



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE CASCAS E FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* Mart  
(RHAMNACEAE) EM RELAÇÃO AOS PERFIS FITOQUÍMICO E  
TOXICOLÓGICO E AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

**TÁSSIA CAMPOS DE LIMA E SILVA**

**RECIFE, 2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE CASCAS E FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* Mart  
(RHAMNACEAE) EM RELAÇÃO AOS PERFIS FITOQUÍMICO E  
TOXICOLÓGICO E AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

**TÁSSIA CAMPOS DE LIMA E SILVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Pernambuco.

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Orientadora)

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (Co-Orientadora)

**RECIFE, 2009**

Silva, Tássia Campos de Lima e.

Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (RHAMNACEAE) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana / Tássia Campos de Lima e Silva. – Recife : O Autor, 2009.

73 folhas : il., fig., tab e gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Ziziphus joazeiro*. 2. Caatinga. 3. Antioxidante.  
4. *Artemia salina*. 5. Antimicrobiano. I. Título.

615.322  
**615.322**

CDU (2.ed.)  
**CDD (21.ed.)**

UFPE  
**CCS2009-161**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Recife, 16 de novembro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 16 de novembro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim** (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Elba Lúcia S. Amorim

**EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Maria Nelly Caetano Pisciotano** (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Maria Nelly Caetano

**EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Ednaldo Cavalcante de Araújo** (Deptº de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Ednaldo Cavalcante de Araújo

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

## **Reitor**

Amaro Henrique Pessoa Lins

## **Vice-Reitor**

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

## **Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisas e Pós-Graduação**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

## **Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

José Thadeu Pinheiro

## **Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde**

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

## **Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Dalci José Brondanni

## **Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Antônio Rodolfo de Faria

## **Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Pedro José Rolim Neto

## **Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Beate Saegesser Santos

*À minha filha,  
Minha vida, Laura  
Aos meus pais,  
A minha cara metade, Jorge,  
Com amor*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a vida, por me fortalecer em todas as horas, pelas bênçãos que recebi Dele e pela prova diária que Ele existe e sempre estará por nós.

À Universidade Federal de Pernambuco, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a realização deste curso.

Aos meus pais Edilson e Cássia por sempre me apoiarem, compreenderem-me, e terem me ajudado a ver que eu não sou apenas mais uma na multidão.

À minha filha Laurinha, pelo seu sorriso, que é a fonte da minha alegria, da minha vida.

A Jorge, companheiro fiel que sempre apóia e traz amor à minha vida e a seus pais, Clézia e Jorge pelo apoio.

À minha família por estar sempre ao meu lado.

À minha segunda mãe e minha orientadora Profa. Elba Amorim, que sempre tem paciência e sabedoria para me conduzir até este momento de realização profissional e pessoal, pelo seu carinho, atenção e todos os ensinamentos.

A co-orientadora Profa. Janete Magali de Araújo por me oferecer a oportunidade de aprender com seus conhecimentos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do setor de microbiologia do Hospital das Clínicas/UFPE, pela colaboração com as cepas as quais trabalhei.

Aos professores Ednaldo Cavalcante, Maria Nelly Caetano, Jane Higino e João Eudes do Nascimento por terem aceitado o convite para participar da defesa e contribuir com este trabalho.

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), Tadeu, Jenifer, Clarissa, Joabe, Cecília, Diego, Daniela, Daniele e Valerium, que sempre me apóiam, acreditam e trazem alegria ao dia-a-dia e em especial a Camila, Elvis, Renato e Eliz que contribuíram significativamente para a conclusão deste estudo.

A todos que me apoiaram e que sabiam a hora certa de me dizer uma palavra amiga, sem exceção, meus agradecimentos.

**“Sonho que se sonha só  
É só um sonho que se sonha  
só...**

**Mas sonho que se sonha  
junto é realidade”.**

**(Prelúdio, Raul Seixas)**



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>13</b>
<b>2.1 A Caatinga e os estudos etnobotânicos</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Espécie selecionada</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Taninos</b>	<b>18</b>
2.3.1 <i>Generalidades sobre taninos</i>	18
2.3.2 <i>Atividade biológica dos taninos</i>	19
<b>2.4 Flavonóides</b>	<b>20</b>
2.4.1 <i>Generalidades sobre flavonóides</i>	20
2.4.2 <i>Atividade biológica dos flavonóides</i>	21
<b>2.5 Estudo citotóxico frente à <i>Artemia salina</i> LEACH.</b>	<b>22</b>
<b>2.6 Atividade antioxidante</b>	<b>23</b>
2.6.1 <i>Produção de radicais livres</i>	23
2.6.2 <i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	24
<b>2.7 Atividade antimicrobiana</b>	<b>25</b>
<b>2.8 Teste de Difusão em Disco</b>	<b>25</b>
<b>2.9 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>28</b>
<b>4. ARTIGO 1 - Avaliação fitoquímica e bioensaio frente a <i>Artemia salina</i> Leach. de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.</b>	<b>29</b>
<b>5. ARTIGO 2 - Atividade antioxidante e antimicrobiana de <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart., avaliação comparativa entre cascas e folhas.</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>68</b>

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE CASCAS E FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* Mart (RHAMNACEAE) EM RELAÇÃO AOS PERFIS FITOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO E AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, tais como câncer, doenças renais, hepáticas, pulmonares, intestinais, cerebrais, articulares e oftalmológicas. As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) um dos mais utilizados. Os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Joazeiro) com relação à atividade antioxidante, o teor de taninos e flavonóides, o perfil fitoquímico e toxicológico preliminar frente a *Artemia salina* Leach. e atividade antimicrobiana. As coletas foram realizadas no município de Altinho - PE. A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada, a análise quantitativa de taninos e flavonóides foi baseada na técnica de complexação por Folin-Ciocalteu e  $AlCl_3$ , respectivamente, a ação antioxidante foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras captarem o radical livre DPPH. O perfil toxicológico dos extratos foi avaliado frente *Artemia salina* Leach. e a atividade antimicrobiana baseada na metodologia descrita por Bauer-Kirby. Os dados destas quantificações receberam delineamento fatorial e tratamento estatístico através do *Software BioEstat* 4.0. Observou-se diferenças nos teores de fenóis totais, taninos e flavonóides para as duas partes estudadas (cascas e folhas). As folhas de *Z. joazeiro* apresentaram diversidade fitoquímica mais acentuada que as cascas, entretanto, cumarinas glicosídicas não foram visualizadas nas folhas e sim apenas nas cascas. O ensaio com as larvas de *A. salina* indicou que os extratos das cascas ( $CL_{50} = 796,6 \mu\text{g/mL}$ ) e folhas ( $CL_{50} = 609,46 \mu\text{g/mL}$ ) são moderadamente tóxicos. Com relação à atividade antioxidante, as folhas apresentaram melhor desempenho ( $IC_{50} = 461,8816 \mu\text{g/mL}$ ), sendo mais eficiente que as cascas ( $IC_{50} = 1743,0541 \mu\text{g/mL}$ ). A espécie foi fortemente ativa contra 66% das bactérias testadas. O extrato das folhas apresentou CMI de 0,25-0,5 mg/mL contra *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100) e de 0,125-0,250 mg/mL frente *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), o extrato das cascas apresentou CMI 0,5-1,0 mg/mL frente *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71). Os teores de metabólitos presentes nas folhas são superiores aos presentes nas cascas, sendo assim, as cascas (parte usada popularmente) podem ser substituídas pelas folhas, visando evitar a dizimação da espécie. Observou-se a presença de metabólitos secundários na espécie estudada ainda não mencionados na literatura. Ambos os extratos foram considerados moderadamente tóxicos. O extrato vegetal de *Z. joazeiro* devido ao seu potencial antimicrobiano pode ser considerado um recurso promissor para o tratamento de enfermidades causadas por bactérias.

Palavras-chave: *Ziziphus joazeiro*, joazeiro, Caatinga, antioxidante, *Artemia salina*, antimicrobiano.

## ABSTRACT

### COMPARATIVE EVALUATION OF BARKS AND LEAVES *Ziziphus joazeiro* Mart. (RHAMNACEAE) IN RELATION TO THE PROFILES PHYTOCHEMISTRY AND TOXICOLOGICAL AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES

The presence of free radicals have been correlated with a great number of illnesses, such as cancer, renais, hepáticas, pulmonary, intestinais, cerebral illnesses, to articulate and oftamológicas. The methodologies most common to determine the antirust activity in practical way, fast sensible e are the ones that involve a radical cromóforo, simulating the reactive species of oxygen (EROs), being free radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) one of the most used. The phenolic composites gifts in vegetables have received considerable attention for being the main components with antirust activity, that play important role in the neutralization of free radicals. The objective of this study was comparativily to evaluate the barks and leaves of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Joazeiro) with regard to the antirust activity, the tannins and flavonoids, the fitoquímico profile and toxicology preliminary front the *Artemia salina* Leach. and antimicrobial activity. The collections had been carried through in the city of Altinho - PE. The fitoquímica selection was carried through by chromatography in thin layer, the quantitative tannins analysis and flavonoids was based on the technique of complex for Folin-Ciocalteu and  $\text{AlCl}_3$ , respectively, the antirust action was analyzed by the capacity of antirust substances gifts in the samples will catch free radical DPPH. The toxicology profile of extracts was evaluated front *Artemia saline* Leach. e the based antimicrobial activity in the described methodology for Bauer-Kirby. The data of these quantifications had received factorial delineation and statistical treatment through Software BioEstat 4.0. One observed differences in texts of total phenols, tannins and flavonoids for the two studied parts (barks and leaves). The leaves of *Z. joazeiro* had more presented phytochemistry diversity accented that the barks, however, glico-coumarins had not been visualized in leaves and yes only in the barks. The test with larvae of *A. salina* indicated that extracts of barks ( $\text{LC}_{50} = 796.6 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) and leaves ( $\text{LC}_{50} = 609.46 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) are moderately toxic. With regard to antioxidant activity, the leaves showed better performance ( $\text{IC}_{50} = 461.8816 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), being more efficient than the bark ( $\text{IC}_{50} = 1743.0541 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). The species was strongly active against 66% of the bacteria tested. The extract of the leaves showed MIC of 0.25-0.5 mg/mL against *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100) and 0.125-0.250 mg/mL against *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), the extract of the bark showed MIC 0.5-1.0 mg/mL against *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71). The levels of metabolites present in leaves are higher than those present in the bark, so the barks (the popularly used) can be replaced by leaves, so as to prevent the decimation of the species. We observed the presence of secondary metabolites in the studied species not mentioned in the literature. Both extracts were moderately toxic. The herbal extract of *Z. joazeiro* due to its antimicrobial activity can be considered a promising for the treatment of diseases caused by bacteria.

Keywords: *Ziziphus joazeiro*, joazeiro, Caatinga, antioxidant, *Artemia salina*, antimicrobial.

# 1. Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

Cerca de 40% do globo terrestre está ocupado pelas florestas tropicais e subtropicais, entre as quais 42% são compreendidas pelas florestas secas, onde se inclui a Caatinga (MOREIRA *et al.*, 2006). O domínio do bioma Caatinga abrange cerca de 800 mil Km<sup>2</sup>, correspondendo aproximadamente a 54% da região Nordeste e 11% do território brasileiro. Apenas nas últimas três décadas é que este bioma vem sendo estudado de forma mais aprofundada, constatando-se sua relevância a partir do conhecimento da sua alta biodiversidade além de suas potencialidades (TROVÃO *et al.*, 2004).

Pesquisas apontam que as arbóreas silvestres são uma fonte importante de produtos medicinais nas regiões mais secas (FERRAZ, 2007). Apesar do grande número de espécies exóticas na Caatinga, é observado que as espécies nativas são consideradas as mais importantes. Em outros estudos administrados no bioma Caatinga, plantas nativas normalmente estão entre as mais utilizadas (ALBUQUERQUE, 2007a).

Entre as árvores mais notáveis do bioma da Caatinga, encontramos a do gênero *Ziziphus* Miller (Rhamnaceae), pertencente ao grande grupo das dicotiledôneas. Este gênero é constituído por cerca de 100 espécies, tem distribuição tropical e subtropical da Ásia e América, utilizada na medicina popular para curar vários tipos de doenças.

A espécie *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro) é inconfundível na paisagem da Caatinga, por sua copa globosa a subglobosa de cor verde. Conserva-se sempre verde, nunca perde toda a folhagem que se renova pelo mês de outubro, mesmo nas mais rigorosas secas, graças ao amplo e profundo sistema radicular capaz de coletar a escassa umidade existente no subsolo (KEW, 2009). Com alguma razão foi criada a fama de ser a única espécie da Caatinga que não perde as folhas no período de estiagem. Mesmo existindo outras espécies, que dificilmente perdem as folhas naquele período, e que há algumas condições em que o próprio juazeiro perde as folhas. A presença de *Z. joazeiro* na Caatinga é fato curioso pois as demais espécies de *Ziziphus* não são típicas de áreas secas e, sim, de áreas úmidas (CARVALHO, 2008).

