



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E  
CONSERVAÇÃO DA NATUREZA – PPGETNO**



JACQUELINE COSMO ANDRADE PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS  
AQUOSOS DE FOLHAS E CASCAS DO CAULE DE *Ziziphus joazeiro* Mart.  
(Rhamnaceae) EM BIOFILMES MICROBIANOS**

**RECIFE - PE**

**2019**

JACQUELINE COSMO ANDRADE PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS  
AQUOSOS DE FOLHAS E CASCAS DO CAULE DE *Ziziphus joazeiro* Mart.  
(Rhamnaceae) EM BIOFILMES MICROBIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em  
Etnobiologia e Conservação da Natureza (UFRPE,  
UEPB, URCA e UFPE) como parte dos requisitos para  
obtenção do título de doutor.

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri - URCA

**RECIFE – PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

P654a Pinheiro, Jacqueline Cosmo Andrade  
Avaliação de bioatividades e da ação dos extratos aquosos  
de folhas e cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart.  
(Rhamnaceae) em biofilmes microbianos / Jacqueline Cosmo  
Andrade Pinheiro. – 2019.  
147 f.: il.

Orientador: Henrique Douglas Melo Coutinho.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da  
Natureza, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e anexo(s).

1. Etnofarmacologia 2. Folhas 3. Cascas 4. Agentes  
antiinfeciosos. 5. *Ziziphus joazeiro* I. Coutinho, Henrique Douglas  
Melo, orient. II. Título

CDD 304.2

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Etnobiologia e Conservação da Natureza (Área de Concentração: Biodiversidade/Linha de Pesquisa: Sistemas Cognitivos e uso de recursos Naturais), outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Apresentada em 27 de setembro de 2019.

Orientador

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**  
Universidade Regional do Cariri - URCA

Examinadores

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Kerntopf**  
Universidade Regional do Cariri – Membro Interno

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga**  
Universidade Regional do Cariri – Membro Externo

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celestina Elba Sobral Souza**  
Faculdade Vale do Salgado – Membro Externo

---

**Prof. Dr. Saulo Relison Tintino**  
Universidade Regional do Cariri – Membro Externo

Suplentes

---

**Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha**  
Universidade Regional do Cariri – Membro Externo

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**  
Universidade Regional do Cariri – Membro Externo

RECIFE-PE

2019

*Dedico a minha Mãe **Maria José Andrade Lourenço**,  
pelo amor e apoio incondicional e por iluminar os  
meus passos e orientar as minhas decisões.*

*“O correr da vida embrulha tudo.  
A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem”.*

***Guimarães Rosa***

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por guiarem meus passos pelos melhores caminhos. Deus, Tu podes Tudo!

Aos meus familiares, em especial minha tia Damiana, minha mãe, Maria José, minhas irmãs e meus sobrinhos pelo amor, carinho, apoio, ajuda e por sempre me incentivarem.

Ao meu amor, Allysson, por toda paciência, apoio, amor e ânimo.

A minha Luise, que já amo incondicionalmente.

Ao meu orientador Henrique Douglas Melo Coutinho pelas oportunidades, confiança e por todas as essenciais e valiosas orientações e conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia molecular e Microbiologia – LMBM e do Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri – LMAC, por compartilharem os momentos de conhecimento, trabalho e diversão.

As amigas Ana Raquel, Antônia Thassya, Joara Carneiro e Yedda Maria, pela colaboração e dedicação com todo os ensaios.

A amiga Anita Oliveira por todo apoio e carinho durante esse período.

Ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, da Universidade Federal de Pernambuco, pela parceria nos ensaios de biofilmes fúngicos, em especial a amiga Maria Audilene.

Ao Laboratório de Biologia Molecular - Biomol, da Universidade Federal de Pernambuco, pela parceria nos ensaios de biofilmes bacterianos, em especial a Bárbara de Azevedo Ramos.

Ao Laboratório de Produtos Naturais da Embrapa, pela parceria com a análise química dos extratos, em especial a Paulo R. V. Ribeiro.

Aos coordenadores, professores, colegas e funcionários do programa de Pós-graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza da URCA, UFRPE e da UEPB pelo conhecimento transmitido.

A Universidade Federal do Cariri, em especial o campus de Brejo Santo, pelo incentivo a qualificação profissional.

As instituições de fomentos Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), e o Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Minha gratidão!*

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRAT

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
<b>CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	17
1.1 FAMÍLIA Rhamnaceae E O GÊNERO <i>Ziziphus</i> .....	17
1.2 ESPÉCIE <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. ....	18
1.3 ETNOBIOLOGIA E ETNOFARMACOLOGIA DE <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. ....	20
1.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA .....	22
1.5 BIOFILMES .....	23
1.5.1 Biofilmes Bacterianos .....	25
1.5.2 Biofilmes Fúngicos .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 2: UPLC-MS-ESI-QTOF CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ANTIBIOTIC ACTIVITY OF <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. AQUEOUS EXTRACTS</b> .....	43
<b>CAPÍTULO 3: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIPARASITARY AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.</b> .....	68
<b>CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS DE <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. POR UPLC-QTOF E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA</b> .....	84
<b>CAPÍTULO 5: POTENCIAL DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. (RHAMNACEAE) CONTRA RESISTÊNCIA MICROBIANA NA ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS E FÚNGICOS</b> .....	105
<b>CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	131
<b>ANEXOS</b> .....	134



## RESUMO

**ANDRADE, Jacqueline Cosmo Pinheiro. Dr<sup>a</sup>. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Setembro/2019. AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CASCAS DO CAULE DE *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) EM BIOFILMES MICROBIANOS. Henrique Douglas Melo Coutinho.**

A utilização de produtos naturais com foco terapêutico surge como alternativa contra à presença de resistência à antimicrobianos e a busca por novas opções para o tratamento das diversas infecções microbianas. As pesquisas etnobiológicas se tornaram uma investigação essencial na identificação por princípios ativos, pois são fundamentadas no conhecimento popular e no uso medicinal de plantas nas práticas tradicionais. *Ziziphus joazeiro* é uma das plantas endêmicas da Caatinga mais exploradas pelo homem, sendo notório o valor terapêutico que possui em várias práticas medicinais, uma das principais indicações consiste na sua utilização na higiene bucal e tratamento de gengivites. Partes da planta, principalmente, cascas e contra casca do caule são trituradas e usadas na escovação dentária. Entretanto, a prática incorreta da retirada de partes do caule, pode impossibilitar o fluxo de nutrientes, resultando na desidratação do tecido, além do ataque de pragas e microrganismos ocasionando a morte da planta. Neste sentido, se faz necessário à validação de outras partes de *Z. joazeiro*, na busca de minimizar a utilização do caule. Esse trabalho objetivou avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e a ação na erradicação de biofilmes bacterianos e fúngicos pelos extratos aquosos das folhas e das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart, comparando os efeitos de ambos extratos, como também com a ação de drogas padrões convencionais. Para tanto, foram realizados ensaios microbiológicos, como atividade antibacteriana e antifúngica, pelo método microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima e a atividade modulatória frente a antibióticos e antifúngicos, a atividade antiparasitária contra *Trypanonoma cruzi* (epimastigota) e *Leishmania brasiliensis* (promastigota), além da citotoxicidade, frente a células de mamíferos. O tratamento de biofilmes microbianos foi determinado pela absorbância de OD600nm e pelo ensaio de cristal violeta. Todos os resultados foram comparados entre si e com os efeitos de drogas padrões. A composição química dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência. Os extratos não demonstraram atividade antibacteriana direta, com CIM  $\geq$  2048  $\mu$ g/mL. Entretanto, apresentaram atividade moduladora significativa quando combinados com antibióticos. Em uma avaliação comparativa entre os extratos, o EACCZJ apresentou valores mais significativos, em relação a atividade antifúngica (CFM  $\geq$  8192  $\mu$ g/mL) e contra formas promastigotas. Já o EAFZJ, se destacou quando utilizado em combinação com o fluconazol e uma ação antiparasitária sem relevância clínica. Frente a biofilmes microbianos, o EACCZJ apresentou um tratamento mais eficaz do que o EAFZJ, apresentando alguns resultados semelhantes as drogas padrões utilizadas. A análise química identificou no EAFZJ a presença de flavonoides, saponinas, ácido fenólico e composto nitrogenado, e no EACCZJ revelou derivados de saponinas. Do ponto de vista do conhecimento etnofarmacológico, o uso das cascas do caule de Joazeiro para escovação dentária possui fundamentação científica, sendo comprovados os efeitos antimicrobianos e de tratamento de biofilmes bacterianos e fúngicos. Os mesmos efeitos não foram totalmente observados nos extratos das folhas, reforçando a escolha do caule pela população. Por fim, apesar de tais efeitos, mesmo apresentando resultados significativos frente aos ensaios realizados, o extrato da casca não apresentou ação superior às drogas padrões de referência.

**Palavras- chaves:** Etnofarmacologia; joazeiro; Atividade antimicrobiana; Casca do caule; Folha.

## ABSTRACT

**ANDRADE, Jacqueline Cosmo Pinheiro. Dr<sup>a</sup>. University Federal Rural of Pernambuco. September/2019. EVALUATION OF BIOACTIVES AND THE ACTION OF AQUEOUS EXTRACTS OF LEAVES AND STEM BARK OF *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) IN MICROBIAL BIOFILMS. Henrique Douglas Melo Coutinho.**

The use of natural products with a therapeutic focus appears as an alternative against the presence of antimicrobial resistance and the search for new options for the treatment of various microbial infections. Ethnobiological research has become an essential scientific field in identification by active principles, since it is based on popular knowledge and the medicinal use of plants in traditional practices. *Ziziphus joazeiro* is one of the most exploited endemic plants of the Caatinga, being notorious its therapeutic value in several medicinal practices. One of the main popular uses is in oral hygiene and treatment of gingivitis. Plant parts, mainly peels and against bark of the stem are crushed and used in tooth brushing. However, the incorrect management of removing parts of the stem can impede the flow of nutrients, resulting in dehydration of the tissue, besides the attack of pests and microorganisms causing the plant death. In this sense, it is necessary to investigate other parts of *Z. joazeiro*, for minimize the use of the stem. This work aimed to evaluate in vitro the antimicrobial activity, the action against bacterial and fungal biofilms by the aqueous extracts of leaves and stem bark of *Ziziphus joazeiro* Mart, comparing the effects of both extracts, as well as with the action of conventional standard drugs. For this, microbial assays for antibacterial and antifungal activity were carried out by the microdilution method in broth. The minimum inhibitory concentration and the modulatory activity against antibiotics and antifungals, the antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* (epimastigote) and *Leishmania brasiliensis* (promastigote), in addition to cytotoxicity, against mammalian cells were determined. The treatment of microbial biofilms was determined by the OD 600 nm absorbance and the crystal violet assay. All the results were compared to each other and to the effects of standard drugs. The chemical composition of the extracts was performed by ultra-high performance liquid chromatography. The extracts did not demonstrate direct antibacterial activity, with MIC  $\geq$  2048  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . However, they showed significant modulatory activity when combined with antibiotics. In a comparative evaluation between the extracts, the EACCZJ presented more significant values, regarding antifungal activity (CFM  $\geq$  8192  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) and against promastigote forms. On the other hand, the EAFZJ had a highlighted effect when used in combination with fluconazole and an antiparasitic action with no clinical relevance. For microbial biofilms, the EACCZJ presented a more effective treatment than the EAFZJ, presenting some results similar to the standard drugs used. The chemical analysis identified in the EAFZJ the presence of flavonoids, saponins, phenolic acid and nitrogen compound, and in the EACCZJ revealed derivatives of saponins. From the point of view of ethnopharmacological knowledge, the use of the Joazeiro stem bark for dental brushing show scientific basis, proving the antimicrobial effects and treatment of bacterial and fungal biofilms. The same effects were not completely observed in the leaf extracts, reinforcing the stem choice by the population. Finally, in spite of these effects, the presented significant results in relation to the tests performed, the bark extract did not present superior action to the standard reference drugs.

**Keywords:** Ethnopharmacology; Joazeiro; Antimicrobial activity; Stem bark; Leaf.

# **INTRODUÇÃO GERAL**

---

## INTRODUÇÃO GERAL

A busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana está cada vez mais intensificada dentre as atividades farmacológicas, devido principalmente ao agravamento da resistência microbiana, que ocorre em vários grupos de microrganismo como bactérias, fungos e protozoários (GOMES et al., 2012; GOLL, FARIA, 2014; THAKARE et al., 2019). A Organização Mundial da Saúde reconhece a resistência microbiana como uma grave ameaça aos avanços na assistência médica mundial (WHO, 2019).

O uso inadequado e disseminado de medicamentos convencionais é um dos principais fatores que proporcionam desenvolvimento de novos mecanismos de defesa nos microrganismos. A exposição repetida de uma infecção microbiana a um determinado antibiótico, diminui consequentemente a suscetibilidade antimicrobiana (MOYAERT et al., 2019).

Bactérias podem desenvolver, adquirir e transmitir mecanismos de resistência contra várias classes de antibióticos pela recombinação gênica, tornando-se cada vez mais virulenta e apresentando impactos significativos na saúde pública em relação a morbidade e as taxas elevadas de mortalidade (LIMA et al., 2019).

Fungos apresentam alta incidência de infecções invasivas principalmente em indivíduos imunocomprometidos, os agentes antifúngicos clinicamente disponíveis são bastante limitados, devido a toxicidade por hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (WU et al., 2017). A resistência fúngica a drogas antifúngicas varia conforme a classe de antifúngico e as espécies fúngicas (XIE et al., 2014).

As infecções parasitárias, conhecidas como doenças tropicais negligenciadas, sofrem principalmente em relação ao tratamento, devido à escassez de fármacos e investimento em novas drogas. Dentre elas a leishmaniose e a doença de chagas possuem em comum um número pequeno de fármacos que apresentam alto índice de resistência ao parasita, o que leva a necessidade de altas doses e considerável toxicidade (OLIVEIRA et al., 2019; DAFLON-TEIXEIRA et al., 2019).

Uma das principais formas de resistência microbiana consiste na formação de biofilmes, que são desenvolvidos devido a interação entre os microrganismos e o substrato no qual se aderem. São definidos complexos de ecossistemas microbianos, que podem ser encontrados em uma

variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; YAU et al., 2018).

Biofilmes são formados quando micro-organismos planctônicos se ligam a uma superfície e iniciam o desenvolvimento de microcolônias sésseis envolvidas por uma matriz extracelular, formada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que atua como uma barreira neutralizando substâncias nocivas (TRENTIN et al., 2011; YE et al., 2015, BAIG et al., 2018). A estrutura dos Biofilmes contribui com uma maior resistência aos métodos antimicrobianos, pois proporciona uma diversidade de mecanismos de resistência suplementar, como resposta ao estresse oxidativo, estimula a expressão de bomba de efluxo, expressão e transferência diferencial de genes ou proteínas, presença de células persistentes, alteração fisiológica em resposta a escassez, além de realizar *quorum sensing* (JIANG, Li, 2013, YAU et al., 2018).

Neste contexto, a utilização de produtos naturais com foco terapêutico surge como alternativa contra à presença de resistência à antimicrobianos e a busca por novos fármacos para o tratamento das diversas infecções microbianas. As pesquisas etnobiológicas se tornaram uma investigação essencial na identificação por princípios ativos, pois são fundamentadas no conhecimento popular e no uso medicinal de plantas nas práticas tradicionais (ALBUQUERQUE; HAZANAKI, 2006).

A presença de uma rica diversidade em espécies vegetais caracteriza a Caatinga nordestina, considerada um dos principais biomas brasileiros. Aproximadamente a metade do território cearense encontra-se ocupado por vegetação provindas da caatinga, muitas são endêmicas e com escassa investigação das atividades biológicas (MAGALHÃES et al., 2019). A Chapada do Araripe, na região do Cariri Cearense, está localizada dentro do domínio da Caatinga, apresentando uma rica biodiversidade, conhecida e utilizada no âmbito popular, como recurso terapêutico na medicina tradicional (RIBEIRO-SILVA et al., 2012; FERREIRA-SILVA et al., 2016).

*Ziziphus joazeiro* é uma espécie endêmica típica dos sertões nordestinos, com maior ocorrência na caatinga e no Agreste (PRADO, GIBBS, 2003; SOUZA et al., 2015), pertencente à família Rhamnaceae, e ao gênero *Ziziphus* (DANTAS et al., 2014).

Popularmente é conhecida como joazeiro, juá-babão, juá-de-boi, joá-mirim, juazeiro, juá e juá-bravo. Apresenta um amplo potencial econômico e relevância para região do semiárido, podendo ser utilizada como planta ornamental, como fonte de energia, na fabricação de

cosméticos, na alimentação humana e de animais, principalmente nos períodos de seca, e na medicina popular (SILVA et al., 2011).

Dentre as atividades biológicas da espécie *Z. joazeiro* podemos destacar as atividades antibacteriana (ALVINO et al., 2008), antifúngica (CRUZ et al., 2007), antioxidante (ALMEIDA et al., 2011), antipirética (NUNES et al., 1987), anti-inflamatória (BOTAN, 2018), gastroprotetora (WASHIDA, 2007; ROMÃO et al., 2010) e antiparasitária (GOMES et al., 2016).

Uma das principais indicações de *Z. joazeiro* consiste na sua utilização na higiene bucal e tratamento de gengivites. Partes da planta, principalmente, casca e entrecasca do caule são trituradas e usadas na escovação dentária (CAVALCANTI et al., 2011; DANTAS et al., 2014). Entretanto, a prática incorreta da retirada do caule, pode ocasionar o anelamento, processo de retirada total da casca em toda circunferência da planta, o que impossibilita o fluxo de nutrientes e água, resultando na desidratação do tecido, além do ataque de pragas e microrganismos causando a morte da planta (SANTOS, 2009).

Neste sentido, se faz necessário à validação do uso de outra parte de *Z. joazeiro*, na busca de minimizar a utilização do caule. Este trabalho busca verificar a ação das folhas de *Z. joazeiro*, como antimicrobiano, e contra a resistência microbiana, em biofilmes, e comparar com os efeitos das cascas e produtos químicos já utilizados. Além de oferecer alternativas para diminuição do extrativismo da espécie, através da comprovação e descobertas de atividades biológicas.

Considerando as atividades biológicas e o uso terapêutico de *Z. joazeiro* no combate a microrganismos, um estudo etnofarmacológico é estabelecido e diante disso, algumas hipóteses são sugeridas: (1) Os extratos aquosos das folhas e das cascas do caule de *Z. joazeiro* apresentam resultados significativos contra a atividade microbiana, tão quanto antimicrobianos comumente utilizados. (2) O extrato das folhas atua contra a resistência microbiana, na erradicação de biofilmes bacterianos e fúngicos, tão efetivo quanto os extratos das cascas do caule, que já é comumente utilizado pela população como antisséptico bucal.

Para testar as hipóteses levantadas foram realizadas análises químicas dos extratos aquosos de *Z. joazeiro* e testes microbiológicos, como atividades antimicrobianas e erradicação de biofilmes bacterianos e fúngicos, o que resultou em quatro produções científicas, as quais estão listadas no quadro 1.

**Tabela 1.** Produções científicas originadas da tese de doutorado intitulada: Avaliação de Bioatividades e da Ação dos Extratos Aquosos das Folhas e Cascas do Caule de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) em Biofilmes Microbianos, autoria de Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro, do Programa de Pós-graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Título	Periódico	Qualis em Biodiversidade	Fator de Impacto
Artigo 1: UPLC-MS-ESI-QTOF characterization and evaluation of the antibacterial and modulatory antibiotic activity of <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. aqueous extracts (capítulo 2)	South African Journal of Botany	B2	1.340
Artigo 2: Chemical composition, antiparasitary and cytotoxic activity of <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. (capítulo 3)	Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine	B2	1.634
Manuscrito 1: Phytochemical characterization of metabolites from <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. By UPLC-QTOF and evaluation of the antifungal activity. (capítulo 4)	Plos One	A1	3.54
Artigo 3: Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. (Rhamnaceae) (capítulo 5)	Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases	B2	1.920

Os resultados da pesquisa estão apresentados em quatro capítulos, cada capítulo é composto por um artigo e/ou manuscrito, disponibilizados após a revisão de literatura (capítulo 1). O primeiro artigo, encontra-se no segundo capítulo, apresenta a análise dos extratos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-MS-ESI-QTOF), seguido pelos ensaios antibacterianos e atividade Modulatória.

O terceiro capítulo trata dos ensaios antiparasitários dos extratos, avaliando a atividade tripanocida e leishmanicida através de ensaios *in vitro* com as formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e promastigota de *Leishmania brasiliensis*, além de verificar a citotoxicidade dos extratos frente à cultura de células de mamíferos.

Os ensaios antifúngicos frente a cepas do gênero *Candida* estão dispostos no quarto capítulo, foram avaliados os efeitos fungistático ou fungicida exercidos sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, abordando também o efeito potencializador do antifúngico fluconazol pelos extratos, além de acrescentar informações referentes a prospecção química dos extratos.

O quinto capítulo apresenta o potencial da ação dos extratos contra a resistência microbiana, através da erradicação de biofilmes bacterianos e fúngicos, com micro-organismos

presentes na flora microbiana da cavidade bucal, comparando os resultados com drogas padrões, gluconato de clorexidina e fluconazol.

As etapas do desenvolvimento desse trabalho foram pensadas com o propósito de investigar o efeito dos extratos das folhas e confirmar o conhecimento etnofarmacológico da população em relação a utilização das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart.



# **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

## CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 FAMÍLIA Rhamnaceae E O GÊNERO *Ziziphus*

Com aproximadamente 58 gêneros e 900 espécies, a família Rhamnaceae encontra-se distribuídas em regiões temperadas, tropicais e subtropicais, sendo composta por árvores, arbustos, trepadeiras lenhosas e ervas (MOREIRA, 2012; LIMA, GIULIETTI, 2014; KALEEM et al., 2014).

Apresenta vasto potencial econômico, sendo ainda pouco explorada. Suas espécies são utilizadas como plantas ornamentais, na fabricação de cosméticos, alimentação de animais, como madeira, na marcenaria e para produção de carvão. Na medicina popular são empregadas na cura e tratamento de diversas doenças, como disenteria, hipertensão arterial, antipirético e vários tipos de infecção (ZÁCHIA et al., 1999; MENDES, 2010)

A ocorrência da família Rhamnaceae no território brasileiro, é representada por aproximadamente cerca 13 gêneros na flora nativa, os quais são *Alvimiantha*, *Ampelozizyphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus*, *Scutia*, *Ziziphus* (LIMA, 2010).

O gênero *Ziziphus* Mill. compreende cerca de 100 espécies disseminadas principalmente na América tropical, África, Austrália, Mediterrâneo, além de países como Paquistão e Índia (UR-RAHMAN et al., 2007). É representado por 30 espécies, distribuídas nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) do Brasil (REFLORA, 2019).

A maioria das espécies do gênero *Ziziphus* são investigadas devido a sua utilização medicinal, etnofarmacologicamente este gênero tem um importante papel na terapêutica de várias doenças, sendo utilizado como analgésico, antipirético, anti-inflamatório, sedativo, antioxidante, antibacteriano, protetor do trato gastrointestinal, antiespasmódico, antidiabético e antifúngico (KALEEM et al., 2014; SANTOS et al., 2019).

Na composição fitoquímica do gênero *Ziziphus* é destacada a presença de alcalóides, triterpeno glicosídeos, flavonoides, taninos, bem como saponinas (WANG et al., 2013; KANG et al., 2016).

## 1.2 ESPÉCIE *Ziziphus joazeiro* Mart.

Espécie endêmica do bioma caatinga, também conhecida como joazeiro, juá-babão e juá-de-boi, joá-mirim, joazeiro, juazeiro, juá, juá-bravo, enjoá, enjuá, joá, juá-espinho, juá-de-espinho, juá fruta, laranjeira-de-vaqueiro (OLIVEIRA et al., 2009). O juazeiro é uma planta típica do semiárido, amplamente distribuída no nordeste do Brasil, como na Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (REFLORA, 2019).

Árvore perenifólia (Figura 1), devido ao vasto e profundo sistema radicular, exibe raízes pivotantes, que permitem a captação de água dos lenções freáticos, o que favorece sua cor verde durante todo o período de estiagem. Possuem tronco reto ou tortuoso, com presença de galhos e ramos com espinhos, copa globosa e densa, atingem dimensões próximas de 16m de altura, na idade adulta (SILVA et al., 2011; DANTAS et al., 2014).

Figura 1: *Ziziphus joazeiro* Mart. – Localizado Sítio Ipueiras, Brejo Santo – Ceará.



Suas folhas possuem morfologia ovalada, são alternadas e elíptica, medem de 3 cm a 10 cm de comprimento, serradas na base, com nervuras inferiores. Possuem folhagem intensa, sempre conservada verde, mesmo nos períodos mais secos não perdem totalmente suas folhas. Os ramos são levemente flexuosos, com espinhos rígidos, retos normalmente dispostos aos pares

(SOUSA et al., 2015). As pequenas flores possuem coloração amarelo-esverdeada, se dispõem em inflorescências, a floração ocorre nos meses de novembro a dezembro. O Fruto do tipo drupa globosa de coloração amarelada e carnosos, com tamanho aproximadamente de 1,5 a 2,0 cm de diâmetro e 2 g de peso. É comestível, rico em vitamina C, e utilizado na dieta animal e humana (ROCHA et al., 2015; CARVALHO, 2007).

Figura 2: Folhas, Frutos e ramos com espinho de *Ziziphus joazeiro* Mart.



A reprodução ocorre de forma lenta, através das sementes, após decomposição da polpa do fruto, a germinação pode levar até 12 meses para acontecer. Os solos mais adequados são os férteis e densos, no entanto, mesmos em solos impróprios pode ocorrer desenvolvimento, contudo observa-se uma diminuição no tamanho da planta e na quantidade de suas folhas e ramos (COSTA, 2011).

*Z. joazeiro* é uma espécie de grande valor econômico, ecológico e social, considerada uma das espécies-chave para o desenvolvimento regional. Desempenhando um papel funcional no equilíbrio dos ecossistemas, além de ser utilizada na medicina popular, na arborização de ruas e jardins, produz frutos comestíveis, suas folhas são usadas na alimentação de caprinos e ovinos, as flores são utilizadas na meliponicultura, pois são recurso alimentar para abelhas, na produção de lenha e carvão. Na maioria das vezes são explorados de maneira extrativista. (NADIA, 2005; MENDES, 2010).

A cerca de três anos, a espécie foi gravemente ameaçada por uma praga de fitófagos, ocasionando um desequilíbrio na fisiologia da planta e acarretando comprometimento na sobrevivência da espécie, fato preocupante pois além da redução da biodiversidade, ocorreria uma

drástica redução nas escalas de produção econômica dependentes desse recurso biológico (INSA, 2016).

### 1.3 ETNOBIOLOGIA E ETNOFARMACOLOGIA DE *Ziziphus joazeiro* Mart.

A crescente utilização de pesquisas com plantas, se deve à procura e o interesse dos princípios ativos responsáveis pelas suas atividades biológicas. O amplo emprego das plantas na medicina popular, corresponde ao seu potencial farmacológico. De acordo com a tradição popular, podemos ter ciência de qual planta é mais indicada, as partes utilizadas e as formas de preparo.

Como estratégia de acesso ao conhecimento popular, entra em cena os estudos etnobotânicos, que se caracterizam como ferramenta indispensáveis, para a aproximação da pesquisa científica aos saberes tradicionais. Etnobotânica pode ser definida como uma área contextualizada da utilização das plantas pelas populações tradicionais, além de realizar um estudo da interação existente entre o homem e as plantas, como também os costumes de utilização desses recursos (LINS NETO et al., 2010; SOUZA et al., 2015). Segundo Rocha e colaboradores (2015), em uma abordagem mais recente, a etnobotânica procura se comprometer com o mundo contemporâneo, assumindo uma postura mais estratégica com foco integrativo.

A Caatinga é uma das principais áreas alvo dos levantamentos etnobotânicos, devido ser um bioma exclusivamente brasileiro e por se encontrar em um exacerbado processo de degradação, diante disso, se tem a necessidade de documentar a riqueza de espécies bioativas dessa região. Dentre os estudos etnodirigidos realizados em regiões da caatinga é comumente citado a espécie *Ziziphus joazeiro* (PEREIRA JÚNIOR et al., 2014).

*Ziziphus joazeiro* é bastante utilizado nas práticas caseiras da medicina, odontologia e cosmética. Dentre suas características e utilização baseadas no conhecimento tradicional, visando a efetivar-se pesquisas, que comprovem as atividades biológicas, e o melhor aproveitamento dessa espécie são realizados diferentes ensaios como fitotécnicos, químicos, farmacológicos e clínicos mais aprofundados (LORENZI, MATOS, 2002; SANTOS et al., 2019).

Em conformidades com levantamentos etnobotânicos concretizados, toda a planta possui diversos usos medicinais, sendo utilizada como antisséptico bucal, distúrbios nos sistemas respiratórios (tosse, gripe, inflamação na garganta, pneumonia, tuberculose, bronquite e asma) e digestório (estomatite, má digestão, constipação e úlceras gástricas), problemas dermatológicos

(caspas, sarna, dermatite) e na cicatrização (CRUZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2011).

Para fins terapêuticos, as partes mais utilizadas de *Ziziphus joazeiro* são cascas, caule e folhas, possuindo diversas formas de preparo, desde *in nature*, Lamedor, Decocção, Maceração, banhos dentre outras (FREITAS et al., 2015).

Sob a forma de extrato aquoso, principalmente partes do caule. São conhecidas como eficientes anti-inflamatórios, cicatrizantes, adstringentes, antidiabéticas, antimicrobiana, entre outras ações medicinais. Quando agitadas com água, as folhas e as cascas produzem abundante espuma, devido a presença de saponinas em várias partes da planta, substâncias também conhecidas com efeito alelopático em vários estudos. Além disso, raspas do caule quando secas são reduzidas a pó e usadas como dentifrício (MARASCHIN-SILVA, ÁQUILA, 2005, 2006; CARVALHO, 2007; GUSMAN et al., 2008).

Ensaio farmacológicos comprovam a eficácia de *Z. joazeiro* na diminuição da placa dentária, exercendo uma ação antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, devido a escovação dos dentes com uma suspensão aquosa a 1 % da entrecasca pulverizada (MOURA et al., 2013).

Pesquisas realizadas para avaliar a atividade antifúngica, demonstram atividade importante frente a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi* - com valores de CMI inferiores ao do controle (anfotericina B), além de *Candida guilliermondii* e *Trichophyton rubrum* (CRUZ et al., 2007). Este fato, somado ao alto custo dos antibióticos de última geração e ao crescente fenômeno de resistência de drogas, aumenta a procura por novas substâncias com menor custo (ALVIANO et al., 2008).

O extrato aquoso da entrecasca de *Z. joazeiro*, apresentou atividade antibacteriana, contra bactérias cariogênicas da microbiota oral, associadas a doenças peridentais, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Lactobacillus casei*. O mesmo extrato, apresentou potencial antioxidante, partir de ensaios fotométricos. A atividade antimicrobiana de extratos etanólico das cascas foi comprovada para *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (SILVA et al., 2011; MOURA et al., 2013). A atividade antipirética do extrato aquoso das cascas também foi comprovada. (NISAR et al., 2007).

Em ensaios fitoquímicos a composição química da entrecasca de *Ziziphus joazeiro* apresentam a presença de ácido betulínico, ácido oleanólico, saponina esteróide e triterpenos, já

suas folhas são ricas em n-alcanos, triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico) e saponinas (OLIVEIRA, SALATINO, 2000; MELO et al., 2012).

#### 1.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Um fato preocupante ligado a área microbiológica é o crescente número de microrganismos com menor suscetibilidade aos fármacos antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários. A resistência microbiana se caracteriza como um grave problema de saúde, sendo responsável por surtos de infecções, que muitas vezes, são seguidos de morte (REIS et al., 2013; THAKARE et al., 2019).

O fenômeno da resistência a agentes quimioterápicos entre as cepas de bactérias tem início a partir da era microbiana. Tendo como principal fio condutor a larga utilização e eficácia dos antibióticos. O uso exacerbado, ocasionou uma sucessão de eventos adversos, como o desequilíbrio da ecologia humana e uma pressão seletiva crescente no meio, precipitando a evolução de formas de adaptação e resistência pelos microrganismos aos mecanismos de ação dos antimicrobianos (DIAS, MONTEIRO, 2009; QUEIROZ, FERREIRA, 2010).

A resistência microbiana, teve um aumento significativo nas últimas décadas, que refletiram em graves problemas para a terapêutica de infecções, constituindo-se uma ameaça à saúde pública a nível mundial. Um conjunto de fatores são responsáveis pelo surgimento dessa resistência, dentre eles, o uso indiscriminado e de maneira intensa de antimicrobianos em humanos e animais, associado a doses subterapêuticas, inefetividade da droga de referência, esquemas terapêuticos curtos, baixa ação sobre infecção, falta de conhecimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco para opção terapêutica, além da escassez de drogas (SILVEIRA et al., 2006; COUTINHO et al., 2010; DAFLON-TEIXEIRA et al., 2019).

Diante do grave cenário instituído pelas incorretas práticas de antibioterapia, se torna necessário e fundamental a realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos, com o propósito de conduzir de maneira mais correta, segura e eficaz o tratamento (GIOLO; SVIDZINSK, 2010; SILVA et al., 2014).

A proliferação da resistência microbiana, propicia evolução e adaptação de cepas microbianas, resistentes a múltiplas drogas, aumentando a morbidade, os custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por infecções

(TRAVASSOS, MIRANDA, 2010). Assim, se faz necessário, o uso racional de antimicrobianos, pois a administração indevida pode ocasionar danos irreversíveis quando utilizados de forma não apropriada (TERRÍVEL et al., 2013).

