaths and no macroscopic changes in the organs were observed in the mice. MO-EtOH (62.5, 125, 250 and 500 mg/kg) and lansoprazole (30 mg/kg) significantly reduced the ulcerative index for 65.58 ± 8.74 , 43.00 ± 9.53 , 15.50 ± 7.56 , 54.75 ± 8.88 and 36.13 ± 9.55 , respectively, in comparison with saline 82.13 ± 12.48 . In conclusion, the MO-EtOH showed low toxicity and antiulcerogenic activity, confirming the popular use of *M. obtusifolia*.

Keywords: *Maytenus obtusifolia*, Celastraceae, *Artemia salina*, acute oral toxicity, antiulcerogenic activity.

INTRODUCTION

The plants have acquired crucial importance in folk medicine, because of its therapeutic or toxic properties (Martins et al., 2003). The use of vegetal extracts in the treatment of some diseases is a widespread habit in Brazil. This habit may be explained, at least in part, by the belief that the plants exhibit therapeutic effect without causing toxic effects in the organism. Therefore, the search of medicinal plants has great

scientific importance, because it intends to validate the popular use and give greater safety (Brandão et al., 2006; Carvalho et al., 2008; Veiga-Junior et al., 2008).

In this context, a prominent family is Celastraceae, a large family of trees and shrubs. It is comprised by approximately 89 genera and 1300 species, with *Maytenus* as one of the largest genera, with some 270 species distributed throughout Brazilian territory (Stevens, 2001). Plants of this genus are used in South America's folk medicine like infusion or decoctions, due

Manuscript Number:

Title: A 90-day oral toxicity study of *Zizyphus joazeiro* Mart. in mice

Article Type: Full Length Article

Keywords: Toxicity, *Zizyphus joazeiro*, creatinine, neutropenia

Corresponding Author: Miss Ethiene Castellucci Estevam,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal da Paraíba

First Author: Ethiene Castellucci Estevam

Order of Authors: Ethiene Castellucci Estevam; Patrícia Livia G Azevedo; Clélia Alencar X Mota; Aldeide Oliveira B Rocha; Cláudia Sampaio A Lima; Margareth de Fátima F Melo Diniz; Liana Clélia S Lima de Moraes

Abstract: *Zizyphus joazeiro* Mart. is a plant popularly known as "juazeiro" or "juá", and its leaves and stem bark are traditionally used by the people from the northeastern of Brazil as a fever reliever, anti-inflammatory, as treatment for gastric problems, skin diseases, and as a tooth cleaner. The widespread use of this vegetable specie in popular medicine and odontology, justify toxicity studies which guarantee its safe use. For this reason, a toxicity assessment is presented with the ethanolic extract of the stem bark of the *Zizyphus joazeiro*, Swiss albino mice of both sexes where tested by daily oral doses of 7, 35 and 175 mg/kg for 90 days. At the end of the administration and 30 days after this period were observed serum creatinine higher in males and females, decreased urea in males, and leukopenia, neutropenia and monocytosis in both sexes. The histological analysis of viscera revealed renal, liver and lung with multiple outbreaks of lymphocyte infiltration. The analysis of the results obtained in this study with ethanolic extract of the stem bark of the *Zizyphus joazeiro* orally indicates that, despite popular indications, this plant induces renal, liver and lung toxicity and its indiscriminate oral use by the population is not recommended.