Neste estudo, selecionou-se a espécie *Ziziphus joazeiro* Mart., uma das espécies arbóreas mais importantes da Caatinga, utilizada popularmente no município de Altinho, onde foram realizadas as coletas e para a qual é conhecido o uso popular no tratamento de problemas de pele como dermatites e micoses (ALBUQUERQUE, 2007, CRUZ, 2007), além de gripe, tuberculose, pneumonia, bronquite, estomatite e má digestão (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A escolha pela investigação das atividades farmacológicas antioxidante e antimicrobiana é justificada pela relação que possuem com as patologias que mais acometem o homem atualmente: inúmeras doenças associadas à formação de espécies reativas; resistência microbiana frente a vários fármacos disponíveis; problema de saúde crescente e com elevado índice de mortalidade em todo o mundo, respectivamente. Além da atividade citotóxica para avaliar a possibilidade da utilização, via dermatológica, pela população.

São encontrados altos índices de pessoas que não possuem acesso ao tratamento convencional, os medicamentos, a utilização de plantas medicinais pode ser o único tratamento disponível para essa população. Sabe-se que existem benefícios com esse tratamento alternativo, porém é importante conhecer os riscos que essa terapia pode ocasionar, pois uma utilização errada pode acarretar problemas à saúde da população. Com isso o interesse científico vem crescendo, a fim de saber sobre o valor terapêutico, risco e toxicidade dessas plantas. Foram realizadas triagens fitoquímicas de caráter qualitativo, quantificação de taninos e flavonóides, perfil toxicológico e atividades antioxidante e antimicrobiana. Procurando fazer um comparativo entre a ação das cascas e folhas para se avaliar em qual parte se encontra os melhores resultados.

Deste modo, optou-se pela aplicação de testes pouco ou ainda não estudados para a espécie, combinando abrangência, simplicidade e sensibilidade, considerando os recursos disponíveis.

fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

## 2. Revisão da Literatura

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A Caatinga e os estudos etnobotânicos

A Caatinga é o tipo vegetacional que cobre a maior parte da área com clima árido e semi-árido da região Nordeste do Brasil, abrangendo cerca de 800 mil km<sup>2</sup> (RODAL; SAMPAIO, 2002; TABARELLI; VICENTE, 2002), geograficamente, encontra-se abaixo do Equador, entre as florestas Amazônica e Atlântica, numa região marcada pela rudeza climática e bem definida por sua sazonalidade em referência às suas oscilações climáticas (FERNANDES, 2002). Por sua vez, sua vegetação é xerofítica, cuja condição de sobrevivência está intimamente ligada à secura ambiental, já que a água disponível procede de um ínfimo período de estação chuvosa (FERNANDES, 2002). Apesar dos problemas climáticos e sua baixa profundidade do solo e escoamento superficial, várias espécies medicinais são citadas na literatura regional para diversos fins.

A Caatinga é possivelmente o mais desvalorizado e mal-conhecido botanicamente, dentre os biomas brasileiros. Isto decorre, principalmente, de uma propaganda injustificada de que resulta de formação modificada de outro tipo de vegetação, associada a baixa diversidade de plantas sem existência de espécies endêmicas (GIULIETTI *et al.*, 2002).

Pesquisas etnobotânicas na Caatinga são ainda escassas e, uma provável solução seria direcionar estudos para o conhecimento e uso que as populações locais mantêm dos recursos naturais, bem como, uma avaliação destas práticas sobre a biodiversidade regional (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002a).

A apropriação e retirada de recursos vegetais em determinada área da Caatinga obedecem a sua disponibilidade e utilidade, onde árvores como o juazeiro são bastante demandadas para uso medicinal e higiênico. Há evidências que a espécie tem sua existência futura comprometida por alguns aspectos como a coleta intensiva, ausência de cultivos ou propagação e o consumo por indústrias de medicamentos a base de plantas que requerem vultuosas quantidades de matéria-prima vegetal. Estudos que visem o manejo de populações vegetais que estão em eminente perigo de extinção são extremamente necessários, pois a interação entre pesquisadores e povos tradicionais parece ser a saída para esse crescente problema (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002b).



## 2.2 Espécie selecionada

Pertencente a família Rhamnaceae, o gênero *Ziziphus* Mill., possui cerca de 100 espécies amplamente distribuídas no globo terrestre, sendo *Ziziphus joazeiro* Mart. (= *Z. guaranhlica* Malme), conhecida popularmente como joazeiro, juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, o representante mais notável do bioma Caatinga (LORENZI, MATOS, 2002). Espécie nativa da região é encontrada abundantemente e com frequência nas localidades da pesquisa (FERRAZ, 2007).

Planta de porte arbóreo que chega até 16 m de altura, *Z. joazeiro* (Fig. 1) possui troncos de 39 a 50 cm e ramos armados de fortes espinhos, formando uma copa mais larga do que alta. Folhas inteiras semi-coriáceas, elípticas, com três nervuras bem visíveis partindo da base, de 3-7 cm de comprimento, flores amarelo-esverdeadas, pequenas, reunidas em inflorescências cimosas e fruto do tipo drupa, globosa, amarelada, com caroço grande coberto por uma polpa mucilaginosa, branca e doce (LORENZI, MATOS, 2002).

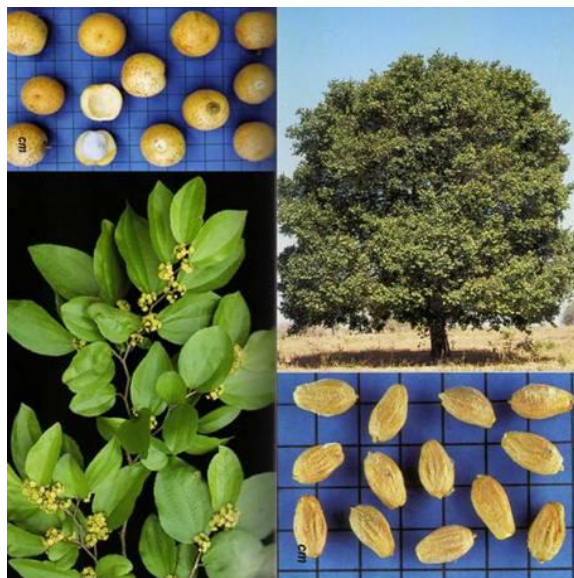


FIGURA 2 - *Ziziphus joazeiro* Mart., onde podem ser observados seus frutos, inflorescências e sementes. (Fonte: LORENZI, MATOS, 2002)



FIGURAS 3 e 4 - Indivíduo de *Ziziphus joazeiro* Mart., com detalhe nos frutos, amostra coletada no município de Altinho-PE. (Fonte: Arquivo pessoal)

De acordo com Albuquerque e colaboradores (2007a) a planta inteira possui diversos usos medicinais, como antisséptico bucal, contra problemas dermatológicos (caspa, sarna, dermatite por seborreia e coceiras) e do sistema respiratório (asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquites, inflamação de garganta e gripe) e sistema digestório (constipação, estomatite e má digestão), sendo ainda relatado o uso como cicatrizante (ALBUQUERQUE, 2006).

Agra e colaboradores (2007a) em estudos sobre plantas utilizadas em nove estados do Nordeste, referiram que a população pesquisada utiliza as raízes da espécie para higiene bucal e no tratamento de gengivites, sendo as cascas trituradas utilizadas diretamente para escovar os dentes, assim como contra caspas.

Estudos da atividade antifúngica foram realizados com a entrecasca da planta com a finalidade de se avaliar a ação contra monilíase e dermatoses. Observou-se atividade importante frente a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, com CMI maiores que o controle (anfotericina B), *Candida guilliermondii*, *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, com resultados semelhantes ao antibiótico (CRUZ *et al.*, 2007) e propriedades nas quais apóiam o uso popular, confirmando o valor da etnofarmacologia e sua bioatividade. Este fato, somado ao alto custo de antibióticos mais novos e mais efetivos e o fenômeno de resistência de droga emergindo, aumenta a procura por substâncias alternativas e com menores custos (ALVIANO *et al.*, 2008).

Nos estudos conduzidos por Alviano e colaboradores (2008), o extrato aquoso, da entrecasca de *Ziziphus joazeiro* Mart., apresentou atividade contra bactérias da microbiota oral, associadas a doenças peridentais, *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gingivalis*,

*Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, que são bactérias cariogênicas. Nestes estudos também foi avaliada a toxicidade aguda e DL<sub>50</sub>, com uso de ratos machos e fêmeas, sendo administrada a infusão das cascas por via oral de 1.0 a 5.0 g/kg do extrato, não sendo observado efeito letal em nenhuma dose. Os resultados apresentados estavam de acordo com os observados no uso popular como líquido para higiene bucal com esta espécie, pois a ocorrência de efeitos adversos não foi documentada (ALVIANO *et al.*, 2004).

Luna *et al.* (2005) analisaram extratos etanólicos das cascas de *Ziziphus joazeiro*, coletadas em quatro estados do Nordeste, observando pequena ação larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* e alta toxicidade frente a *Artemia salina*, mesmo havendo indicação de uso para tratar problemas gástricos e febres intermitentes.

Ensaio pré-clínico foram relatados por Nunes e colaboradores (1987), que avaliou a atividade antipirética do extrato aquoso das cascas de juá em coelhos infectados com a endotoxina de *E. coli*. Os autores relataram que houve diminuição significativa da febre nos animais com a administração oral da infusão. A ação antipirética foi também observada para o extrato metanólico das folhas de *Zizyphus oxyphylla* Edgew (NISAR *et al.*, 2007).

Estudos iniciados em 1985, por Barbosa Filho e colaboradores, forneceram informações sobre os compostos biologicamente ativos de *Z. joazeiro*. Tais estudos foram realizados com extrato bruto clorofórmico da entrecasca da planta, sendo posteriormente tratado por hexano e metanol. Da primeira porção, foi isolado ácido betulínico e ácido oleanólico, da porção metanólica foi obtida uma saponina (o produto final foi ebinil lactona, fornecido após a hidrólise ácida da saponina).

Estudos realizados por OLIVEIRA *et al.* (2000, 2003) referem que folhas de *Z. joazeiro*, tem sua cera epicuticular rica em n-alcenos que retém água na planta, além de triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico), levando a discussão quanto à comparação da permeabilidade das folhas da Caatinga e do Cerrado.

Outros pesquisadores conseguiram isolar novos terpenóides a partir de extratos da espécie, como é o caso de Higuchi *et al.*, (1984) que isolaram três novas saponinas (jujubogenin 3-O- $\alpha$ -arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -glucopyranosyl(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -arabinopyranoside, its 4-O-sulphate e 3",4-di-O-sulphate, respectivamente).

Schühly e colaboradores (1999, 2000) ao aprofundarem a pesquisa com os triterpenos e saponinas encontrados por Higuchi *et al.*, (1984), isolaram do extrato metanólico da entrecasca duas novas saponinas e uma aglicona, que foram chamadas de joazeirosideo A e B e joazeirogenina, respectivamente. Posteriormente foram realizados testes antimicrobianos

(difusão em disco e concentração mínima inibitória - CMI) utilizando extrato bruto com diclorometano, para o qual se observou ação apenas frente a bactérias Gram-positivas com destaque para *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*.

O uso de folhas de outras espécies de *Ziziphus* é encontrado na literatura. As folhas de *Ziziphus mauritiana* Lam. são usadas como alimento por serem ricas em lipídeos, ferro, cálcio, magnésio e zinco (SENA *et al.* 1998; ARBONNIER, 2000), com a possibilidade de estimular os usuários a usar as folhas da espécie estudada.

## 2.3 Taninos

### 2.3.1 Generalidades sobre taninos

Os taninos apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO; SANTOS, 2001).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, cedendo uma duradoura estabilidade a estas substâncias. Para a formação destas ligações é necessário que o peso molecular dos taninos esteja compreendido entre limites bem definidos, pois é demasiadamente elevado, a molécula não pode se intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas, ou se é muito baixo, a molécula fenólica se intercala, mas não forma número suficiente de ligações que assegure a estabilidade da combinação (BRUNETON, 1991).