A resistência microbiana pode estar relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Os micro-organismos são capazes de desenvolver inúmeros mecanismos de defesa às substâncias nocivas, e transferir geneticamente esses mecanismos de resistência entre as cepas microbianas (OLIVEIRA et al., 2011; AYDIN, INCE, INCE, 2015).

Entre os principais mecanismos de resistência estão, alteração no alvo das drogas, diminuição na permeabilidade celular, retirada da droga da célula, que ocorre através das bombas de efluxo, eliminação ou modificação da droga, através dos mecanismos enzimáticos, além da formação de comunidades de micro-organismos, com diferentes graus de complexidade, que estão associadas a superfícies diversificadas, denominadas de biofilme (COWEN et al., 2015; AIYER, VIJAYAKUMAR, 2019).

## 1.5 BIOFILMES

Definido como um complexo ecossistema microbiano, os biofilmes são formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de várias espécies, sendo denominado de monoespécie e multiespécie, respectivamente (RICKARD et al., 2006; PARAI et al., 2017), podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas (ABEE et al., 2011).

A dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Iniciando com organismos, denominados colonizadores primários, que se ligam a uma superfície, contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. As células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que sintetizam uma matriz, composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários. Estes colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos (GREGOIRE et al., 2011; CONDÒ et al., 2018).

A matriz extracelular desempenha papel fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento dos biofilmes, possuindo como principais funções garantir a coesão da estrutura



do biofilme, com a adesão inicial e intercelular, o que contribui para a comunicação através do *quorum sensing*, atua como barreira protetora, realizando adsorção de vários componentes e retendo água, é fonte de nutrientes principalmente nos períodos de escassez, como também armazenam energia (ALBANO et al., 2018). Além da presença de polissacarídeos, a composição da matriz apresenta proteínas, DNA, moléculas anfífilas e outros componentes que variam conforme a espécie ou espécies presentes no biofilme (AZEVEDO, CERCA, 2012; FOSTER et al., 2014).

Levando em consideração a estrutura do biofilme, é possível observar células aderidas que são designadas de sésseis, enquanto as livres e dispersas na fase aquosa são denominadas de planctônicas. A mudança de células planctônica para sésseis ocorre devido a diversas alterações ambientais, e envolve múltiplas vias reguladoras, as quais traduzem os sinais em alterações da expressão de genes, levando a uma reorganização espacial e temporal das células microbianas (PARSEK; SINGH, 2003; LENZ et al., 2008; MONDS; O'TOOLE, 2009; GRESSLER et al., 2015).

Há uma enorme variedade de locais, onde podem ser encontrados os biofilmes, nos implantes como válvulas cardíacas, próteses, cateteres e alguns tecidos corpóreos, como dentes e gengivas, pulmões, ouvidos, trato urogenital, entre outros (FREITAS et al., 2010). Os biofilmes representam uma vantagem evolutiva para os micro-organismos, uma vez que, colabora com a proliferação de infecções microbianas, aumento da resistência a antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro, ocasionando infecções mais severas e de difícil tratamento (MUZNY, SCHWEBKE, 2015). Micro-organismo em biofilme suportam concentrações mais elevadas de agentes antimicrobianos do que suas formas planctônicas (SHUNMUGAPERUMAL, 2010; CONDÒ et al., 2018)

Os mecanismos de resistência desses ecossistemas, estão relacionados com a sua estrutura e as modificações fisiológicas dos micro-organismos presentes, como a penetração limitada da droga pela matriz extracelular, há relatos que a droga tenham dificuldades em se difundir pela matriz e atingir os microrganismos, como também sua inativação através da ligação com componentes da matriz e eliminação por um número significativo de bombas de efluxo (WUYTS, DIJCK, HOLTAPPELS, 2018).

Outro fator é a presença de células persistentes tolerantes a múltiplos fármacos, são células com variações fenotípicas, constituem uma pequena parte da população de biofilme, são capazes

de sobreviver a elevadas doses de antimicrobianos, podendo assim restaurar o biofilme (BRAUNER et al., 2016). As células presentes nos biofilmes, frente a determinadas mudanças fisiológicas, como choque térmico, mudança de pH e agentes químicos, respondem a esse estresse, sintetizando diversos fatores ou expressando determinados genes de resistência, que de certa forma ocasiona uma proteção do biofilme de forma geral (BENTO, CERCA, 2012).

### 1.5.1 Biofilmes Bacterianos

Dentre as principais espécies bacterianas que formam biofilme podemos citar, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, dentre outras (ANTUNES et al., 2011)

A formação de biofilme confere várias vantagens às bactérias, principalmente no que diz respeito à proteção contra agentes agressivos, biofilmes bacterianos possuem alta tolerância a antimicrobianos e aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis e a colonização de novos nichos (COENYE; NELIS, 2010; LESOUHAITIER et al., 2019).

Os biofilmes bacterianos representam um problema bastante crítico em hospitais, sobretudo nas Unidade de Terapia Intensiva e para pacientes imunodeficientes, devido ao tratamento comprometido pela resistência desenvolvida altas doses de antibióticos e combinações com classes diferentes, são realizadas na busca de reverter o quadro clínico. Para reduzir a infecção ocasionada por biofilme bacteriano, é necessário cerca de doses superiores a concentração inibitória mínima de antibióticos administrados em infecções ocasionadas por espécies planctônicas (SOHAIL, LATIF, 2018).

Como exemplos típicos de doenças relacionadas a biofilmes incluem: endocardites bacterianas, otite média, prostatite crônica bacteriana, fibrose cística, periodontite e cárie (DONLAN; COSTERTON, 2002; SANTOS, WATANABE, ANDRADE, 2011).

### 1.5.2 Biofilmes Fúngicos

Dentre as espécies fúngicas, *Candida* spp. tem merecido destaque na formação de biofilmes, devido principalmente a capacidade de adesão a superfícies, possuindo assim facilidade

em formar biofilmes. O que leva essa espécie ter um alto grau patogenicidade, resistência a antifúngicos e proteção contra o sistema imunológico (SANTANA et al., 2013; SAHAL, BILKAY, 2018; HUANG et al., 2019).

A estrutura do biofilme de *Candida*, consiste também em uma matriz extracelular que possui composição conforme a espécie, além da presença de hifas e pseudo-hifas. A matriz em biofilmes de *Candida albicans*, é composta principalmente por hidratos de carbono, proteínas, fosfato e hexosaminas. Biofilmes de *Candida* levam até 48 horas para atingir sua estruturação mais complexa (HENRIQUE, NEGRI, SILVA, 2012; NAGY et al., 2018).

As infecções ocasionadas por biofilmes de *Candida*, representam uma preocupação no âmbito clínico, devido serem de difícil tratamento, principalmente quando o biofilme é formado por multiespécie. São candidíase vulvovaginal, ocasionada na maioria das vezes pela utilização de cateteres urinários e venosos centrais, candidíase oral relacionadas a prótese dentária e xerostomia e endocardites acarretando obstrução das válvulas cardíacas (ANDES et al., 2012; GUTIERREZ et al., 2018).

# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KOVACS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 22, p. 172-179, 2011.

AIYER, K. S.; & VIJAYAKUMAR, B. S. An improvised microtiter dish biofilm assay for non-invasive biofilm detection on microbial fuel cell anodes and studying biofilm growth conditions. **Brazilian Journal of Microbiology.** p. 1-8, 2019.

ALBANO, M.; CRULHAS, B.P.; ALVES, F.C.B.; PEREIRA, A.F.M.; ANDRADE, B.F.M.T.; BARBOSA, L.N.; FURLANETTO, A.; LYRA, L.P.D.S.; RALL, V.L.M.; JÚNIOR, A.F. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. **Microb Pathog.** v. 126, p. 231-238, 2019.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 16, p. 678–689, 2006.

ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public Market in northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol.** v. 110, p. 76-91, 2007.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments.** v. 62, p. 127-142, 2005.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. G.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology.** v. 53, p. 545-52. 2008.

ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J.W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A.C.; REX, J.H. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: A patient-level quantitative review of randomized trials. **Clin Infect Dis.** v. 54, p. 1110-1122, 2012.

ANTUNES, A.L.S. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 106, p. 51-55, 2011.

AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater. **Water Research.** v. 83, p. 337–344, 2015.

AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria. **Publindústria.** 2012.

BAIG, Z.T.; MENG, L.; SAINGAM, P.; XI, J. Ozonation and Depolymerization of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Extracted from a Biofilter Treating Gaseous Toluene. **Polymers (Basel).** v. 10, p. 2 -11, 2018.

BENTO, J.C.; CERCA, N. O problema da resistência a antibióticos em biofilmes. IN: Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria. **Publindústria.** 2012.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O.; GEFEN, O.; BALABAN, N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat Rev Microbiol.** Nature Publishing Group. v. 14, p.320-330, 2016.

BOTAN, A.G. Citotoxicidade e ação anti-inflamatória *in vitro* dos extratos glicólicos de morus nigra (amora), *Ziziphus joazeiro* (juá) e *Vitis vinifera* (uva). Dissertação. Universidade Estadual Paulista (Unesp). Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal. São José dos Campos – São Paulo, 2018

CARVALHO, P.E.R. Juazeiro *Ziziphus joazeiro*. **Embrapa, Circular Técnico 139**. Colombo, PR, 2007.

CAVALCANTI, M. T.; SILVEIRA, D. C.; FLORÊNCIO, I. M.; FEITOSA, V. A.; ELLER, S. C. W. S. Obtenção da farinha do fruto do juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e Capítulo IV: Teor de caracterização físico-química. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 6, p. 220-224, 2011.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of microbiological methods**. v. 83, p. 89-105, 2010.

CONDÒ, C.; ANACARSO, I.; SABIA, C.; ISEPPI, R.; ANFELLI, I.; FORTI, L.; NIEDERHÄUSERN, S.; BONDI, M.; MESSI, P. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. **Nat Prod Res**. v. 13, p.1-8, 2018.

COWEN, L. E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S. J.; ROGERS, P. D.; PERLIN, D. S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 5, p. 325-331, 2015.

COUTINHO, H.D.M; COSTA J.G.M.; LIMA, Edeltrudes O.; FALCÃO-SILVA V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Increasing of the Aminoglycosyde Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine. **Biological Research for Nursing**. v. 11, p. 332-335, 2010.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR, A. M.; MELO, 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.

DAFLON-TEIXEIRA, N.F.; COUTINHO, C.; GOMES, T.F.; TOMA, H.K.; DUARTE, R.; BÓIA, M.N.; CARVALHO-COSTA, F.A.; ALMEIDA, C.E.; LIMA, M.M. Multiple Approaches to Address Potential Risk Factors of Chagas Disease Transmission in Northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 100, p. 296-302, 2019.

DANTAS, F.C.P.; TAVARES, M.L.R.; TARGINO, M.S.; COSTA, A.P.; DANTAS, F.O. *Ziziphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae: características biogeoquímicas e importância no bioma Caatinga. **Res principal.** v. 25, p. 51-57, 2014;

DIAS, M.; MONTEIRO, M.S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação.** 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review.** v. 15, p. 167-193, 2002.

FOSTER, T.J.; GEOGHEGAN, J.A.; GANESH, V.K.; HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology.** v.12, p.49-62, 2014.

FERREIRA-SILVA, C.; OLIVEIRA, D.B.; OLIVEIRA, H.F., A´VILA, R.W. Spatial and temporal distribution in two anuran communities in the Chapada do Araripe, Northeastern Brasil. **Biota Neotropica.** v. 16, p. 1-10, 2016.

FREITAS, A.V.L.; COELHO, M.F.B.; PEREIRA, Y.B.; FREITAS NETO, E.C.; AZEVEDO, R.A.B. Diversidade e usos de plantas medicinais nos quintais da comunidade de São João da Várzea em Mossoró, RN. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 17, p. 845-856, 2015.

FREITAS, V.R.; VAN, D.S.S.T.; SIMONETTI A.B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Rev. Odontol.** v. 39, p. 193-200, 2010.



GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **J Bras Patol Med Lab.** v. 46, p. 225-234, 2010.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Bacterial resistance as a result of use unsuitable of antibiotics. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research.** v. 5, p. 69-72, 2014.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology.** v. 114 p. 672-679, 2012.

GOMES, D.C.; LIMA, H.G.; VAZ, A.V.; SANTOS, N.S.; SANTOS, F.O.; DIAS, Ê.R.; BOTURA, M.B.; BRANCO, A.; BATATINHA, M.J. In vitro anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. **Vet Parasitol.** v. 226, p.10-16, 2016.

GREGOIRE, S.; XIAO, J.; SILVA, B. B.; GONZALEZ, I.; AGIDI, P. S.; KLEIN, M. I.; KOO, H. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. **Applied and environmental microbiology.** v. 77, p. 6357-6367, 2011.

GRESSLER, L.T.; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; SUTILI, F.J.; SCHWAB, M.; PEREIRA, D.I.B.; SANGIONI, L.A.; BOTTON, S.A. Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. **Pesq. Vet. Bras.** v. 35, p. 835-841, 2015.

GUSMAN, G.S.; BITTENCOURT, A. H.C.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum.** v. 30, p. 119-125, 2008.

GUTIERREZ, J.K.; SANITÁ, P.V.; TEDESCO, A.C.; PAVARINA, A.C.; MIMA, E.G.O. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of mul tispecies biofilm. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 24, p. 212-219, 2018.

HENRIQUE, M.; NEGRI, M.; SILVA, S. O impacto clínico de biofilmes de espécies de *Candida*. IN: Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria. **Publindústria**. 2012.

HUANG, G.; HUANG, Q.; WEI, Y.; WANG, Y.; DU, H. Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*. **Mol Microbiol.** v. 111, p. 6-16, 2019

INSA, Instituto Nacional do Semiárido. **Pesquisadora alerta que Juazeiro da Caatinga está fortemente ameaçado por praga.** 2016. Disponível em: <<http://www.insa.gov.br/noticias/pesquisadora-alerta-que-juazeiro-da-caatinga-esta-fortemente-ameacado-por-praga/#.V0suVvkrLIV>> Acesso: 20 de março de 2019.

JIANG, T.; LI, M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. **Expert Opin Ther Pat.** v. 23, p. 867-94, 2013.

KALEEM, W.A.; MUHAMMAD, N.; KHAN, H.; RAUF, A. Pharmacological and Phytochemical Studies of Genus *Zizyphus*. **Journal of Scientific Research.** v. 21, p. 1243-1263, 2014.

KANG, K. B.; KIM, J. W.; OH, W. K.; KIM, J.; SUNG, S. H. Cytotoxic Ceanothane- and Lupane-Type Triterpenoids from the Roots of *Zizyphus jujuba*. **Journal of Natural Products.** v. 79, p. 2364–2375, 2016.

LENZ, A. P.; WILLIAMSON, K. S.; PITTS, B.; STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 74, p. 4463-4471, 2008.

LESOUHAITIER, O.; CLAMENS, T.; ROSAY, T.; DESRIAC, F.; LOUIS, M.; RODRIGUES, S.; GANNESEN, A.; PLAKUNOV, V.K.; BOUFFARTIGUES, E.; TAHRIOUI, A.; BAZIRE, A.; DUFOUR, A.; CORNELIS, P.; CHEVALIER, S.; FEUILLOLEY, M.G.J.

Host Peptidic Hormones Affecting Bacterial Biofilm Formation and Virulence. **J Innate Immun.** v. 11, p. 227-241, 2019.

LIMA, M.C.; PAIVA DE SOUSA C.; FERNANDEZ-PRADA C.; HAREL J.; DUBREUIL J.D.; DE SOUZA E.L. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. **Microb Pathog.** v. 130, p. 259-270, 2019.

LIMA, R.B. 2015. Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20675>>. Acesso em: 14 May 2019.

LIMA, R.B.; GIULIETTI, A.M. Synonymies and typification of the Rhamnaceae of Brazil. **Acta Botanica Brasilica.** v. 28, p. 376-381, 2014.

LIMA, R.B. Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 2010

LINS NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Traditional knowledge and management of umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Economic Botany.** v. 64, p. 11-21, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, São Paulo, 2002.

MAGALHÃES, K.D.N.; GUARNIZ, W.A.S.; SÁ, K.M.; FREIRE, A.B.; MONTEIRO, M.P.; NOJOSA, R.T.; BIESKI, I.G.C.; CUSTÓDIO, J.B.; BALOGUN, S.O.; BANDEIRA, M.A.M. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980-1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **J Ethnopharmacol.** v. 16, p. 314-353, 2019

MARASCHIN-SILVA, F.; ÁQUILA, M.E.A. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. **Iheringia.** v. 60, p. 91-98, 2005.

MENDES, F.O. **Avaliação das ações moluscicida e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Zizyphus joazeiro* Mart. Expostos a altas taxas de doses de radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ .** Dissertação - Mestrado em Ciências. Universidade Federal de Pernambuco. 98p. 2010.

MELO, M.S.F.; ROCHA C.Q.; SANTOS, M.H.; CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólico do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde.** v. 10, p. 43-51, 2012.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.** v. 17, p. 73-87, 2009.

MOREIRA, T.F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae).** Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 96p. 2012.

MOURA, F.M.L.; BAPTISTA, R.I.A.A.; SANTOS, MOURA, V.V.M.; A.P.B.L., COSTA, M.M. Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. **Acta Veterinaria Brasílica.** v. 7, p. 125-136, 2013.

MOYAERT, H.; DE JONG, A.; SIMJEE, S.; ROSE, M.; YOUALA, M.; EL GARCH, F.; VILA, T.; KLEIN, U.; RZEWUSKA, M.; MORRISSEY, I. Survey of antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from dogs and cats with respiratory tract infections in Europe: ComPath results. **J Appl Microbiol.** p. 1-33, 2019.

MUZNY, C.A.; SCHWEBKE, J.R. Biofilms: An underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. **Clin Infect Dis.** v. 61, p. 601-606, 2015.

NADIA, T.C.L. **Sistemas de polinização de duas espécies frutíferas endêmicas da cantiga: *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) e *Spondias tubeosa* Arruda (Anacardiaceae).**

Dissertação. Mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Pernambuco. Recife – PE. 88p. 2005.

NAGY, F.; ZOLTA, T.; BOZO, A.; CZEGLÉ, A.; REBENKU, I.; MAJOROS, L.; KOVA, R. Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Medical Mycology**. v. 0, p.1-9, 2018.

NISAR, M.; ADZU, B.; INAMULLAH, K.; BASHIR, A.; IHSAN, A.; GILANI, A. H. Antinociceptive and antipyretic activities of the *Zizyphus oxyphylla* Edgew. Leaves. **Phytotherapy Research**. v. 21, p. 693-695, 2007.

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). **Braz J Med Biol Res**. v. 20, p. 599-601. 1987.

OLIVEIRA, F.B.M.; LIMA, L.M.; MOURA, M.E.B.; NUNES, B.M.V.T.; OLIVEIRA, B.M. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**. v.4, p.72-77, 2011.

OLIVEIRA, D.M.C.; QUINTÃO, S.J.J.; SOARES, P.A.O.; MAGALHÃES, R.S.; HORTA, A.P.A.; PAES, L.R.B.; ROSANDISKI, L.M.; PIMENTEL, M.I.F.; FÁTIMA, A.L.; CAMARGO, F.E.V.É.; SAHEKI, M.N.; ALMEIDA, M.M.C.; VALETE-ROSALINO, C.M.; OLIVEIRA, S.A. Comparison between systemic and intralesional meglumine antimoniate therapy in a primary health care unit. *Acta Trop*. v. 193, p. 176-182, 2019.

OLIVEIRA, A.F.; SALATINO, A. Major constituents of the foliar apicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. **J Biosciences**. 55(9): 688-692, 2000.

PARSEK, M. R., SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol*. v. 57, p. 677-701, 2003.

PARAI, D.; ISLAM, E.; MITRA, J.; MUKHERJEE, S.K. Effect of Bacoside A on growth and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Can J Microbiol.** v. 63, p. 169-178, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, L.R.; ANDRADE, A.P.; ARAÚJO, K.D.; BARBOSA, A.S.; BARBOSA, F.M. Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. **Floresta e Ambiente.** p. 1-12, 2014.

PRADO, D.E.; GIBBS, P.E. Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. **Annals of Missouri Botanical Garden.** v. 80, p. 902-927, 2003.

QUEIROZ, A.M.P.; FERREIRA, C.E.F. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de primeira escolha prescritos no tratamento de pneumonias em clínica e UTI pediátrica do Município de campos dos goytacazes , RJ. **Infarma.** v. 22, 2010.

RIBEIRO-SILVA, S.; MEDEIROS, M.B.; GOMES, B. M.; SEIXAS, E. N. C.; SILVA, M. A. P. Angiosperms from the Araripe National Forest, Ceará, Brazil. **Check List Journal of species lists and distribution.** v. 8, p. 744–751, 2012.

REIS, H.P.L.C.; VIEIRA, J.B.; MAGALHÃES, D.P.; SARTORI, D.P.; FONSECA, D.B.; VIANA, J.M.; CUNHA, F.A. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza – Ceará. **Rev. Bras. Farm.** v. 94, p. 83-87, 2013.

RICKARD, A. H.; PALMER, R. J. Jr.; BLEHERT, D. S.; CAMPAGNA, S. R.; SEMMELHACK, M. F.; EGLAND, P. G.; BASSLER B. L.; KOLENBRANDER P. E. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Mol. Microbiol.** v. 60, p. 1446-1456, 2006.

ROCHA, J.A.; BOSCOLO, O.H.; FERNANDES, L.R.R.M.V. Etnobotânica: um instrumento para valorização e identificação de potenciais de proteção do conhecimento tradicional. **Interações**. v. 16, p. 67-74, 2015.

ROMÃO, M.O.C.; COSTA, A.M.D.D.; TERRA, F.S.; BORIOLLO, M.F.G.; SOARES, E.A. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá. **Rev Bras Clin Med**. v. 8, p. 187-192, 2010;

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.S.; NAVES, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**. v.12, p.229-233, 2013.

SAHAL, G.; BILKAY, I.S. Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. And antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 51, p. 644-650, 2018.

SANTOS, A. P. A.; WATANABE, E.; ANDRADE, D. Biofilme em Marca-passo Artificial: Ficção ou Realidade? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 97, p. 113-120, 2011.

SANTOS, C.H.C.; DE CARVALHO, M.G.; FRANKE, K.; WESSJOHANN, L. Dammarane-type triterpenoids from the stem of *Ziziphus glaziovii* Warm. (Rhamnaceae). **Phytochemistry**. v. 162, p. 250–259, 2019.

SANTOS, M. O. **Efeito do anelamento do caule sobre as relações fonte – dreno em plantas de *Inga vera* Willd.** Dissertação – Mestardo em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal da Larvas. Larvas, Minas gerais. 59f. 2009.

SHUNMUGAPERUMAL, T. Biofilm eradication and prevention. A pharmaceutical approach to medical device infections. 1st ed. Hoboken (NJ): **John Wiley & Sons**, 2010.

SILVA, L.R.; BARRETO, N.D.S.; BATISTA, P.F.; ARAÚJO F.A.R.; MORAIS, P.L.D. Caracterização de frutos de cinco acessos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.13, p.15-20, 2011.

SILVA, A.R.H., et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **J Ethnopharmacol**. v. 153, p. 908-916, 2014.

SILVEIRA, G.P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência microbiana. **Química Nova**. v. 29, p. 844-855, 2006.

SOHAIL, M.; LATIF, Z. Molecular analysis, biofilm formation, and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing community- and health care-associated infections in central venous catheters. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 51, p. 603-609, 2018.

SOUSA, R.F.; SILVA, R.A.R.; ROCHA, T.G.F.; SANTANA, J.A.S.; VEIRA, F.A. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira carnaúba no semiárido brasileiro. **CERNE**. v. 21, p. 587-594, 2015.

THAKARE, R.; SHUKLA, M.; KAUL, G.; DASGUPTA, A.; CHOPRA, S. Repurposing disulfiram for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Int J Antimicrob Agents**. p.1-23, 2019.

TRAVASSOS, MIRANDA, I.O.; K.C.V. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Infarma**. v. 22, p. 15-26, 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. v. 14, p. 113-238, 2013.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.; BAUMVOL, I.J.; MACEDO, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-



arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol.** v. 137, p. 327-335, 2011.

UR-RAHMAN, K.; INAYAT, M. A.; ARFAN, M.; AKHTAR, G.; KHAN, L.; AHMAD, V. U. A new 14-membered cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus oxyphylla*. **Natural Product Research.** v. 21, p. 243–253, 2007.

WANG, Y.; DING, B.; LUO, D.; CHEN, L.Y.; HOU, Y.L.; DAI, Y.; YAO, X.S. New triterpene glycosides from *Ziziphi Spinosae Semen*. **Fitoterapia.** v. 90, p.185-191, 2013.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2019. Antimicrobial Resistance - About the WHO Antimicrobial Resistance Secretariat. Disponivel:< <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>>. Acesso em: 05 de março de 2019.

WU, S.; WANG, Y.; LIU, N.; DONG, G.; SHENG, C. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. **J Med Chem.** v. 60, p. 2193-2211, 2017.

WUYTS, J.; DIJCK, P.V.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLOS Pathogens.** v. 18, p. 1-14, 2018.

XIE, J. L.; POLVI, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiol.** v.9, p. 523-542, 2014.

YAU, K.P.S.; MURPHY, A.B.; ZHONG, L.; MAI-PROCHNOW, A. Cold plasma effect on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* – Role for bacterioferritin. **PLoS ONE.** v. 13, p. 1 -12, 2018.

YE, Y.; YANG, Q.; FANG, F.; LI, Y. The camelliagenin from defatted seeds of *Camellia oleifera* as antibiotic substitute to treat chicken against infection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **BMC Vet Res.** v. 11, p. 4-10, 2015.

ZÁCHIA, N.R.B.; MORAES, D. *Pesquisas botânicas.* 49, 121, 1999.

# **CAPÍTULO 2**

---

**CAPÍTULO 2: UPLC-MS-ESI-QTOF CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *Ziziphus joazeiro* Mart. AQUEOUS EXTRACTS (ARTIGO 1)**

Jacqueline C. Andrade<sup>1,2</sup>, Ana R. P. Silva<sup>1</sup>, Antônia T. L. Santos<sup>1</sup>, Maria A. Freitas<sup>1</sup>, Joara N. P. Carneiro<sup>1</sup>, Maria I. P. Gonçalo<sup>2</sup>, Aleudo de Souza<sup>2</sup>, Thiago S. Freitas<sup>1</sup>, Paulo R. V. Ribeiro<sup>3</sup>, Edy S. Brito<sup>3</sup>, Maria F. B. Morais-Braga<sup>1</sup>, Henrique D. M. Coutinho<sup>1\*</sup>

Artigo publicado no periódico: South African Journal of Botany (Anexo1)

Link para acesso: <https://www.journals.elsevier.com/south-african-journal-of-botany>

Qualis em Biodiversidade: B2

Fator de Impacto: 1.340



**UPLC-MS-ESI-QTOF CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE  
ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *Ziziphus  
joazeiro* Mart. AQUEOUS EXTRACTS**

Jacqueline C. Andrade<sup>1,2</sup>, Ana R. P. Silva<sup>1</sup>, Antônia T. L. Santos<sup>1</sup>, Maria A. Freitas<sup>1</sup>, Joara N. P. Carneiro<sup>1</sup>, Maria I. P. Gonçalo<sup>2</sup>, Aleudo de Souza<sup>2</sup>, Thiago S. Freitas<sup>1</sup>, Paulo R. V. Ribeiro<sup>3</sup>, Edy S. Brito<sup>3</sup>, Maria F. B. Morais-Braga<sup>1</sup>, Henrique D. M. Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato (CE), Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Bioensaios – LABIO, Universidade Federal do Cariri - UFCA, Instituto de Formação de Educadores, *Campus* Brejo Santo (CE), Brasil;

<sup>3</sup>Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais- LMQPN, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), Brasil.

\*Corresponding author:

**Henrique Douglas Melo Coutinho**

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88) 31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

**ABSTRACT**

Plant extracts are defined as complex heterogeneous mixtures composed of diverse active ingredient categories which characterize their bioactivities. *Ziziphus joazeiro* Mart., belonging to the Rhamnaceae family, is an endemic caatinga species with a wide economic potential and application in medicine. In the search for new antibacterial drugs, due to the manifestation and development of bacterial antibiotic resistance mechanisms, medicinal plants, with their broad pharmacological aspects, have led to the development of several phytomedicines. With this in mind, the objective of the present study was to identify the chemical composition of the *Ziziphus*

*joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts through the UPLC-qTOF-MS/MS method, as well as to verify their antibacterial and modulatory action. Cold extract maceration was used to prepare the *Z. joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts (AEL and AEB). The broth microdilution method was used for the antibacterial and modulatory activity evaluations. This study is the first to report on the *Ziziphus joazeiro* extract analyzes by ultra-performance liquid chromatography. The UPLC-MS-ESI-QTOF analysis revealed compounds already present in the *Ziziphus* genus. The extracts did not present antibacterial activity, however, they presented significant modulatory activity when combined with antibiotics. The results highlight the need for further detailed compound identification analysis and toxicity evaluation of these extracts.

**Key-words:** Liquid chromatography; Bacterial resistance; Flavonoids; Synergism.

## 1. INTRODUCTION

Plant extracts are defined as complex heterogeneous mixtures composed of diverse active ingredient categories, in addition to having different functional groups, which often characterize their bioactivities, such as secondary metabolites which represent many of the plant biological activities and adaptive processes (Barreto Junior, 2005). Research on this subject and the identification of new molecules present in extracts are important and of great economic and pharmacological interest since many extracts have therapeutic potential (Yunes and Cechinel Filho, 2014).

*Ziziphus joazeiro* Mart., belonging to the Rhamnaceae family, is an endemic caatinga species and popularly known as “joazeiro”, “juá-babão”, “juá-de-boi”, “juazeiro” and “juá” (Prado, Gibbs, 2003; Carvalho, 2007; Sousa et al., 2015). *Ziziphus joazeiro* possesses a wide economic potential and relevance for the northeastern back lands, being used as ornamental plants, as an energy source, in cosmetics manufacturing as well as in human and animal feeding, especially during dry periods, in addition to its application in popular medicine (Silva et al., 2011). Within its many biological activities, the antipyretic (Nunes et al., 1987), analgesic (Schühly et al., 1999), antioxidant, antibacterial (Alvino et al., 2008), antifungal (Cruz et al, 2007), antiparasitic (Gomes et al., 2016) and gastroprotective activities (Washida, 2007; Romão et al., 2010) stand out.

Moreover, the species is frequently used in oral hygiene and for gingivitis treatment (Almeida et al., 2006).

Infections caused by pathogenic bacteria cause apprehension due to their high mortality, especially due to their sensitivity to treatment with commercially available antimicrobial drugs (Patey et al., 2018). Antibacterial therapy has been threatened by the manifestation and development of antibiotic resistance mechanisms. In general, bacteria have the genetic potential to acquire and transfer resistance to therapeutic drugs and therefore, jeopardize the antibiotic's ability to treat the most common infections among the population (Kraupner et al., 2018).

Several factors contribute to the emergence of resistant strains with the main one being the indiscriminate use of antimicrobial drugs. Therefore, it is extremely necessary to devise measures seeking to control the abusive use of antibiotics, as well as new research which understands and specialises on genetic resistance mechanisms, in addition to investigating synthetic or natural substances which display potential for new antimicrobial drug developments or which act as antibiotic action modifiers (World Health Organization, 2014).

In addition to antibacterial activity, the association between drugs and natural products are carried out in search of observing the potentiation of their actions. For this interaction to be positive, several factors must be taken into account, from pharmacokinetics and employed doses to pharmacodynamics (Szalek et al., 2006; Silva and Fernando Júnior, 2010).

In the search for new drugs, medicinal plants are, due to their wide pharmacological aspects, choices which lead to the development of several phytomedicines. With this in mind, the objective of the present study was to identify the chemical composition of the *Ziziphus joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts using UPLC-MS-ESI-QTOF, as well as to verify the antibacterial action of the extracts in isolation and in combination with conventional antibiotics to evaluate their potential antibiotic modifying action.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Collection area and plant material*

The leaves and stem bark were collected from eight *Ziziphus joazeiro* Mart. specimens located in the Sítio Ipueiras, in the rural area of the Brejo Santo municipality, south of Ceará, Brazil, at the foot of the Chapada do Araripe (geographical coordinates, south latitude and west

longitude of Greenwich: 1- 442m, 07°28'54.4"S/39°01'47.2"W; 2- 431m, 07°28'53.3"S/39°01'46.1"W; 3- 436m, 07°28'50.5"S/39°01'57.6"W; 4- 440m, 07°28'42.8"S/39°02'10.2"W; 5- 447m, 07°28'48.5"S/39°02'12.0"W; 6- 441m, 07°28'51.4"S/39°02'16.0"W; 7- 439m, 07°28'54.6"S/39°02'07.6"W; 8- 436m, 07°28'58.6"S/39°01'48.8"W). The exsiccate produced can be found deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima of the Regional University of Cariri - URCA under n° 13.346 and identified as *Ziziphus joazeiro* Mart. The collection took place in the month of February 2017, from 7:30 to 9:00 in the morning. The plant material was sent to the laboratory, cleaned and weighed.