Os taninos têm sido alvo de diversos estudos, que em sua maioria aborda interações ecológicas entre vegetais e herbívoros, visto que se têm sugerido que os teores de taninos podem diminuir a taxa de predação por se tornarem impalatáveis, afastando seus predadores naturais (SCALBERT, 1991; MOLE, 1993; HELDT, 1997; MOORE, 1998; PAES *et al.*, 2002). Pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos (SCALBERT, 1991). Além disso, podem agir como anti-inflamatórios e cicatrizantes (MELLO; SANTOS, 2001).

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

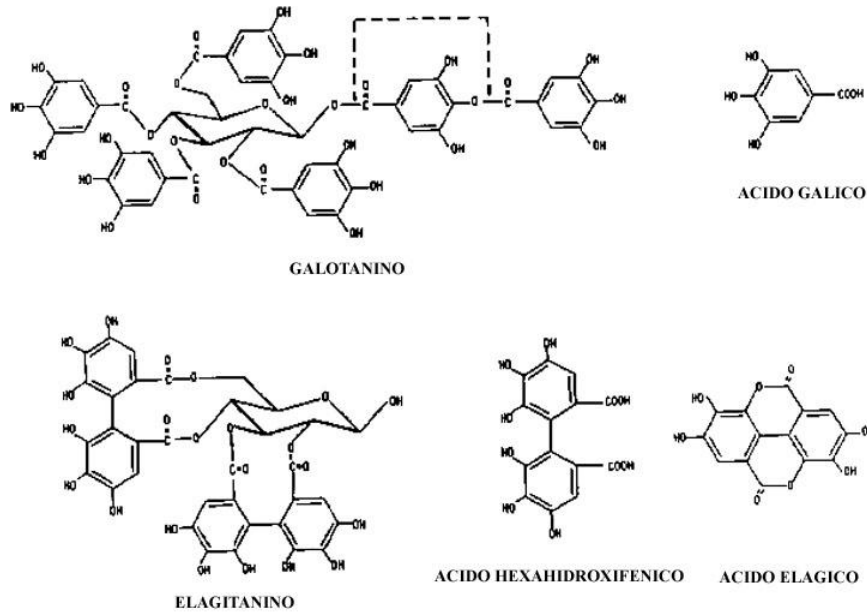


FIGURA 5: Estrutura química dos taninos

### 2.3.2 Atividade biológica dos taninos

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e antisséptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes (BRUNETON, 1991). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações (BRUNETON, 1991). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO; SANTOS, 2001).

Provavelmente, devido à habilidade de se ligar às proteínas e a outras macromoléculas, os taninos também apresentam atividades tóxicas. Ayres e colaboradores (1997) verificaram que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados propôs ter sido devido à atividade tóxica e não pela inibição da digestibilidade.

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO; SANTOS, 2001). Chung e colaboradores (1998a) sugerem que os taninos pressupõem ter duplo efeito, por um

lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese ou atividades antimicrobianas, por outro lado, estão envolvidos possivelmente na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais. Taninos das espécies *Quercus suber* L. e *Q. coccifera* L. apresentaram efeito gastroprotetor, variando entre 66 e 91% (KHENNOUF *et al.*, 2003).

As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas. Moléculas de taninos foram testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHUNG *et al.*, 1998a; 1998b; KILKUSKIE *et al.*, 1992).

Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre as quais *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (CASTRO *et al.*, 1999).

Nishizawa e colaboradores (1990) demonstraram significativa atividade bactericida do decocto da raiz de *Nuphar variegatum* Durand contra microorganismos patógenos. O rizoma, em especial, é empregado na cura de diversas infecções e o decocto da raiz, para tratamento de infecções dos olhos, garganta e dores internas. Scalbert (1991) relata que taninos condensados e hidrolisáveis não apresentam diferenças significantes frente fungos e bactérias, visto que o efeito da toxicidade relacionada à sua estrutura molecular são ainda desconhecidos.

## **2.4. Flavonóides**

### **2.4.1 Generalidades sobre flavonóides**

Derivado da rota metabólica dos fenilpropanóides, os flavonóides compõem amplo grupo destes metabólitos, sendo conhecidas mais de nove mil estruturas identificadas, com diversas funções biológicas, tais como defesa a herbivoria, perpetuação de espécies por atrair animais dispersantes de sementes e proteção contra raios ultravioletas (MARTENS; MITHÖFER, 2005; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Os flavonóides também desempenham atividades farmacológicas, sendo as principais: antioxidante, antidiabética e hipocolesterolemiantes (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; MARTENS; MITHÖFER, 2005; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Possivelmente, diferenças na produção de flavonoides entre estações climáticas estariam relacionadas com a defesa à herbivoria, haja vista que em períodos de chuva aumenta a assembléia de insetos herbívoros, enquanto que, ao se aproximar estações de estiagem, em especial nas áreas de vegetação de Caatinga e Cerrado, decresce significativamente, seguindo um padrão sazonal (IANNUZZI *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2002). Do mesmo modo, áreas fragmentadas com indivíduos localizados na borda ou no interior podem apresentar comportamento diferenciado em relação à produção de metabólitos secundários, uma vez que Barbosa e colaboradores (2005) verificaram que a assembléia de herbívoros é significativamente maior na borda, seguido de trilhas e interior do fragmento.

Afora os agentes ambientais, fatores abióticos laboratoriais (tempo e temperatura de armazenamento) exercem interferência degradativa sobre o teor de substâncias fenólicas, como flavonóides e antocianinas (LIMA *et al.*, 2006).

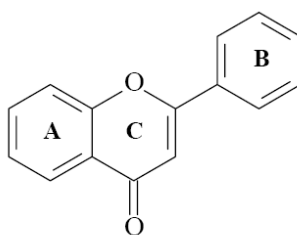


FIGURA 6: Estrutura geral dos flavonóides

#### 2.4.2 Atividade biológica dos flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, com extensa diversidade estrutural, cuja síntese não ocorre na espécie humana (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Constituídos por um esqueleto simples composto de dois anéis fenólicos (A e B) interconectados por uma cadeia propânica, os flavonóides podem ser encontrados associados a carboidratos (heterosídeos), não associados (agliconas) e ainda polimerizados (antocianinas) (MARTENS; MITHÖFER, 2005; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). O anel A é proveniente da via do acetato (Malonil-CoA), enquanto que o anel B juntamente à ponte de três carbonos é oriundo do ácido chiquímico (p-Cumaril-CoA) (MARTENS; MITHÖFER, 2005; UGAZ, 1994; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Tais compostos possuem uma série de propriedades atribuídas na medicina popular e muitas são testadas empiricamente como atividade antioxidante, antimicrobiana, hipocolesterolemiantes, hipoglicemiantes (AJALI; CHUKWURAH, 2004; FUHRMAN *et al.*, 2002) e para prevenir acidentes isquêmicos (DAJAS *et al.*, 2003). Miltersteiner e

colaboradores (2003) avaliaram o uso de quercetina em ratos cirróticos e observaram uma significativa diminuição nas alterações causadas pela cirrose, aumentando o tempo de sobrevivência.

## 2.5 Estudo citotóxico frente à *Artemia salina* Leach.

Os laboratórios de produtos naturais vêm realizando constantemente ensaios biológicos complementares à investigação fitoquímica, buscando orientar a descoberta de novas drogas com potencial terapêutico.

*Artemia salina* é uma espécie de pequeno crustáceo marinho, utilizado como um bioindicador. O termo bioindicador é usado para qualquer membro da fauna e flora de um determinado habitat, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresente uma resposta nítida face às pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989). Desenvolve-se em habitat marinho, sendo assim, pode ser cultivado em laboratório, pois pode ficar na forma latente por alguns meses.

O estudo de letalidade dos extratos frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach. (Fig. 7) é um exemplo prático destes bioensaios que permite realizar um *screening* da planta a ser testada, avaliando a toxicidade geral, apresentam facilidade e rapidez de execução associado ao baixo custo, favorecendo estudos rotineiros nos laboratórios. Este estudo também fornece boa correlação entre citotoxicidade e atividade antitumoral e antitripanossomíase (Meyer *et al*, 1982), sendo por estas razões uma excelente ferramenta para analisar preliminarmente a toxicidade geral (Luna *et al*, 2005).



FIGURA 7 - Metanúplios do microcrustáceo *Artemia salina* Leach usadas para determinar a toxicidade seletiva. Fonte: Nourriture, 2007.



## 2.6 Atividade Antioxidante

### 2.6.1 Produção de radicais livres

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças, não possuindo papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (SOUSA *et al.*, 2007; ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007; RUSSO *et al.*, 2002). O aumento na produção de radicais livres pode ocorrer devido à hiperóxia (aumento na quantidade de oxigênio em tecidos e órgãos) e à exposição das células ou indivíduos a certos componentes químicos, à radiação ou a inflamação tecidual local, resultando em estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, no qual ocorre predominância de radicais livres (EL-HABIT *et al.*, 2000).

Em relação aos danos causados pela radiação ionizante, os mais importantes são os relacionados à molécula de DNA, uma vez que é a responsável pelo armazenamento e transporte das informações genéticas. As interações da radiação ionizante com o DNA ocorrem através de dois mecanismos: o efeito direto e o indireto (KUMARAN; KARUKUMARAN, 2007; SHARIFIFAR *et al.*, 2006). No efeito direto, a radiação ioniza diretamente as moléculas que compõem a estrutura do DNA (DOWD; TILSON, 1999). Por outro lado, o efeito indireto resulta da formação de radicais livres, geralmente originados por modificações das moléculas de água (H<sub>2</sub>O), que constituem os meios intra e extracelulares. A água constitui cerca de 80% do peso corpóreo do organismo humano. Por conseguinte, a interação entre um fóton de raios X e uma molécula de água constitui a principal fonte de formação de radicais livres. O processo de radiólise da água é bastante complexo, contudo sabe-se que esta substância é em grande parte convertida em radicais livres. Estes podem se ligar a outros radicais livres e formar o peróxido de hidrogênio e hidroperoxila, os quais representam as principais substâncias tóxicas para a célula (GULCIN *et al.*, 2005; WHITE; PHAROAH, 1999). Quando presentes no interior dos tecidos, os radicais livres podem danificar o DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (SOUSA *et al.*, 2007; ARDESTANI; YAZDANPARAST, 2007). Adicionalmente são responsáveis por numerosas condições clínicas como enfarto do miocárdio (STRATIL *et al.*, 2007), câncer, doenças renais, hepáticas, pulmonares (fibrose cística), intestinais, cerebrais (Mal de Parkinson), articulares

(artrite reumatóide) e oftalmológicas (catarata) (STRATIL *et al.*, 2007). A produção de radicais livres constitui um dos fatores decorrentes da interação da radiação com a matéria.

### **2.6.2 Avaliação da atividade antioxidante**

Em função da grande diversidade química existente, particularmente, entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio da reação, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, como dienos conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica ou medindo a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado (MELO *et al.*, 2006).

Apesar da diversidade de métodos para avaliar a atividade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com mecanismos de ação diferentes.

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) um dos mais utilizados (MELO *et al.*, 2006). O radical livre DPPH é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta intensa (BLOIS; 1958). A medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000; BLOIS, 1958).

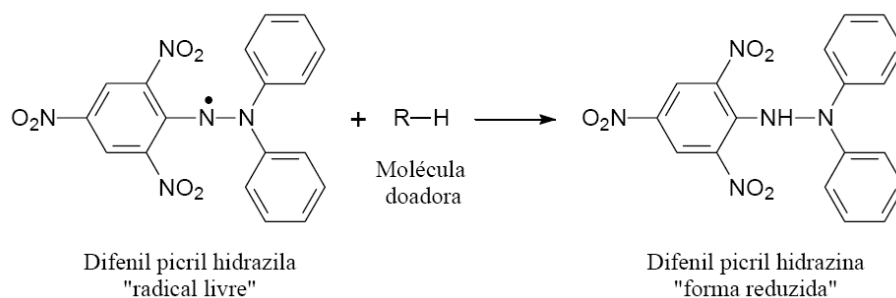


FIGURA 8: Reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, originando a forma reduzida DPPH-H.

## 2.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana vem sendo estudada nas últimas décadas devido aos microrganismos apresentarem resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica medicamentosa.

A resistência bacteriana aos antibióticos, refere-se à capacidade de multiplicação das cepas de microrganismos na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas habituais (WANNMACHER, 2004).

Neste contexto, os compostos de origem vegetal são interessantes porque, além de sua diversidade em estruturas químicas, que dificultam o desenvolvimento de resistência, também produzem substâncias frente à agressão de predadores, como fungos e insetos. Tendo, estas substâncias, a propriedade de inibir o crescimento de determinados organismos, pode haver potencialidade quanto à ação antimicrobiana.

Os microrganismos escolhidos estão associados à infecção nosocomial e estão presentes na flora bacteriana colonizante da ferida por queimadura, cujo tratamento é importante para evitar complicações infecciosas mais graves (MARTINS *et al.*, 2004).

### 2.7.1 Teste de Difusão em Disco

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos é uma das provas mais importantes do laboratório de microbiologia clínica, pois avalia a suscetibilidade dos microrganismos contra diferentes agentes antimicrobianos. Trata-se de um método prático, de fácil execução e

idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados (SEJAS, 2003).

O método de difusão em disco foi idealizado por Bauer *et al.* em 1966, e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia no Brasil. O princípio deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento microbiano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração mínima inibitória (CMI). Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra em suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano.

### **2.7.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) em meio sólido**

Por este ensaio torna-se possível avaliar a efetividade da espécie. Sendo considerada uma faixa de inibição, a qual avalia o comportamento dos microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos antimicrobianos em culturas de meio sólido. Para a determinação da CMI foi usada a técnica em meio sólido, usando concentrações de 5000, 2500, 1250, 1000, 500, 250, 125, 60, 30 e 10 µg/mL, de acordo com as recomendações do NCCLS (1997).

A suspensão-inóculo de cada amostra testada foi preparada em solução salina (NaCl p/v 0,85%), a partir de culturas de 18-20 horas em ágar Muller Hinton, e a turbidez da suspensão foi padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland.

A CMI foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir todo o crescimento dos microrganismos visível a olho nu, em comparação ao controle. Foram levados em consideração os níveis aceitáveis de inibição dos extratos de plantas quando comparados com os padrões, sendo considerados fortes inibidores até 500 µg/mL; inibidores moderados entre 600 e 1500 µg/mL; inibidores fracos acima 1600 µg/mL.

## 3. Objetivos

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os perfis fitoquímico e toxicológico e a atividade antioxidante e antimicrobiana da espécie nativa da Caatinga *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), comparando os resultados das cascas e das folhas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem fitoquímica e avaliar os principais metabólitos secundários presentes na espécie medicinal da Caatinga selecionada para estudo;
- Realizar doseamento de taninos e flavonóides da espécie medicinal;
- Avaliar a capacidade da espécie *Ziziphus joazeiro* Mart. de captar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil);
- Testar a bioatividade (toxicidade) em *Artemia salina* Lench;
- Realizar ensaios de atividade antimicrobiana do extrato vegetal;
- Realizar um estudo comparativo entre os resultados da casca e das folhas da espécie estudada.

## 4. Artigo 1:

Avaliação fitoquímica e bioensaio frente a *Artemia salina*

Leach. de *Ziziphus joazeiro* Mart.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

#### **4. ARTIGO 1**

##### **ARTIGO 1 A SER SUBMETIDO A:**

**Revista:** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

**Título:** Avaliação fitoquímica e bioensaio frente a *Artemia salina* Leach. de *Ziziphus joazeiro* Mart.

**Autores:** Tássia Campos de Lima e Silva, Camila Castelo Branco Rangel de Almeida, Elvis Alves Tavares, Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho, Janete Magali de Araújo, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.



SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

## Avaliação fitoquímica e bioensaio frente a *Artemia salina* Leach. de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Phytochemistry and toxicological bioassay against *Artemia salina* Leach. *Ziziphus joazeiro* Mart.

Tássia Campos de Lima e Silva<sup>1</sup>, Camila Castelo Branco Rangel de Almeida<sup>1</sup>, Elvis Alves Tavares<sup>1</sup>, Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho<sup>1</sup>, Janete Magali de Araújo<sup>2</sup>, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup>Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

### RESUMO

*Ziziphus joazeiro* Mart., conhecida popularmente por juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, é uma espécie nativa da Caatinga com extenso uso popular para o tratamento de problemas da pele, respiratórios e gástricos. Avaliar, comparativamente, o perfil fitoquímico e toxicológico preliminar das cascas e folhas de *Z. joazeiro* foram os objetivos deste estudo. A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada e o perfil toxicológico dos extratos foi avaliado frente aos metanúplios de *Artemia salina* Leach. Os resultados mostraram que as amostras de casca e folha apresentam diferenças nos teores de fenóis totais, taninos e flavonóides. A folha de *Z. joazeiro* apresentou uma diversidade fitoquímica mais acentuada que a casca, entretanto, a casca possui cumarinas glicosídicas não visualizadas na folha. O ensaio com as larvas de *A. salina* indicou que os extratos da casca (CL<sub>50</sub> = 796,6 µg/mL) e folha (CL<sub>50</sub> = 609,46 µg/mL) são moderadamente tóxicos. Estes resultados mostram diferenças qualitativas e quantitativas significativas em relação à casca e a folha de *Z.*

---

1 E.L.C. de Amorim, Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS/UFPE - Av. Prof Arthur de Sá, s/n - Cidade Universitária - Recife/PE, Brasil. CEP: 50.740-520. Fone: (81) 2126-8511 e-mail: [elba@ufpe.br](mailto:elba@ufpe.br)

*joazeiro*, onde a casca (parte usada popularmente) pode ser substituída pela folha, visando reduzir o extrativismo da espécie.

Unitermos: Caatinga, juá, taninos, flavonóides, *Artemia salina*.

## ABSTRACT

*Ziziphus joazeiro* Mart., popularly known juazeiro or laranja-do-vaqueiro, is a species native to the Caatinga with extensive popular use for the treatment of skin problems, respiratory and gastric. Comparative evaluation of the toxicological and phytochemical profile of the primary bark and leaves of *Z. joazeiro* were the objectives of this study. The phytochemical screening was performed by thin layer chromatography and toxicological profile of the extracts was evaluated against the metanauplius *Artemia salina* Leach. The results showed that the samples of bark and leaf show differences in total phenols, tannins and flavonoids. Leaf *Z. joazeiro* presented a diverse phytochemical more pronounced than the bark, however, the shell glycosidic coumarins have not seen on the sheet. The test with larvae of *A. salina* indicated that the bark extracts ( $LC_{50} = 796.6$  mg / mL) and leaf ( $LC_{50} = 609.46$  mg / mL) are moderately toxic. These results show qualitative and quantitative differences significantly from the bark and leaf of *Z. joazeiro*, where the shell (the popularly used) can be replaced by sheet, to reduce the extraction of the species.

Unitermos: Caatinga, juá, tannins, flavonoids, *Artemia salina*.

## INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo (Guerra e Nodari, 2004). Há séculos, as plantas medicinais são exploradas por populações de todo o mundo, onde cada uma possui peculiaridades quanto às suas práticas e o conhecimento sobre seu uso popular (Rodrigues *et al.*, 2005). Com a conscientização de que os recursos naturais conduzem a novos fármacos, muitos pesquisadores têm procurado estudar, através de ferramentas etnodirigidas, o

conhecimento e as formas de uso de plantas utilizadas como medicamento para a cura de determinadas doenças por comunidades tradicionais (Albuquerque e Andrade, 2002), o que vem reduzindo o tempo de descoberta de novas drogas.

As espécies do gênero *Ziziphus* (família Rhamnaceae) apresentam vasto uso medicinal, principalmente para o tratamento de problemas de pele e respiratório. *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecido popularmente como juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, é o representante mais conspícuo e nativo deste gênero no bioma Caatinga (Lorenzi e Matos, 2002; Ferraz *et al.*, 2007). Esta espécie possui diversos usos tradicionais, como antisséptico bucal, contra problemas de pele (caspa, sarna, micose e dermatite), sistema respiratório (gripe, asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquite e inflamação de garganta), sendo ainda relatado o uso como cicatrizante (Almeida *et al.*, 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque *et al.*, 2007a,b), sendo preparadas a partir de suas raízes ou cascas formulações semi-sólidas. Agra e colaboradores (2007a) em estudos sobre plantas utilizadas em nove estados do Nordeste, referiram que a população pesquisada utiliza as raízes da espécie para higiene bucal e no tratamento de gengivites, sendo as cascas trituradas utilizadas diretamente para escovar os dentes, assim como contra caspas, sugerindo a grande importância da espécie para a investigação farmacológica.

Estudos realizados por Cruz *et al.* (2007). mostraram atividade antifúngica dos extratos etanólicos das cascas de *Z. joazeiro* contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Candida guilliermondii*, *Trichophyton rubrum* e *Candida guilliermondii*, do extrato bruto diclorometano frente a bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* (Schühly *et al.*, 1999) e extrato aquoso contra bactérias cariogênica e peridental *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutan* e *Lactobacillus casei* (Alviano, 2008).

Fundamentando-se no valor da etnofarmacologia para bioprospeção de novos medicamentos, o presente estudo objetiva comparar o perfil fitoquímico, o teor de fenóis totais, taninos e flavonóides das cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. e realizar ensaio toxicológico preliminar frente a *Artemia salina* Leach.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Equipamentos, reagentes e padrão de referência**

As análises quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-Mini 1240) em cubeta de vidro Equilab de 10 mm de caminho óptico. No desenvolvimento do estudo foram utilizados agitador eletro-magnético e Tamises (modelo B-Agit, Tecnal), balança analítica eletrônica Shimadzu (modelo AX200), banho de ultrassom Unique (modelo ultracleaner 1400A), estufa de secagem Nova Técnica (modelo NT-513), evaporador rotativo Marconi (modelo MA-120), placa de aquecimento Tecnal (modelo TE-018) e triturador Berman (modelo BM30).

Os solventes etanol e piridina foram da Vetec Química Fina e o ácido acético glacial da Merck do Brasil, todos de grau analítico. O reagente Folin-Ciocalteu foi Fluka e o tensoativo Cremophor da Sigma-Aldrich. Carbonato de sódio anidro, caseína, cloreto de alumínio e Tween foram da Vetec Química Fina. Como padrão para fenóis totais e taninos foi empregado ácido tânico 99,5% (Vetec Química Fina) e para flavonóides foi utilizada a rutina 99,5% (Merck).

## **Material vegetal**

As cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. foram coletadas numa comunidade rural do município de Altinho (08°35'13,5"S e 36°05'34,6"W), localizado na mesorregião Agreste de Pernambuco, a 469 m acima do nível do mar, com área total de 454,5 km<sup>2</sup> e clima Bsh (semi-árido quente) (Araújo *et al.*, 2008). Após secagem em estufa a 45±5 °C durante três dias, o material foi totalmente pulverizado em triturador e padronizado a 60 Mesh. O material testemunho encontra-se incorporado no Herbário UFP Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, sob o n°. 55.097.

## **Perfil fitoquímico**

O material vegetal pulverizado foi extraído exaustivamente por maceração com etanol e os extratos obtidos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo. A análise qualitativa dos principais compostos do metabolismo secundário das cascas e folhas de *Z. joazeiro* Mart. foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo as metodologias descritas por Markhan (1982), Harbone (1984) e Wagner e Bladt (1996) com a utilização de padrões e reveladores específicos para alcalóides gerais e xantinas, saponinas, flavonóides, taninos, fenóis, antocianinas, lignanas, cumarinas agliconas e glicosiladas, quinonas, naftoquinonas, antraquinonas agliconas e glicosiladas, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteróis. As ceras epicuticulares foram analisadas segundo a metodologia descrita por Oliveira e Salatino (2000).

## **Análise quantitativa**

Os extratos foram preparados por decocção, durante 30 minutos, em placa de aquecimento com as amostras pulverizadas (500,0 mg) em 50,0 mL de etanol 80% (v/v), obtendo

concentração final de 10,0 mg/mL. Todo o procedimento foi realizado com seis réplicas autênticas.

O método Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinar os fenóis totais e o método da precipitação por caseína, seguida pelo método de Folin-Ciocalteu, foi utilizado para quantificar os fenóis residuais (Folin; Ciocalteu, 1927), os polifenóis reagem com reagentes de oxi-redução específicos, formando um complexo de coloração azul, passível de ser quantificado por espectrofotometria no visível (Verza, 2007). A quantidade de taninos totais corresponde à diferença entre os teores de fenóis totais e fenóis residuais (Amorim *et al.*, 2008). Estes resultados foram expressos em mg de ácido tânico por g de matéria seca. O doseamento dos flavonóides totais foi baseado na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho *et al.*, (2008) que se baseia na capacidade dos íons alumínio ( $Al^{3+}$ ) reagirem com moléculas de flavonóides do extrato, estabelecendo um complexo estável flavonóide- $Al^{3+}$  de coloração amarela cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonóide presente na amostra, a leitura foi em espectrofotometria com 420nm de comprimento de onda (Amorim *et al.*, 2008). Os teores de flavonóides totais foram expressos em mg de rutina por g de matéria seca.