## 2.2. Extract preparation

The *Z. joazeiro* aqueous extracts from the leaves and stem bark (AEL and AEB) were prepared by cold extraction maceration (Matos, 2002). Fresh leaves were cut to increase their surface area, while the stem barks were dried at room temperature and ground in a mechanical mill. Subsequently, both were added to distilled sterile water and maintained in a container protected from light and air. After 72 hours the extracts were filtered, frozen and taken to a lyophilizer (-60°C) producing a crude extract of 39.9g and 111.58g, respectively.

## 2.3. Compound identification through Ultra-efficient liquid chromatography coupled to quadrupole/time of flight system (UPLC-qTOF-MS/MS)

The samples were filtered through Syringe filters (PTFE, 0.2 µm pore and 13 mm diameter, Millipore Millex) and 5 µL of each sample were injected into the UPLC system (Waters Co., Milford, MA, USA). The instrumental UPLC analysis was performed in an ACQUITY UPLC BEH column (150 × 2.1 mm, 1.7 µm; Waters Co.) on a Waters Acquity UPLC system. The column temperature was set to 40 °C. The binary gradient elution system consisted of 0.1 % formic acid in water (A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (B), with a linear gradient from 2 to 95 % B (0-15 min) and a flow rate of 0.4 mL.min<sup>-1</sup>.

Profiling was performed by coupling the Waters ACQUITY UPLC system to the Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK) with electrospray ionization interface (ESI) in the negative ionization mode. The desolvation gas used was nitrogen and set to 350 °C with a flow rate of 500 L/h. The capillary and cone voltages were adjusted to 2.6



kV and 0.5 V, respectively. Mass accuracy and reproducibility were maintained by infusing lock mass (leucine-enkephalin, 0.2 ng/uL; [M-H]<sup>-</sup> ion at m/z 556.2771). MS data were collected for m/z values in the range of 110-1180 Da with a scan time of 0.1 over an analysis time of 19 min. The accurate mass and molecular formula assignments were obtained with the MassLynx 4.1 software (Waters MS Technologies).

#### 2.4 Bacterial strains

Three of the bacterial strains used in this study were obtained from the Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - INCQS: *Streptococcus mutans* INCQS 00446 (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* INCQS 00018 (ATCC 14506), *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 (ATCC 12228) and the other three were obtained from the Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) of Universidade Regional do Cariri (URCA) collection: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922. Bacteria were cultured on solid Heart Infusion Agar slants and maintained at 37 °C for 24 h. The inocula were derived from this solid medium using test tubes containing sterile saline solution which were standardized according to the McFarland 0.5 scale corresponding to 10<sup>6</sup> CFU (Colony Forming Units)(NCCLS, 2003).

#### 2.5. Extract and drug solution preparations

20mg of each extract were weighed and diluted in 1mL of dimethyl sulfoxide (DMSO-Merck, Darmstadt, Germany), followed by distilled, sterile water addition to obtain the 2.048 µL/mL concentration used in the tests and to reduce DMSO concentration.

The antibiotics gentamicin, norfloxacin and ampicillin (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) were used at a concentration of 1024 µL/mL in the assays.

#### 2.6. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method, in 96-well plates, as described by CLSI (2008), where in each well, 100 µL of a solution containing 1350 µL of 10% BHI and 150 µL of the inoculum is added. Then, 100 µL of each extract solution is added, followed by successive 1:1 dilutions, with extract concentrations ranging from 1024 µg/mL to 0.5 µg/mL. The plates were kept in incubation chambers at 35 °C for a period

of 24 hours. The test was performed in triplicate. After incubation, 20  $\mu\text{l}$  of resazurin sodium indicator solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was added, where after one hour at room temperature, reading of the resazurin color change was performed. A change from blue to pink indicates bacterial growth and the unchanged blue color indicates growth inhibition, confirming the lowest substance concentration that inhibits bacterial growth.

### 2.7. Modulatory Activity

Evaluation of the extracts as antibiotic resistance modulators was performed according to Coutinho et al. (2008). The MICs of the antibiotics were determined in the presence and absence of the extracts at subinhibitory concentrations (MIC/8), added to 150  $\mu\text{l}$  of the bacterial suspension and to 10% BHI medium, these solutions are distributed (100  $\mu\text{L}$ ) into microdilution well cavities, followed by 100  $\mu\text{L}$  addition of each antibiotic solution and successive dilutions in the 1:1 ratio up until the penultimate cavity, where lastly the plates are incubated for 24h at 35 °C. Antibiotic concentrations range from 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . All tests were performed in triplicates.

### 2.8 Statistical analysis

The test results were expressed as the geometric mean. A Two-Way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test was applied using the GraphPad Prism 5.0 software. Only results with  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. RESULTS AND DISCUSSIONS

This study is the first to perform the characterization of the *Ziziphus joazeiro* Mart. aqueous extract components using UPLC-ESI-QTOF-MS in the negative ionic mode.

Figure 1, shows the AEL high performance mass spectrometry (UPLC-MS) chromatogram. Compound identification based on their molecular ion mass, retention time, fragmentation pattern and available literature data resulted in fourteen compounds, shown in table 01, according to their elution order, molecular formula, error and main fragments ( $\text{MS}^2$ ). Phenolic derivatives such as kaempferol, quercetin, isorhamnetin and myricetin were the main compounds identified.

According to the deprotonated molecule, kaempferol, quercetin, isorhamnetin and myricetin show a  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ion at  $m/z$  285, 301, 315, 317, respectively. In addition, fragmentation

patterns in MS<sup>2</sup> saw the relative loss of feruloyl, sinapoyl, rutinoside and sophoroside resulting in the absence of 176, 206, 308, 324 da, respectively (Ferrerres et al., 2005).

Compound **1** showed a deprotonated molecule [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 285.0608 with product ion at *m/z* 153 [(M-H)-132]<sup>-</sup>, relative to the loss of a pentose unity, resulting in dihydroxybenzoic acid and was identified as dihydroxybenzoic acid pentoside (Russo et al., 2013; Choi et al., 2015).

Compounds **2**, **6** and **7** exhibited a [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 289, 609 and 463, respectively, and were identified as catechin, rutin and quercetin-3-*O*-glucoside by authentic standard comparison. Compound **8** showed the same deprotonated ion and MS/MS spectrum as compound **7** at *m/z* 463 and 301 being identified as quercetin-*O*-hexoside. Compound **3** showed a deprotonated molecule [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 595 and fragmentation patterns in accordance with previously identified *Ziziphus jujube* (tab 01), being identified as 5-allyl-1-(2,3,4,-tris-*O*-benzoylpentofuranosyl)-2,4(1 H,3 H)-pyrimidinedione. Compounds **4** and **5** showed a [M-H]<sup>-</sup> ion at *m/z* 625 and 479 with the same product ion at *m/z* 317, the myricetin ion, in accordance with the loss of rutinoside and hexoside, thus being identified as Myricetin-*O*-rutinoside and Myricetin-*O*-hexoside, respectively (Barbosa et al., 2006; Memona et al., 2013).

Similarly, compounds **9** and **10** showed a deprotonated ion [M-H]<sup>-</sup> at *m/z* 625 and *m/z* 479 with the same fragment ion at *m/z* 315 relative to the loss of rutinoside and hexoside, respectively. Therefore, these compounds were identified as Isorhamnetin-*O*-rutinoside and Isorhamnetin-*O*-hexoside (Pelotto, Pero Martinez, 1993; Chen et al., 2015).

Compounds **12** and **13** showed a deprotonated molecule at *m/z* 815 and 785, with fragmentation evidencing loss of sinapoyl/sophoroside and feruloyl/sophoroside respectively. These compounds were analogous to those previously identified in *Tronchuda Cabbage* (Ferrerres et al., 2005). Thus, compounds **12** and **13** were identified as kaempferol-*O*-(sinapoyl)sophoroside and kaempferol-3-*O*-(feruloyl)sophoroside, respectively.

Compounds **14**, **19**, **21** and **22** from the AEL, as well as compounds **1**, **3**, **4** and **7** from the AEB, shown in Figure 2 and Table 1, were tentatively identified as saponin derivatives, based on the review by Pu et al., (2017). For a more complete identification, isolation and structural characterization using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is necessary.

Saponins, tannins, polyphenols and flavonoids are chemically reported in extracts from *Ziziphus joazeiro* Mart. leaves (Brito et al., 2015) whilst betulinic acid, oleanolic acid and saponins are reported in stem bark extracts (Barbosa Filho et al., 1985; Gomes et al., 2016).

Chemical characterization studies with the *Ziziphus* genus, evidenced a total of thirty-five compounds including nitrogen, flavonoid, saponin and fatty acid compounds in the *Ziziphus jujuba* cv. Junzao dried fruit ethanolic fraction composition, as identified by LC-MS/QTOF in negative ionic mode (Pu et al., 2017). An LC-MS analysis of the *Ziziphus mauritiana* fruits *in nature* found 11 flavonoids, with myricetin-O-glycoside among them, also identified using an UPLC-QTOF AEL analysis.

The antibacterial activity evaluation of both extracts (AEL and AEB) against the used strains revealed a MIC  $\geq 2048\mu\text{g/mL}$ , a value above what is considered relevant (Houghton et al., 2007). Thus, the *Ziziphus joazeiro* aqueous extracts did not present clinically significant antibacterial activity. However, flavonoids, especially myricetin and quercetin present in the AEL, have been reported in other studies as active compounds against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (Xu and Lee, 2001). Studies with the *Ziziphus joazeiro* Mart aqueous bark extract, which is rich in saponins, show a remarkable action against *Staphylococcus epidermidis* (Alviano et al., 2008).

The extracts evaluated have in their composition the presence of saponins and flavonol derivatives which have prominent antimicrobial activity (Fang et al., 2015; Simões et al., 2017). However, inactivity may be attributed to the quantity of these compounds in the extract, since while the UPLC-QTOF analysis is qualitative, it does not quantify compounds present in the extract. Moreover, in the study by Brito et al. (2015), the *Ziziphus joazeiro* leaf hydroethanolic extract did not present relevant antibacterial activity, with a MIC  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ .

In the antibiotic activity modifying assays using extracts associated with antibiotics, a synergism with gentamicin, norfloxacin and ampicillin against *Staphylococcus aureus* (Figure 03) can be observed when in combination with the AEL extract, resulting in a significant MIC reduction when compared to the control. Inhibition values of 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$  and 6.34  $\mu\text{g/mL}$  for the aforementioned combinations, respectively, were observed with the ampicillin combination standing out with nearly 100% bacterial growth inhibition. The AEB interaction with antibiotics was mostly indifferent, characterizing a significant antagonism when combined with ampicillin, increasing its MIC up to 48  $\mu\text{g/mL}$ .

The action of ampicillin is potentiated against *Staphylococcus epidermidis* (Figure 3) when combined with both extracts, with inhibition occurring at 128 µg/mL and 256 µg/mL when combined with AEL and AEB extracts, while the control showed a MIC of 322.5 µg/mL. Moreover, a decrease in the effect of gentamicin and norfloxacin when combined with AEB was observed, increasing the MIC in relation to the controls by 34.8 µg/mL and 58.3 µg/mL, respectively.

Figure 4 shows the combination of the extract with antibiotics against *Enterococcus faecalis*, demonstrating gentamicin potentiation when combined with AEL, decreasing the MIC by 12.8 µg/mL in relation to the control. Additionally, antagonism is evidenced with norfloxacin, when combined with either AEL or AEB, with a MIC of 6.34 µg/mL and 32 µg/mL, while the control obtained a MIC of 2.5 µg/mL.

The action of gentamicin, with a MIC of 812.7 µg/mL, and norfloxacin, with a MIC of 256 µg/mL was intensified by the extracts against *Streptococcus mutans* (Figure 5), with the AEL combination presenting a MIC of 10.1 µg/mL for gentamicin and 32 µg/mL for norfloxacin, and the AEB presenting MIC values of 20.2 µg/mL and 64 µg/mL, respectively. For ampicillin, synergism was observed when in combination with AEL, obtaining a MIC of 0.8 µg/mL, and antagonism with AEB, obtaining a MIC of 101.6 µg/mL, when compared to the MIC of the control (40 µg/mL).

Figure 06 shows the modulatory activity of gram negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, where synergism is demonstrated with gentamicin (MIC = 64 mg/mL) and norfloxacin (MIC = 256 ug/mL) when associated with both extracts. A MIC of 40.3 µg/mL for gentamicin and of 101.5 µg/mL for norfloxacin, respectively, were observed when combined with AEL. For AEB the MICs obtained were of 20.2 µg/mL and 128 µg/mL, respectively. Gentamicin had its action potentiated by AEL against *Escherichia coli* strains obtaining a MIC of 12.7 µg/mL and of 32 µg/mL when in combination with AEB, compared to the MIC of the control (64 µg/mL). The AEB interaction with norfloxacin dramatically reduced the antibiotic effect, increasing the MIC by 30.5 µg/mL, when compared to the MIC of the control (1.5 µg/mL).

The extracts did not modify the ampicillin effect against Gram-negative bacteria. This may be due to the complexity of the cell wall structure found in these bacteria, as well as their ability to synthesize β-lactamase enzymes, considered one of the most efficient resistance mechanisms against β-lactam antibiotics, where β-lactamase hydrolyzes the beta-lactam ring causing rupture

of the amide bond, thus reversing the antibiotic's ability to inhibit bacterial cell wall synthesis (Silva et al., 2018).

Brito et al. (2015), presents results from the combination of the *Ziziphus joazeiro* leaf hydroethanolic extract with the antibiotics gentamicin and amikacin, obtaining MICs ranging from 78 to 9.7 µg/mL for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*.

When comparing the modulatory effect of the EAFZJ and EACCZJ, the leaf extract presented a synergistic and statistically relevant potential when combined with antibiotics against gram positive and gram negative bacteria. Among the antibiotics used, gentamicin was the most potentiated, while ampicillin stands out as the antibiotic with the lowest modulation number, especially against gram negative bacteria.

Gentamicin belongs to the aminoglycosides class, altering or inhibiting protein synthesis (Leggett, 2015). Norfloxacin, from the fluoroquinolones class, is capable of inhibiting DNA gyrase, an enzyme essential for bacterial DNA replication (LI et al., 2007). In addition, ampicillin is part of the beta-lactams class and exerts its action at the end of the peptidoglycan biosynthesis, by inhibiting bacterial cell wall synthesis (Suarez and Gudiol, 2009). Thus, for these antibiotics to exert an effect it is necessary that they first cross the cell wall and cell membrane.

The antibiotic potentiation by the extracts may be associated with their chemical composition, which contribute to the destabilization of the cellular membrane structure, consequently altering its permeability, thus facilitating antibiotic penetration into the bacterium (Trombetta et al., 2005).

From the compounds found in the extract, flavonoids and saponins alter permeability, in addition to being able to disrupt or rupture the cell membrane of microorganisms. Saponins found in both the EAFZJ and EACCZJ have detergent and emulsifying action through the formation of complexes with steroids, proteins and phospholipids present in cell membranes, causing openings in the cell membrane (Fang et al., 2015, Simões et al., 2017).

When analyzing the negative antibiotic action modification, that is, antagonism by the extracts, it is worth noting the AEB contributed to a decrease in antibiotic action, especially for norfloxacin and ampicillin. This negative action may be attributed to the presence of compounds with antioxidant potential, which are especially present in the bark (Barbosa Filho et al., 1985; Gomes et al., 2016).

Some antibiotics induce a common oxidative pathway which damages bacterial cells by producing reactive oxygen species (Kalghatgi et al., 2013). The antagonism may thus be explained by the capture of these radicals by antioxidant compounds, intercepting active oxygen and forming stable radicals, such that the action of the antibiotic is reduced (Mello; Santos, 2017).

## 5. CONCLUSION

In view of the results, it is concluded that both *Ziziphus joazeiro* aqueous extracts did not demonstrate direct antibacterial activity. However, they present significant modulatory activity when combined with antibiotics. Moreover it is important to emphasize that the AEL showed a greater synergistic effect when compared to the AEB, which in turn stood out with an antagonistic effect. This study is the first to report the analysis of *Ziziphus joazeiro* extracts by ultra-performance liquid chromatography (UPLC-QTOF), showing compounds already present in the *Ziziphus* genus, in addition to presenting the need for more detailed analyzes through isolation and structural characterization using spectrometry and spectroscopy.

## REFERENCES

- Almeida, C.F.C.B.R., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., Maia, M.B., 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingó regiona semi-arid location in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 15: 1–7. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-2-15>
- Alviano, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antonioli, A.R., Alviano, C., Farias, L.M., Carvalho, M.A.R., Souza, M.G., Bolognese, A.M., 2008. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*. 53: 545-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>.
- Barbosa Filho, J.M., Trigueirou J.A., Cheriyan, O.; Bhattacharyya J., 1985. Constituents of the stem-bark of zizyphus joazeiro. *Journal of Natural Products*. 48: 152- 153. <https://doi.org/10.1021/np50037a039>.

Barbosa, W.L.R., Peres, A., Gallori, S., Vincieri, F.F., 2006. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16: 333-337. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300009>.

Barreto, J., Amaro, G., Biscaia J., Evaristo C., 2005. Cromatografia De Troca-Iônica Aplicada Ao Isolamento Da Fração Ácida Do Óleo De Copaíba (*Copaifera multijuga*) E Da Sacaca (*Croton cajucara*). *Quim. Nova*. 28: 719-722. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400028>.

Brito, S.M.O., Coutinho, H.D.M., Talvani, A., Coronel, C., Barbosa, A.G.R., Veja, C., Figueredo, F.G., Tintino, S.R., Lima, L.F., Boligon A.A., Athayde M.L., Menezes, I.R.A., 2015. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. *Food Chemistry* 186: 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.031>

Carvalho, P.E.R., 2007. Juazeiro *Ziziphus joazeiro*. Embrapa, Circular Técnico 139. Colombo, PR.

Chen, Y., Yu, H., Wu, H., Pan, Y., Wang, K., Jin, Y., Zhang, C., 2015. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. *Molecules* 20: 18352-18366. <https://doi.org/10.3390/molecules201018352>.

Choi, J., An, X., Lee, B. H., Lee, J.S., Heo, H.J., Kim, T., Ahn, J.W., Kim, D., 2015. Protective Effects of Bioactive Phenolics from Jujube (*Ziziphus jujuba*) Seeds against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress in Neuronal PC-12 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 2219-2227. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0296-4>.

CLSI, 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, eighth ed.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54: 328-330. <https://doi.org/10.1159/000151267>.



Cruz, M.C.S., Santos, P.O., Barbosa Jr, A.M., Melo, D.L.F.M., Alviano, C.S., Antonioli, A.R.; Alviano, D.S., Trindade, R.C., 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*. 111: 409-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.005>.

Fang, Y., Cai, L., Li, Y., Wang, J., Xiao, H., Ding, Z., 2015. Spirostanol steroids from the roots of *Allium tuberosum*. *Steroids* 100: 1 – 4. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.015>.

Ferrerres, F., Valentão, P., Llorach, R., Pinheiro, C., Cardoso, L., Pereira, J.A., Sousa, C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2005. Phenolic Compounds in External Leaves of Tronchuda Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC). *J. Agric. Food Chem.* 53: 2901-2907. <http://dx.doi.org/10.1021/jf040441s>.

Gomes, D.C., Lima, H.G., Vaza, A.V., Santosa, N.S., Santos, F.O., Dias, Ê.R., Boturac, M.B., Branco, A., Batatinha, M.J.M. 2016. In vitro anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. *Veterinary Parasitology* 15: 10-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.004>

Houghton, P.J., Howes, M.J., Lee, C.C., Steventon, G., 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal Ethnopharmacology*. 110: 391- 400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032>

Kalghatgi, S., Spina, C.S., Costello, J.C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J.R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O.S., Collins, J.J., 2013. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci Transl Med* f5, 1-11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006055>.

Kraupner, N., Ebmeyer, S., Bengtsson-Palme, J., Fick, J., Kristiansson, E., Flach, C.F., Larsson, D.G.J., 2018. Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in

complex aquatic bacterial biofilms. *Environ Int.* 25: 255-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.029>.

Leggett, J.E. Aminoglycosides. 2015. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / [edited by] John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. – Eighth edition. Philadelphia: Elsevier: 211-221.

Li, X.H., ZHU, Z.L., Cheng, X.L., Yang, X.D. 2007. Quantitative structure-pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for fluoroquinolones. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 41: 82-87. <http://dx.doi.org/0091-150X/07/4102-0082>.

Matos, F.J.A. 2002. *Farmácias vivas*. 4 ed. Fortaleza: Editora UFC. P. 36-40.

Mello, J. C.P.; Santos, S. C. Taninos. In: Simões, C.M.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2017. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 517-543.

Memona, A.A., Memon, N., Bhangar, M.I., Luthria, D.L, 2013. Assay of phenolic compounds from four species of ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits: Comparison of three base hydrolysis procedure for quantification of total phenolic acids. *Food Chemistry* 139: 496–502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.065>.

Nunes, P.H.M., Marinho, L.C., Nunes, M.L.R.L., Soares, E.O. 1987. Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res.* 1987; 20(5): 599-01. PMID: 3330679.

NCCLS, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, (2003) USA.

Patey, O., McCallin, S., Mazure, H., Liddle, M., Smithyman, A., Dublanchet, A. 2018. Clinical Indications and Compassionate Use of Phage Therapy: Personal Experience and Literature Review with a Focus on Osteoarticular Infections. *Viruses*. 18: 2 – 21. <https://doi.org/10.3390/v11010018>.

Pelotto, P., Pero Martinez, M.A., 1993. Flavonoid variation with the plant age in *Ziziphus mistol* leaves. *Biochemical systematics and ecology*. 1414- 1420.

Prado, D.E., Gibbs, P.E., 2003. Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 80: 902-927. <http://dx.doi.org/10.2307/2399937>.

Pu, Y., Ding, T., Zhang, N., Jiang, P., Liu, D., 2017. Identification of bitter compounds from dried fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Junzao. *International Journal of Food Properties*. 01-34. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1288133>.

Romão, M.O.D.C., Costa, A.M.D.D., Terra, F.D.S., Boriollo, M.F.G., Soares, E.A., 2010. Assessment of gastric protective of rasp juá extract. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, 8, 222–227.

Russo, D., Kenny, O., Smyth, T.J., Milella, L., Hossain, M.B., Rai, M.D.K., Brunton, N.P., 2013. Profiling of Phytochemicals in Tissues from *Sclerocaryabirrea* by HPLC-MS and Their Link with Antioxidant Activity. *Hindawi Publishing Corporation ISRN Chromatography*, 1 -11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/283462>

Schühly, W., Heilmann, J., Calis, I., Sticher, O., 1999. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med*. 65: 740-743. <http://dx.doi.org/10.1055/s-1999-14054>

Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16: 402-413. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>.

Silva, O.N., Franco, O.L., Porto, W.F. 2028.  $\beta$ -Lactamase inhibitor peptides as the new strategies to overcome bacterial resistance. *Drugs Today (Barc)*. 54: 737-746. <http://dx.doi.org/10.1358/dot.2018.54.12.2895652>.

Silva, T. C. L.; Almeida, C. C. B. R.; Veras Filho, J.; Peixoto Sobrinho, T. J. S.; Amorim, E. L. C.; Costa, E. P., Araújo, J. M., 2011. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 32: 193-199. ISSN 1808-4532.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.(Orgs). 2017. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. 1104.

Sousa, F.C., Martins, J.J.A., Rocha, A.P.T., Gomes, J.P., Pessoa, T. Martins, J.N., 2015. Predição de modelos sobre a cinética de secagem de folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart *Rev. Bras. Pl. Med.* 17: 195-200. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_071](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_071).

Suarez, C., Gudiol, F. 2009. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 27: 116-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>.

Szalek, E, Grzeskowiak, E, Kozielczyk, J., 2006. Interactions between herbal and synthetic drugs. Advantages and risks. *Herba Polonica*. 52: 153-157. <https://doi.org/10.20883/jms.2017.143>.

Trombetta, D., Castelli, F. Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mozzanti, G., Bisignanso, G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.

Xu, H.X., Lee, S.F., 2001. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. *Phytotherapy Research*. 15: 39 – 43. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200102\)15](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200102)15).

Washida, B., Abderrahman, B., Nabil, C., 2007. Antiulcerogenic activity of Zizyphus lotus (L.) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 228-231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.02.024>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. 2014. Disponível em: <  
<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> > Acesso em: mar. 2018

Yunes, R.A., Filho Cechinel, V., 2014. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.; A.; FILHO CECHINEL, V. (Org.) *Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia*. UNIVALI. 4: 11-34.

## Figures

Figure 1: High Definition Mass Spectrometry (UPLC-MS) chromatogram of the Aqueous Extract of Leaves (AEL) in the negative ionic mode.

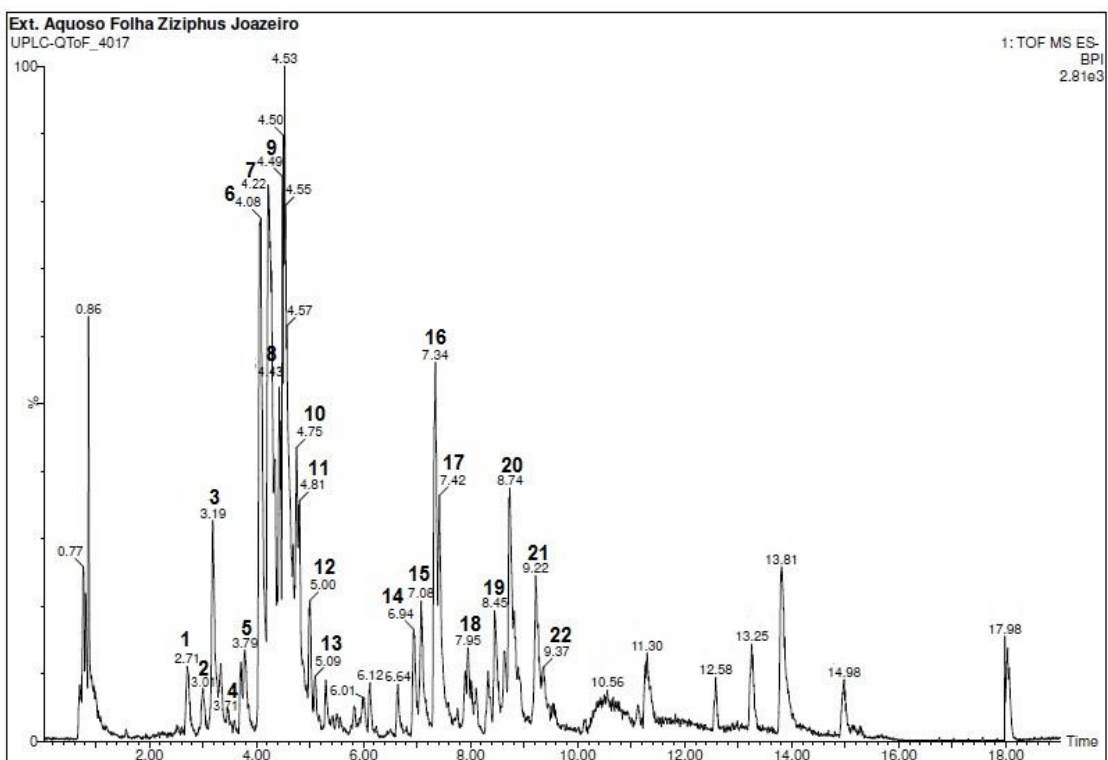


Figure 2: High Definition Mass Spectrometry (UPLC-MS) chromatogram of the Aqueous Extract of Bark (AEB) in the negative ionic mode.

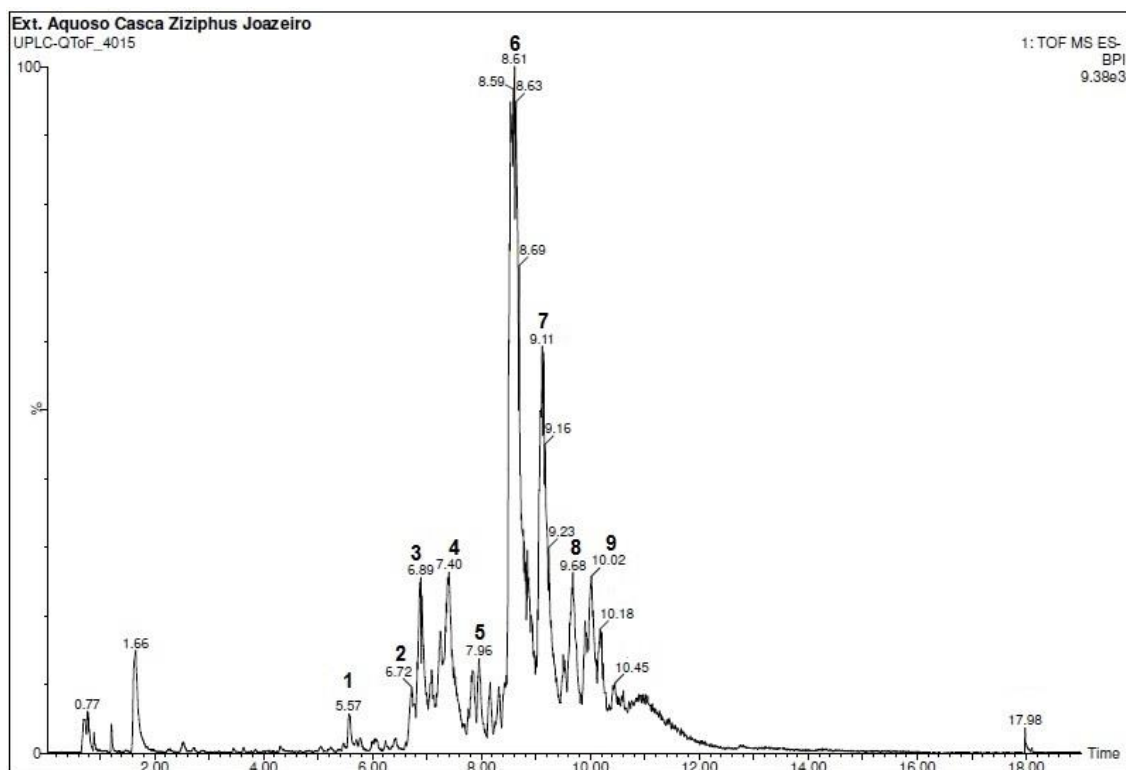
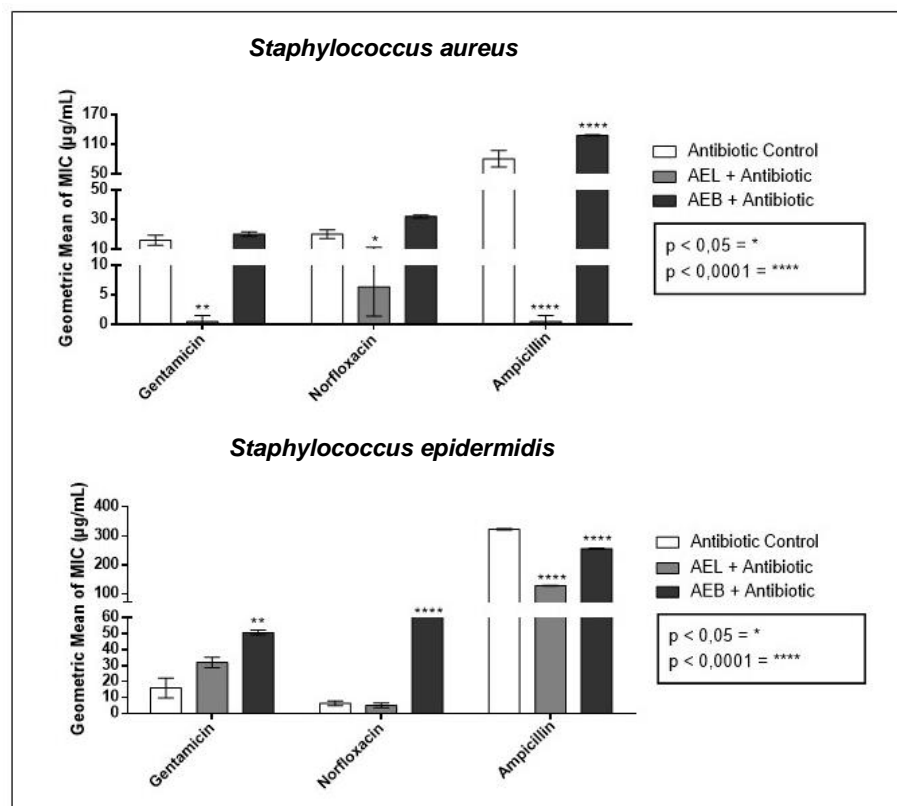
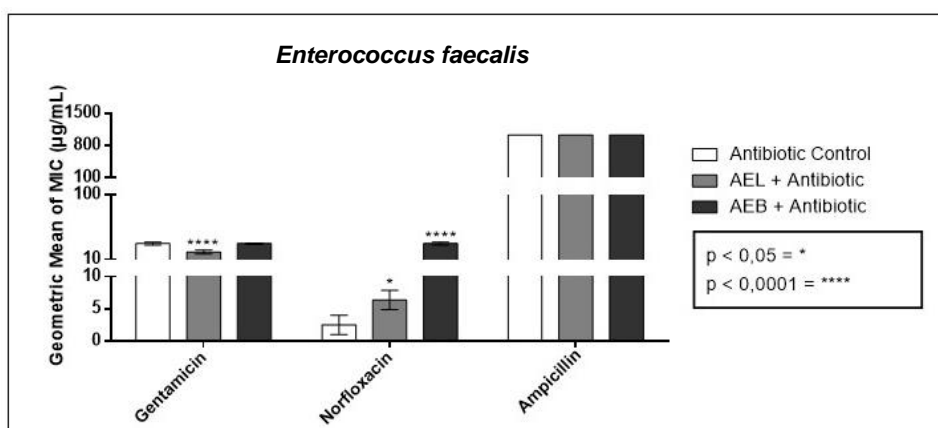


Figure 3. Aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* associated with antibiotics against strains of *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. (AEL - Aqueous Extract of Leaves; AEB - Aqueous Extract of Bark).