### **Toxicidade seletiva**

O bioensaio com *Artemia salina* Leach. foi baseado na metodologia de Meyer *et al.* (1982), onde 10,0 mg do extrato bruto foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL e adicionados 100,0  $\mu$ L de Cremophor, 1,0 mL de Tween 80 a 5% e 3,0 mL de água do mar com pH ajustado para 8,0 (com HCl ou NaOH) e filtrada. Após homogeneização das soluções em banho de ultrassom, os volumes finais foram completados com água salinizada. Destas soluções foram pipetadas alíquotas e transferidas para novos balões volumétricos de 5 mL,

obtendo-se seis concentrações finais (50, 100, 250, 500, 750 e 1000,0 µg/mL). Os ovos de *A. salina* (20,0 mg) foram incubados, sob iluminação artificial, por 48 horas, para eclosão dos metanúplios, e estes, separados em sete grupos com 10 indivíduos cada, em tubos de ensaio. O Grupo I recebeu a solução controle (água salinizada e tensoativos) e os seis seguintes receberam as soluções do extrato nas diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial, durante 24 horas e, após esse período, foram contabilizados os metanúplios vivos e mortos, para a determinação das concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

### **Análise estatística**

A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a análise de variância ANOVA: um critério, seguido pelo teste de Tukey foi utilizada para comparar os resultados, todos pelo programa BioEstat 5.0. As concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) foram obtidas por meio da análise Probit pelo programa StatPlus com 95% de confiança.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Triagem fitoquímica**

Os testes mostraram a presença de alcalóides, antraquinonas, cumarinas agliconas, flavonóides, terpenóides e saponinas e ausência de naftoquinonas na casca e folha de *Z. joazeiro*. Também foi observado que as folhas possuem um perfil fitoquímico mais complexo em relação a casca, sendo detectada a presença de antocianinas, antraquinonas agliconas, antraquinonas glicosídicas e lignanas. Em contra-partida, apenas a casca apresentou

cumarinas glicosídicas. Foram observadas ceras epicuticulares, principalmente ácidos graxos e n-alcanos. Apesar serem escassos estudos na literatura sobre triagem fitoquímica de plantas do gênero *Ziziphus*, principalmente *Z. joazeiro* Mart., os trabalhos realizados enfatizam o isolamento de terpenos e, em especial saponinas, que estão relacionados ao seu uso mais freqüente.

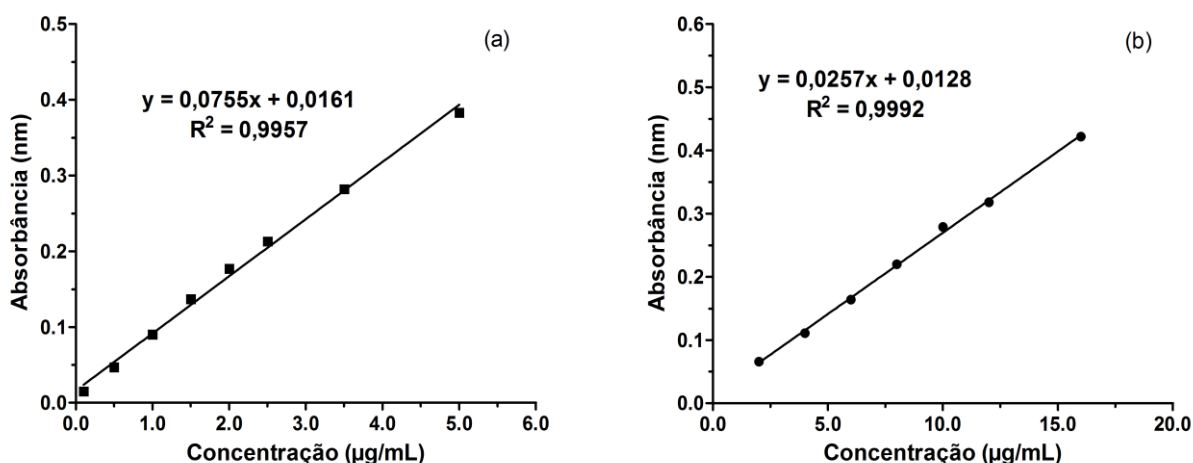
Observou-se na CCD três manchas, com fatores de retenção (Rf) para terpenos, sugerindo diferentes compostos, o que corrobora com os achados de Barbosa Filho *et al.* (1985) que isolaram ácido betulínico e ácido oleanólico do extrato bruto clorofórmico da entrecasca e sua fração metanólica mostrou a presença de uma saponina. Demais estudos isolaram novos terpenóides a partir de extratos da espécie, como os estudos conduzidos por Higuchi *et al.* (1984) que isolaram três novas saponinas (jujubogenin 3-*O*- $\alpha$ -arabinofuranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-[ $\beta$ -glucopyranosyl(1  $\rightarrow$  3)]- $\alpha$ -arabinopyranoside, its 4-*O*-sulphate and 3",4-di-*O*-sulphate, respectivamente). Schühly *et al.* (2000), ao aprofundarem a pesquisa com os triterpenos e saponinas, isolaram, do extrato metanólico da entrecasca, duas novas saponinas e uma aglicona, que foram chamadas de joazeirosideo A e B e joazeirogenina, respectivamente.

As amostras estudadas apresentaram fenóis simples e flavonóides, compostos que têm grande importância devido as suas ações farmacológicas, com destaque para ação antioxidante, antidiabética e hipocolesterolemiantes (Harborne e Williams, 2000; Martens e Mithöfer, 2005). Estudos realizados por Oliveira *et al.* (2000; 2003) referem que folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart., tem cera epicuticular rica em n-alcanos e ácidos graxos que retêm água na planta, além de triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico), o que confirma nossos achados.



### Análise quantitativa

O teste Kolmogorov-Smirnov apresentou distribuição normal dos resultados e por isto foram utilizados testes paramétricos. A equação de correlação e o coeficiente de determinação obtidos para fenóis e taninos totais foram  $y = 0,0755x + 0,0161$  e  $R^2 = 0,9957$ , respectivamente, e para flavonóide foram  $y = 0,0257x + 0,0128$  e  $R^2 = 0,9992$ , respectivamente (Figura 1).



**FIGURA 1** - Curva de calibração construída com ácido tânico (a) empregada para quantificar fenóis totais e taninos; e construída com rutina (b) utilizada para quantificar os flavonóides nos extratos de casca e folha de *Ziziphus joazeiro* Mart.

As cascas de *Z. joazeiro* apresentaram um baixo teor de fenóis totais ( $9,06 \pm 0,72$  mg/g) e taninos ( $2,14 \pm 0,19$  mg/g), não apresentando valores quantitativos satisfatórios para flavonóides. Entretanto, as folhas de *Z. joazeiro* apresentam teores de fenóis totais ( $26,01 \pm 1,75$  mg/g) e taninos ( $11,02 \pm 1,10$  mg/g) superiores aos da cascas e elevados níveis de flavonóides ( $15,94 \pm 0,47$  mg/g).

A quantidade de metabólitos variou intraespecificamente em relação às cascas e folhas. Foi observado durante o monitoramento que as folhas de *Z. joazeiro* apresentaram flavonóides, diferentemente das cascas. Antagonicamente ao esperado, o teor de taninos foi maior nas folhas do que nas cascas, onde este metabólito é mais predominante.

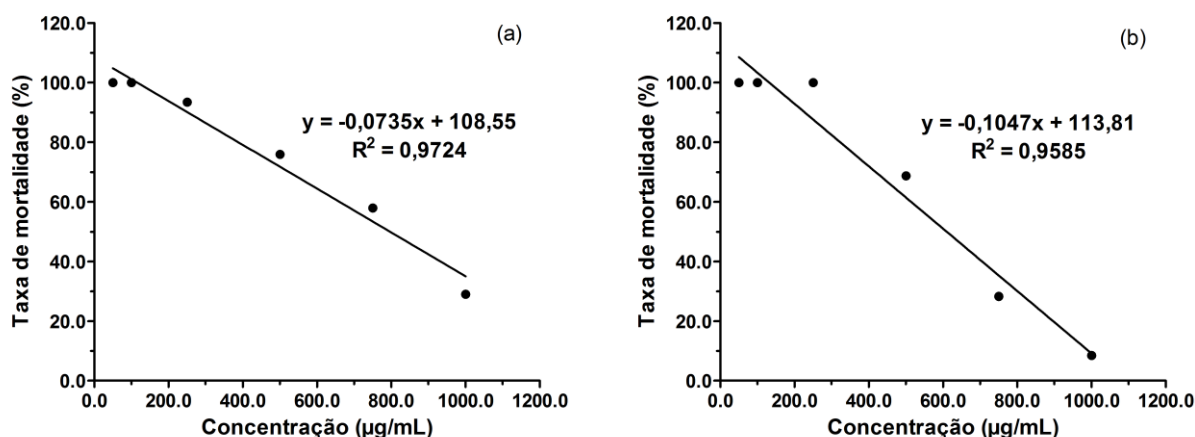
Há uma forte tradição em torno do uso medicinal na Caatinga de cascas de diversas espécies ricas em tanino, o que aponta uma predominância quanto a este tipo de metabólito. Provavelmente, esta preferência pelas cascas às folhas de *Z. joazeiro*, ocorre porque as cascas mantêm-se como recurso disponível durante todo o ano (Monteiro *et al.*, 2005).

#### **Toxicidade seletiva frente *A. salina* Leach.**

Meyer *et al.* (1982) estabeleceram uma correlação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, sendo considerado tóxico até 500,0 µg/ml, moderadamente tóxico de 500-1000,0 µg/ml e atóxico acima de 1000 µg/ml.

A partir desta escala pode-se observar que os extratos da casca (796,60 µg/mL) e da folha (609,46 µg/mL), embora se exclua a possibilidade de serem classificados como tóxico, não podem ser considerados atóxicos, visto que foram ativos frente as larvas de *A. salina* e exibirem valores de CL<sub>50</sub> abaixo de 1000,0 µg/mL. Também foi observado durante o experimento que, após 24 horas de exposição, houve um número significativo de óbitos das larvas de *A. salina* expostas tanto para as folhas quanto para a casca (Figura 2). A análise comportamental das larvas nas concentrações de 250-1000,0 µg/mL do extrato da casca revelou diminuição na movimentação larval em relação ao controle e de 500-1000,0 µg/mL

para o extrato das folhas, demonstrando que concentrações elevadas dos extratos têm influência direta sobre a movimentação das larvas. As larvas expostas a concentração máxima (1000,0 µg/mL) dos extratos da casca e folha, apresentaram percentuais de vivos inferiores a 40% e 20%, respectivamente.



**FIGURA 2** - Taxa mortalidade (%) de *Artemia salina* Leach. em função da concentração dos extratos (µg/mL) das cascas (a) e folhas (b) de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Estevão *et al.* (2008), que ao avaliarem a toxicidade do extrato etanólico da entrecasca de *Z. joazeiro* frente as larvas de *A. salina*, verificaram moderada toxicidade, com  $CL_{50}$  inferior a 1000 µg/mL. Um estudo realizado com o extrato etanólico a 95% da casca de *Z. joazeiro*, na concentração de 1000,0 µg/ml, revelou baixa ação larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* e alta toxicidade frente as larvas de *A. salina*, com um total de 83% de óbitos ao término do experimento (Luna *et al.* 2005).

Dolabela (1997) criou um critério de classificação dos solventes hidroetanólicos, com base nos níveis de  $CL_{50}$  frente às larvas de *A. salina*, e estabeleceu uma correlação entre o limite de toxicidade para *A. salina* e a ação anti-tripanosômica onde a maioria dos extratos com ação frente às larvas de *A. salina* exibiram toxicidade moderada ao protozoário. A toxicidade aguda

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

e DL<sub>50</sub> do extrato aquoso das cascas foi avaliada com ratos machos e fêmeas, por via oral, com 1-5,0 g/kg, não sendo observado efeito letal em nenhuma dose (Alviano *et al.*, 2008).

## **CONCLUSÃO**

Este estudo teve como importância observar que os teores de metabólitos presentes nas folhas são superiores aos presentes nas cascas, sendo assim, a substituição do uso popular das cascas pelas folhas (fonte renovável), poderia constituir uma atitude importante para a preservação da espécie. Observou-se também a presença de metabólitos secundários na espécie estudada ainda não foram mencionados na literatura.

A utilização do bioensaio de letalidade da *A.salina* na avaliação de extratos brutos das cascas e folhas de *Z. joazeiro* foi simples e eficiente revelando resultados interessantes, os quais foram considerados moderadamente tóxicos. Estes extratos podem vir a apresentar atividade citotóxica.

## **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)/CNPq, pela concessão da bolsa de estudos de T.C.L. Silva e T.J.S. Peixoto Sobrinho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro através do “Edital Universal” a E.L.C. Amorim.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.17, n.1, p.114-140, 2007a.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol*, v.111, p.383-395, 2007b.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Bot Bras*, v.16, n.3, p.273-285, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed*, v.2, n.30, p.1-10, 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, 2007a.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol*, v.114, p.325-354, 2007b.
- 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). *J Arid Environ*, v.62, n.1, p.127, 2005.
- ALVIANO, W.S.; ALVIANO, D.S.; DINIZ, C.G.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, C.S.; 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. *Arch oral biol*, v.53, p.545-552, 2008.
- AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; ARAÚJO, T.A.S.; ALBUQUERQUE, U.P. A Simple and Accurate Procedure for the Determination of Tannin and Flavonoid Levels and Some Applications in Ethnobotany and Ethnopharmacology. *Functional Ecosystems and Communities*, v.2, n.1, p.88-94, 2008.
- ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ethnopharmacol*, v. 120, p. 72-80, 2008.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

- BARBOSA FILHO, J.M.; TRIGUEIRO, J.A.; CHERIYAN, U.O.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of The Stem-Bark of *Zizyphus joazeiro*. *J Nat Prod*, v.48, n.1, p.152-153. 1985.
- CRUZ, M.C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; MELO, D.L.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol*, v.111, p.409-412, 2007.
- DOLABELA, M.F. Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ESTEVAM, E.C.; XAVIER, A.L.; PITA, J.C.L.R.; LIMA, C.S.A.; DINIZ, M.F.F.M. Toxicidade do extrato etanólico de *Zizyphus joazeiro* Mart. sobre *Artemia salina* Leach. In: II Reunião Regional da FESBE, 2007, Recife. Anais da II Reunião Regional da FESBE, 2007.
- FERRAZ, J.S.F.; MEUNIER, I.M.J.; ALBUQUERQUE, U.P. Os usos medicinais das árvores de mata ciliar da Caatinga. 2007. Disponível em: [http://www.ufrpe.br/artigo\\_ver.php?idConteudo=1296](http://www.ufrpe.br/artigo_ver.php?idConteudo=1296). Acesso em: 20/09/2008.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J Biol Chem*, v.73, p.627-650, 1927.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC. 2004, p.13-28.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoids in research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.
- HIGUCHI, R.; KUBOTA, S.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; PANDEY, V.B.; SINGH, J.P.; SHAH, A.H. Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. *Phytochemistry*, v.23, n.11, p.2597-2600, 1984.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2002. 544 p.
- LUNA, J. S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*, v.97, p.199-206, 2005.
- MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, v.66, p.2399-2407, 2005.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta med*, v.45, p.31, 1982.
- MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; AMORIM, E.L.C.; ARAUJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. *Rev Árvore*, v.29, n.6, p. 999-1005, 2005.
- OLIVEIRA, A.F.; MEIRELLES, S.T.; SALATINO, A. Epicuticular waxes from Caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Ann Braz Acad Sci*, v.75, n.4, p.431-439, 2003.
- OLIVEIRA, A.F.M.; SALATINO, A. Major constituents of the foliar apicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. *J Biosciences*, v.55, n.9, p.688-692, 2000.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; SILVA, C.H.T.P.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev Bras Cien Farm*, v. 44, n.4, p.683-689, 2008.
- RODRIGUES, E.; ROMANUS, P.C.; GIORGETTI, M.; OTSUKA, R.D. A investigação de plantas medicinais a partir da etnofarmacologia. In: ALVES, A.G.C. (Org.) *et al. Atualidades em etnobiologia e etnoecologia*. Recife: NUPEEA/Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia. v. 2, p. 107-120. 2005.
- SCHÜHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. Novel triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. *Helv Chim Acta*, v.83, n.7, p.1509-1516, 2000.
- SCHUHLY, W; HEILMANN, J; CALIS, I, STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Plant Med*, v.65, n.8, p.740-743, 1999.
- VERZA, S. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *psidium guajava* L. *Quím. Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-20, 2007 .
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlim: Ed. Springer Verlag, 1996, 384p.

## 5. Artigo 2:

Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas.



SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

## 5. ARTIGO 2

### ARTIGO 2 SUBMETIDO A:

**Revista:** Revista Química Nova

**Título:** Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas.

**Autores:** Tássia Campos de Lima e Silva, Camila Castelo Branco Rangel de Almeida, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, Elizianne Pereira Costa, Janete Magali de Araújo

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Ziziphus joazeiro* MART.  
(RHAMNACEAE): AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE CASCAS E FOLHAS**

**Tássia Campos de Lima e Silva, Camila Castelo Branco Rangel de Almeida, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim\***

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife - PE, Brasil

**Elizianne Pereira Costa, Janete Magali de Araújo**

Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521 Recife - PE, Brasil

---

\* e-mail: elba@ufpe.br

**ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Ziziphus joazeiro* MART. (RHAMNACEAE): COMPARISON BETWEEN BARK AND LEAVES**

The objectives of this study were to determine the antioxidant and antimicrobial activities of the bark and leaves of *Ziziphus joazeiro* Mart. The antioxidant activity was assayed by the DPPH and the antimicrobial disk diffusion followed by minimum inhibitory concentration (MIC). The results of antioxidant activity showed EC<sub>50</sub> of 461.88 and 1743.05 mg/mL for the leaf and bark, respectively. Samples were active against 70% of the bacteria tested. The leaf extract showed MIC of 0.25-0.5 mg/mL against *Micrococcus luteus* and 0.125-0.250 mg/mL against *Mycobacterium smegmatis*, while the bark extract showed MIC of 0.5-1.0 mg/mL against *M. smegmatis*.

Keywords: juazeiro; DPPH; MIC.

## INTRODUÇÃO

A atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres que reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e o aparecimento de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática.<sup>1</sup> Antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação e/ou propagação da reação de oxidação em cadeia.<sup>1-6</sup>

Pertencente a família Rhamnaceae, o gênero *Ziziphus* Mill. possui cerca de 100 espécies amplamente distribuídas no globo, sendo *Z. joazeiro* Mart., conhecida por juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, o representante mais notável do bioma Caatinga.<sup>7</sup> *Z. joazeiro* apresenta vasto uso popular para o tratamento de problemas de pele como dermatites e micoses.<sup>8-10</sup> De acordo com Albuquerque e *et al.* (2007a)<sup>8</sup> a planta inteira possui diversos usos medicinais, como anti-séptico bucal, contra problemas dermatológico (caspa, sarna, dermatite por seborréia e coceiras), do sistema respiratório (asma, tosse, pneumonia, tuberculose, bronquites, inflamação de garganta e gripe) e sistema digestório (constipação, estomatite e má-digestão), sendo ainda relatado o uso como cicatrizante.<sup>11,12</sup>

Estudos da atividade antifúngica com a entrecasca da planta foram realizados com a finalidade de avaliar a ação contra monilíase e dermatoses. Observou-se atividade importante frente a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, com valores de CMI inferiores ao do controle (anfotericina B) e *Candida guilliermondii*, *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, com resultados semelhantes ao do antibiótico de referência.<sup>10</sup> Este fato, somado ao alto custo dos antibióticos de última geração e o fenômeno de resistência de droga emergindo, aumenta a procura por novas substâncias com menor custo.<sup>13</sup>

Em estudos conduzidos por Alviano *et al* (2008),<sup>13</sup> o extrato aquoso, da entrecasca de *Ziziphus joazeiro* Mart., apresentou atividade contra bactérias da microbiota oral, associadas a doenças peridentais, *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutan* e *Lactobacillus casei*, bactérias cariogênicas. A atividade antioxidante também foi avaliada pelos autores a partir de ensaios fotométricos, apresentando o extrato aquoso da entrecasca um bom potencial antioxidante.

Ensaio pré clínicos são relatados por Nunes *et al.* (1987),<sup>14</sup> avaliando a atividade antipirética do extrato aquoso das cascas de Juá em coelhos infectados com a endotoxina de *E. coli*. Os autores relataram que houve uma diminuição significativa da febre nos animais através da administração oral da infusão. A ação antipirética foi também observada para o extrato metanólico das folhas de *Zizyphus oxyphylla* Edgew.<sup>15</sup>

Em relação a composição química da entrecasca da planta, é relatada a presença de ácido betulínico, ácido oleanólico e saponina.<sup>16,17</sup> A cera epicuticular das folhas de *Z. joazeiro* Mart. é rica em n-alcanos que retêm água na planta, além de triterpenóides (lupeol, beta-amirina, epifriedelinol e ácido ursólico).<sup>18,19</sup>

Schühly *et al.* (1999, 2000)<sup>20,21</sup> isolaram, do extrato metanólico da entrecasca, duas novas saponinas e uma aglicona, e posteriormente realizaram testes antimicrobianos utilizando extrato bruto com diclorometano, para o qual se observou atividade apenas frente a bactérias Gram-positivas, com destaque para *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*.

O presente estudo analisou a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de uma investigação comparativa entre cascas e folhas. Para o estudo da atividade antimicrobiana foram testadas cepas relacionadas a infecções nosocomiais e da flora bacteriana da pele com queimadura.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Caracterização da área e coleta de material vegetal**

A coleta foi realizada no município de Altinho, distante 163 km do Recife, localizado no Agreste central de Pernambuco e com área total de 454.486 km<sup>2</sup>, com clima Bsh (semi-árido quente),<sup>22</sup> na zona rural deste município, na comunidade de Carão (08°35'13,5"S e 36°05'34,6"W) a 469 m acima do nível do mar, localizada a 16 km do centro urbano.

### **Preparação do material vegetal**

As amostras coletadas de *Z. joazeiro* foram acondicionadas em sacos de papel até o processo de secagem. O material testemunho foi armazenado no Herbário UFP Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica na Universidade Federal de Pernambuco (exsicata de nº. 55.097). Após secagem à temperatura ambiente, o material foi submetido à trituração, sendo o pó resultante devidamente identificado.

### **Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos**

A ação antioxidante foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes no joazeiro em captarem o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), conforme a metodologia descrita por Sousa *et al.* (2007).<sup>23</sup> Como controle, foi utilizado 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 1 mM e 3 mL de etanol. Para avaliar a atividade captadora de radical, foi obtida a porcentagem de inibição, conforme a equação:

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

$$\% \text{ de Inibição} = \left[ \frac{(Abs_{Controle} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Controle}} \right] \times 100$$

Onde: Abs controle = absorbância do controle (solução de DDPH sem antioxidante); Abs amostra = absorbância da amostra a ser testada. Comprimento de onda: 517nm.

A determinação da CE<sub>50</sub>, ou seja, concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH, foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente, utilizando os valores das médias em triplicata.

### **Ensaio microbiológicos**

A atividade antimicrobiana foi avaliada em dois ensaios. Inicialmente realizou-se o teste de difusão em disco de papel conforme Bauer *et al.* (1966),<sup>24</sup> com adaptações. Posteriormente, para os extratos que apresentaram halos de inibição acima de 15 mm, determinou-se a Concentração Mínima Inibitória.<sup>25</sup>

### **Microorganismos testes**

Os extratos de *Z. joazeiro* foram avaliados frente a microrganismos representantes de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes, fungos filamentosos e leveduras (Tabela 1) cultivados em meios apropriados para cada espécie.

Os microrganismos selecionados estão associados à infecção nosocomial e estão presentes na flora bacteriana colonizante da ferida por queimadura, cujo tratamento é importante para evitar complicações infecciosas mais graves.<sup>26</sup> Estes foram doados pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de

Pernambuco, sendo posteriormente incorporados a coleção de microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

### **Difusão em disco**

Os microorganismos utilizados nos testes, foram mantidos nos meios de agar correspondentes, a 5 ° C. Para o teste previamente dito, foi preparada uma suspensão dos microorganismos em solução fisiológica estéril, a uma concentração de  $3 \times 10^8$  UFC/ mL, após terem sido repicados com 24 horas de antecedência (com exceção de *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* que foram 48 horas), para que fossem usadas colônias no ápice da curva de crescimento, na escala padronizada MacFarland de 2,0 para *Mycobacterium smegmatis* e para os demais na escala de 0,5 a 1,0.<sup>27</sup> Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução dos extratos foram usados como controle negativo. Os testes foram sempre realizados em triplicata.

A leitura dos halos de inibição foi realizada, após incubação, a temperaturas de 30°C para *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*, durante 48 horas e 35 °C para as demais bactérias durante 24 horas.

Foi avaliado o grau de atividade para cada amostra, comparando os diâmetros dos halos de inibição e número de resultados positivos frente aos microorganismos estudados, sendo considerado que o extrato tem forte atividade quando o mesmo produz halos superiores a 16 mm; moderada atividade, para halos entre 13 mm e 15 mm e baixa atividade para halos abaixo de 12 mm.