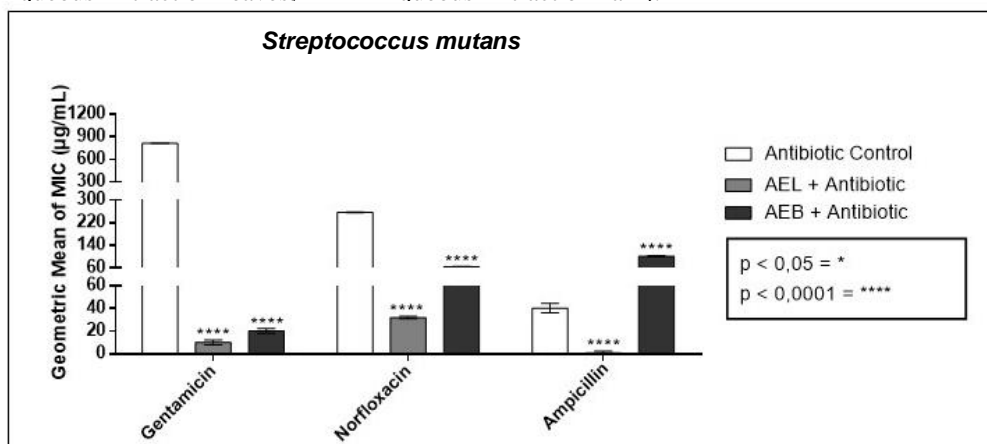
\* statistically significant value at  $p < 0.05$ ; \*\*\*\* statistically significant value with  $p < 0.0001$

Figure 4. Aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* associated with antibiotics against strains of *Enterococcus faecalis* (AEL - Aqueous Extract of Leaves; AEB - Aqueous Extract of Bark).



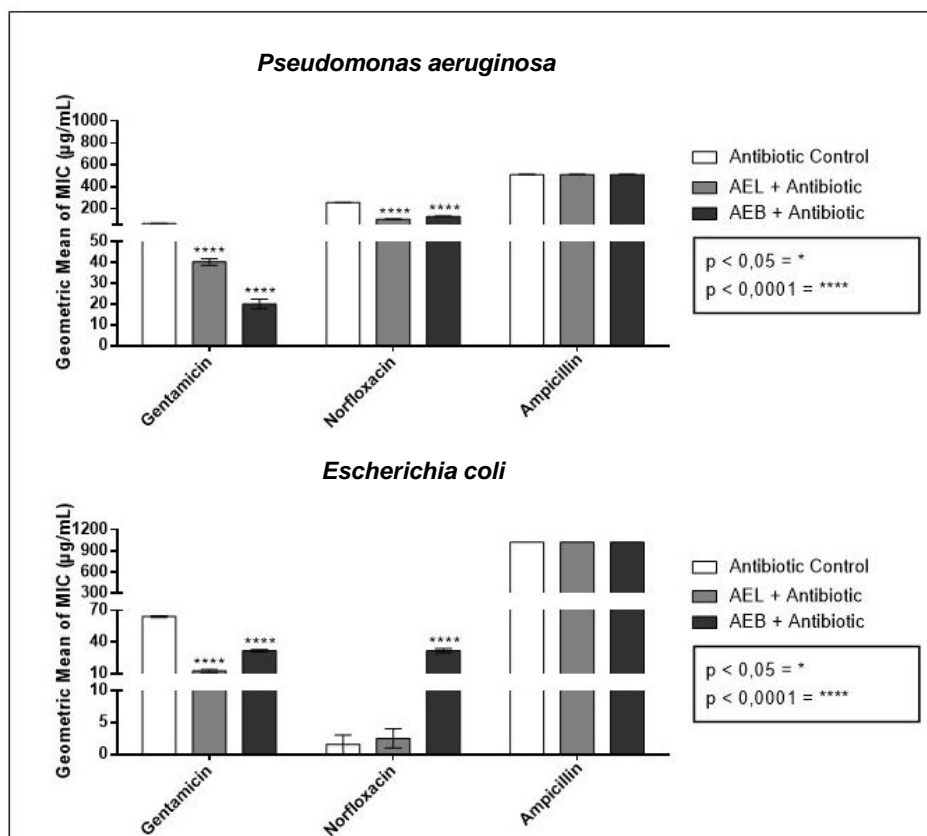
\* statistically significant value at  $p < 0.05$ ; \*\*\*\* statistically significant value with  $p < 0.0001$

Figure 5. Aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* associated with antibiotics against strains of *Streptococcus mutans* (AEL - Aqueous Extract of Leaves; AEB - Aqueous Extract of Bark).



\* statistically significant value at p < 0.05; \*\*\*\* statistically significant value with p < 0.0001

Figura 6. Aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* associated with antibiotics against strains of *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (AEL - Aqueous Extract of Leaves; AEB - Aqueous Extract of Bark).



\* statistically significant value at p < 0.05; \*\*\*\* statistically significant value with p < 0.0001



## Tables

**Table 1:** UPLC-ESI-QTOF-MS<sup>E</sup> identification of compounds from aqueous leaves extract of *Ziziphus joazeiro* M.

Peak no.	Rt min	[M-H] <sup>-</sup> Observed	[M-H] <sup>-</sup> Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	2.71	285.0608	285.0610	153.0122, 152.0070, 108.0177	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	0.7	Dihydroxybenzoic acid pentoside	[23,24]
2	3.01	289.0709	289.0712	-	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	1.0	Catechin	Std
3	3.19	595.1713	595.1717	475.1239, 385.0903, 355.0844	C <sub>33</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	0.7	5-allyl-1-(2,3,4,-tris-O-benzoylpentofuranosyl)-2,4(1H,3 H)-pyrimidinedione	[29]
4	3.71	625.1401	625.1405	317.0168, 316.0158	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub>	0.6	Miricetin- <i>O</i> -rutinoside	[25]
5	3.79	479.0823	479.0826	317.0247, 316.0145	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	0.6	Miricetin- <i>O</i> -hexoside	[26]
6	4.08	609.1448	609.1456	301.0280, 300.0291	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	1.3	Rutin	Std
7	4.22	463.0866	463.0877	301.0312, 300.0226	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	2.4	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	Std
8	4.43	463.0866	463.0877	301.0316, 300.0218	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	2.6	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	Std
9	4.49	623.1617	623.1612	315.0445, 314.0366, 300.0192, 271.0243	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	0.8	Isorhamnetin- <i>O</i> -rutinoside	[27, 28]
10	4.75	477.0988	477.0974	315.0482, 314.0372, 299.0231, 285.0406, 271.0137	C <sub>29</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	2.9	Isorhamnetin- <i>O</i> -hexoside	[27, 28]
11	4.81	439.1044	439.1029	437.0979, 329.1394,	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	3.4	N.i	-
12	5.00	815.2075	815.2035	609.1489, 429.1145, 285.0415	C <sub>38</sub> H <sub>39</sub> O <sub>20</sub>	4.9	kaempferol- <i>O</i> -(sinapoyl)sophoroside	[22]
13	5.09	785.1030	785.1029	609.1467, 285.0416	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> O <sub>19</sub>	0.1	kaempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl)sophoroside	[22]
14	6.94	1013.5316	1013.5321	851.4647, 701.2863	C <sub>51</sub> H <sub>81</sub> O <sub>20</sub>	0.5	Diosgenin tetraglycoside	[29]
15	7.08	851.4494	851.4488	469.0810, 240.9931	C <sub>37</sub> H <sub>71</sub> O <sub>21</sub>	0.7	N.i	-

<b>16</b>	7.34	837.4362	837.4366	663.3777, 339.1071	$C_{54}H_{61}O_8$	0.5	N.i	-
<b>17</b>	7.42	751.3934	751.3940	705.3948, 663.3815	$C_{47}H_{65}O_{13}$	2.3	N.i	-
<b>18</b>	7.95	897.5009	897.5000	877.3986, 878.5026, 751.4100	$C_{50}H_{73}O_{14}$	1.0	N.i	-
<b>19</b>	8.45	1021.4822	1021.4832	1007.4745, 941.5298, 881.4555	$C_{73}H_{65}O_5$	1.0	Saponin derivative	[29]
<b>20</b>	8.74	977.4584	977.4593	965.4107, 865.3158, 785.3562	$C_{46}H_{73}O_{22}$	0.9	N.i	-
<b>21</b>	9.22	1021.4794	1021.4797	977.4593, 311.1655,	$C_{55}H_{73}O_{18}$	0.3	Saponin derivative	[29]
<b>22</b>	9.37	1035.5089	1035.5071	1021.4946, 977.4622, 311.1689	$C_{42}H_{83}O_{28}$	1.7	Saponin derivative	[29]

---

\*N.i - No identified; Std - corresponde a Standa

**Table 2:** UPLC-ESI-QTOF-MS<sup>E</sup> identification of compounds from aqueous bark extract of *Ziziphus joazeiro* M.

Peak no.	Rt min	[M-H] <sup>-</sup> Observed	[M-H] <sup>-</sup> Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	5.57	1077.5557	1077.5482	1075.4966, 977.4888, 945.5064,	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub>	7.0	Saponin derivative	[29]
2	6.72	1153.5768	1153.5771	1091.5408, 975.5472, 537.1963	C <sub>47</sub> H <sub>93</sub> O <sub>31</sub>	6.1	N.i	-
3	6.89	1077.5557	1077.5482	991.5376, 946.5178, 945.5141	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub>	6.0	Saponin derivative	[29]
4	7.40	1091.5724	1091.5732	1005.5424, 959.5316	C <sub>64</sub> H <sub>83</sub> O <sub>15</sub>	0.7	Saponin derivative	[29]
5	7.96	897.4842	897.4848	543.1935	C <sub>39</sub> H <sub>77</sub> O <sub>22</sub>	6.1	N.i.	-
6	8.61	977.4518	977.4535	528.3604	C <sub>46</sub> H <sub>73</sub> O <sub>22</sub>	7.7	N.i.	-
7	9.11	1077.5570	1077.5575	976.3211, 945.5136	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub>	0.5	Saponin derivative	[29]
8	9.68	991.4636	991.4636	977.4589	C <sub>43</sub> H <sub>75</sub> O <sub>25</sub>	3.9	N.i.	-
9	10.02	991.4583	991.4574	977.4442, 845.4070, 550.1986	C <sub>43</sub> H <sub>75</sub> O <sub>25</sub>	1.4	N.i.	-

\* N.i - No identified

# **CAPÍTULO 3**

---

**CAPÍTULO 3: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIPARASITARY AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Ziziphus joazeiro* Mart. (ARTIGO 2)**

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>1,2</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>1</sup>, Antônia Thassya Lucas dos Santos<sup>1</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>1</sup>, Yedda Maria Lobo Soares de Matos<sup>1</sup>, Maria Flaviana Bezerra Morais Braga<sup>1</sup>, Camila Fonseca Bezerra<sup>1</sup>, Maria Isabeli Pereira Gonçalo<sup>2</sup>, Maria Celeste Vega Gomez<sup>3</sup>, Míriam Rolóm<sup>3</sup>, Cathia Coronel<sup>3</sup>, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>4</sup>, Edy Sousa de Brito<sup>4</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1</sup>✉

Artigo publicado no periódico: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (Anexo2)

Link para acesso: <http://www.apjtb.org/>

Qualis em Biodiversidade: B2

Fator de Impacto: 1.634



## Chemical composition, antiparasitary and cytotoxic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart.

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>1,2</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>1</sup>, Antônia Thassya Lucas dos Santos<sup>1</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>1</sup>, Yedda Maria Lobo Soares de Matos<sup>1</sup>, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga<sup>1</sup>, Camila Fonseca Bezerra<sup>1</sup>, Maria Isabeli Pereira Gonçalo<sup>2</sup>, Maria Celeste Vega Gomez<sup>3</sup>, Míriam Rolóm<sup>3</sup>, Cathia Coronel<sup>3</sup>, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>4</sup>, Edy Sousa de Brito<sup>4</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Biological Chemistry Department, Regional University of Cariri - URCA, Crato (CE), Brazil

<sup>2</sup>Bioassays Laboratory - LABIO, Federal University of Cariri - UFCA, Brejo Santo University campus (CE), Brazil

<sup>3</sup>Center for the Development of Scientific Research, Moisés Bertoni Foundation/Díaz Gill Laboratories, Asunción, Paraguay

<sup>4</sup>Natural Products Chemistry Multiuser Laboratory LMQPN, Embrapa Tropical Agroindustry, Fortaleza (CE), Brazil

✉Corresponding author: Henrique Douglas Melo Coutinho, Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Biological Chemistry Department, Regional University of Cariri - URCA, Crato-CE, Brazil.

Tel: +55(88) 31021212

Fax: +55(88) 31021291

E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

### Abstract

**Objective:** To compare the *in vitro* antiparasitic activity of aqueous extracts from *Ziziphus joazeiro* leaves and stem bark against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania brasiliensis*, and *Leishmania infantum*, as well as to evaluate its cytotoxicity in mammalian cells, in addition to identifying the

chemical composition of the extracts. **Methods:** The *Ziziphus joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts were prepared by cold extraction maceration and subjected to ultra-efficient liquid chromatography coupled to a quadrupole/time of flight system. The susceptibility assays used *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strains and promastigote forms of *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania infantum* for antiparasitic activity of the extracts. Moreover, in the cytotoxic analysis mammalian fibroblasts NCTC clone 929 were used. **Results:** Chemically, the classes of terpenoid compounds, flavonoids and phenolic acid were identified in extracts. The stem bark aqueous extracts presented more significant results in terms of antiparasitic activity compared with the leaf aqueous extracts, especially against *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania infantum* promastigote forms with an  $IC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ . The cytotoxic evaluation showed moderate toxicity for the stem bark aqueous extracts, which is relevant information for the rational use of this plant part since it is widely used by the population. **Conclusions:** These preliminary results may contribute to the formulation of new therapeutic agents against this group of neglected diseases, so complementary investigations are fundamental to verify the mechanisms of action mainly of the aqueous extract of the bark of the stem of *Ziziphus joazeiro*.

Keywords: Antiepipromastigote Antipromastigote; UPLC-MS-ESI-QTOF

## 1. Introduction

Infectious diseases termed as neglected diseases are caused by parasitic or infectious agents which mainly affect populations living in conditions of poverty and social inequality. The World Health Organization (WHO) emphasizes that housing, food, poor sanitation and lack of health care are the main causes of these diseases[1,2]. Leishmaniasis, malaria, dengue, Chagas disease, leprosy and tuberculosis can be highlighted as examples of neglected diseases[3].

Chagas disease is a parasitic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and transmitted through vectors. Chagas disease is a systemic and chronic disease considered to be an endemic tropical disease in 21 countries in Latin America where its main transmission mechanism occurs through triatomine vectors. Secondary transmission mechanisms such as transfusion (through blood transfusion or infected organ transplantation), congenital (mother-child transmission, if the woman has the disease) and oral (through ingestion of foods infected with insect feces) transmission exist. During the *T. cruzi* biological cycle three

evolutionary forms (trypomastigote, epimastigote and amastigote) can be observed[4,5]. According to the WHO, there are approximately 8 million people infected, with 56 thousand new cases per year and 12 thousand annual deaths[6].

Leishmaniasis is characterized as a group of diseases caused by protozoa from more than 20 *Leishmania* species where the parasites have two life cycle stages: promastigote and amastigote. Transmission of these parasites is achieved through a phlebotomine vector[7,8]. There are three main types of leishmaniasis: cutaneous, which causes ulcers on exposed body parts (face, arms and legs); visceral, one of the most severe forms, is characterized by fever, weight loss, spleen and liver enlargement, followed by anemia; and mucocutaneous, where the lesions cause destruction of the nose, mouth, throat and surrounding mucous tissue membranes[9,10]. The WHO noted that in 2014 more than 90% of new cases occurred in six countries: Brazil, Ethiopia, India, Somalia, South Sudan and Sudan[11].

Neglected diseases suffer from a therapeutic disadvantage as they do not attract the interest of pharmaceutical industries[12]. Chagas' disease treatment is achieved by only two drugs, nifurtimox and benznidazole. For leishmaniasis, pentavalent antimonials, amphotericin B and pentamidine are used. In general, these drugs have a high parasite resistance index, often requiring high administration doses, which generate considerable toxicity[13,14]. Thus, the importance of finding new compounds which act as chemotherapeutic agents for the treatment of these diseases is evident.

Moreover, natural products derived from various plant parts can be used as agents for the treatment of infections, mainly due to the bioactive potential of secondary metabolites present in their composition[15]. *Ziziphus joazeiro* (*Z. joazeiro*) Mart. (Rhamnaceae) is a tree species widely used in ethnomedicine with several proven biological activities such as antifungal, antibacterial, antioxidant, antipyretic, anti-inflammatory and astringent activity[16,17].

The objective of this work was to evaluate the *in vitro* antiparasitic activity of the *Z. joazeiro* aqueous extracts derived from its leaves and stem bark against *T. cruzi*, *Leishmania brasiliensis* (*L. brasiliensis*), and *Leishmania infantum* (*L. infantum*), as well as its cytotoxic potential in mammalian cells, in addition to identifying the chemical composition of the extracts through UPLC-MS-ESI-QTOF.

## 2. Materials and methods



### 2.1. Collection area and plant material

The leaves and stem bark were collected from eight *Z. joazeiro* Mart. specimens located in the Sítio Ipueiras, in the rural area of the Brejo Santo municipality, south of Ceará, Brazil, at the foot of the Chapada do Araripe (geographical coordinates, south latitude and west longitude of Greenwich: 1: 442 m, 07°28'54.4"S/39°01'47.2"W; 2: 431 m, 07°28'53.3"S/39°01'46.1"W; 3: 436 m, 07°28'50.5"S/39°01'57.6"W; 4: 440 m, 07°28'42.8"S/39°02'10.2"W; 5: 447 m, 07°28'48.5"S/39°02'12.0"W; 6: 441 m, 07°28'51.4"S/39°02'16.0"W; 7: 439 m, 07°28'54.6"S/39°02'07.6"W; 8: 436 m, 07°28'58.6"S/39°01'48.8"W). The voucher material was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima of the Regional University of Cariri - URCA under n° 13.346 and identified as *Z. joazeiro* Mart. The collection took place in the month of February 2017, from 7:30 to 9:00 in the morning. The plant material was sent to the laboratory, cleaned and weighed.

### 2.2. Extract preparation

The *Z. joazeiro* aqueous extracts from the leaves and stem bark (AEL and AEB) were prepared by cold extraction maceration[18]. Fresh leaves were cut to increase their surface area, while the stem barks were dried at room temperature and ground in a mechanical mill. Subsequently, both were added in distilled sterile water and maintained in a container protected from light and air. After 72 h, the extracts were filtered, frozen and taken to a lyophilizer (-60 °C) producing a crude extract of 39.9 g and 111.58 g, respectively.

### 2.3. Compound identification through ultra-efficient liquid chromatography coupled to quadrupole/time of flight system (UPLC-MS-ESI-QTOF)

The analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC system to the Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK) with electrospray ionization interface (ESI) in negative ionization mode. Chromatographs were run on a Waters Acquity UPLC BEH column (150 mm × 2.1 mm, 1.7 µm), fixed temperature of 40 °C, mobile water phases with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile, 1% formic acid (B), gradient ranging from 2% to 95% B (15 min), flow 0.4 mL/min and injection volume 5 µL. The negative ESI mode was acquired in the range of 110-1 180 Da, fixed source temperature at 120 °C, desolvation temperature 350 °C,

desolvation gas flow of 500 L/h, extraction cone 0.5 V, voltage capillary of 2.6 kV. Leucine-enkephalin was used as a lock mass. The acquisition mode was MS<sup>E</sup>. MS data were collected for  $m/z$  values in the range of 110-1 180 Da with a scan time of 0.1 over an analysis time of 19 min. The accurate mass and molecular formula assignments were obtained with the MassLynx 4.1 software (Waters MS Technologies).

#### 2.4. Cell lines

The *T. cruzi* assays used CL-B5 parasite strains (clone CL-B5) transfected with the  $\beta$ -galactosidase gene of *Escherichia coli* (LacZ). Epimastigote forms were cultured in infusions of liver tryptase with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin at 28 °C, being harvested during the exponential growth phase[19]. For the leishmanicidal activity, promastigotes of *L. braziliensis* and *L. infantum* grown at 26 °C were used in Schneider's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% normal human urine plus penicillin and streptomycin. In the NCTC clone 929 mammalian fibroblast cytotoxicity test, they were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. Cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin, maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.5 *In vitro* trypanocide and leishmanicidal assay

The trypanocidal assay was performed on 96-well microdilution plates with cultures that did not reach the stationary phase[20]. Epimastigotes were seeded ( $1 \times 10^5$  cells/well) on 200 mL of RPMI médium and incubated with the products at 28 °C by 72 hours. Subsequently, 50  $\mu$ L of CPRG (Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside) solution were added, incubated at 37 °C for an additional 6 h and then read at 595 nm in a spectrophotometer. Nifurtimox was used as reference drug. Each concentration was tested in triplicate. The percentage of inhibition (% AE) was calculated.

The leishmanicidal assay was based on the method developed by Mikus and Steverding[21] with modifications. Promastigotes ( $2.5 \times 10^5$  parasites/well) were grown in 96-well plastic plates. The extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and different dilutions of up to 200 mL of final volume were added. After 48 h at 26 °C, 20  $\mu$ L of resazurin solution was added and

the oxidation-reduction was quantified at 570 to 595 nm. Each concentration was tested in triplicate. In each test, Metronidazole, the reference drug, was used as a control. The antipromastigote percentages (% AP) were calculated.

### 2.6. Cytotoxic assay

The method for assessing cell viability was colorimetric, with resazurine[22]. Fibroblasts NCTC 929 were seeded ( $5 \times 10^4$  cells / well) in 96-well microdilution plates with 100  $\mu$ L RPMI 1640 medium for 24 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was replaced by different concentrations of the extracts in 200  $\mu$ L of medium and then incubated for another 24 h. Growth controls were also included. Subsequently, a 20  $\mu$ L volume of 2 mM resazurin solution was added and the plates incubated for 3 h to evaluate cell viability. Each concentration was tested in triplicate. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the percentage of cytotoxicity (%C).

### 2.7 Statistical analysis

The IC<sub>50</sub> of the results about cytotoxic effect, anti-leishmania and anti-trypanosoma activities were calculated using the software GraphPad Prism 7.0, applying a sigmoidal regression curve of doseresponse.

## 3. Results

### 3.1. Compounds identified in AEL and AEB

The chromatographic analysis of the *Z. joazeiro* Mart. extracts were determined by UPLC-MS-ESI-QTOF in the negative mode. The results obtained show 12 compounds present in AEB, with the identification of 7 saponin derivatives which belong to the terpenoid classes (Table 1).

Twenty-four compounds were found in AEL, with 12 compounds being identified (Table 1), including four terpenoids, seven flavonoids and one phenolic acid.

### 3.2. Results of *in vitro* trypanocide, leishmanicidal and cytotoxic assay

Table 2 presents the antipromastigote, antiepipimastigote and cytotoxicity activity results of the *Z. joazeiro* extracts, in addition to the standard drug results. AEB presented more significant

results for its antiparasitic activity in comparison to the AEL, especially against the *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigote forms.

The AEL presented antiparasitic activity against promastigotes and epimastigotes, with an  $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ , however, without clinical relevance. Furthermore, its cytotoxic evaluation was not determined.

The  $IC_{50}$  values of AEL for antipromastigote activities were  $1\ 241 \mu\text{g/mL}$  (*L. braziliensis*) and  $33\ 770 \mu\text{g/mL}$  (*L. infantum*) and for antiepipimastigote activity, the  $IC_{50}$  value was  $76\ 640 \mu\text{g/mL}$ .

The AEB was the most efficient extract against the promastigote forms with an 85.71% inhibition for *L. braziliensis* and 68.44% for *L. infantum*, at  $1000 \mu\text{g/mL}$  concentration. The  $IC_{50}$  values for antipromastigote activities were  $327.4 \mu\text{g/mL}$  (*L. braziliensis*) and  $405.2 \mu\text{g/mL}$  (*L. infantum*) and for antiepipimastigote activity, the  $IC_{50}$  value was  $1\ 080 \mu\text{g/mL}$ .

### 3.3. Cytotoxicities of the extracts of *Z. joazeiro* Mart.

The cytotoxicity of AEL was not observed. The AEB showed moderate toxicity, with an  $IC_{50}$  value for cytotoxicity of  $333.9 \mu\text{g/mL}$ , and inhibition of 61.87% fibroblasts at the concentration of  $250 \mu\text{g/mL}$ .

## 4. Discussion

The *Ziziphus* genus is known for having a presence of alkaloids and polysaccharides, in addition to a significant number of flavonoids, tannins and saponins in its composition[23,24].

Regarding antiparasitic activity, in a study carried out by Brito *et al*[25] using a *Z. joazeiro* leaf hydroethanolic extract, no relevant antiparasitic activity was observed against *T. cruzi* ( $IC_{50}$ :  $612.061 \mu\text{g/mL}$ ), *L. braziliensis* ( $IC_{50}$ :  $> 5\ 000 \mu\text{g/mL}$ ) and *L. infantum* ( $IC_{50}$ :  $693.67 \mu\text{g/mL}$ ), with the extract exhibiting a low cytotoxic activity.

Gomes *et al*[26] evaluated the antimalarial activity of aqueous extract from *Z. joazeiro* stem bark, observing complete nematode egg inhibition, *Haemonchus* spp., where the  $IC_{50}$  was determined at  $1.9 \mu\text{g/mL}$  of the extract.

In this study, the AEL did not present relevant antiparasitic activity. However, some constituents of the flavonoid class, such as myricetin-*O*-glucoside, quercetin-*O*-hexoside and quercetin-robnoside, which are derived from mirecetin and quercetin, have been observed in its

composition. When isolated from plant extracts, mirecetin and quercetin were effective in reducing *T. cruzi* strains, in addition to presenting low toxicity to mammalian cells[27]. In this way it is believed that the constituents present in complexes do not have the effect that their isolated form has.

The cytotoxicity presented by the AEB may be related to the presence of saponins in its chemical composition. Several studies report high cytotoxicity for many saponins[28-30].

Saponins are molecules produced by the plant's secondary metabolism which act primarily as a chemical defense system against herbivores, as well as fungal and bacterial infections[31,32]. Despite reports on its toxicity, these molecules are responsible for a wide variety of biological activities such as molluscicidal, antiparasitic[33], anti-inflammatory, cytotoxic, anti-platelet and anti-diabetic activities[23,26,29,34].

In conclusion, comparative evaluation of the antiparasitic activity of the *Z. joazeiro* aqueous extracts demonstrated the efficacy of the AEB against promastigote forms and an antiparasitic action without clinical relevance of the AEL. The cytotoxicity from the AEB extract observed is of relevant information for the rational use of this plant part since it is widely used by the population. UPLC-QTOF analysis revealed compounds which can be used as a basis for further biological studies against this group of neglected diseases.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

- [1] World Health Organization. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva: World Health Organization; 2011. [Online]. Available from: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/) [Accessed on 15 Dec 2017].
- [2] Vasconcelos RS, Kovalski DF, Tesser Junior ZC. *Doenças Negligenciadas: Revisão da Literatura sobre as Intervenções Propostas*. Saúde Transformação Social 2016; **6**(2): 114-131.

[3] Reis ACMS, Borges DPL, D'Ávila VCGF, Barbosa MS, Ternes YMF, Santiago SB, et al. O cenário de políticas públicas do Brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. *Saúde Ciência em Ação* 2016; **2**(2): 99-107.

[4] Moraes-Braga MFB, Souza TM, Santos KKA, Andrade JC, Guedes GMM, Tintino SR, et al. Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. *Acta Toxicol Argent* 2013; **21**(1): 50-56.

[5] DNDi. *Diseases and projects*. [Online]. Available from: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/> [Accessed on 22 Jan 2017].

[6] World Health Organization. *Información general: Enfermedad de Chagas*. [Online]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=es) [Accessed on 15 Dec 2017].

[7] Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**(1): 71-80. Doi: 10.1590/S0037-86822003000100011.

[9] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**(11): 873-882. Doi: 10.1038/nrmicro1748.

[8] Mennai I, Hanfer M, Esseid C, Benayache S, Ameddah S, Menad A, et al. Chemical composition, *in vitro* antiparasitic, antimicrobial and antioxidant activities of *Frankenia thymifolia* Desf. *Nat Prod Res* 2019; **24**: 1-6. Doi: 10.1080/14786419.2018.1561685.

[10] World Health Organization. *Clinical forms of the leishmaniasis*. [Online]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. [Accessed on 23 Jan 2018]

[11] Organização Panamericana da Saúde - OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses N° 7. [Online]. Available from:

[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5)  
[Accessed on 22 Jan 2018]

[12]Santos CS, Gomes AMT, Souza FS, Marques SC, Lobo MP, Oliveira DC. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. *Esc Anna Nery* 2017; **21**(1): 1-9. Doi: 10.5935/1414-8145.20170016.

[13]Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; **7**(3): 338-349. Doi: 10.1590/S1415-790X2004000300011.

[14]Silva EL, Nicoletti MA. Controle e tratamento das doenças negligenciadas: visão da situação atual. *Rev Saúde* 2013; **7**(3): 65-81.

[15]Freitas AVL, Coelho MFB, Pereira YB, Freitas Neto EC, Azevedo RAB. Diversidade e usos de plantas medicinais nos quintais da comunidade de São João da Várzea em Mossoró, RN. *Rev Bras Pl Med* 2015; **17**(4): 845-856. Doi: 10.1590/1983-084X/14\_080.

[16]Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *J Arid Environ* 2005; **62**: 127-142.

[17]Nisar M, Adzu B, Inamullah K, Bashir A, Ihsan A, Gilani AH. Antinociceptive and antipyretic activities of the *Zizyphus oxyphylla* Edgew. Leaves. *Phytother Res* 2007; **21**(7): 693-695. Doi:10.1002/ptr.2139.

[18]Matos FJA. *Farmácias vivas*. 4 ed. Fortaleza, CE: Editora UFC; 2002, p. 36-40.

[19] Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; **97**: 1101–1105.

- [20] Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res* 2005; **95**: 296-298.
- [21] Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using dye Alamar Blue®. *Parasitol Int* 2000; **48**: 265-259.
- [22] Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A et al. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 104–109.
- [23] Kaleem WA, Muhammad N, Khan H, Rauf A. Pharmacological and phytochemical studies of genus *Zizyphus*. *Int J Sci Res* 2014; **21**(8): 1243-1263. Doi: 10.5829/idosi.mejsr.2014.21.08.21099.
- [24] Pu Y, Ding T, Zhang N, Jiang P, Liu D. Identification of bitter compounds from dried fruit of *Zizyphus jujuba* cv. Junzao. *Int J Food Prop* 2017; **20**: 1-34. Doi: 10.1080/10942912.2017.1288133.
- [25] Brito SMO, Coutinho HDM, Talvani A, Coronel C, Barbosa AGR, Veja C, et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Zizyphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. *Food Chem* 2015; **1**(186): 185-191. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.031.
- [26] Gomes DC, Lima HG, Vaza AV, Santos NS, Santos FO, Dias ÊR, et al. *In vitro* anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. *Vet Parasitol* 2016; **15**(226): 10-16. Doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.004.
- [27] Faria RX, Souza ALA, Lima B, Tietbohl LAC, Fernandes CP, Amaral RR, et al. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. *J Bioenerg Biomembr* 2017; **49**(6): 473-483. Doi: 10.1007/s10863-017-9733-9.



- [28]Kim AD, Kang KA, Zhang R, Lim CM, Kim HS, Kim DH, et al. Ginseng saponin metabolite induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMP-activated protein kinase. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; **30**(2): 134-140. Doi: 10.1016/j.etap.2010.04.008.
- [29]Li N, Wu CF, Xu XY, Liu ZY, Li X, Zhao YQ. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *Eur J Med Chem* 2012; **50**: 173-178. Doi: 10.1016/j.ejmech.2012.01.052.
- [30]Hu Q, Chen YY, Jiao QY, Khan A, Li F, Han DF, et al. Triterpenoid saponins from the pulp of *Sapindus mukorossi* and their antifungal activities Qingwen. *Phytochemistry* 2018; **147**: 1-8. Doi: 10.1016/j.phytochem.2017.12.004.
- [31]Qu L, Wang J, Ruan J, Yao X, Huang P, Wang Y, et al. Spirostane-type saponins obtained from *Yucca schidigera*. *Molecules* 2018; **23**(1): 2-12. Doi: 10.3390/molecules23010167.
- [32]Wina E, Muetzel S, Becker K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production-A review. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(21): 8093-8105. Doi: 10.1021/jf048053d.
- [33]Moses T, Pollier J, Almagro L, Buyst D, Montagu MV, Pedreño MA, et al. Combinatorial biosynthesis of sapogenins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 $\alpha$  hydroxylase from *Bupleurum falcatum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(4): 1634-1639. Doi: 10.1371/journal.pone.0165954.
- [34]Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review. *Phytochem Rev* 2010; **9**(3):425-474. Doi:10.1007/s11101-010-9183-z.

## Tables

**Table 1.** Identification of compounds by UPLC-QTOF in aqueous extract of stem bark (AEB) and leaves (AEL) of *Z. joazeiro*.

Samples	Quantitative	Classes	Compound
AEB	7	Terpenoids	Saponin derivates
	5	None	None
AEL	4	Terpenoids	Saponin derivates
	7	Flavonoids	C-flavone glycosides
			Myricetin-O-glucoside
			Rutin
			Quercetin-O-hexoside
			Quercetin- robnoside
			Ramnazin-3-O-rutinoside
			Ramnazin-hexoside
	1	Phenolic acid	Dihydroxybenzoic acid pentoside
	12	None	None

**Table 2.** Antipromastigote and antiepipimastigote activities of the extracts of *Z. joazeiro* Mart (mean± SD) (%).

Samples (µg/mL)	% AP (L.b)	% AP (L.i)	% AE
AEL			
1 000	51.11±2.33	3.88±0.86	1.72±0.80
500	23.51±0,43	0.00±0,22	0.00±0.31
250	13.05±0.75	0.00±0.31	0.00±0.61
AEB			
1 000	85.71±0.70	68.44±0.42	43.00±4.74
500	82.16±0.47	67.89±0.20	26.71±0.14
250	42.92±0.78	51.83±0.43	25.78±0.64
Metronidazole			
2.0	100.0	100.0	-
1.0	97.9	97.9	-
Nifurtimox			
1.0	-	-	54.9
0.5	-	-	45.6

AP:antipromastigote percentage; AE: antiepipimastigote; L.b: *L. braziliensis*; L.i: *L. infantum*. AEL: aqueous extracts of leaves of *Z. joazeiro*; AEB: aqueous extracts of stem bark of *Z. joazeiro*.

**Table 3.** Cytotoxicities of the extracts of *Z. joazeiro* Mart (mean± SD) (%).

Samples (µg/mL)	%C
AEL	
1 000	0.00±0.22
500	0.00±1.27
250	0.00±0.21
AEB	
1 000	-
500	-
250	61.87±0.86

AEL: aqueous extracts of leaves of *Z. joazeiro*; AEB: aqueous extracts of stem bark of *Z. joazeiro*. C: cytotoxicity.

# **CAPÍTULO 4**

---

**CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS DE *Ziziphus joazeiro* Mart. POR UPLC-QTOF E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (MANUSCRITO 1)**

Jacqueline C. Andrade<sup>a,b</sup>, Antônia T.L. dos Santos<sup>c</sup>, Ana R.P. da Silva<sup>a</sup>, Maria A. Freitas<sup>a</sup>, Maria I.P. Gonçalo<sup>b</sup>, Maria do S. Costa<sup>a</sup>, Joara N.P. Carneiro<sup>c</sup>, Yedda M.L.S. de Matos<sup>a</sup>, Thiago S. de Freitas<sup>a</sup>, Amanda K. de Sousa<sup>a</sup>, Maria F.B. Morais-Braga<sup>c</sup>, Henrique D.M. Coutinho<sup>a</sup>

Artigo aceito no periódico: Plos One (Anexo 3)

Link para acesso: <https://journals.plos.org/plosone/>

Qualis em Biodiversidade: A1

Fator de Impacto: 3.54



## CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS DE *Ziziphus joazeiro* Mart. POR UPLC-QTOF E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>a,b</sup>, Antônia Thassya Lucas dos Santos<sup>c</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>a</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>a</sup>, Maria Isabeli Pereira Gonçalo<sup>b</sup>, Maria do Socorro Costa<sup>a</sup>, Joara Nályda Pereira Carneiro<sup>c</sup>, Yedda Maria Lobo Soares de Matos<sup>a</sup>, Thiago Sampaio de Freitas<sup>a</sup>, Amanda Karine de Sousa<sup>a</sup>, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga<sup>c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a</sup>

a Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato (CE), Brasil;

b Laboratório de Bioensaios – LABIO, Universidade Federal do Cariri - UFCA, Instituto de Formação de Educadores, *Campus* Brejo Santo (CE), Brasil;

c Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri – LMAC, Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato (CE), Brasil;

\*Autor para correspondência: **Henrique Douglas Melo Coutinho**, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88) 31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

### Resumo

A ocorrência de infecções fúngicas tem levado a morbidade e mortalidade, mesmo quando há recurso terapêutico disponível, devido principalmente à resistência dos micro-organismos que gera como consequência a inatividade das drogas comercializadas. Frente a isso, o objetivo desse estudo é verificar a ação antifúngica dos extratos aquosos das folhas e da casca de *Ziziphus joazeiro*, de forma isolada e em combinação com o fluconazol, na busca de avaliar o potencial modificador na ação desse antifúngico contra a resistência de espécies do gênero *Candida*. Os ensaios antifúngicos, determinaram a Concentração Inibitória de 50% dos micro-organismos (IC50), utilizando extratos isolados e combinados com antifúngico padrão, através do método de microdiluição em caldo e com leitura espectrofotométrica e a após a concentração fungicida mínima foi verificada por subcultivo em meio sólido. Na curva de viabilidade celular das cepas utilizadas, é possível observar que ambos extratos apresentaram inibição de crescimento fúngico em concentrações crescentes, além de apresentar pontos de concentração inibitória semelhante à do fluconazol. No entanto os extratos se comportaram de forma fungistática, com concentração inibitória mínima >8192 µg/mL, e valores de IC50 variando de 450,60 a 9040,94 µg/mL. Quando

combinado com fluconazol, foi observado uma diminuição na concentração inibitória mínima de ambos os extratos, destacando, o EAFZJ frente a *Candida albicans* URM 4387, que revelou uma IC<sub>50</sub> bem próxima ao fluconazol de 2,83 µg/mL. No entanto, foi possível observar antagonismo do fluconazol, frente as cepas utilizadas. Avaliando de forma geral percebemos que a ação antifúngica dos extratos utilizados frente as cepas *candida* spp. possuem valores de Concentração inibitória maiores que os valores do antifúngico de referência. No entanto, levando em consideração que são extratos brutos, rico em uma complexidade química, demonstraram um efeito antifúngico e propriedades que consolidam o aspecto etnobiológico da espécie *Ziziphus joazeiro*.

**Palavras-chave:** Fungistático; Patógenos oportunistas; Joazeiro.

## 1. Introdução

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na microbiota normal do organismo humano e se tornam patogênicas em pacientes Imunocomprometidos, sendo responsáveis por causar Candidíase, uma das mais comuns infecções fúngicas oportunistas, de quadro clínico variável e diagnóstico leve, agudo ou crônico. O gênero é composto por cerca de 200 espécies, tendo como agente mais virulento a espécie *Candida albicans*, seguidos por outras espécies não-albicans [1-2].

A ocorrência de infecções fúngicas é cada vez mais observada, levando a morbidade e mortalidade, mesmo quando há recurso terapêutico disponível. Essa situação ocorre principalmente, devido a inatividade das drogas comercializadas. A resistência do gênero *Candida*, pode ser intrínseca ou adquirida no decorrer do tratamento, os mecanismos de resistência, como biofilme, desenvolvimento de pseudo-hifa ou hifa, bombas de efluxo e fatores de transcrição mutantes colaboram com a ampliação da resistência microbiológica aos antifúngicos [3-4].

Por muito tempo, as medidas de prevenção contra infecções fúngicas se davam através da prescrição de fluconazol e o uso abusivo desse antifúngico é considerado como responsável pela maior incidência de espécies de *Candida* com respostas adaptativas ao tratamento, contribuindo com a redução de susceptibilidade ao fármaco [5]. Assim, é notável a necessidade de pesquisas voltadas para desenvolvimento de novas substâncias que contribuam para o tratamento eficaz da candidíase.

Os extratos vegetais, no ponto de vista farmacológico, são importantes na pesquisa por princípios ativos que apresentem efeito biológico, e que possam direcionar o desenvolvimento de novos medicamentos. *Ziziphus joazeiro* Mart. é uma espécie endêmica da caatinga, da família

Rhamnaceae, popularmente conhecida como joazeiro, juá-babão, juá-de-boi, juazeiro e juá [6-7]. É comumente utilizado pela população na higiene bucal e tratamento de gengivites [8], além de possuir várias atividades biológicas comprovadas, analgésica [9], atividade gastroprotetora [10-11], antipiréticas [12], antioxidantes, antibacteriana [13], antifúngica [14], antiparasitária [15].

Este trabalho, objetivou verificar a ação antifúngica dos extratos de forma isolada, e em combinação com o fluconazol, para avaliar o potencial modificador na ação desse antifúngico contra a resistência do gênero *Candida*.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Área de coleta e material vegetal

As coletas das folhas e cascas do caule, foram realizadas em oito espécimes de *Ziziphus joazeiro* Mart., localizadas no Sítio Ipueiras, na zona rural do município de Brejo Santo, sul do Ceará, Brasil, no sopé da Chapada do Araripe (coordenadas geográficas, latitude sul e longitude oeste de Greenwich: 1- 442m, 07°28'54.4"S/39°01'47.2"W; 2- 431m, 07°28'53.3"S/39°01'46.1"W; 3- 436m, 07°28'50.5"S/39°01'57.6"W; 4- 440m, 07°28'42.8"S/39°02'10.2"W; 5- 447m, 07°28'48.5"S/39°02'12.0"W; 6- 441m, 07°28'51.4"S/39°02'16.0"W; 7- 439m, 07°28'54.6"S/39°02'07.6"W; 8- 436m, 07°28'58.6"S/39°01'48.8"W)A exsiccata produzida, encontra-se depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o nº13.346 e identificada como *Ziziphus joazeiro* Mart. As coletas aconteceram no mês de fevereiro de 2017, das 7:30 às 9:00 da manhã. O material vegetal foi encaminhado para o laboratório, submetido a limpeza e pesado.

### 2.2 Preparação dos extratos

A técnica utilizada para preparação dos extratos aquosos das folhas e cascas do caule de *Z. joazeiro* (EAFZJ e EACCZJ) foi maceração com extração a frio, descrito por [16]. Folhas frescas foram cortadas, para aumentar sua superfície, e as cascas do caule passaram por secagem em temperatura ambiente e trituradas em moinho mecânico. Posteriormente ambos foram adicionados em água destilada e estéril. Acondicionados em recipiente protegido da ação da luz e o do ar, e



após 72h foram filtrados, congelados e levados ao liofilizador (-60°C). Produzindo um extrato bruto de 39,9g e 111,58g respectivamente.

### **2.3 Prospecção química qualitativa**

Os ensaios químicos foram utilizados para a análise qualitativa da presença de metabolitos secundários. Os testes de detecção para avaliar a presença de fenóis, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides foram realizados de acordo com o método descrito por [17]. Os testes são baseados na observação visual de modificações de cor e na formação de precipitado após a adição de reagentes específicos. O teste Liebermann - Burchard foi utilizado para a detecção de esteróides e/ou triterpenoides, pelo método adaptado de [18].

### **2.4 Ensaios antifúngico**

#### **2.4.1 Cepas e meios de cultura**

As linhagens padrões foram obtidas da Coleção de Cultura Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Instituto Brasileiro de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), *Candida albicans* INCQS 40006, *Candida tropicalis* INCQS 40042 e linhagens isoladas foram obtidas da Micoteca URM – University Recife Mycology da Universidade Federal de Pernambuco, *Candida albicans* URM 4387, *Candida tropicalis* URM 4262. As estirpes foram inoculadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA, KASVI) e incubadas durante 24 h a 37°C. Posteriormente, pequenas alíquotas de levedura foram transferidas para tubos de ensaio contendo cada um 3 mL de solução salina estéril (0,9%). A concentração do inóculo foi padronizada comparando-se à escala 0.5 de McFarland [19]. O Caldo Sabouraud Dextrose (SDB, HIMEDIA), duplamente concentrado foi utilizado nos testes de microdiluição.

#### **2.4.2 Drogas, reagentes e preparação de soluções**

A solução dos produtos foi preparada pesando-se 0,15 g de cada extrato e depois diluindo-se em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha). Para obter a concentração desejada para os testes, os extratos foram diluídos em água destilada estéril (16,384 µg/mL) de modo que a concentração de DMSO não exercesse qualquer atividade nas células dos

testes [20]. O fluconazol antifúngico (Cápsula – Prati donaduzzi), diluído em água, foi utilizado como medicamento de referência.

#### **2.4.3 Determinação da IC<sub>50</sub> e obtenção da curva de viabilidade celular**

Foi realizado pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 100 µL de CSD contendo 10% de inóculo fúngico e, em seguida, foram adicionados 100 µL do produto natural (16.384 µg/mL) ou fluconazol (referência antifúngica) na mesma concentração, ao primeiro poço seguido a diluição em série. As concentrações nos poços variaram de 8 a 8,192 µg/mL. O último poço não continha nenhum produto ou medicamento e serviu de controle de crescimento normal [21]. Foram também preparados controles para o diluente dos produtos (com solução de Cloreto de sódio 0,9% em vez de inóculo) e o meio estéril. Todos os testes foram realizados em quadruplicata. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e posteriormente lidas num espectrofotômetro ELISA (Thermoplate®) a um comprimento de onda de 630 nm. Os resultados obtidos na leitura ELISA foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e a IC<sub>50</sub> dos extratos aquosos de *Z. Joazeiro* [22].

#### **2.4.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Uma haste estéril foi inserida em cada poço da placa do teste anterior (exceto no controle de esterilidade). Depois de misturar o meio em cada poço, a haste foi levada a uma placa de Petri contendo SDA, com auxílio de uma cartela guia fixada no fundo da placa para a subcultura de levedura e verificando a viabilidade celular. Após 24 h de incubação, as placas foram inspecionadas para qualquer formação de colônias de *Candida* [23]. A concentração em que não houve crescimento de colônias de fungos foi considerada a CFM dos extratos aquosos.

#### **2.4.5 Avaliação do efeito modificador da ação do fluconazol**

Inicialmente foi verificada a ação intrínseca de cada extrato e do fluconazol sob o crescimento de leveduras e neste ensaio foi avaliado o efeito da combinação dos extratos com a droga de referência, para constatar se houve ou não potencialização da ação do antifúngico pelos extratos. Para tanto, utilizou-se os extratos em concentração subinibitória (CFM/16), de acordo com a metodologia utilizada por [24] com modificações. Caso os extratos potencializasse a ação do antifúngico, o efeito verificado seria considerado do tipo sinérgico, caso prejudicasse a atuação

deste, ficaria constatado um efeito antagônico. As placas foram preenchidas com 100 µL de meio + inóculo + extratos e em seguida microdiluídas com 100 µL do fluconazol na concentração de 16,384 µg/mL. O volume foi adicionado em cada primeiro poço da coluna, para que sofresse diluição seriada em concentrações que variaram de 8,192 a 8 µg/mL. O último poço foi destinado ao controle de crescimento fúngico. Foram realizados controles de diluição do extrato (inóculo substituído por salina) e controle de esterilidade do meio. A IC<sub>50</sub> do fluconazol também foi determinada para fins comparativos, sendo necessário também realizar o controle de diluição. As placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Thermoplate®) [22].

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software Graphpad Prism, v. 5.0. Foram verificados quanto à sua distribuição normal e depois analisados por ANOVA de duas vias ( $P < 0.05$ ;  $*P < 0.1$ ;  $****P < 0.0001$ ), comparando os valores para cada concentração do extrato, ponto a ponto, com o teste *post hoc de Bonferroni*. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos por regressão não linear com interpolação de incógnitas de curvas padrão obtidas a partir dos valores do crescimento fúngico em função da concentração do extrato e expressos em µg/mL.

## 3. Resultados

A caracterização fitoquímica dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro*, evidenciou a presença das classes de metabolitos secundários, como fenóis, flavonoides e triterpenoides (Tabela 1).

Em estudo realizado com UPLC-ESI-QTOF-MS no modo iônico negativo, foi possível identificar no extrato aquoso das folhas de *Ziziphus joazeiro*, 10 flavonoides (Catequina, Miricetina-O-rutinosídeo, Miricetina-O-hexosídeo, Rutina, Quercetina-O-Glucosídeo, Quercetina-O-hexosídeo, Isoramnetina-O-rutinosídeo, Isoramnetina-O-hexosídeo, kaempferol-O-(sinapoyl)sophoroside, kaempferol 3-O-(feruloyl)sophorosid e.), 4 saponinas (Tetraglicosideo Diogenina e derivados de saponinas), 1 ácido fenólico (Ácido dihidroxibenzóico pentoside) e 1 composto nitrogenado (5-alil-1-(2,3,4 - tris-O- benzoilpentafuranosil) - 2,4(1H,3H) - Pirimidinadiona). Já no extrato aquoso das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro*, foi possível a

identificação de 3 derivados de saponinas (ANDRADE et al., 2019). A Figura 1, apresenta a estrutura química dos principais compostos das classes presentes na composição fitoquímica dos extratos.

Nos ensaios antifúngicos frente *Candida albicans* INCQS 40006 e URM 4387, verifica-se na curva de viabilidade celular (Figura 02), que ambos extratos apresentaram inibição de crescimento fúngico com o aumento da sua concentração.

Em uma análise comparativa dos extratos, é possível avaliar uma ação mais relevante do EACCZJ, que frente *Candida albicans* INCQS 40006, apresentando inibição de mais de 50% do crescimento em 512 µg/mL, tendo ação semelhante ao fluconazol na concentração de 1024 µg/mL. Nessa mesma concentração o EAFZJ, não obteve inibição nem 50% do crescimento fúngico, chegando a essa inibição, só na maior concentração utilizada de 8192 µg/mL para ambas cepas.

Os resultados para *Candida albicans* URM 4387, são equivalentes, onde o EACCZJ, apresentou inibição relevante em 512 µg/mL, acompanhando a partir dessa concentração a ação de inibição do fluconazol.

Nenhum dos extratos avaliados, em relação a concentração fungicida mínima, apresentou efeito fungicida, uma vez que, não ocorreu inibição, mas sim, diminuição do crescimento fúngico das cepas de *Candida*. Assim o efeito antifúngico observado, é denominado de fungistático, com concentração fungicida mínima de  $\geq 8192$  µg/mL.

O EACCZJ se destaca quando comparado ao EAFZJ, frente as cepas de *Candida tropicalis* (Figura 03), no entanto o EACCZJ, só apresenta diminuição de 50% da viabilidade celular das cepas, na concentração de 4096 µg/mL. Em contrapartida o fluconazol, demonstra inibição significativa a partir de 64 µg/mL, para *Candida tropicalis* INSQC 40042 e 32 µg/mL para URM 4262.

Na avaliação do potencial modificador da ação antifúngica dos extratos sobre o fluconazol, frente as cepas utilizadas de *Candida* (Figura 04), é possível verificar, em CA 40006 que a combinação da droga de referência com os extratos em concentrações sub-inibitórias, não demonstra uma atuação significativa, quando comparado com a droga sozinha. Já em frente a CA URM 4387, o efeito modulador do EAFZJ sobre o fluconazol, obteve comportamento semelhante a droga isolada, potencializando a ação entre as concentrações de 32 a 256 µg/mL.

A ação modulatória nas cepas de *Candida tropicalis* (Figura 05) não apresentou potencialização nas combinações entre os extratos e a droga. Sendo possível verificar uma

diminuição da ação do fluconazol quando combinado com ambos os extratos. Em uma análise comparativa, a combinação com o EACCZJ, apresentou um aumento na curva de viabilidade celular, caracterizando um antagonismo, nas concentrações de 8 a 2048  $\mu\text{g/mL}$ , para CT INCQS 40042 e CT URM 4262.

A Tabela 2, mensura os valores  $\text{IC}_{50}$  dos extratos, demonstrando que de forma isolada os EAFZJ e EACCZJ possuem uma concentração inibitória mínima muito alta em relação ao efeito de inibição do Fluconazol, tendo  $\text{IC}_{50}$  variando de 450,60 a 9040,94  $\mu\text{g/mL}$ . Quando combinado com fluconazol, foi observado uma diminuição na concentração inibitória mínima de ambos os extratos, no entanto, o EAFZJ frente a CA URM 4387, revelou uma  $\text{IC}_{50}$  bem próxima ao fluconazol de 2,83  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4. Discussões

Em caracterização fitoquímica das folhas, entrecascas e cascas de *Z. joazeiro* foram identificados em quantidade considerável flavonoides, esteroides, taninos, alcaloides e saponinas [25].

Alguns trabalhos realizaram análises por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), com o gênero *Ziziphus* da família Rhamnaceae, alguns trabalhos corroboram com a composição química encontrada nos extratos em estudo, como em *Ziziphus mauritiana* [26-27], *Ziziphus jujube* [28] e *Ziziphus jujuba* [29-30].

Dos metabolitos encontrados, na caracterização química dos extratos os triterpenóides e flavonoides são apontados como substância com potencial antifúngico [31-32].

A atividade antifúngica referente aos compostos terpenóides, como as saponinas, está ligada à desorganização da membrana, levando a lise celular, além de realizarem interação com esteróides [33]. Já os flavonoides, possivelmente possuem a capacidade de desestabilizar às membranas dos fungos, devido à sua natureza lipofílica, além de serem capazes de formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas [34-35-36].

Em comparação com os ensaios antifúngicos, em estudo realizado por [25], saponinas isoladas do caule de *Ziziphus joazeiro*, apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231, possuindo uma concentração inibitória mínima de 156  $\mu\text{g/mL}$ .

Em estudo desenvolvido com espécies de *Candida* não-*albicans*, como *Trichophyton rubrum* e *Candida guilliermondii*, foi avaliado a ação antifúngica do extrato aquoso das casca de

*Ziziphus joazeiro*, apresentando resultados semelhantes a anfotericina B, que foi utilizado como medicamento de referência [14].

O efeito potencializador do EAFZJ sobre o fluconazol, pode ser evidenciado devido ao seu caráter, mas polar, que é consequência da presença de flavonoides em sua composição fitoquímica, além de possuir nessa composição, classes dos flavonoides, que estão ligadas a atividade antifúngica como os flavonóis, que são apontados com atividade contra *C. albicans*, além de outras espécies de *Candida não-albicans* [37].

No estudo de [31], também foi avaliado o efeito modificador da ação do fluconazol, frente a cepas de *C. tropicalis*. A combinação sinérgica entre flavonoides isolados e fluconazol, obteve resultados diferentes dos citados nessa pesquisa, demonstrando o potencial dos flavonoides como agente efetor de sinergismo do fluconazol.

## 5. Conclusão

Avaliando de forma geral percebemos que a ação antifúngica dos extratos utilizados frente as cepas *candida* spp. possuem valores de CIM maiores que os valores do antifúngico de referência. No entanto, levando em consideração que são extratos brutos, rico em uma complexidade química, demonstraram um efeito antifúngico e propriedades que consolidam o aspecto etnobiológico da espécie *Ziziphus joazeiro*. Em uma avaliação comparativa entre os extratos, o EACCZJ apresentou valores mais significativos, em relação a atividade antifúngica, quando utilizado de forma isolado. Já o EAFZJ, se destacou quando utilizado em combinação com o fluconazol, apresentando-se como agente efetor de sinergismo do fluconazol, frente a *candida albicans*. Frente a *Candida tropicalis*, foi evidenciado antagonismo de ambos extratos. Assim, outros estudos se fazem necessários para entender e destacar os mecanismos de interação extrato e droga.

## Conflict of interest

There is nothing to declare.

## Referências

- [1] Rohilla S., Bhatt DC, Gupta A. 2018. Therapeutic potential of phytomedicines and novel polymeric strategies for significant management of candidiasis. *Current Pharmaceutical Design*. 2018, 25-27.
- [2] Hacıoglu M, Guzel CB, Savage PB, Tan ASB. 2018. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*. 2018.
- [3] Vieira AJH, Santos JI. 2017. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*. 2017, 49(3): 235-239.
- [4] Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Machado AJT, Sales DL, Santos ATL, Boligon AA, Athayde ML, Menezes IRA, Souza DSL, Costa JGM, Coutinho HDM, 2017. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017, 24: 302–313.
- [5] Linares CE, Giacomelli SR, Altenhofen D, Alves SH, Morsch VM, Schetinger MR. 2013. Fluconazole and amphoterecin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013, 46(6): 752-758.
- [6] Carvalho Per. 2007. Juazeiro *Ziziphus joazeiro*. Embrapa, Circular Técnico 139. Colombo, PR, 2007.
- [7] Sousa FC, Martins JJA, Rocha APT, Gomes JP, Pessoa T, Martins JN, 2015. Predição de modelos sobre a cinética de secagem de folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. *Rev. Bras. Pl. Med*. 2015, 17: 195-200.

- [8] Almeida CFCBR, Amorim ELC, Albuquerque UP, Maia MB, 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingo region a semi-arid location in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006, 15: 1–7.
- [9] Schühly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O, 1999. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med*. 1999, 65(8):740-743.
- [10] Washida B, Abderrahman B, Nabil C, 2007. Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 112:228-231.
- [11] Romão MODC, Costa AMDD, Terra FDS, Boriollo MFG, Soares EA, 2010. Assessment of gastric protective of rasp juá extract. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2010, 8:, 222–227.
- [12] Nunes PHM, Marinho LC, Nunes MLRL, Soares EO, 1987. Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res*. 1987; 20(5): 599-601.
- [13] Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano C, Farias LM, Carvalho MAR, Souza MG, Bolognese AM, 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*. 2008, 53: 545-552.
- [14] Cruz MCS, Santos PO, Barbosa Jr AM, Melo D LFM, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC, 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 111:409-412.
- [15] Gomes DC, Lima HG, Vaza AV, Santosa NS, Santos FO, Dias ÊR, Boturac MB, Branco A, Batatinha MJM, 2016. In vitro anthelmintic activity of the *Zizyphus joazeiro* bark against gastrointestinal nematodes of goats and its cytotoxicity on Vero cells. *Veterinary Parasitology*. 2016, 15(226): 10-16.



- [17] Matos FJA, 2009. Introduction to Experimental Phytochemical, 3th edn, Fortaleza: Publisher UFC, Português.
- [16] Matos FJA, 2002. Farmácias vivas. 4 ed. Fortaleza: Editora UFC. P. 2002. 36-40.
- [18] Campbell MK, Shawn OF, 2005. 2005. Biochemistry. (4<sup>th</sup> ed.) Singapore: Thomson Asia pte Ltd.
- [19] NCCLS Norma M27–A2, 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27–A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2002, 19087-1898.
- [20] Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, Silva MLA, Martins CHG, Furtado NAJC, 2009. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. Química Nova. 2009, 498–502.
- [21] Javadpour M.M, et al, 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. Journal of Medicinal Chemistry. 1996, 39: 3107–3113.
- [22] Moraes-Braga M FB, Sales DL, Carneiro JNP, Machado AJT, Santos ATL, Freitas, MA, Souza DS, 2016. Psidium guajava L. and Psidium brownianum Mart ex DC.: Chemical composition and anti-Candida effect in association with fluconazole. Microbial pathogenesis. 2016, 95: 200-207.
- [23] Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA, 1999. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1999, 33: 75–80.
- [24] Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Junior JP, 2009. In vitro interference of Momordica charantia and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides, Pharm. Biol. 2009, 47: 1056–1059.

- [25] Ribeiro BD, Coelho MAZ, Marrucho IM. 2013. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*, 2013, 237: 965–975.
- [26] Nag TN, Chouhan N. 2009. Secondary metabolites from tissue cultures and plant parts of *Ziziphus mauritiana* cultivars Gola and Seb. *Acta Hort.* 2009, 840: 327-334.
- [27] Memona AA, Memon N, Bhangar M, Luthria DL. 2013. Assay of phenolic compounds from four species of ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits: Comparison of three base hydrolysis procedure for quantification of total phenolic acids. *Food Chemistry*. 2013, 139: 496–502.
- [28] Wojdyło A, Carbonell-Barrachina AA, Legua P, Hernández F. 2016. Composition, ascorbic acid content, and antioxidant capacity of Spanish jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) fruits. *Food Chemistry*. 2016, 201: 307–314.
- [29] Choi J, An X, Lee BH, Lee JS, Heo HJ, Kim T, Ahn JW, Kim DO, 2015. Protective Effects of Bioactive Phenolics from Jujube (*Ziziphus jujuba*) Seeds against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress in Neuronal PC-12 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 2015, 24(6): 2219-2227.
- [30] Pu Y, Ding T, Zhang N, Jiang P, Liu D, 2017. Identification of bitter compounds from dried fruit of *Ziziphus jujuba* cv. Junzao. *International Journal of Food Properties*. 2017, 01-34.
- [31] Serpa R, França E, Maia L, Andrade C, Diniz A, Furlaneto M, 2012. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, 61, 1704 – 1709.
- [32] Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR(Orgs), 2017. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC. 1104.

[33] Cunha AP, Roque OR, 2005. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotónicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005, 432-482.

[34] Arif T, Mandal TK, Dabur R, 2011. Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. 2011, 81:283 – 311.

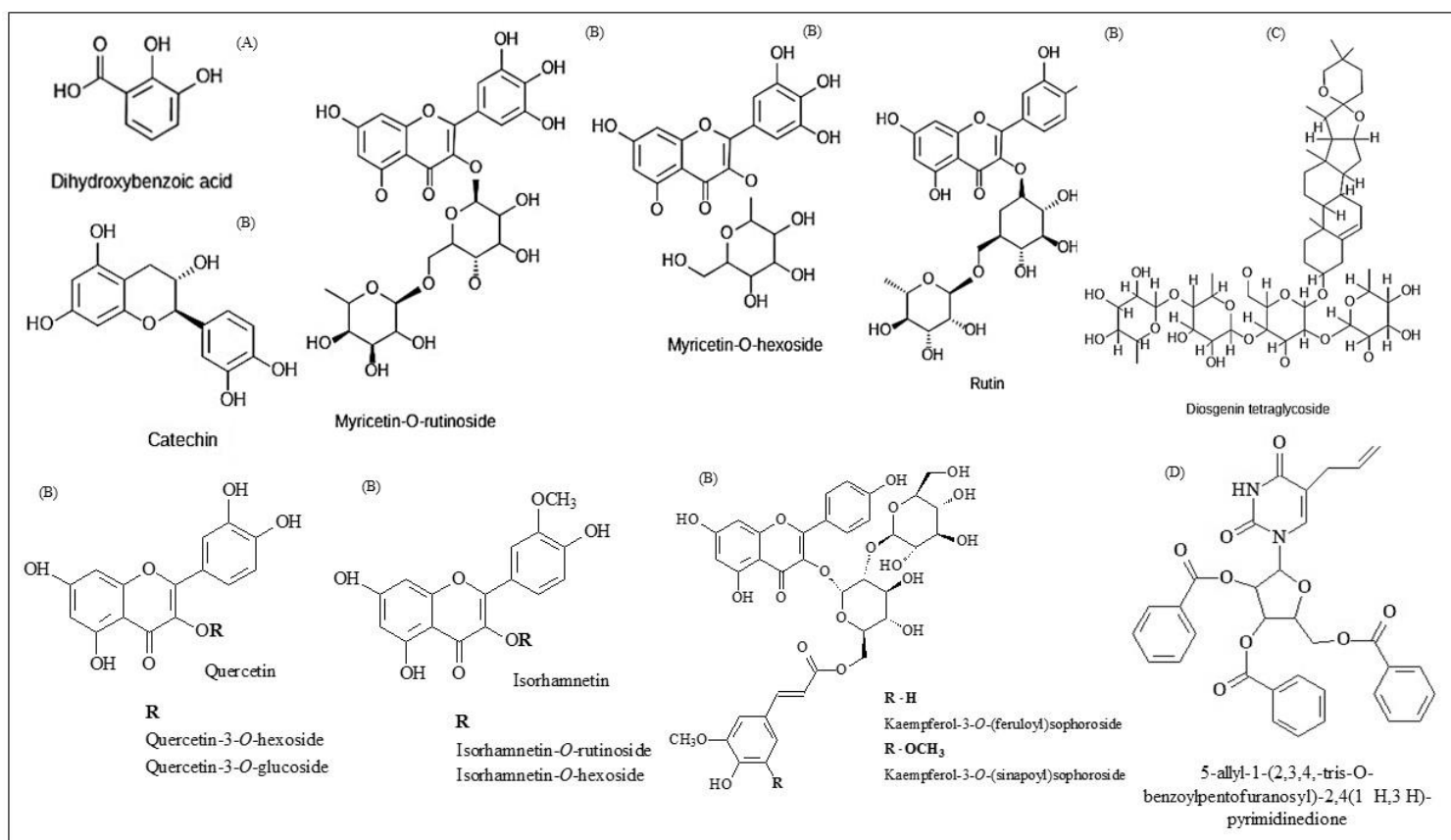
[35] Salas PM, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik SL, 2011. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. Food Chemistry. 2011, 124: 1411 – 1415.

[36] Chua LS, 2013. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities, Journal of Ethnopharmacology. 2013, 150: 805 – 817.

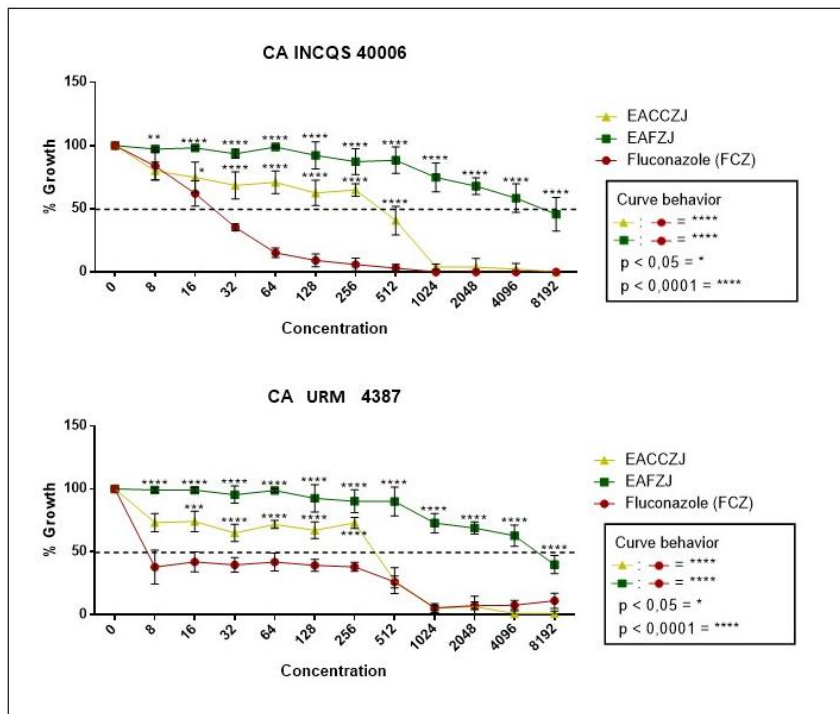
[37] Scorzoni L, Sangalli-Leite F, Lacorte SJ, Paula SAC, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ, 2016. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. Journal of Microbiological Methods, 2016, 123: 68-78.