### **Concentração Mínima Inibitória (CMI) em meio sólido**

Para a determinação da CMI foi usada a técnica em meio sólido, usando concentrações de 5000, 2500, 1250, 1000, 500, 250, 125, 60, 30 e 10 µg/mL, de acordo com as recomendações do NCCLS (1997)<sup>25</sup>. Os testes foram realizados em duplicata. Empregaram-se nesta etapa os seguintes microorganismos para cascas: *Mycobacterium smegmatis* e *Enterococcus faecalis*, e para folhas: *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus* e *Mycobacterium smegmatis*, pois para estes microorganismos observou-se halos de inibição superiores a 15mm.

A suspensão-inóculo das amostras testadas foi preparada em solução salina (NaCl p/v 0,85%), a partir de culturas de 18-20 horas em ágar Muller Hinton, e a turbidez da suspensão foi padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. As placas foram inoculadas, após 30 minutos de preparo do inóculo. Após incubação de 48 horas para *Mycobacterium smegmatis* e 24 horas para as demais bactérias a 37°C foi observada a ocorrência de turvação das cepas presentes na superfície da placa.

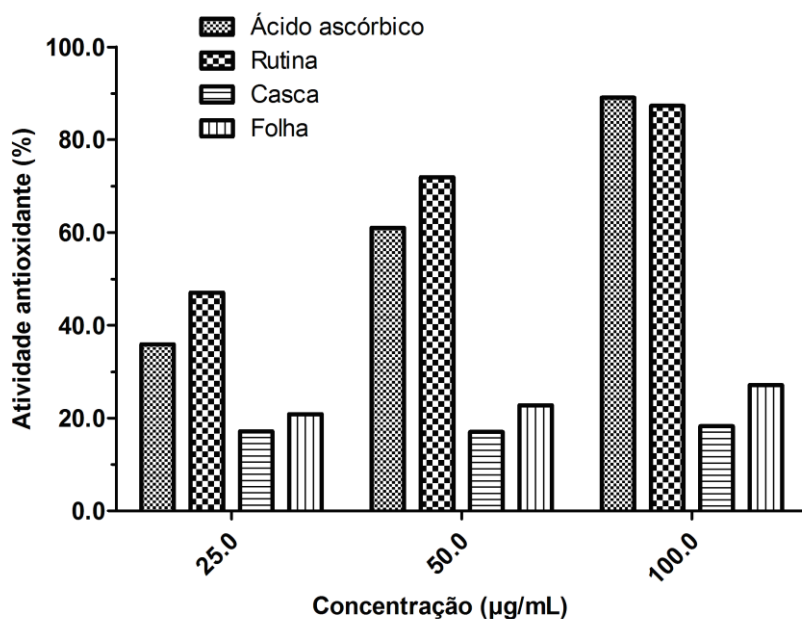
A CMI foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento dos microrganismos visíveis a olho nu, em comparação ao controle. Foram levados em consideração os níveis aceitáveis de inibição dos extratos de plantas quando comparados com os padrões, sendo considerados fortes inibidores até 500 µg/mL; inibidores moderados entre 600 e 1500 µg/mL; inibidores fracos acima 1600 µg/mL.<sup>28</sup>

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos**

Os resultados da atividade antioxidante CE<sub>50</sub> foram 461,88 e 1743,05 µg/mL para folhas e cascas, respectivamente. No entanto, estes resultados estão abaixo dos padrões ácido

ascórbico ( $CE_{50} = 13,95 \mu\text{g/mL}$ ) e rutina ( $CE_{50} = 40,48 \mu\text{g/mL}$ ). Na Figura 1 são apresentados os dados da porcentagem de atividade antioxidante das amostras das folhas e cascas de *Z. joazeiro* e padrões.



**Figura 1.** Porcentagens de atividade antioxidante obtidas pelo teste de DPPH nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

Alviano *et al.* (2008)<sup>13</sup> utilizando o mesmo método avaliaram a atividade antioxidante de *Z. joazeiro* e obtiveram para o extrato etanólico da entrecasca um melhor potencial antioxidante ( $CE_{50} = 821.4 \pm 35.3 \mu\text{g/mL}$ ). Acredita-se que a discordância com os valores obtidos no presente estudo é devido a variação da área de coleta. As amostras analisadas no presente trabalho (cascas e folhas de *Z. joazeiro*) apresentaram atividade antioxidante inferior aos controles.

### Teste de difusão em disco

Na Tabela 1 são apresentados os resultados dos halos de inibição (mm). Observa-se que a levedura *Candida albicans* foi inibida fracamente pelo extrato das cascas da planta, no entanto Cruz *et al.* (2007)<sup>10</sup> em seu trabalho sobre plantas medicinais utilizadas para o tratamento de micoses, observou que *C. albicans* foi sensível ao extrato aquoso das cascas de *Z. joazeiro*, apresentando CMI de 25 µg/mL. Os diferentes métodos extrativos e diferentes locais de coleta podem ter levado a resultados distintos.

**Tabela 1.** Resultados dos halos de inibição (mm) para os microorganismos testes, das cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Microorganismo	Cascas	Folhas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	-	11,5 ± 0
<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 01)	11,5 ± 0,5	-
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86)	12,0 ± 1,0	-
<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	10,5±0,5	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (UFPEDA 71)	22,0 ± 3,0	34,0 ± 4,0
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	13,0±1,0	-
<i>Serratia marcescens</i> (UFPEDA 352)	10,0 ± 0	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA 369)	12,0 ± 0	11,0 ± 0
<i>Enterobacter aerogenes</i> (UFPEDA 739)	11,0 ± 1,0	15,0 ± 0
<i>Acinetobacter baumannii</i> (UFPEDA 738)	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (UFPEDA 737)	10,0 ± 1,0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	-	11,0 ± 0
<i>Proteus vulgares</i> (UFPEDA 740)	10,5 ± 0,5	10,0 ± 0
<i>Micrococcus luteus</i> (UFPEDA 100)	12,5 ± 0,5	16,0± 1,0
<i>Enterobacter cloacae</i> (UFPEDA 55)	-	-
<i>Staphylococcus sp.</i> Coagulase (UFPEDA 629)	-	-

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

<i>Streptococcus pyogenes</i> (UFPEDA 07)	10,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5
---	------------	------------

UFPEDA = Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. (-) = Não apresentou halo de inibição

O extrato com atividade mais expressiva foi o das cascas que inibiu 66,66% dos microrganismos testados. Deve ser ressaltado que o extrato na concentração de 10 mg/mL, inibiu tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e álcool-ácido resistente.

Trabalhos sobre a atividade antimicrobiana de outras espécies de *Ziziphus*, são citados na literatura. Ali-Shtayeh *et al.*(1998)<sup>29</sup> ao realizarem estudo com 20 plantas usadas na medicina popular da Palestina observaram para *Ziziphus spinachristi* uma fraca atividade frente as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*), com halos que variaram de 6 a 10mm.

Em estudo desenvolvido por Adamu *et al.* (2005)<sup>30</sup>, extratos aquosos de quatro espécies de *Ziziphus* (*Z. abyssinica*, *Z. spina-christi*, *Z. mauritiana* e *Z. mucronata*), coletadas na Nigéria, mostraram atividade contra cepas de *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, no entanto apenas a espécie *Z. mucronata* apresentou halos de inibição maiores que 15mm.

### Concentração mínima inibitória (CMI) em meio sólido

A concentração mínima inibitória (CMI) em meio sólido foi determinada para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana mais significativa (Tabela 2). Observa-se que a CMI dos extratos das cascas de *Z. joazeiro* variou entre 0,5 e 1,0 mg/mL, para *Mycobacterium smegmatis*, sendo este extrato considerado um inibidor moderado. Para esta mesma bactéria, o extrato das folhas mostrou-se mais eficaz, com CMI entre 0,125 e 0,250 mg/mL, sendo considerado um forte inibidor. O extrato das folhas também foi um forte inibidor para *Micrococcus luteus* cuja CMI foi de 0,25-0,5 mg/mL. Já para *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter aerogenes* os extratos das cascas e das folhas de joazeiro são considerados inibidores fracos, apresentando CMI's respectivamente >10,0 mg/mL e entre 5,0 e 10,0 mg/mL.

**Tabela 2.** Concentração mínima inibitória (CMI) em mg/mL em meio sólido dos extratos das cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart.

Microorganismo	Cascas	Folhas
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (UFPEDA 71)	0,5-1,0	0,125 - 0,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057	>10,0	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (UFPEDA 739)	-	5,0 – 10,0
<i>Micrococcus luteus</i> (UFPEDA 100)	-	0,25 - 0,5

(-) = Teste não realizado

Cruz *et al.*, 2007,<sup>10</sup> verificaram que o extrato aquoso das cascas desta espécie inibiu 100% dos fungos testados (6 espécies), com CMI variando entre 6,25 a 400 µg/mL. Da

mesma forma, Alviano *et al.* (2008)<sup>13</sup> também observaram efeito inibitório em estudos conduzidos com o extrato aquoso apresentando atividade contra 5 bactérias da microbiota oral, associadas a doenças peridentais e cariogênicas com CMI variando entre 1000 e 16000 µg/mL.

Outra espécie de *Ziziphus*, como *Ziziphus spinachristi* foi testada recentemente por Eldeen *et al.* (2008)<sup>31</sup>, em um estudo comparativo entre diferentes tipos de extratos (diclorometano, acetato de etila e etanólico) e duas partes da planta (cascas e folhas) frente a *Mycobacterium aurum* A+, onde foi observada melhor atividade com o extrato etanólico das cascas (CMI de 0,39 mg/mL). Para as folhas a CMI foi de 6,25 mg/mL.

A espécie *Zizyphus jujuba*, considerada exótica na Europa e no Sudeste Asiático foi testada por Al-Reza *et al.* (2009)<sup>32</sup> frente cinco diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*, bactéria responsável pela deteriorização precoce de alimentos. Os quatro extratos de cascas testados (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico) tiveram comportamento semelhante, com variação de CMI entre 0,0625 a 0,500 mg/mL, sendo o extrato hexânico o menos ativo.

A partir de levantamento realizado em bancos de dados internacionais sobre a patogenia das bactérias, as quais os extratos obtiveram melhores resultados, foi observado que *Mycobacterium smegmatis*, é uma espécie de bacilo álcool-ácido resistente, originalmente isolada do esmegma humano, saprófita, geralmente não patogênica (patógeno oportunista), está associada a lesões dos tecidos moles, após trauma ou cirurgia. Também é relatado como um possível fator na carcinogênese peniana, além de estar relacionada à doenças genitais como cancos sífilicos, é encontrada no solo e na água.<sup>33</sup>

*Enterobacter aerogenes* são bastonetes Gram-negativos, encapsulados, produtores de gás e encontrados amplamente na natureza. Existem tanto as cepas móveis quanto as imóveis. A espécie é intimamente associada a infecções nosocomiais, incluindo inserções de cateteres

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

venosos e procedimentos cirúrgicos. *Micrococcus luteus* é uma bactéria Gram-positiva e seu habitat primário é a pele de mamíferos. *Enterococcus faecalis* normalmente presente na flora intestinal humana é responsável por infecções intestinais e urinárias.<sup>33</sup>

O extrato vegetal de *Z. joazeiro* devido ao seu potencial antimicrobiano pode ser considerado um recurso promissor para o tratamento de tais enfermidades.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro à T.C.L.Silva e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido a E.L.C. Amorim através do Edital Universal. Agradecemos a Dra. Maria do Carmo Monteiro Villar, do Laboratório de Bacteriologia – HC/UFPE, pela coleta e doação das cepas dos isolados clínicos.