## Figuras

**Figura 1.** Estrutura química dos principais compostos das classes (A) Ácido Fenólico (B) Flavonoides (C) Saponina e (D) composto nitrogenado presente na composição fitoquímica dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* Mart.

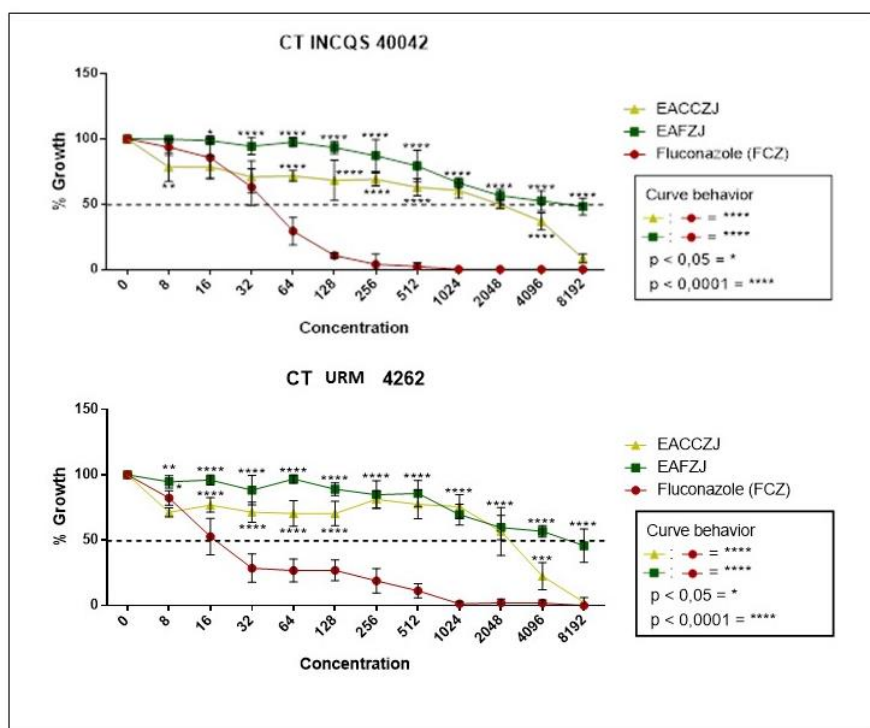


**Figure 2.** Curva de viabilidade celular de cepas *Candida albicans* sob o efeito dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* Mart.



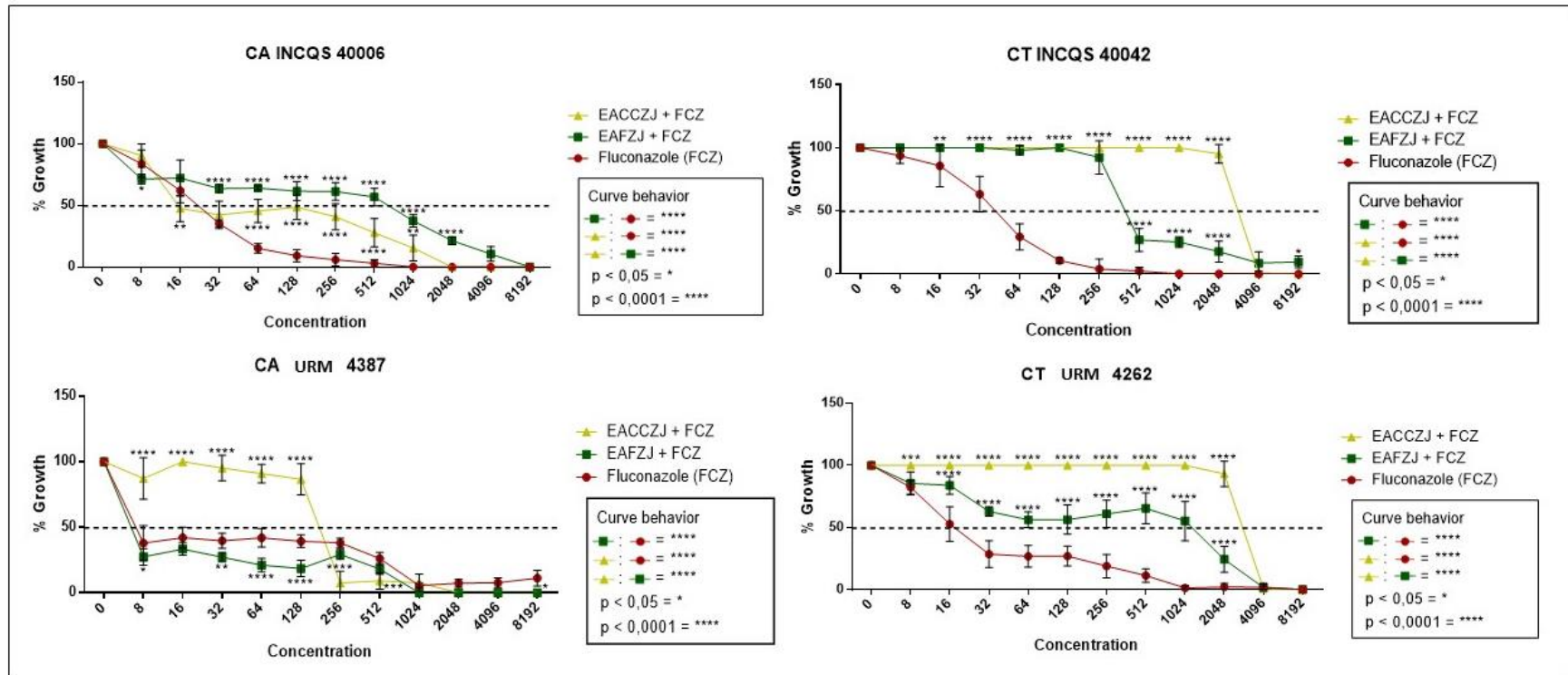
\*EACCZJ: Extrato Aquoso das Casca do Caule de *Ziziphus joazeiro*; EAFZJ: Extrato Aquoso das Folhas de *Ziziphus joazeiro*; FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. URM: \*. ( $p < 0,05$ ); \*\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado com o controle.

Figure 3. Curva de viabilidade celular de cepas *Candida tropicalis* sob o efeito dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* Mart.



\*EACCZJ: Extrato Aquoso das Casca do Caule de *Ziziphus joazeiro*; EAFZJ: Extrato Aquoso das Folhas de *Ziziphus joazeiro*; FCZ: Fluconazol; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. URM: \*( $p < 0,05$ ); \*\*\*\*( $p < 0,0001$ ) quando comparado com o controle.

Figure 4. Curva de viabilidade celular de cepas *Candida* sob o efeito da combinação do extrato aquoso de *Ziziphus joazeiro* Mart. com antifúngico padrão.



\*EACCZJ: Extrato Aquoso das Casca do Caule de *Ziziphus joazeiro*; EAFZJ: Extrato Aquoso das Folhas de *Ziziphus joazeiro*; FCZ: Fluconazol; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. URM: \*(p < 0,05); \*\*\*\*(p < 0,0001) quando comparado com o controle.

## Tabelas

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro*.

Extratos	Metabólitos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EAFZJ	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
EACCZJ	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+

1- Phenols; 2- Tannin pyrogallates; 3- Condensed tannins; 4- Anthocyanidins; 5- Leucoanthocyanidins; 6 - Flavones; 7 - Flavonols; 8 - Flavononols; 9 - Flavonones; 10 - Xantones; 11 - Aurones; 12 - Chalcones; 13 - Catechins; 14 - Alkaloids; 15 – Steroids and/or triterpenoids; (+) presence; (-) absense; EAFZJ: Extrato Aquoso das Folhas de *Ziziphus joazeiro* EACCZJ: Extrato Aquoso das Casca do Caule de *Ziziphus joazeiro*;

**Tabela 2 .** IC<sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* isolados e combinados com Fluconazol, frente a diferentes estirpes de *Candida*

Produtos testados	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	INCQS 40006	URM 4387	INCQS 40042	URM 4262
Fluconazol	21,24	2,72	41,81	14,54
EAFZJ	5889,00	6035,63	9040,94	5453,83
EACCZJ	480,30	450,60	2193,62	3026,91
EAFZJ+FCZ	506,64	2,83	378,40	937,72
EACCZJ+FCZ	53,75	173,40	2654,00	2632,00

\*EACCZJ: Extrato Aquoso das Casca do Caule de *Ziziphus joazeiro*; EAFZJ: Extrato Aquoso das Folhas de *Ziziphus joazeiro*; FCZ: Fluconazol; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. URM:



# **CAPÍTULO 5**

---

**CAPÍTULO 5: Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) (ARTIGO 3)**

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>a,b</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>a</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>c</sup>, Bárbara de Azevedo Ramos<sup>d</sup>, Thiago Sampaio Freitas<sup>a</sup>, Franz de Assis G. dos Santos<sup>c</sup>, Melyna C. Leite-Andrade<sup>c</sup>, Michellângelo Nunes<sup>c</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>a</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>d</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>d</sup>, Rejane P. Neves<sup>c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a</sup>.

Artigo publicado no periódico: Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases (Anexo 4)

Link para acesso: <https://www.journals.elsevier.com/comparative-immunology-microbiology-and-infectious-diseases>

Qualis em Biodiversidade: B2

Fator de Impacto: 1.920



**Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)**

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>1,2</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>1</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>3</sup>, Bárbara de Azevedo Ramos<sup>4</sup>, Thiago Sampaio Freitas<sup>1</sup>, Franz de Assis G. dos Santos<sup>3</sup>, Melyna C. Leite-Andrade<sup>3</sup>, Michellângelo Nunes<sup>3</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>1</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>4</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>4</sup>, Rejane P. Neves<sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratory of Microbiology and Molecular Biology - LMBM, University Regional of Cariri - URCA, Crato (CE), Brazil;*

<sup>2</sup> *Laboratory Bioassay – LABIO, University Federal of Cariri - UFCA, Institute of Educators Training, Campus Brejo Santo (CE), Brazil;*

<sup>3</sup> *Laboratory of Medical Mycology Sylvio Campos, University Federal of Pernambuco – UFPE, Recife (PE), Brazil;*

<sup>4</sup> *Center of Biological Sciences and Department of Biochemistry, University Federal of Pernambuco – UFPE, Recife (PE), Brazil;*

\* Corresponding author: Henrique Douglas Melo Coutinho, Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, University Regional of Cariri – URCA. Crato-CE, Brazil. Street Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88) 31021212; Fax +55(88) 31021291. Email: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

**Abstract**

The aim of this study is to verify the action of the aqueous leaf extract *Ziziphus joazeiro* in the eradication of bacterial and fungal biofilms, and to compare these with the effects of aqueous bark and stem bark extracts, as well as with conventional standard drugs. The presence of secondary metabolites was observed through phytochemical prospection assays. The effect of the aqueous extract on microbial biofilm formation was observed by OD600nm absorbance and the crystal violet assay. For bacterial and fungal biofilms, chlorhexidine gluconate and fluconazole, respectively, were used as positive controls. Phytochemical characterization showed the presence of secondary metabolite classes common to both extracts such as flavonoids, steroids and saponins. In particular, in the aqueous leaf extract phenols, condensed tannins and alkaloids were observed. Eradication results using the aqueous leaf extract showed an inhibition of the microbial biofilm mass, moreover the biofilms were more sensitive to the

bark extract, which presented a greater inhibition number and an action similar to standard drugs. It is important to highlight the leaf extract showed significant eradication at the lowest concentrations for mature yeast biofilms, thus demonstrating its potential to modify microbial resistance susceptibility. Bacterial and fungal biofilm eradication results using the *Ziziphus joazeiro* aqueous extracts presented a biofilm inhibition effect for both, moreover the results support the ethnopharmacological knowledge surrounding the use of *Ziziphus joazeiro* stems in the community. In comparison, the bark extract presented a more effective treatment than the leaf extract against biofilms, presenting inhibition levels similar to the used standard drugs.

**Keywords:** Microbial biofilms; Stem bark; Ethnoknowledge; Leaf; chlorhexidine gluconate; saponins.

## INTRODUCTION

Biofilms are microbial ecosystem complexes characterized by one or more microbial cell community, covered by an extracellular polymeric structure which adheres to a biotic and/or abiotic substrate.<sup>1-2</sup>

This complex represents one of the main microbial resistance mechanisms, due to evolutionary advantages this confers to it, especially protection against extreme conditions, such as lack of nutrients, pH and temperature changes, free radicals and ultraviolet radiation, in addition to the action of antibiotics and even the action of the host's immune system.<sup>3</sup>

Biofilm development is a serious healthcare concern given persistent infections, comprising roughly 80% or more of microbial infectious cases.<sup>4-5</sup>

Bacterial infections caused by biofilm proliferation such as chronic, nosocomial and medical device associated infections, have an increased resistance to conventional antibiotics when compared to isolated infections.<sup>6</sup> Among the bacterial resistance mechanisms, biofilms induce physiological changes in response to scarcity, stimulate efflux pump expression, participate in *quorum sensing* and provides an environment for genetic interaction and transfer, thus contributing to the dissemination of tolerance mechanisms against various drugs of clinical interest.<sup>7</sup>

Infections caused by the *Candida* genus represent the fourth greatest cause of infections associated with healthcare.<sup>8</sup> *Candida* spp. pathogenicity is directly linked to its virulence factors, such as dimorphism, extracellular enzyme production, their ability to adhere to surfaces and their ease in forming biofilms. Biofilm formation is the main clinical repercussion, especially due to the increased resistance of certain species to antifungal therapy.<sup>9-10</sup>

Therefore, biofilms represent a source of infection and are associated with a growing mortality index when compared to the same species isolate which does not form a biofilm.<sup>11</sup>

In this context, the implementation of natural products with a therapeutic focus, which are already used by the population, occurs due to the high antimicrobial resistance incidence. Plant extracts are being increasingly studied and considered as possible sources of new compounds with antimicrobial activity.<sup>12</sup>

According to ethnobiological studies, *Ziziphus joazeiro* Mart. is an endemic plant from the Caatinga, commonly used as an oral antiseptic,<sup>13</sup> antimycotic,<sup>14</sup> expectorant, as well as in the treatment of bronchitis and gastric ulcers.<sup>15</sup>

*Ziziphus joazeiro* Mart. is commonly used by the population in oral hygiene and gingivitis treatment. Plant parts, especially the bark and stem bark, are triturated and used for tooth brushing. From conservative point of view, the incorrect practice of stem removal may lead to girdling, a process of total or partial removal of the bark in the circumference of the plant, which impedes nutrient and water flow, resulting in tissue dehydration, in addition to leaving the plant exposed to pest and microorganismal attacks causing plant death.<sup>16</sup> In turn, the leaves are used for the manufacture of anti-dandruff shampoo and capillary tonic, as well as for washing utensils.<sup>17-18</sup>

Buccal cavities possess a vast and diverse microbial flora, composed by bacteria and fungi, with *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis* and yeasts such as *Candida* spp. being commonly found. These coexist, interact and grow in biofilms, which can range from a simple dental plaque to other oral diseases, such as periodontal disease, endodontic infections, angular cheilitis and prosthetic stomatitis.<sup>19</sup>

*Ziziphus joazeiro* bark and leaves have in their phytochemical constitution, saponins, which in aqueous solutions form persistent and abundant foam, this being responsible for the property that makes the *Ziziphus joazeiro* stem bark be used by the population for dental brushing.<sup>18</sup>

Due to the *Ziziphus joazeiro* traditional medicine application and the continuous removal of its stem bark by the population, it is necessary to validate the use of another *Z. joazeiro* part in order to minimize stem bark usage. Therefore, the aim of this study is to verify the action of the aqueous leaf extract against microbial resistance in the eradication of bacterial and fungal

biofilms, and to compare this with the aqueous stem bark extract and chlorhexidine gluconate effects, a chemical already used in oral hygiene, as well as fluconazole.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Collection area and plant material**

*Ziziphus joazeiro* Mart. leaves and stem barks were collected from Sítio Ipueiras, located in the rural area of the Brejo Santo municipality, South of Ceará, Brazil, at the foot of the Chapada do Araripe, with geographic coordinates 07°28'54.4"S/ 39°01'47.2"W. Collections took place in February 2017. A species sample was deposited in the Dárdano de Andrade Lima Herbarium of the Regional University of Cariri - URCA under n°13.346 and identified as *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae).

### **Extract preparation**

*Z. joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts (EAFZJ and EACCZJ) were produced by cold extraction maceration.<sup>20</sup> Fresh leaves were cut and the stem barks were dried at room temperature and crushed in a mechanical mill. Posteriorly, both were added to distilled sterile water, packaged in a container protected from light and air, and after 72 hours, the extracts were filtered, frozen and taken to a lyophilizer (-60 °C).

### **Qualitative chemical prospection**

Chemical assays qualitatively analysed the presence of secondary metabolites. The method based on Matos<sup>21</sup> evaluated the presence of phenols, tannins, flavonoids, alkaloids, steroids. To verify steroids and/or triterpenoids, the Liebermann - Burchard test was performed using an adapted method from Campbell and Shawn.<sup>22</sup>

### **Biofilm production evaluation and bacterial strain eradication**

#### Used strains

Six bacterial lineages were used: *Streptococcus mutans* INCQS 00446 (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* INCQS 00018 (ATCC 14506) and *Staphylococcus epidermidis* INCQS 00016 (ATCC 12228), obtained from the Microorganism Collection Reference in Sanitary Surveillance (CMRVS), Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ - INCQS, Rio de Janeiro, RJ;

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Escherichia coli* ATCC 259223, obtained from the Mycology Laboratory of the Federal University of Paraíba (UFPB). To perform the assays, each sample was subcultured in a BHI agar environment and incubated at 37 °C for 24 hours, after which a small amount of cells were removed and diluted in 0.9% NaCl and adjusted in a spectrophotometer (600 nm) to a concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/mL ( $5 \times 10^4$  CFU/ $\mu$ L well).

#### Solution preparations for Biofilm assays

Product solutions were prepared through a 20mg and 2mg dilution for each extract, with concentrations ranging from 2mg/mL to 0.2mg/mL. 0,12% Chlorhexidine gluconate (Kley) was used as the standard reference antibiofilm.

#### Biofilm formation induction

Induction was performed according to the methodology by Trentin et al.<sup>23</sup> with some modifications. For biofilm production, 96-well microdilution plates were used. 20  $\mu$ L of 0.85% NaCl, 20  $\mu$ L of the bacterial inoculum and 160  $\mu$ L of the brain-heart infusion (BHI) broth medium were added to each well and were incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the contents were removed and the dishes were washed three times with sterile 0.85% saline with the biofilms being fixed by incubating at 55 °C for 1h.

#### Biofilm formation evaluation

Biofilm formation using isolates were evaluated by the Violet Crystal method described by Stepanovic et al.<sup>24</sup> in different culture medium and formation surfaces using microtiter plates. Through optical density (OD) readings, average absorbance values were determined for each sample (ODa), compared to the absorbance of the sterility control (ODc). Samples were classified as strongly ( $4x ODc < ODa$ ), moderately ( $2x ODc < ODa < 4x ODc$ ) and weakly ( $ODc < ODa < 2x ODc$ ) biofilm forming agents. Isolates presenting absorbance values equal to or lower than the control were classified as non-biofilm producers.

#### Biofilm treatment

After biofilm preparation, 20  $\mu\text{L}$  of the different extract concentrations and of chlorhexidine gluconate were added to the microtiter plate with 20  $\mu\text{L}$  of the bacteria and 160  $\mu\text{L}$  of the brain-heart infusion broth (BHI) growing media. The plate was incubated for 24 h at 37°C, where the contents were removed after incubation and the plate was washed three times with 0.85% saline solution, incubated at 55°C for 1 h, and colored with 0.4% CV for 15 min. This was subsequently washed three times with saline solution and eluted in ethanol (100%). The reading was performed with an absorbance of 570 nm.

### Statistical analysis

Statistical analysis were performed using the software *Graphpad Prism*, v. 5.0. Data were analyzed using the arithmetic mean of the absorbances obtained from each extract for each bacterium in up to 8 replicates. Data were subsequently analyzed using a one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ; \* $P < 0.1$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ), followed by Tukey's post-hoc test. Each variable was compared to the biofilm growth control and chlorhexidine gluconate.

## **Biofilm Production Evaluation and *Candida* genus eradication**

### **Used strains**

Standard lineages were obtained from the Oswaldo Cruz Culture Collection (FIOCRUZ) of the Brazilian Institute of Quality Control in Health (INCQS). *Candida albicans* INCQS 40006, *Candida tropicalis* INCQS 40042 and isolated strains were obtained from the Culture collection of the Federal University of Pernambuco - URM (Recife Mycology University) *Candida albicans* URM 4387, *Candida tropicalis* URM 4262. The strains were inoculated in Sabouraud Dextrose Agar (SDA, KASVI) and incubated for 24 h at 37 °C. An initial suspension was subsequently prepared in 5 mL of sterile saline solution (NaCl, 0.85% saline) and its density was adjusted according to the 0.5 MacFarland scale with 90% transmittance determined by spectrophotometry, using a wavelength of 530 nm. This provides a standard yeast concentration containing from  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  cells per mL.

### **Preparation of solutions for biofilm assays**

Products solutions were prepared through dilution of 0.15g of each extract followed by further dilution in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany). The tested



concentrations varied from 16.384 $\mu$ g/mL to 128 $\mu$ g/mL. Fluconazole (Pfizer) was used as reference antifungal drug with concentrations varying from 64 $\mu$ g/mL to 0.5 $\mu$ g/mL.

### **Qualitative evaluation of *Candida* spp. biofilm development**

Qualitative evaluation of biofilm formation capacity was performed using the visual method adapted from Shin et al.<sup>25</sup> After seeding the isolates in Sabouraud agar medium and preparing the suspensions as described above, 20 $\mu$ L were inoculated into 180 $\mu$ L of liquid Sabouraud contained in the microplate wells, which were maintained at 35°C for 24h and 48h without shaking. The contents were then aspirated and the wells were washed with distilled sterile water and a Fuchsin dye (QEEL-Specialized Chemistry Erich Ltda.) was added to perform the evaluation according to the intensity of the staining. Staining was evaluated visually and classified as follows: 1) Strongly stained: when the biofilm was intensely stained allowing the correct determination of the contour of the areas containing the biofilm; 2) Average staining: when the biofilm was stained more weakly but still allowed the determination of the contour of the areas containing the biofilm; 3) Poor staining: when the biofilm was not stained making it impossible to distinguish the color of the plate and the characteristic colour of the stain. The interpretation represented a strong, moderate and weak biofilm formation activity, respectively.

### **Biofilm formation induction**

96-well microdilution plates were used for biofilm production where, 20  $\mu$ L of the suspensions were transferred to microplate wells containing 180  $\mu$ L of YPD (*Yeast extract - Peptone-Dextrose*). The plates were incubated at 37°C for 48 hours. Following the incubation time, the wells were carefully aspirated and washed twice with 200 $\mu$ L of PBS buffer.

The prewashed wells were stained with 110  $\mu$ L of 0.4% aqueous violet crystal solution for 45 min. Thereafter, they were washed three times with 200  $\mu$ L of ultrapure sterile water (Milli-Q) and the biofilm was discoloured using 200  $\mu$ L ethanol for 45 minutes. At the end, 100  $\mu$ L from each well were transferred to a new microplate and biofilm formation was evaluated using the optical density difference between the biofilm formed and the control well, by reading the absorbance in a spectrophotometer adjusted with a wavelength of 595 nm. Each strain was tested three times and the absorbance values of the control well were subtracted from the tested wells to minimize interference.<sup>26</sup>

### Biofilm treatment

Biofilms were formed onto microdilution plates, as aforementioned. After a 48h period, wells with biofilms were filled with 200µL of the eight *Ziziphus joazeiro* (EAFZJ and EACCZJ) aqueous extracts and Fluconazole serial dilutions. The extracts and standard drug were diluted in RPMI 1640 to achieve each concentration. Untreated biofilm wells and biofilm free wells were included as positive and negative controls respectively. The microdilution plates were incubated for 24 h and 48 h at 35 °C. After each period, the biofilm was quantified as previously described.<sup>27</sup>

### Statistical analysis

For statistical analysis, the *Graphpad Prism* v. 5.0. software was used. Data were analyzed using the arithmetical mean from triplicates for each tested concentration and posteriorly analysed using a two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ;  $*P < 0.1$ ;  $****P < 0.0001$ ), comparing values for each extract concentration, point by point, using Bonferroni's post-hoc test. A general behaviour comparison for each substance against the tested strains was inferred through the already cited analysis.

## RESULTS

Aqueous extract production from the stem and leaves presented a yield of 9.51% and 8.54%, respectively.

EAFZJ and EACCZJ phytochemical characterization saw the presence of secondary metabolite classes common to both extracts such as flavonoids (leucoanthocyanidins, flavones, flavonols, flavononols, flavonones, xanthones, catechins), steroids and saponins. In particular, phenols, condensed tannins and alkaloids were observed in the EAFZJ.

Table 1 and Figure 1 show the biofilm formation capacity of the tested bacterial strains, including *Escherichia coli* which presented minimal biofilm formation, being eliminated during treatment assays.

In the *Streptococcus mutans* biofilm eradication (Fig. 2), the extracts presented a lower biofilm growth percentage than the growth control at all concentrations used. Treatment with EAFZJ and EACCZJ at a concentration of 0.2 mg/ml inhibited biofilm mass by 46.4% and

48.5%, respectively, presenting a similar action than chlorhexidine gluconate, with an inhibition of 46.8%.

The 0.2 mg/ml EAFZJ concentration was the only one which presented biomass reduction compared to the growth control against *Enterococcus faecalis* (Fig. 3) biofilms; however, its inhibition was not significant, when compared to chlorhexidine.

As for *Staphylococcus* biofilm treatment (Fig. 4), a significant inhibitory extract effect was observed against *Staphylococcus epidermidis* biofilms, when compared to the growth control, with 0.2 mg/ml EAFZJ and EACCZJ concentrations inhibiting biofilm mass by 40% and 36.5%, respectively. However, these did not present a significant result when compared to the standard reference drug, chlorhexidine gluconate, which inhibited 74.5% of biofilm formation.

Results from the extracts' influence on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation are shown in figure 5. All extract concentrations used in the treatment presented significant results against the positive control, with 2 mg/ml EAFZJ and EACCZJ concentrations inhibiting biofilm formation by 45.8% and 45.3%, and the 0.2 mg/ml concentrations inhibition biofilm formation by 46.4% and 73%. EACCZJ biofilm mass inhibition approached the inhibition of chlorhexidine gluconate, which showed a reduction of 80%.

The EAFZJ eradication results demonstrate bacterial biofilm mass inhibition, however, biofilms were more susceptible to the EACCZJ extract, which presented higher inhibition numbers and an action similar to that of chlorhexidine gluconate against the tested strains.

The biofilm formation capacity of clinical *Candida spp* isolates are shown in Table 2, with the interpretation being performed taking into account colour intensity.

Figure 6 presents the biofilm induction results obtained based on optical density values, with all yeast isolates being capable of forming biofilms within 24 and 48 hours, with different intensities. *C. tropicalis* isolates presented, when statistically compared to others, a higher capacity for biofilm production URM 4262 (2.494 nm) and INCQS 40042 (2.487 nm), followed by *C. albicans* INCQS 40006 (1.780nm) and URM 4387 (1.873nm).

Treatment of biofilms formed by *C. albicans* (Fig. 7) isolates demonstrate significant inhibition (58.8%) by the EACZJ against the INCQS 40006 strain, 24h, at the lowest concentration, when compared to the EAFZJ (14.6%). At 48h, inhibition using both EAFZJ concentrations is noticeable, with the effect at the highest concentration standing out, obtaining

an inhibition value of 94.4% (59.9% for the EACZJ; 72.2% for fluconazole). For URM 4387 isolates, inhibition occurs only in the 24h biofilm formation assays, using a concentration of 128  $\mu\text{g/mL}$ ; the EACZJ presented a percentage inhibition of 61.1%, being statistically the best result when compared to the EAFZJ (8.7%) and fluconazole (10.6%). At the 16.384  $\mu\text{g/mL}$  concentration, an inversion of the results was observed with the EAFZJ standing out against the EACZJ, obtaining an 88.4% inhibition, a result similar to the standard drug (99.1%).

Figure 8 shows the *C. tropicalis* biofilm formation results for the INCQS 40042 strain, 24 h, with biofilm reduction occurring at the lowest and highest EACZJ concentrations, inhibiting biofilm formation by 59.1% and 74.4%, respectively. Thus presenting significant inhibition when compared to EAFZJ (7.9% and 38.9%) and the conventional antifungal (25.5% and 69.3%). In the 48 hours assay, the lowest EAFZJ concentration induced an inhibition of 75.5%, standing out from the EACZJ (35.1%) and fluconazole (25.5%). Treatment with the URM 4262 isolate was statistically relevant at 24h with the 128  $\mu\text{g/mL}$  concentration, where the EACZJ reduced biofilm biomass by approximately 90.5%.

With the results in mind, the EAFZJ presented a greater biofilm formation inhibition in the 48h assays, that is, in mature biofilms, whereas the EACZF acted in intermediate biofilms formed within 24h. In addition, the EACZJ inhibitory actions over biofilms formed by *Candida* isolates, occurred in greater numbers when compared to the EAFZJ.

## DISCUSSION

Phytochemical analysis using *Ziziphus joazeiro* leaves, bark and stem bark extracts report the presence of flavonoids, alkaloids, steroids, tannins, saponins, carbohydrates and cellulose.<sup>28-31</sup>

Several phenolic compounds such as flavonoids, tannins and saponins, present antimicrobial activity and act as fungal and bacterial biofilm formation inhibitors and biomass inhibitors.<sup>32-33</sup>

The probable secondary metabolite antimicrobial and antibiofilm mechanisms of action are listed as cytoplasmic membrane trauma, effective inhibition of cell metabolism enzymes and microbial aggregation inhibition.<sup>34</sup>

Bacterial biofilm formation capacity is determined by the particulars of each species and by a variety of adhesion site factors.<sup>35</sup>Albano et al.<sup>5</sup> cite *Staphylococcus epidermidis*,

*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* as species with a high proliferation capacity in medical devices and biofilm development, within clinically relevant biofilm formation bacterial strains.

*Candida* spp. biofilm formation is species-dependent, this meaning, biofilm formation is conditioned to the species type and environmental conditions, where *Candida albicans* and non-*albicans* strains create biofilms in a similar way, though with well-defined characteristics.<sup>36</sup> *Candida albicans* and *Candida tropicalis* are the *Candida*'s species which most form biofilms.<sup>37</sup>

*C. albicans* isolates possess thicker and less compact biofilms, with the presence of yeasts in basal parts and filamentous forms in superior parts.<sup>10</sup> *C. tropicalis* biofilms are an agglomerate of cells and filaments, with these differences contributing to the pathogenic potential of each lineage.<sup>38</sup>

The biofilm formation process in *Candida* spp. is separated into three steps: an initial, intermediary and a mature phase. In the mature phase, specifically within 48 hours, the entire biofilm is covered by the polymeric extracellular matrix and displays a three-dimensional growth, where all resistance mechanisms are established and active in this phase.<sup>39</sup>

With respect to biofilm inhibition, the results support the ethnopharmacological data highlighting the use of the *Ziziphus joazeiro* stem barks by the community as toothpaste.<sup>17</sup> In contrast, studies carried out with *Ziziphus joazeiro* aqueous bark extracts<sup>40</sup> and leaf essential oils<sup>41</sup> were not active against bacterial and fungal biofilms.

Some studies cite the antimicrobial activity of *Ziziphus joazeiro*,<sup>14-29-42-43</sup> however, it is important to note that to reduce biofilm biomass, inhibitory concentrations of up to ten times greater than the usual concentrations needed to inhibit planktonic cells<sup>44</sup> are necessary.

In view of the bacterial biofilm eradication results, the 0.2 mg/ml concentration presented the highest biofilm formation inhibition, when compared to the 2 mg/ml concentration, probably due to a higher nutrient subsidy present in the higher extract concentrations, such as proteins and polysaccharides, which instead of reducing, contribute to biofilm development and formation.<sup>3</sup>

Among the extracts, the EACCZJ presented greater *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* inhibition, inhibiting similarly or superiorly, when compared to chlorhexidine gluconate. Chlorhexidine is an antimicrobial agent with a broad spectrum against gram-positive and gram-negative bacteria, yeast, dermatophytes and some viruses.<sup>45</sup>

Chlorhexidine gluconate is one of the most popular antiseptics used in the prevention and inhibition of caries and gingivitis at concentrations ranging between 0.12% and 2%. Its action against biofilms consists of microbial lysis, due to cellular permeability modifications or coagulation of bacterial cytoplasmic compounds, in addition to reducing microbial adhesion to contact surfaces.<sup>46-47</sup>

The significant EACCZ treatment results against some biofilm strains may be associated with its chemical composition, especially secondary metabolites, such as saponins. These have antimicrobial, insecticide and molluscicide properties, in addition to interacting with bacterial membrane lipids and consequently increasing cellular permeability through channel formation and/or membrane rupture.<sup>42-48</sup>

Microscopy and biochemical studies performed by Parai et al.<sup>49</sup> indicate *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm eradication may be associated with the loss of extracellular polymer substances present in the bacterial biofilm matrix and alterations in cell membrane integrity of the bacterial strains by saponins. The action of saponins in mature *Candida albicans* biofilm eradication is reported by Sadowska et al.<sup>50</sup>, who highlight a cellular wall instability and reduced yeast adherence during biofilm formation.

When comparing isolated yeast biofilm formation periods, almost no biofilm biomass inhibition was noticed in the 48h period with the highest concentration (16.384 µg/mL). According to Gutierrez et al.<sup>51</sup>, a lower biomass reduction and/or biofilm increase when exposed to an extract, is a specificity of yeast species, which produce marked filamentation in an attempt to defend and enhance its virulence, to overcome stress and death by the presence of these natural products.

The phytochemical extract composition is another factor, which may contribute nutrients for extracellular matrix development, thus guaranteeing greater biofilm resistance. The matrix from *Candida* species consists mainly of carbohydrates, proteins, phosphate and hexosamines; the *Ziziphus joazeiro* aqueous extract possesses a considerable amount of carbohydrates.<sup>18</sup>

A study performed by Paula-Mattiello et al.<sup>52</sup>, using *C. parapsilosis* biofilms formed between 6, 12 and 24 hours showed cell viability loss when these were treated with ketoconazole, while biofilms from the same species were resistant to this antifungals after a 48h period, thus showing a greater structural complexity of the mature biofilm.

The treatment of mature biofilms by standard drugs and natural substances are mostly ineffective, which is probably due to the complexity and resistance of their structure, such as the extracellular matrix, which acts as a barrier neutralizing substances and the presence of resistant cells at high concentrations, the *persisters*, which collaborate with the resistance and insistence of fungal biofilm infections.<sup>53</sup>

Thus, it is important to highlight the EAFZJ result, which showed a significant inhibition against *Candida* biofilms formed within 48 h, this reduction being relevant given it shows a change in mature biofilm susceptibility and resistance. The phytochemical composition of the leaf extract revealed the presence of condensed tannins which, in mature *Candida* sp. biofilms, can interact with polysaccharides, inactivating enzymes responsible for maintaining the extracellular matrix, thus reducing biofilm mass and cell surface hydrophobicity.<sup>54-55</sup>

## CONCLUSION

Eradication of fungal and bacterial biofilms using the *Ziziphus joazeiro* aqueous extracts indicate a biofilm inhibition effect for both fungi and bacteria. Moreover, results support the ethnopharmacological knowledge regarding *Ziziphus joazeiro* stem bark usage by community. The EACCZJ presented more effective results against biofilms than the EAFZJ, obtaining inhibition values similar to standard drugs. Additionally, the EAFZJ presented significant eradication of mature yeast biofilms, at the lowest concentrations, thus demonstrating its potential in modifying microbial resistance susceptibility. Lastly, further studies addressing the mechanisms of action of the aforementioned extracts against biofilms are necessary.

## Acknowledgements

We thank to Laboratory of Medical Mycology Sylvio Campos and the Center of Biological Sciences and Department of Biochemistry, University Federal of Pernambuco, for their partnership in biofilm assays.

## Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

1. Messi P. Biofilm formation, development and relevance. editors Biofilm in bioengineering. Hauppauge, New York: Nova Science, 2013.

2. Condò C, Anacarso I, Sabia C, Iseppi R, Anfelli I et al. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Nat Prod Res.* 2018; 13:1-8.
3. Cerca N, Azevedo NF. Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria. Braga, Porto: Publindústria, 2012.
4. Pelling H, Nzakizwanayo J, Milo S, Denham EL, MacFarlane WM et al. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol.* 2019.
5. Albano M, Crulhas BP, Alves FCB, Pereira AFM, Andrade BFMT et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microb Pathog.* 2019; 126: 231-238.
6. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 2018; 12:10-67.
7. Jiang T, Li M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2013; 7:867-894.
8. Santana DP, Ribeiro TF, Ribeiro EL, Aquino GLB, Naves PLF. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2015; 36:83-90.
9. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot J L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 979-986.
10. Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Faleiro PL. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2013; 12:229-233.
11. Nagy F, Tóth Z, Bozó A, Czeglédi A, Rebenku István et al. Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Med Mycol.* 2018; 0: 1-9.
12. Bona EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq Inst Biol.* 2014; 81:218-225.



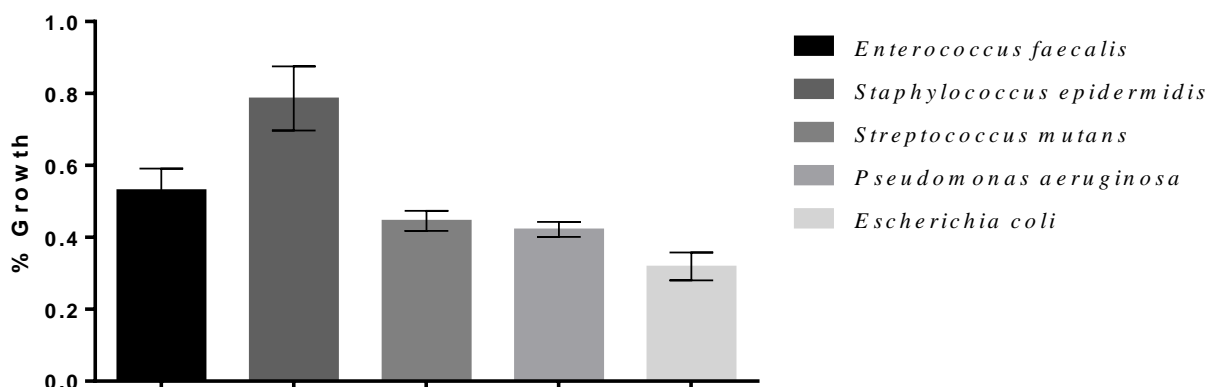
13. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa – São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
14. Cruz MCS, Santos PO, Barbosa Jr AM, Melo D LFM, Alviano CS, et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111:409-412.
15. Lorenzi HE. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa – São Paulo: Instituto Plantarum, 2009.
16. Santos MO. Efeito do Anelamento do caule sobre as relações fonte-dreno em plantas de *Inga vera* WILLD. Dissertação – Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Lavras, Minas Gerais. Brasil, 2009.
17. Cavalcanti MT, Silveira DC, Florêncio IM, Feitosa VA, Eller SCWS. Obtenção da farinha do fruto do juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e Teor de caracterização físico-química. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.* 2011; 6: 220-224.
18. Dantas FCP, Tavares MLR, Targino MS, Costa AP, Dantas FO. *Ziziphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae: características biogeoquímicas e importância no bioma Caatinga. *Res principal.* 2014; 25: 51-57.
19. Dutreix L, Bernard C, Juin C, Imbert C, Girardot M. Do raspberry extracts and fractions have antifungal or anti-adherent potential against *Candida* spp.? *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52: 947-953.
20. Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. terceira ed. Fortaleza, Ceará: Editora UFC, 2009.
21. Matos FJA. Farmácias vivas. 4 ed. Fortaleza: Editora UFC. P. 36-40, 2002.
22. Campbell MK, Shawn OF. Biochemistry. (4<sup>th</sup> ed.) Singapore: Thomson Asia pte Ltd, 2005.
23. Trentin DS, Giordani RB, Zimmer KR, Silva AG, Silva MV et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137:327-335.
24. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40:175-179.
25. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 40; 1244–1248.

26. Melo AS, Bizerra FC, Freymuller E, Arthington-Skaggs, BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. Isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011; 49: 253- 62.
  
27. Prazinska M, Gospodarek E. In vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* biofilm formation. *Mycopathologia.* 2002; 177:19-27.
  
28. Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, Vidoti GJ, Oliveira AJB. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Rev bras farmacogn.* 2008; 18:627-641.
  
29. Silva TCDL, Almeida CCBR, Veras Filho J, Peixoto Sobrinho T, Amorin ELC et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2011; 32:193-199.
  
30. Melo MSF, Rocha CQ, Santos MH, Chavasco JM, Chavasco JK. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Ziziphus joazeiro* Mart. *Rev Universidade do Vale Verde.* 2012; 10:43-51.
  
31. Brito SM, Coutinho HD, Talvani A, Coronel C, Barbosa AG et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. *Food Chem.* 2015; 1:185-191.
  
32. Xing M, Shen F, Liu L, Chen Z, Guo N et al. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Lett Appl Microbiol.* 2012; 54:475-482.
  
33. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013; 19:256-265.
  
34. Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob.* 2011; 38:99-107.
  
35. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, HOOK M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12:49-62.
  
36. Henriques A, Negri M, Silva S. O impacto clínico de biofilmes de espécies de *Candida*. In: *Biofilmes na saúde, no meio ambiente, na indústria.* Braga, Porto: Publindústria, 2012.
  
37. Mohammed A, Al-Fattani L, Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006; 5: 999–1008.

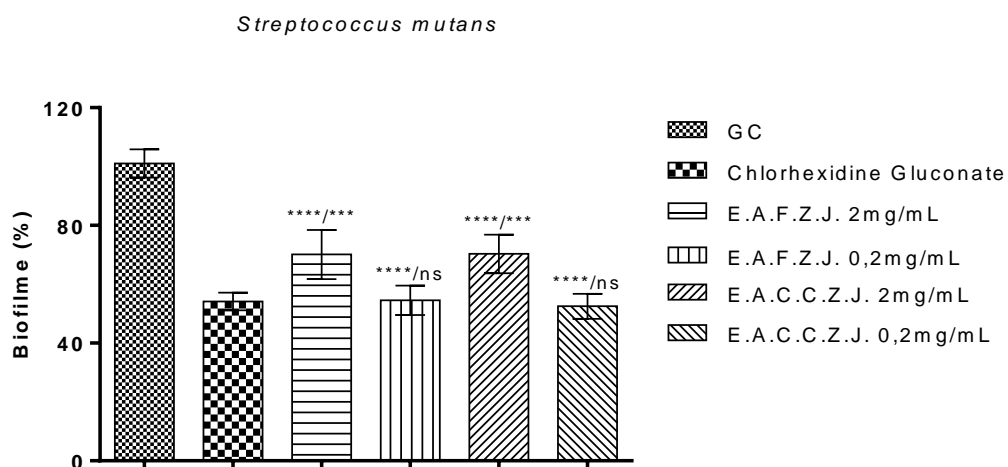
38. Negri M, Silva S, Henriques M, Azeredo J, Svidzinski T et al. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. *Med Mycol.* 2011; 49:739-47.
39. Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petraitis V, Walsh TJ. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clin Infect Dis.* 2015; 6:618-621.
40. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CG, Antonioli AR, Alviano C et al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol* 2008; 53:545-52.
41. Bersan SM, Galvão LC, Goes VF, Sartoratto A, Figueira GM et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement Altern Med.* 2014;18: 441-451.
42. Ribeiro BD, Alviano DS, Barreto DW, Coelho MAZ. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2013; 436:736– 743.
43. Scorzoni L, Sangalli-Leite F, Lacorte SJ, Paula SAC, Costa-Orlandi CB et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *J Microbiol Methods.* 2016; 123: 68-78.
44. Bueno, J. Anti-biofilm Drug Susceptibility Testing Methods: Looking for new strategies against resistance mechanism. *J of Microbial and Biochemical Technology.* 2014; 3:1-9.
45. Sakaue Y, Takenaka S, Ohsumi T, Domon H, Terao Y et al. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2018; 18:1-7.
46. Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P et al. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. *Int J Dent Hyg.* 2013;11:35–40.
47. Kohli D, Hugar SM, Bhat KG, Shah PP, Mundada MV et al. Comparative evaluation of the antimicrobial susceptibility and cytotoxicity of husk extract of *Cocos nucifera* and chlorhexidine as irrigating solutions against *Enterococcus Faecalis*, *Prevotella Intermedia* and *Porphyromonas Gingivalis* - An *in-vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2018; 36:142-150.

48. Khan I, Abdulatef A, Jin HS, Jun SB, Min YK et al. Green Tea Seed Isolated Saponins Exerts Antibacterial Effects against Various Strains of Gram Positive and Gram Negative Bacteria, a Comprehensive Study In Vitro and In Vivo Muhammad. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2018; 12:1-12.
49. Parai D, Islam E, Mitra J, Mukherjee SK. Effect of Bacoside A on growth and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* 2017; 63:169-178.
50. Parai D, Islam E, Mitra J, Mukherjee SK. Effect of Bacoside A on growth and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* 2017; 63:169-178.
51. Trigo-Gutierrez JK, Sanitá PV, Tedesco AC, Pavarina AC, Mima EGO. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 24:212-219.
52. Paula-Mattiello S, Oliveira Sd, Medina-Silva R. In vitro evaluation of hydrolytic enzyme activity and biofilm formation of *Candida parapsilosis* species complex from a nosocomial environment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50: 558-561.
53. Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog.* 2018; 8;1-14.
54. Morey AT, Souza FC, Santos JP, Pereira CA, Cardoso JD et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Curr Pharm. Biotechnol.* 2016.; 17: 365-75.
55. Dutreix L, Bernard C, Juin C, Imbert C, Girardot M. Do raspberry extracts and fractions have antifungal or anti-adherent potential against *Candida* spp.? *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 52:947-953.

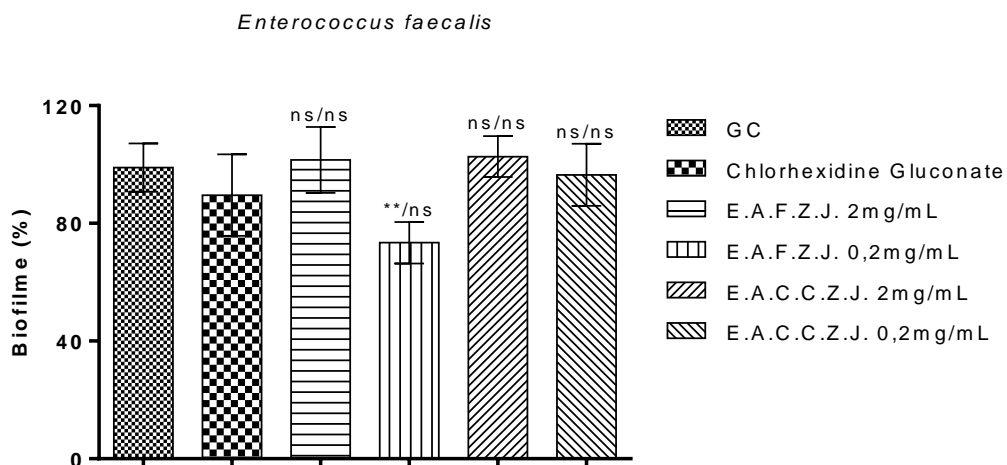
## Figures



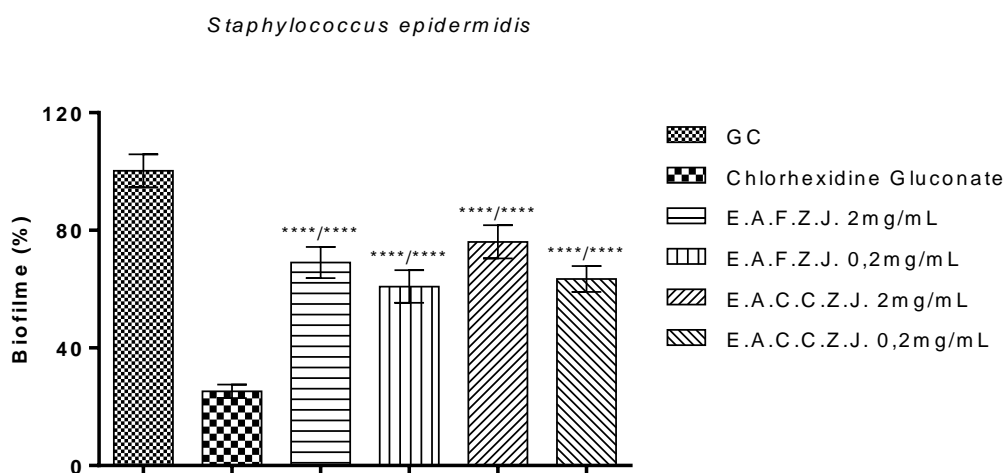
**Figure 1.** Capacity of biofilm formation by bacterial strains by (% ) growth.



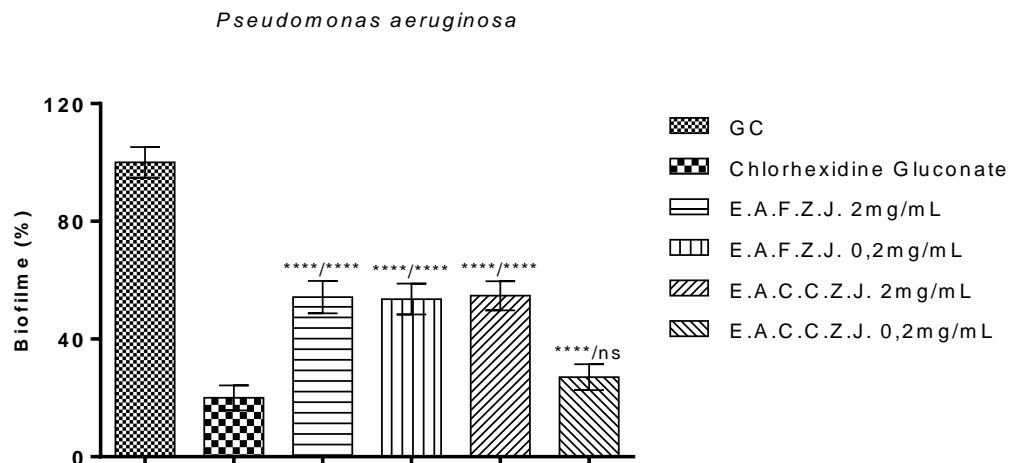
**Figure 2.** Eradication of *Streptococcus mutans* biofilm by aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro*, compared to 12% chlorhexidine gluconate. On the columns are the statistical relevance of the substance in relation: growth control / chlorhexidine gluconate.  $p < 0.05$ ; \* ( $p > 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ); ns = not significant. GC. Growth control. E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.



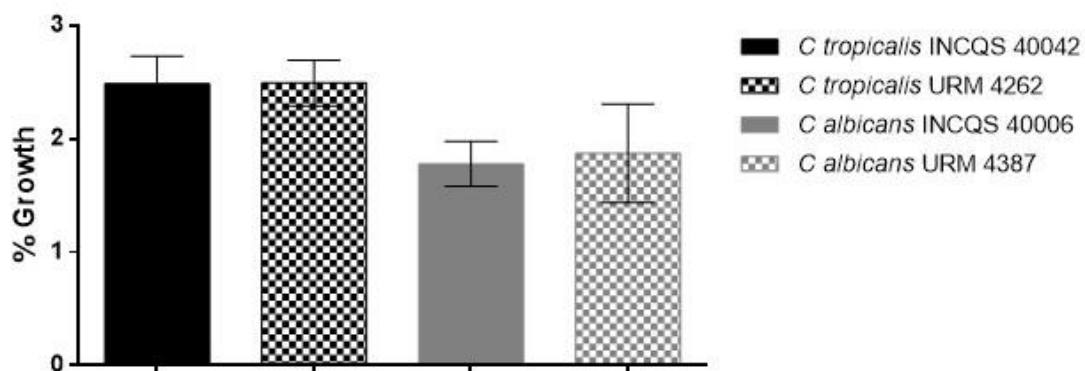
**Figure 3.** Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilm by aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro*, compared to 12% chlorhexidine gluconate. On the columns are the statistical relevance of the substance in relation: growth control / chlorhexidine gluconate.  $p < 0.05$ ; \* ( $p > 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ); ns = not significant. GC. Growth control. E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.



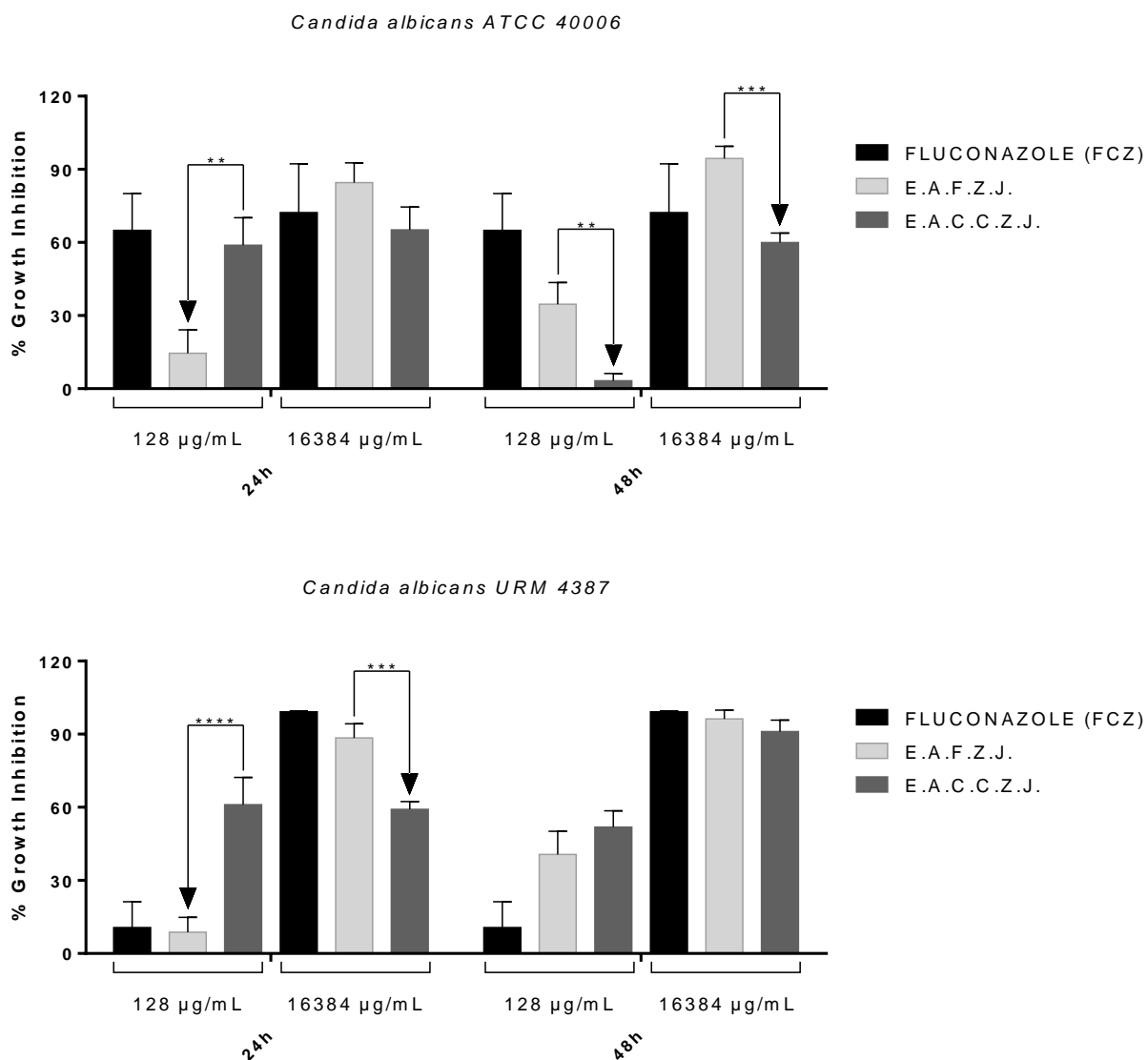
**Figure 4.** Eradication of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro*, compared to 12% chlorhexidine gluconate. On the columns are the statistical relevance of the substance in relation: growth control / chlorhexidine gluconate.  $p < 0.05$ ; \* ( $p > 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ); ns = not significant. GC. Growth control. E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.



**Figure 5.** Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro*, compared to 12% chlorhexidine gluconate. On the columns are the statistical relevance of the substance in relation: growth control / chlorhexidine gluconate.  $p < 0.05$ ; \* ( $p > 0.01$ ); \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ); ns = not significant. GC. Growth control. E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.

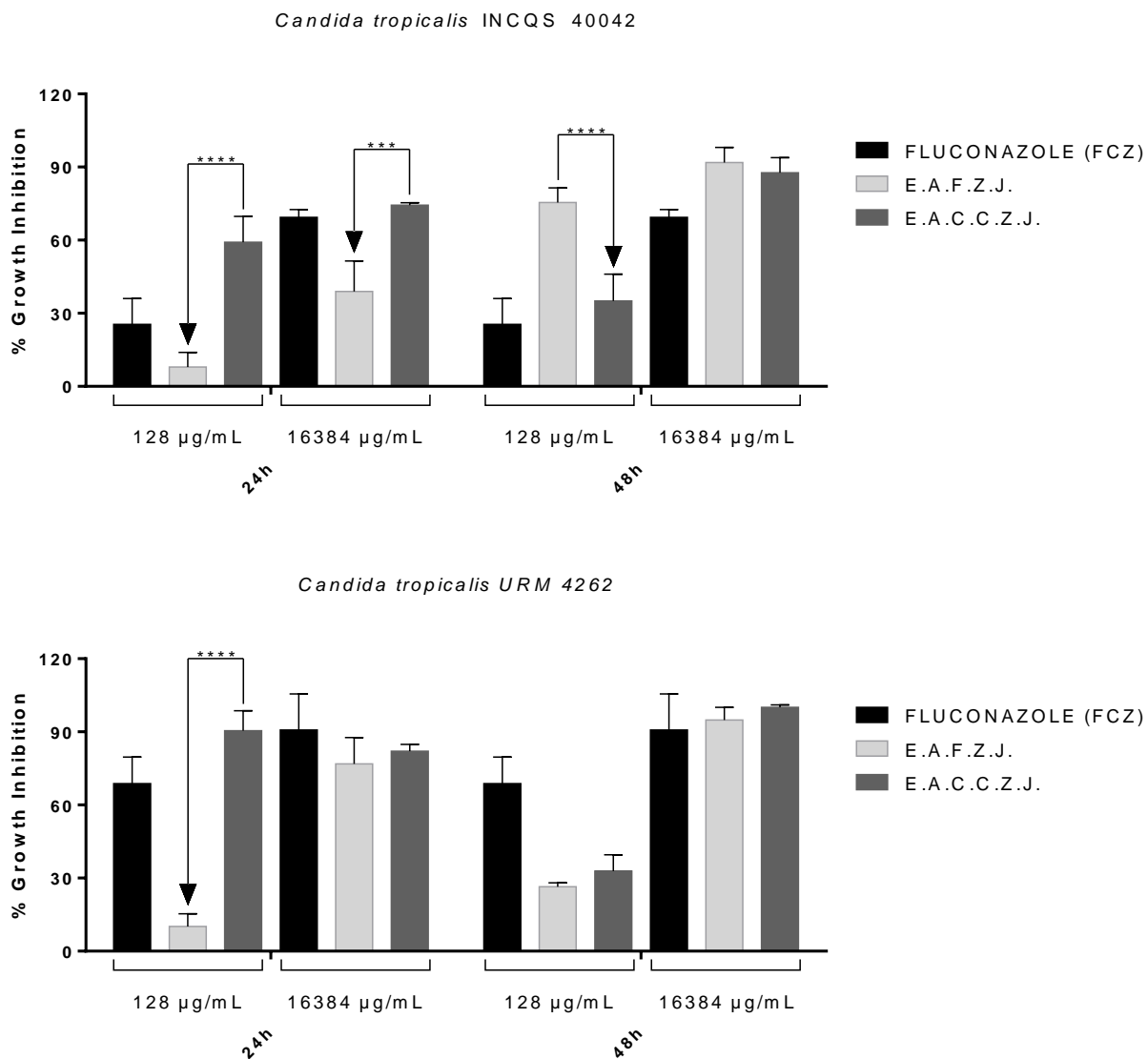


**Figure 6.** Biofilm formation of clinical isolates of *Candida* spp.



**Figure 7.** Inhibition of biofilm formation (%) of isolates *Candida albicans*, in 24 and 48 hours, by treatment of the aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* Mart. Compared with the antifungal standard fluconazole. (\*  $P < 0.1$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ). E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.





**Figure 8.** Inhibition of biofilm formation (%) of isolates *Candida tropicalis*, in 24 and 48 hours, by treatment of the aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* Mart. Compared with the antifungal standard fluconazole. (\* P < 0.1; \*\*\*\* P < 0.0001). E.A.F.Z.J. Aqueous extract of the leaves of *Ziziphus joazeiro*. E.A.C.C.Z.J. Aqueous extract of the bark of the stems of *Ziziphus joazeiro*.

**Table****Table 1.** Evaluation of bacterial biofilm formation by optical density (570 nm)

<b>Clinical isolates</b>	<b>Biofilm formation</b>
<i>Streptococcus mutans</i> INCQS 00446 (ATCC 25175)	Moderate
<i>Enterococcus faecalis</i> INCQS 00018 (ATCC 14506)	Moderate
<i>Staphylococcus epidermidis</i> INCQS 00016 (ATCC 12228)	Strong
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Moderate
<i>Escherichia coli</i> ATCC 259223	weak

\*INCQS - Brazilian Institute of Quality Control in Health.

**Table 2.** Evaluation of biofilm formation by violet crystal method.

<b>Clinical isolates</b>	<b>Biofilm formation</b>
<i>Candida albicans</i> INCQS 40006	Strong
<i>Candida albicans</i> URM 4387	Moderate
<i>Candida tropicalis</i> INCQS 40042	Strong
<i>Candida tropicalis</i> URM 4262	Strong

\*INCQS - Brazilian Institute of Quality Control in Health.; URM - *University Recife Mycology*

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Principais Conclusões

Joazeiro, *Ziziphus joazeiro*, é uma das plantas endêmicas da Caatinga mais exploradas pelo homem, sendo notório o valor terapêutico que possui em várias práticas medicinais. Analisando as hipóteses que direcionaram esse trabalho chegamos as seguintes considerações:

Os extratos aquosos das folhas e das cascas do caule de *Z. joazeiro* apresentam resultados parcialmente significativos contra a atividade microbiana, a saber: i) frente às bactérias gram-positas e gram-negativas ambos não demonstraram atividade antibacteriana direta, embora associados a antibióticos tenham apresentado atividade modulatória significativa; ii) na avaliação da atividade antiparasitária, o EACCZJ demonstrou ação inibitória contra formas promastigotas; iii) nos ensaios antifúngicos, novamente o EACCZJ se destacou, apresentando efeito fungistático frente às cepas de *Candida*, tendo ação equivalente à do Fluconazol.

Em relação a biofilmes microbianos, o extrato aquoso das folhas apresentou diminuição da biomassa de biofilme, principalmente fúngicos, no entanto não foi tão efetivo quando comparado a ação do EACCZJ, que apresentou resultados semelhantes as drogas padrões utilizadas.

Mesmo sendo uma espécie bastante conhecida, este estudo é o primeiro a relatar a análise de extratos de *Ziziphus joazeiro* por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC-QTOF). Contudo, a quantidade de compostos identificados no extrato das cascas, por esta análise, foi limitada pela grande presença de saponinas. Desta forma, investigações futuras com outras técnicas que possibilitem o isolamento e caracterização estrutural são necessários para elucidar maior quantidade de compostos químicos presentes nesses extratos.

Do ponto de vista do conhecimento etnofarmacológico, o uso das cascas do caule de Joazeiro para escovação dentária possui fundamentação científica, sendo comprovados os efeitos antimicrobianos e de diminuição de biofilmes bacterianos e fúngicos. Os mesmos efeitos não foram totalmente observados nos extratos das folhas, reforçando a escolha do caule pela população. Por fim, apesar de tais efeitos, mesmo apresentando resultados significativos frente aos ensaios realizados, o extrato da casca não apresentou ação superior às drogas padrões de referência.

## 6.2 ORÇAMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) por meio do Programa de Bolsa de Formação Acadêmica em nome de Jacqueline Cosmo Andrade (proc. BMD-0008000507.01.08/17). As despesas com material de consumo, reagentes e meios de cultura foram parcialmente financiadas pelo Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) com recursos no valor de R\$ 900,00. As demais despesas de custeio desta pesquisa foram financiadas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

# ANEXOS

---

ANEXO 1 – Comprovante de publicação no periódico *South African Journal of Botany*

South African Journal of Botany 123 (2019) 105–112



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sajb](http://www.elsevier.com/locate/sajb)

## UPLC-MS-ESI-QTOF characterization and evaluation of the antibacterial and modulatory antibiotic activity of *Ziziphus joazeiro* Mart. aqueous extracts



J.C. Andrade <sup>a,b</sup>, A.R.P. Silva <sup>a</sup>, A.T.L. Santos <sup>a</sup>, M.A. Freitas <sup>a</sup>, J.N.P. Carneiro <sup>a</sup>, M.I.P. Gonçalves <sup>b</sup>, A. de Souza <sup>b</sup>, T.S. Freitas <sup>a</sup>, P.R.V. Ribeiro <sup>c</sup>, E.S. Brito <sup>c</sup>, M.F.B. Morais-Braga <sup>a</sup>, H.D.M. Coutinho <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM, Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato (CE), Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Biossaios - LABIO, Universidade Federal do Cariri - UFCA, Instituto de Formação de Educadores, Campus Brejo Santo (CE), Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais-LMQPN, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 November 2018

Received in revised form 17 January 2019

Accepted 8 February 2019

Available online xxx

Edited by S Van Vuuren

#### Keywords:

Liquid chromatography

Bacterial resistance

Flavonoids

Synergism

### ABSTRACT

Plant extracts are defined as complex heterogeneous mixtures composed of diverse active ingredient categories which characterize their bioactivities. *Ziziphus joazeiro* Mart., belonging to the Rhamnaceae family, is an endemic caatinga species with a wide economic potential and application in medicine. In the search for new antibacterial drugs, due to the manifestation and development of bacterial antibiotic resistance mechanisms, medicinal plants, with their broad pharmacological aspects, have led to the development of several phytomedicines. With this in mind, the objective of the present study was to identify the chemical composition of the *Ziziphus joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts through the UPLC-QTOF-MS/MS method, as well as to verify their antibacterial and modulatory action. Cold extract maceration was used to prepare the *Z. joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts (AEL and AEB). The broth microdilution method was used for the antibacterial and modulatory activity evaluations. This study is the first to report on the *Ziziphus joazeiro* extract analyzes by ultra-performance liquid chromatography. The UPLC-MS-ESI-QTOF analysis revealed compounds already present in the *Ziziphus* genus. The extracts did not present antibacterial activity, however, they presented significant modulatory activity when combined with antibiotics. The results highlight the need for further detailed compound identification analysis and toxicity evaluation of these extracts.

© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plant extracts are defined as complex heterogeneous mixtures composed of diverse active ingredient categories, in addition to having different functional groups, which often characterize their bioactivities, such as secondary metabolites which represent many of the plant biological activities and adaptive processes (Barreto et al., 2005). Research on this subject and the identification of new molecules present in extracts are important and of great economic and pharmacological interest since many extracts have therapeutic potential (Yunes and Filho Cechinel, 2014).

*Ziziphus joazeiro* Mart., belonging to the Rhamnaceae family, is an endemic caatinga species and popularly known as “joazeiro”, “juá-babão”, “juá-de-boi”, “joazeiro” and “juá” (Carvalho, 2007; Prado and

Gibbs, 2003; Sousa et al., 2015). *Ziziphus joazeiro* possesses a wide economic potential and relevance for the northeastern back lands, being used as ornamental plants, as an energy source, in cosmetics manufacturing as well as in human and animal feeding, especially during dry periods, in addition to its application in popular medicine (Silva et al., 2011). Within its many biological activities, the antipyretic (Nunes et al., 1987), analgesic (Schühly et al., 1999), antioxidant, antibacterial (Alviano et al., 2008), antifungal (Cruz et al., 2007), antiparasitic (Gomes et al., 2016) and gastroprotective activities (Romão et al., 2010; Washida et al., 2007) stand out. Moreover, the species is frequently used in oral hygiene and for gingivitis treatment (Almeida et al., 2006).

Infections caused by pathogenic bacteria cause apprehension due to their high mortality, especially due to their sensitivity to treatment with commercially available antimicrobial drugs (Patey et al., 2018). Antibacterial therapy has been threatened by the manifestation and development of antibiotic resistance mechanisms. In general, bacteria have the genetic potential to acquire and transfer resistance to therapeutic drugs and therefore, jeopardize the antibiotic's ability to treat the most common infections among the population (Kraupner et al., 2018).

\* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Rua Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta 63105-000, Crato-CE, Brazil.

E-mail address: [hdmcoutinho@urca.br](mailto:hdmcoutinho@urca.br) (H.D.M. Coutinho).

## ANEXO 2 – Comprovante de publicação no periódico *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*

222

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2019; 9(5): 222–226



### Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

#### Original Article



doi: 10.4103/2221-1691.259003

www.apjtb.org

### Chemical composition, antiparasitic and cytotoxic activities of aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* Mart.

Jacqueline Cosmo Andrade<sup>1,2</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>1</sup>, Antônia Thassy Lucas dos Santos<sup>1</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>1</sup>, Yedda Maria Lobo Soares de Matos<sup>1</sup>, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga<sup>1</sup>, Camila Fonseca Bezerra<sup>1</sup>, Maria Isabeli Pereira Gonçalves<sup>2</sup>, Maria Celeste Vega Gomez<sup>3</sup>, Míriam Rolóm<sup>3</sup>, Cathia Coronel<sup>3</sup>, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>4</sup>, Edy Sousa de Brito<sup>4</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Biological Chemistry Department, Regional University of Cariri – URCA, Crato (CE), Brazil

<sup>2</sup>Bioassays Laboratory – LABIO, Federal University of Cariri – UFCA, Brejo Santo University campus (CE), Brazil

<sup>3</sup>Center for the Development of Scientific Research, Moisés Bertoni Foundation/Díaz Gill Laboratories, Asunción, Paraguay

<sup>4</sup>Natural Products Chemistry Multiuser Laboratory LMQPN, Embrapa Tropical Agroindustry, Fortaleza (CE), Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 17 January 2019

Revision 16 February 2019

Accepted 8 May 2019

Available online 28 May 2019

##### Keywords:

Antipromastigote

Antipromastigote

UPLC-MS-ESI-QTOF

#### ABSTRACT

**Objective:** To compare the *in vitro* antiparasitic activity of aqueous extracts from *Ziziphus joazeiro* leaves and stem bark against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, and *Leishmania infantum*, as well as to evaluate its cytotoxicity in mammalian cells, in addition to identifying the chemical composition of the extracts.

**Methods:** *Ziziphus joazeiro* leaf and stem bark aqueous extracts were prepared by cold extraction maceration and subjected to ultra-efficient liquid chromatography coupled to a quadrupole/time of flight system. The susceptibility assays used *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strains and promastigote forms of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* for antiparasitic activity of the extracts. Moreover, mammalian fibroblasts NCTC clone 929 were used for cytotoxicity analysis.

**Results:** Terpenoid compounds, flavonoids and phenolic acid were identified in extracts. The stem bark aqueous extracts presented more significant results in terms of antiparasitic activity compared with the leaf aqueous extracts, especially against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* promastigote forms with an  $IC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ . The cytotoxicity evaluation showed moderate toxicity of the stem bark aqueous extracts, which is relevant information for the rational use of this plant part since it is widely used by the population.

**Conclusions:** These preliminary results may contribute to the formulation of new therapeutic agents against this group of neglected diseases, so further investigations are required to delineate the mechanisms of action mainly of the aqueous extract of stem bark of *Ziziphus joazeiro*.

## 1. Introduction

Infectious diseases termed as neglected diseases are caused by parasitic or infectious agents which mainly affect populations living in conditions of poverty and social inequality. The World Health Organization (WHO) emphasizes that housing, food, poor sanitation

and lack of health care are the main causes of these diseases[1,2].

Leishmaniasis, malaria, dengue, Chagas disease, leprosy and tuberculosis can be highlighted as examples of neglected diseases[3].

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

©2019 *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Produced by Wolters Kluwer-Medknow. All rights reserved.

**How to cite this article:** Andrade JC, da Silva ARP, dos Santos ATL, Freitas MA, de Matos YMLS, Braga MFBM, et al. Chemical composition, antiparasitic and cytotoxic activities of aqueous extracts of *Ziziphus joazeiro* Mart. *Asian Pac J Trop Biomed* 2019; 9(5): 222-226.

✉Corresponding author: Henrique Douglas Melo Coutinho, Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Biological Chemistry Department, Regional University of Cariri – URCA, Crato–CE, Brazil.  
Tel: +55(88) 31021212  
Fax: +55(88) 31021291  
E-mail: hdmcoutinho@gmail.com



ANEXO 3 – Comprovante de aceite no periódico *Plos One*

9/25/2019

Gmail - PONE-D-19-12257R2: Final Decision Being Processed - [EMID:64b188587922d4d3]



Jacqueline Andrade &lt;andradejacquelinec@gmail.com&gt;

**PONE-D-19-12257R2: Final Decision Being Processed - [EMID:64b188587922d4d3]**

1 mensagem

**PLOS ONE** <em@editorialmanager.com>

11 de setembro de 2019 11:43

Responder a: PLOS ONE &lt;plosone@plos.org&gt;

Para: Jacqueline Andrade &lt;andradejacquelinec@gmail.com&gt;

You are being carbon copied ("cc:d") on an e-mail "To" "Henrique Douglas Melo Coutinho" [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)  
 CC: "Jacqueline Andrade" [andradejacquelinec@gmail.com](mailto:andradejacquelinec@gmail.com), "Antonia Santos" [thassyalucas@hotmail.com](mailto:thassyalucas@hotmail.com), "Ana Raquel Silva" [anaraquel\\_ar@hotmail.com](mailto:anaraquel_ar@hotmail.com), "Maria Freitas" [audbiologa@hotmail.com](mailto:audbiologa@hotmail.com), "Maria Gonçalo" [goncalobel@gmail.com](mailto:goncalobel@gmail.com),  
 "Maria Costa" [corrinha\\_live@yahoo.com.br](mailto:corrinha_live@yahoo.com.br), "Joara Carneiro" [nalyda\\_05@hotmail.com](mailto:nalyda_05@hotmail.com), "Nélio Vieira" [nelio.barreto@ufca.edu.br](mailto:nelio.barreto@ufca.edu.br), "Victor Zaia" [victor.zaia@fabc.br](mailto:victor.zaia@fabc.br), "Yedda Matos" [yedda.lobc@urca.br](mailto:yedda.lobc@urca.br), "Thiago Freitas" [thiagocrato@hotmail.com](mailto:thiagocrato@hotmail.com), "Amanda Souza" [amandakarine@leaosampaio.edu.br](mailto:amandakarine@leaosampaio.edu.br), "Maria Morais-Braga" [flavianamoraisb@yahoo.com.br](mailto:flavianamoraisb@yahoo.com.br)

Phytochemical characterization of the *Ziziphus joazeiro* Mart. essential oil metabolites by UPLC-QTOF and essential oil antifungal activity evaluation  
 PONE-D-19-12257R2

Dear Dr. Coutinho,

We are pleased to inform you that your manuscript has been judged scientifically suitable for publication and will be formally accepted for publication once it complies with all outstanding technical requirements.

Within one week, you will receive an e-mail containing information on the amendments required prior to publication. When all required modifications have been addressed, you will receive a formal acceptance letter and your manuscript will proceed to our production department and be scheduled for publication.

Shortly after the formal acceptance letter is sent, an invoice for payment will follow. To ensure an efficient production and billing process, please log into Editorial Manager at <https://www.editorialmanager.com/pone/>, click the "Update My Information" link at the top of the page, and update your user information. If you have any billing related questions, please contact our Author Billing department directly at [authorbilling@plos.org](mailto:authorbilling@plos.org).

If your institution or institutions have a press office, please notify them about your upcoming paper to enable them to help maximize its impact. If they will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team as soon as possible and no later than 48 hours after receiving the formal acceptance. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2 pm Eastern Time on the date of publication. For more information, please contact [onepress@plos.org](mailto:onepress@plos.org).

With kind regards,

Vivek K. Bajpai, PhD  
 Academic Editor  
 PLOS ONE

Additional Editor Comments (optional):

None

Reviewers' comments:

## ANEXO 4 – Comprovante de publicação no periódico *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 65 (2019) 226–233



Contents lists available at ScienceDirect

### Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)



#### Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)



Jacqueline Cosmo Andrade<sup>a,b</sup>, Ana Raquel Pereira da Silva<sup>a</sup>, Maria Audilene Freitas<sup>c</sup>, Bárbara de Azevedo Ramos<sup>d</sup>, Thiago Sampaio Freitas<sup>a</sup>, Franz de Assis G. dos Santos<sup>c</sup>, Melyna C. Leite-Andrade<sup>c</sup>, Michellângelo Nunes<sup>c</sup>, Saulo Relison Tintino<sup>a</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>d</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>d</sup>, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto<sup>e</sup>, Rejane P. Neves<sup>c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbiology and Molecular Biology – LMBM, University Regional of Cariri – URCA, Crato, CE Brazil

<sup>b</sup> Laboratory Bioassay – LABIO, University Federal of Cariri – UFCA, Institute of Educators Training, Campus Brejo Santo, CE, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Medical Mycology Sylvio Campos, University Federal of Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>d</sup> Center of Biological Sciences and Department of Biochemistry, University Federal of Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup> Department of Tropical Medicine, University Federal of Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Microbial biofilms  
Stem bark  
Ethnoknowledge  
Leaf  
Chlorhexidine gluconate  
Saponins

#### ABSTRACT

The aim of this study is to verify the action of the aqueous leaf extract *Ziziphus joazeiro* in the eradication of bacterial and fungal biofilms, and to compare these effects with the stem bark extracts, as well as with conventional standard drugs. The presence of secondary metabolites was observed through phytochemical propection assays. The effect of the aqueous extract on microbial biofilm formation was observed by OD600 nm absorbance and the crystal violet assay. For bacterial and fungal biofilms, chlorhexidine gluconate and fluconazole, respectively, were used as positive controls. Phytochemical characterization showed the presence of secondary metabolite classes common to both extracts such as flavonoids, steroids and saponins. In particular, in the aqueous leaf extract phenols, condensed tannins and alkaloids were observed. Eradication results using the aqueous leaf extract showed an inhibition of the microbial biofilm mass, moreover the biofilms were more sensitive to the bark extract, which presented a greater inhibition number and an action similar to standard drugs. It is important to highlight the leaf extract showed significant eradication at the lowest concentrations for mature yeast biofilms, thus demonstrating its potential to modify microbial resistance susceptibility. Bacterial and fungal biofilm eradication results using the *Ziziphus joazeiro* aqueous extracts presented a biofilm inhibition effect for both, moreover the results support the ethnopharmacological knowledge surrounding the use of *Ziziphus joazeiro* stems in the community. In comparison, the bark extract presented a more effective treatment than the leaf extract against biofilms, presenting inhibition levels similar to the used standard drugs.

#### 1. Introduction

Biofilms are microbial ecosystem complexes characterized by one or more microbial cell community, covered by an extracellular polymeric structure which adheres to a biotic and/or abiotic substrate [1,2].

This complex represents one of the main microbial resistance mechanisms, due to evolutionary advantages this confers to it, especially protection against extreme conditions, such as lack of nutrients, pH and temperature changes, free radicals and ultraviolet radiation, in addition to the action of antibiotics and even the action of the host's immune system [3].

Biofilm development is a serious healthcare concern given persistent infections, comprising roughly 80% or more of microbial infectious cases [4,5].

Bacterial infections caused by biofilm proliferation such as chronic, nosocomial and medical device associated infections, have an increased resistance to conventional antibiotics when compared to isolated infections [6]. Among the bacterial resistance mechanisms, biofilms induce physiological changes in response to scarcity, stimulate efflux pump expression, participate in *quorum sensing* and provides an environment for genetic interaction and transfer, thus contributing to the dissemination of tolerance mechanisms against various drugs of clinical interest [7].

\* Corresponding author at: Street Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta, 63105-000, Brazil.

E-mail addresses: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com), [hdmcoutinho@urca.br](mailto:hdmcoutinho@urca.br) (H.D. Melo Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.06.006>

Received 20 March 2019; Received in revised form 11 June 2019; Accepted 13 June 2019  
0147-9571/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## ANEXO 5 – Parecer com autorização da pesquisa pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)



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

Extrato do relatório Nº 23304 em PDF - Gerado em: 10/06/2018 as 12:06:31 horas

### Dados do pesquisador titular

Nome: Jacqueline Cosmo Andrade	Nacionalidade: Brasileira	CPF: 02052919376	Fone: (0xx88) 9978-7085	E-mail: andradejacquelinec@gmail.com
--------------------------------	---------------------------	------------------	-------------------------	--------------------------------------

### Dados da solicitação

Nº da solicitação: 55064	Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI	Tipo da solicitação: Autorização para atividades com finalidade científica
Título da solicitação: AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E DAS CASCAS DO CAULE DE Ziziphus joazeiro Mart. SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS DE INTERESSE CLÍNICO		

### Informações iniciais

Data da liberação das informações	09/06/2022
O projeto terá continuidade?	Sim
Realizou atividades de campo?	Sim

### Atividades

Descrição das atividades cadastradas
Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico

### Local x Táxons x Atividades x Destinos

BREJO SANTO-CE / Sítio Ipueiras - Zona Rural / Fora de UC / Latitude: / Longitude:										
Data início	Data fim	Taxón	Método de registro	QTD	Unidade	Latitude	Longitude	Situação do material	Local de Destino	Tombamento
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 54.40" S	039° 01' 47.20" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 53.29" S	039° 01' 46.09" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 50.49" S	039° 01' 57.60" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	



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

Data inicio	Data Fim	Taxón	Método de registro	QTD	Unidade	Latitude	Longitude	Situação do material	Local de Destino	Tombamento
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 42.80" S	039° 02' 10.20" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 48.50" S	039° 02' 12.00" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 51.39" S	039° 02' 16.00" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 54.59" S	039° 02' 07.59" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 58.59" S	039° 01' 48.79" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri - URCA	
25/03/2017	18/06/2017	Ziziphus joazeiro	Coleta de amostras	1	Indivíduo	07° 28' 54.40" S	039° 01' 47.20" W	Destinado a laboratório	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - Universidade Regional do Cariri	

## Resultados / Discussão

Pergunta / Item	Resposta
Resultados / Discussão:	<p>O material coletado das espécimes de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. foi cascas do Caule e folhas. Ambas foram utilizadas para preparação de extratos, para desenvolvimento de testes microbiológicos. A técnica utilizada para preparação dos extratos aquosos das folhas e cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i> (EAFZJ e EACCZJ) foi maceração com extração a frio, descrito por Matos (2002). Folhas frescas foram cortadas, para aumentar sua superfície, e as cascas do caule passaram por secagem em temperatura ambiente e trituradas em moinho mecânico. Posteriormente ambos foram adicionados em água destilada e estéril. Acondicionados em recipiente protegido da ação da luz e o do ar, e após 72h foram filtrados, congelados e levados ao liofilizador (-60°C). Produzindo um extrato bruto de 39,9g e 111,58g respectivamente.</p>

**ANEXO 6 – Parecer com autorização da pesquisa pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)**



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

**Extrato da solicitação Nº 55064 em PDF - Gerado em: 21/07/2016 as 11:07:59 horas**

**Dados básicos da Solicitação**

Nº da solicitação: 55064	Situação atual: Submetida para análise	Data da situação atual: 21/07/2016
Tipo da solicitação: Autorização para atividades com finalidade científica		
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS E DAS CASCAS DO CAULE DE Ziziphus joazeiro Mart. SOBRE BIOFILMES MICROBIANOS DE INTERESSE CLÍNICO		

**Dados do pesquisador**

Nome: Jaqueline Cosmo Andrade	Nacionalidade: Brasileira	CPF: 02052919378	E-mail: andradejacqueline@gmail.com	Identidade: 2001029061759 ssp CE
Endereço: Av. Valdemiro Paz de Souza				
Bairro: Mirandão	CEP: 63125-210	Município: CRATO	UF: CE	Fone: (0xx88) 9978-7085 Fax:
Profissão: Professor do ensino superior		Nível escolar: Mestrado		

**Dados do vínculo institucional**

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI	CNPJ: 18.621.825/0001-99	Fone: (0xx88) 3531-4833
Tipo de vínculo: Servidor público		Email: reitoria@ufca.edu.br
Observação:		

**Atividades da solicitação**

Descrição das atividades/substrato	Tipo do item
Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Atividades



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

#### Locais onde as atividades serão executadas

Descrição do local	Bioma	Município	UF	Tipo do local	Abrange caverna?
Chapada do Araripe	Caatinga	CRATO	CE	Fora de UC Federal	Não

#### Táxon(s)

Táxon	Grupo taxonômico
Espécie Ziziphus joazeiro	Plantas

#### Táxon(s) X Atividades

Grupo	Táxon	Envolve espécie ameaçada?	Qtd prevista	Atividade
Plantas	Espécie Ziziphus joazeiro	SIM		Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico

#### Táxon(s) X Materiais, métodos e amostras biológicas

Grupo taxonômico	Descrição	Tipo
Plantas	Coleta manual	Método de captura/coleta
Plantas	Casca	Amostras biológicas
Plantas	Folhas	Amostras biológicas

#### Destino(s) do(s) material(is) biológico(s) coletado(s)

Descrição do destino	Tipo do destino
Universidade Regional do Cariri	Ensino Superior e pesquisa

#### Cronograma de atividades

Descrição da atividade	Data início	Data Fim
Coleta de folhas e cascas do caule de Ziziphus joazeiro	10/01/2017	10/02/2018

#### Áreas do conhecimento

Descrição da atividade
Microbiologia

#### Dados básicos

Nome do campo	Descrição



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

Nome do campo	Descrição
Introdução/Justificativa	<p>É cada vez mais presente a busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana, uma vez que, nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, é a que vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência microbiana, (GUIMARÃES et al., 2010; GOMES et al., 2012; GOLL, FARIA, 2014).</p> <p>Uma das principais formas de resistência microbiana consiste na formação de biofilmes, que são formados devido a interação entre os microrganismos e o substrato no qual se aderem. Biofilmes, são complexos de ecossistemas microbianos, que podem ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). Exemplos típicos de doenças relacionadas a biofilmes incluem: endocardites bacterianas, otite média, prostatite crônica bacteriana, fibrose cística, periodontite e cárie (DONLAN; COSTERTON, 2002; SANTOS, WATANABE, ANDRADE, 2011).</p> <p>A utilização de produtos naturais com foco terapêutico, corresponde a antigas práticas populares, e representam, muitas vezes, os principais e até os únicos recursos acessíveis para o tratamento de doenças por algumas comunidades (ROQUE et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014). As pesquisas etnobiológicas se tornaram uma investigação essencial na busca por novos princípios ativos, pois são fundamentadas no uso medicinal de plantas nas práticas tradicionais (ALBUQUERQUE; HAZANAKI, 2008).</p> <p>A presença de uma rica diversidade em espécies vegetais caracteriza a Caatinga nordestina, considerada um dos principais biomas brasileiros. Aproximadamente a metade do território cearense encontra-se ocupado por vegetação providas da caatinga, muitas são endêmicas e com escassa investigação das atividades biológicas (CARTAXO et al., 2010). A Chapada do Araripe, na região do Cariri Cearense, está localizada dentro do domínio da Caatinga, apresentando uma rica biodiversidade, conhecida e utilizada no âmbito popular, como recurso terapêutico na medicina tradicional (RIBEIRO-SILVA et al., 2012).</p> <p>Ziziphus joazeiro é uma espécie endêmica típica dos sertões nordestinos, com maior ocorrência na caatinga e no Agreste (PRADO, GIBBS, 2003), pertencente à família Rhamnaceae, e ao gênero Ziziphus (CARVALHO, 2007).</p> <p>Popularmente é conhecida como joazeiro, juá-babão, juá-de-boi, joá-mirim, juazeiro, juá e juá-bravo. Apresenta um amplo potencial econômico e relevância para região do semiárido, podendo ser utilizada como planta ornamental, como fonte de energia, na fabricação de cosméticos e na alimentação humana e de animais, principalmente nos períodos de seca, e na medicina popular (SILVA et al., 2011).</p> <p>Dentre as atividades biológicas da espécie Z. joazeiro podemos destacar atividade antifúngica, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, atividade antipirética, atividade anti-inflamatória e atividade adstringente (ALMEIDA et al., 2005; CRUZ et al., 2007; ALVIANO et al., 2008; NISAR et al., 2007).</p> <p>Uma das principais indicações de Z. joazeiro consiste na sua utilização na higiene bucal e tratamento de gengivites. Partes da planta, principalmente, casca e entrecasca do caule são trituradas e usadas na escovação dentária (CAVALCANTI et al., 2011). Entretanto, a prática incorreta da retirada do caule, pode ocasionar o anelamento, processo de retirada total da casca em toda circunferência da planta, o que impossibilita o fluxo de nutrientes e água, resultando na desidratação do tecido, além do ataque de pragas e microrganismos causando a morte da planta (SANTOS, 2009).</p> <p>Neste sentido, se faz necessário à validação do uso de outra parte de Z. joazeiro, na busca de minimizar a utilização do caule. Este trabalho busca verificar a ação das folhas de Z. joazeiro, contra a resistência microbiana, em biofilmes, e comparar com os efeitos das cascas e produtos químicos já utilizados na higienização bucal. Além de oferecer alternativas para diminuição do extrativismo excessivo da espécie, através da comprovação e descobertas de atividades</p>
Objetivo geral	<p>Avaliar bioatividades e a ação in vitro dos extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico das folhas e das cascas do caule de Ziziphus joazeiro Mart, contra microrganismos de relevância clínica (bactérias e leveduras) pela capacidade de interferir sobre o crescimento microbiano e sob a formação de biofilmes.</p>



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

Nome do campo	Descrição
Objetivos específicos	<p>? Realizar prospecção fitoquímica dos Extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico das folhas e das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i>.</p> <p>? Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos Extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico das folhas e das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i> frente a bactérias e leveduras formadores de biofilme: <i>Streptococcus mutans</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>.</p> <p>? Avaliar a capacidade dos extratos das folhas e das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i> influenciar no crescimento planctônico das bactérias e leveduras;</p> <p>? Analisar a inibição da formação de biomassa dos biofilmes formados pelas bactérias e leveduras utilizando os extratos das folhas e das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i>.</p> <p>? Verificar o potencial dos extratos das folhas e das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i> na redução de unidades formadoras de colônias (UFC) nos biofilmes formados por bactérias e leveduras.</p> <p>? Comparar todos os resultados com gluconato de clorexidina;</p> <p>? Relacionar os resultados dos extratos das folhas e das cascas do caule, na busca de validar os efeitos biológicos das folhas.</p> <p>? Identificar a citotoxicidade <i>in vitro</i> frente à cultura de células de mamíferos.</p> <p>? Avaliar a atividade tripanocida através de ensaios <i>in vitro</i> com a forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>.</p> <p>? Analisar o efeito leishmanicida <i>in vitro</i> frente à cepa promastigota de <i>Leishmania brasiliensis</i>.</p>



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

Nome do campo	Descrição
Material e métodos	<p><b>SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO</b>          Plantas da espécie <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart., serão coletadas na Chapada do Araripe, município de Crato, sul do Ceará, Brasil. Do material coletado serão produzidas exsiccatas a serem identificadas pelo Dr. João Marcelo Alvarenga Braga, e depositadas no Cariense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri ? URCA.</p> <p><b>OBTENÇÕES DOS EXTRATOS BRUTOS</b>          Para preparação dos extratos das folhas de <i>Z. joazeiro</i>: folhas frescas terão sua superfície de contato aumentada por meio de cortes, posteriormente adicionadas no tipo de solvente, específico para cada extrato, utilizando 5g de folhas para cada mL do solvente, todos os extratos serão preparados por maceração com extração a frio. Para produção do Extrato Aquoso à frio (EAFZJ), as folhas serão adicionadas em água destilada e estéril. Já para o Extrato Hidroetanólico (EHFZJ), as folhas serão dessecadas em solução de etanol absoluto e água na proporção de 1:1. Na obtenção do Extrato Etanólico (EEFZJ) as folhas serão adicionadas em etanol absoluto P.A. (MATOS, 2002).</p> <p>Para Preparação dos extratos das cascas do caule de <i>Z. joazeiro</i>: as cascas do caule passarão por secagem em temperatura ambiental, e posteriormente será realizado trituração em moinho mecânico, sendo adicionadas no tipo de solvente, específico para cada extrato, utilizando 5g de cascas para cada mL do solvente, todos os extratos serão preparados por maceração com extração a frio. Para produção do Extrato Aquoso à frio (EACZJ), as cascas serão adicionadas em água destilada e estéril. Já para o Extrato Hidroetanólico (EHCZJ), as cascas serão dessecadas em solução de etanol absoluto e água na proporção de 1:1. Na obtenção do Extrato Etanólico (EEFZJ) as cascas serão adicionadas em etanol absoluto P.A. (MATOS, 2002).</p> <p>Todas as misturas devem ser guardadas em recipiente protegido da ação da luz e o do ar e após 72h deverá ser filtrada e concentrada em rotaevaporador (model Q-344B ? Quimis, Brazil). Todos os extratos serão congelados e levados ao liofilizador (-80°C) até que toda a água seja retirada. Os extratos em pó serão armazenados para testes sob refrigeração.</p> <p>Serão realizada Análise Química através dos métodos: Prospecção Química Qualitativa (presença de metabólitos secundários, avaliar a presença de taninos, fenóis, flavonóides e alcalóides serão feitos de acordo com o método descrito por Matos, 2009); Quantificação de Fenóis Totais (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007); Análise estatística da quantificação de fenóis totais e Análise comparativa da composição fenólica (realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD de acordo com Kamdem e colaboradores (2013) e Silva e colaboradores (2014), com modificações)</p> <p>Além da avaliação das bioatividades: antiparasitária contra <i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigota) e <i>Leishmania brasiliensis</i> (promastigota), além da citotoxicidade, frente a células de mamíferos. Assim como ensaios microbiológicos, para verificar a inibição do crescimento microbiano pelos extratos: como o método de concentração inibitória mínima (JAVADPOUR et al., 1996); teste de modulação de drogas (COUTINHO et al., 2008); avaliação da inibição da formação de biomassa dos biofilmes e inibição do crescimento planctônico das bactérias e leveduras será baseada no teste de placas de microtitulação (STEPANOVIC et al., 2000).</p>





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

Nome do campo	Descrição
	<p>ABEE, T.; KOVACS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. <i>Curr. Opin. Biotechnol.</i> 22(2): 172-179, 2011.</p> <p>AINSWORTH E.A.; GILLESPIE K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. <i>Nat Protoc.</i> 2 (4): 875-877, 2007.</p> <p>ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (nordeste Brasil). <i>Interciencia.</i> 27(70), 336-346, 2002.</p> <p>ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnobotânicas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. <i>Revista Brasileira de Farmacognosia.</i> (16): 678-689, 2006.</p> <p>ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public Market in northeastern Brazil. <i>J Ethnopharmacol.</i> 110: 78-91, 2007</p> <p>ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). <i>Journal of Arid Environments.</i> 62 (1): 127-142, 2005.</p> <p>ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. G.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. <i>Archives of Oral Biology.</i> 53: 545-52, 2008</p> <p>ANTUNES, A.L.S. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by <i>Staphylococcus</i> species isolated from central venous catheters. <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,</i> 106: 51-55, 2011.</p> <p>BRAULIO G.L.; SALVADOR, B. T. ESTRESSES HÍDRICO E SALINO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. (Rhamnaceae). <i>Revista Caatinga.</i> 22 (4): 93-99, 2009.</p>
Referências bibliográficas	<p>BRITO, K. L.; OSUÑA, J. T. A. Influência de diferentes substratos na germinação de sementes de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart., Rhamnaceae. <i>Sitientibus Série Ciências Biológicas.</i> 5(2): 63-67, 2005.</p> <p>CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. <i>Journal of Ethnopharmacology.</i> 131, 326-342, 2010.</p> <p>CARVALHO, A. C. B; NUNES, D. S. G; BARATELLI, T. G; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q; NETTO, E. M. N. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. <i>T&amp;C Amazônia,</i> 26-32, 2007.</p> <p>CARVALHO, P.E.R. Juazeiro <i>Zizyphus joazeiro</i>. Embrapa, Circular Técnico 139. Colombo, PR, 2007.</p>



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

#### Histórico da Solicitação

21/07/2016 11:57			Submetida para análise	
21/07/2016 10:58			Em elaboração	

#### Histórico da distribuição

Tipo da Distribuição	Data	Unidade	Fone da Unidade	Lim. Receber	Lim. Parecer	Descrição da situação
Emissão de Parecer (análise obrigatória)	21/07/2016	CECAT	(0xx81) 2028-9698	01/08/2016	11/08/2016	Aguardando recebimento

**ANEXO 7 – Parecer com autorização da pesquisa pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) do Ministério do Meio Ambiente**



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A9250A4**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A9250A4**  
 Usuário: **HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO**  
 CPF/CNPJ: **567.670.564-72**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Ziziphus joazeiro**

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADES E DA AÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CASCAS DO CAULE DE Ziziphus joazeiro Mart. (Rhamnaceae) EM BIOFILMES MICROBIANOS**

**Equipe**

**HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO** URCA  
**JACQUELINE COSMO ANDRADE** UFCA

**Parceiras no Exterior**

**Center for the Development of Scientific Research, Moisés**

Data do Cadastro: **05/09/2018 16:12:46**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**




Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:13 de 05/09/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

**ANEXO 8** – Número de Herbário da exsicata depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL/URCA).



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

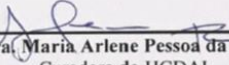
---

## Número de Herbário

---

<b>Remetente:</b>	<b>Nº 48</b>
<p><b>HERBÁRIO CARIRIENSE DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)</b>            Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)            Universidade Regional do Cariri - URCA            Departamento de Ciências Biológicas            Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161            Campus Pimenta            Crato – Ceará - Brasil            CEP: 63.105-100</p>	
<b>Destinatário:</b>	<b>Data: 20.12.2017</b>
<p>Contato: <b>Jacqueline C. Andrade</b>            Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular _ URCA</p>	
<b>Nº Amostras: 1</b>	<b>Tipo de Operação: Número de Herbário</b>

Nº	Nº HERBÁRIO	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTIFICO	RESPONSÁVEL
1	13.346	Joazeiro	Rhamnaceae	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Karina V. Linhares



**Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva**  
Curadora do HCDAL

---

Herbário Caririense Dárdano de Andrade - Lima / Universidade Regional do Cariri - URCA  
 Rua Cel. Antônio Luiz, 1161 - Pimenta - CEP: 63.105-100 - Crato/Ceará  
 Tel: (88) 3102 1212 – Fax: 3102 1291  
 E-mail: herbario@urca.br