## REFERÊNCIAS

1. Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Leal, F. L. L.; Caetano, A. C. S.; Nascimento, R. J. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*. **2006**, 26, 639.
2. Al-Mamary, M.; Al-Meerri, A.; Al-Habori, M. *Nutr. Res*. **2002**, 22,1041.
3. Moreira, D. L.; Engelhardt, R. L.; Reis, A.S.; Sanches, E. M.; Leitão, S. G.; Leitão, G. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2002**, 12(Supl.), 124.
4. Chanwitheesuk, A.; Teerawutgulrag, A.; Rakariyatham, N. *Food Chem*. **2005**, 92, 491.
5. Wu, J. H.; Tung, Y. T.; Wang, S. Y.; Shyur, L. F.; Kuo, Y. H.; Chang, S. T. *J. Agric. Food Chem.***2005**, 53, 5917.
6. Lima, A. R.; Barbosa, V. C.; Santos Filho, P. R.; Gouvêa, C. M. C. P. *Revista Brasileira de farmacognosia*, **2006** , 16, 531.
7. Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.*: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA.: São Paulo, 2002.
8. Albuquerque, U. P.; Medeiros, P. M.; Almeida, A.L.S.; Monteiro, J.M.; Lins Neto, E.M.F.; Melo, J.G.; Santos, J.P. *J. Ethnopharmacol*. **2007**, 114, 325.
9. Albuquerque, U.P.; Oliveira, R.F. *J. Ethnopharmacol*. **2007**, 113, 156.
10. 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. *J. Ethnopharmacol*. **2007**, 111, 409.
11. Almeida, C.F.C.B.R.; Silva, T.C.L.; Amorim, E.L.C.; Maia, M.B.S.; Albuquerque, U.P. *J. Arid Environ.***2005**, 62, 127.
12. Albuquerque, U. P. *J. Ethnobiol. Ethnomed*. **2006**, 2, 1.
13. Alviano, W.S., Alviano, D.S., Diniz, C.G., Antonioli, A.R., Alviano, C.S., Farias, L.M., Carvalho, M.A.R., Souza, M.G., Bolognese, A.M. *Arch. oral biol*. **2008**, 53, 545.
14. Nunes, P.H.M., Marinho, L.C., Nunes, M.L.R.L., Soares, E.O.. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **1987**, 20, 599.
15. Nisar, M., Adzu, B., Inamullah, K., Bashir, A., Ihsan, A., Gilani, A.H. *Phytotherapy Res*. **2007**, 21, 693.



SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

16. Barbosa Filho, J.M., Trigueiro, J.A., Cheriyan,, U.O., Bhattacharyya, J. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48, 152.
17. Higuchi, R., Kubota, S., Komori, T., Kawasaki, T., Pandey, V.B., Singh, J.P., Shah, A.H. *Phytochem.* **1984**, 23, 2597.
18. Oliveira, A.F., Meirelles, S. T., Salatino, A. *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2003**, 75, 431.
19. Oliveira, A.F.M., Salatino, A. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A J. Biosci.* **2000**, 55, 688.
20. Schühly, W., Heilmann , J., Çalis, I., Sticher, O. *Helvetica Chimica Acta*, **2000**, 83, 1509.
21. Schuhly, W; Heilmann, J; Calis, I, Sticher, O. *Planta Med.* **1999**, 65, 740.
22. IBGE, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, **2000**.
23. Sousa, C.M.M.; Rocha e Silva, H.; Vieira Júnior, G.M.; Ayres, M.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. *Quím. Nova*, **2007**, 30, 351.
24. Bauer, A.W.; Kyrby, W.N.M.; Serris, J. C.; Turck, M. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, 45, 493.
25. NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Tentative Standards*. Waine: Villa Nova, Doc. M31-T, 1997.
26. Martins, G.R.; Costa, S.S.S.; Abdalla, L.F.; Gomes, S.T.A.; Macedo, J.L.S. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial In: 38o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial*, Florianópolis, Brasil, 2004.
27. Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. *Manual of clinical microbiology*, 6<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology: Washington D. C., 1995.
28. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; mitaku S.; Chinou, I.B. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4168.
29. Ali-Shtayeh, M.S.; Yaghmour, R.M.R.; Faidi, Y.R.; Salem, K.; Al-Nuri, M.A. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, 60, 265.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

30. Adamu, H.M.; Abayeh, O.J.; Agho, M.O.; Abdullahi, A.L.; Uba, A.; Dukku, H.U.; Wufem, B.M. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 99, 1.
31. Eldeen I.M.S.; Van Staden J. *South African J. Bot.* **2008**, 74, 225.
32. Al-Reza, S.M.; Bajpai, V.K.; Kang, S.C. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, 47, 2374.
33. Winn, W.C.; Koneman, E.W. *Koneman: Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido*. 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 1535.

## 6. Conclusão

## 6. CONCLUSÃO

Observou-se na triagem fitoquímica metabólitos secundários que não foram citados na literatura, sendo o extrato das folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. que apresentou maior número destes compostos.

Considerando que foram observadas diferenças significativas entre os teores de fenóis totais, taninos e flavonóides nos extratos analisados, onde as folhas apresentaram maior teor (no extrato da casca não foi encontrado um teor de flavonóide significativo), levando em consideração as propriedades farmacológicas que estes metabólitos possuem, propõe-se um sistema de manejo e extração que promova, em determinadas épocas, a intercalação ou até mesmo mudança dos recursos, visando reduzir a pressão sobre as cascas evitando a destruição de árvores desnecessariamente, pois culturalmente a parte da planta mais utilizada pela população é a casca.

As folhas e cascas não tiveram uma atividade antioxidante significativa se comparada com os controles utilizados, no entanto ambos os extratos apresentaram esta atividade, havendo uma possibilidade de desenvolver produtos fitoterápicos afim de retardar ou prevenir significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia.

A CL<sub>50</sub> foi utilizada para demonstrar a concentração tóxica dos extratos das cascas e folhas da espécie. *Artemia salina* se apresentou como um bom indicador de toxicidade preliminar, além de constituir um teste simples de baixo custo. O extrato foliar apresentou maior toxicidade quando comparada ao extrato da casca, no entanto ambos foram considerados moderadamente tóxicos, possibilitando estudos futuros de citotoxicidade.

Os experimentos laboratoriais realizados durante esta pesquisa demonstraram que a espécie é capaz de inibir o crescimento de cerca de 66% dos microorganismos testados, sendo maior número de cepas inibidas com o extrato das cascas, no entanto o extrato foliar apresentou resultados mais significativos.

Pela CMI foi considerado o extrato da casca como um inibidor moderado a fraco frente as cepas testadas e o extrato foliar foi considerado um forte inibidor destas mesmas cepas, havendo a possibilidade de se desenvolver medicamentos a partir das folhas desta planta de tradicional valor dermatológico e antimicrobiano.

Embora os resultados obtidos neste estudo suportem o uso fitoterápico deste vegetal não se recomenda, sem estudos toxicológicos mais aprofundados, o uso desta planta no combate a infecções severas.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

Propõe-se um aprofundamento de estudos pré-clínicos de *Z. joazeiro* a fim de se estabelecer uma concentração segura e efetiva para o uso pela população.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, P.D. **Water pollution Biology**. Chichester. Ellis Horwood Ltd, Publishers. 231p. 1989.
- AGRA, M.F., FREITAS, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.114-140. 2007a.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383, 2007b.
- AJALI, U. & CHUKWURAH, B. K. C. Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. **Phytomedicine**, v.11, p.701-03, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, n.30, p.1-10, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P., MEDEIROS, P. M., ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., LINS NETO, E. M. F., MELO, J. G., SANTOS, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114: 325–354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P., OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native *Caatinga* species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, 113, 156 - 170, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3. p. 273-285. 2002a.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, n. 7. p. 336-345. 2002b.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v.22, n.9, p.1041-47, 2002.
- 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, n.1, p.127-42, 2005.
- ALVIANO, D.S., RODRIGUES, K.F., LEITAO, S.G., RODRIGUES, M.L., MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D., *et al.* Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.269–73. 2004.
- ALVIANO, W.S., ALVIANO, D.S., DINIZ, C.G., ANTONIOLLI, A.R., ALVIANO, C.S., 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.
- ARBONNIER M. 2000. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d’Afrique de l’Ouest. CIRAD, MNHN, UICN, Montpellier, France, pp. 438–442.

ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. **Food chemistry**, v.104, p.21-29, 2007.

AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B. Diversity of structure and anti-herbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v.78, p.1696. 1997.

BARBOSA FILHO, J.M.; TRIGUEIRO, J.A.; CHERIYAN, U.O.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of The Stem-Bark of *Zizyphus joazeiro*. **J Nat Prod**, v.48, n.1, p.152-153. 1985.

BAUER A.W.; KYRBY W.N.M.; SERRIS, J. C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, n.45, p.493-9. 1966

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, v.181, p.1199, 1958.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Espanha, Ed. Acribia, SA. 1991.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 3. 593 p.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*), em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, n.2, p.29. 1999.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, p.168, 1998a.

CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C.; HUANG, Y.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.38, p.421, 1998b

CRUZ, M.C.S., SANTOS, P.O., BARBOSA JR., A.M., MÉLO, D.L.F.M. de, 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.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRET, F.; BLASINA, F.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p.1613, 2003.

DOWD, T. B.; TILSON, D. E. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. Philadelphia, W.B Saunders company, second edition, 1999.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.26, p.446-452. 2006.

EL-HABIT, O.H.M *et al*. The modifying of  $\beta$ -carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in males. **Mutation Research**, v.466, p. 179. 2000.

FERNANDES, A. Biodiversidade da Caatinga. In: ARAÚJO, E. L.; MOURA, A. N.; SAMPAIO, E. S. B.; GESTINARI, L. M. S.; CARNEIRO, J. M. T. **Biodiversidade** ,

**Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil.** Imprensa Universitária, UFRPE. 2002. p. 42-44. 262 p.

FERRAZ, J.S.F.; MEUNIER, I.M.J.; ALBUQUERQUE, U. P. **Os usos medicinais das árvores de mata ciliar da Caatinga.** 2007. Disponível em : [http://www.ufrpe.br/artigo\\_ver.php?idConteudo=1296](http://www.ufrpe.br/artigo_ver.php?idConteudo=1296). Acesso em: 20 set. 2008.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; PRESSER, D.; ATTIAS, J.; HAYEK, T.; AVIRAM, M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels, and decreased systolic blood pressure. **Nutrition**, v.18, p. 268, 2002.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; BARBOSA, M.R.V.; NETA, A.L.B. ; FIGUEIREDO, M.A. Espécies endêmicas da Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (editores). **Vegetação e flora da Caatinga.** APNE – CNIP. 2002. p. 103-119. 176p.

GULCIN, I.; ALICI, H.A.; CESUR, M. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. **Chem. Pharm. Bull.**, 53: 281-285, 2005.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1990.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids in research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481, 2000.

HELDT, H.; **Plant Biochemistry and Molecular Biology.** University Press: Oxford, 1997.

HIGUCHI, R., KUBOTA, S., KOMORI, T., KAWASAKI, T., PANDEY, V.B., SINGH, J.P., SHAH, A.H. Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. **Phytochemistry**, v.23, n.11, p.2597-600. 1984.

IANNUZZI, L.; MAIA, A. C. D.; NOBRE, C. E. B.; SUZUKI, D. K.; MUNIZ, F. J. A. Padrões locais de diversidade de Coleoptera (Insecta) em vegetação de Caatinga. In LEAL, I. R.; TABARELLI, M. & SILVA, J. M. C. (eds). **Ecologia e conservação da Caatinga.** Recife, Editora Universitária da UFPE, p.367-389, 2003.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2000.

KEW 250<sup>th</sup> - ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Juazeiro.** Disponível em: <http://www.kew.org/science/directory/projects/annex/PlantInfoNEBrazilANN3.pdf>. Acesso em: 01 novembro 2009.

KHENNOUF, S.; BENABDALLAH, H.; GHARZOULI, K.; AMIRA, S.; ITO, N.; KIM, T.; YOSHIDA, T.; GHARZOULI, A.; Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1469, 2003.

KILKUSKIE, R. E.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BODNER, A.; CHENG, Y.; LEE, K. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.2, n.12, p.1529, 1992.

KUMARAN, A.; KARUKUMARAN, J. *In vitro* antioxidant activity of methanol extracts of five *phyllanthus* species from India. **LTW**, v.40, p.344-352, 2007.



- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.16, p.531-6, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA., 2002. 887p.
- LUNA, J. S., SANTOS, A.F., LIMA, M.R.F, OMENA, M.C., MENDONÇA, F.A.C., BIEBER, L.W., SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.97, p.199–206. 2005.
- MAIA, A. C. D.; IANNUZZI, L.; NOBRE, C. E. B.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Padrões locais de diversidade de Cerambycidae (Insecta, Coleoptera) em vegetação de Caatinga. In LEAL, I. R.; TABARELLI, M. & SILVA, J. M. C. (eds). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária da UFPE, p.391-433, 2003.
- MARKHAN, K.R. Techniques of flavonoids identification. London: Academic Press.1982.113p.
- MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, 66: 2399, 2005.
- MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P. (Orgs.). Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001. p. 527-554.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade Antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.639-44, 2006.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medida**, v.45, p.31, 1982.
- MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA FILHO, N.; FROTA, A. R.; ELY, P. B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. A. & MARRONI, N. P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.3, p.232, 2003.
- MOLE, S. The systematic distribution of tannins in the leaves of Angiosperms: a tool for ecological studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.21, n.8 p.833, 1993.
- MOORE, P. D. Green policies for defence spending. **Nature**, 391: 838, 1998.
- MOREIRA, J.N.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; FERREIRA, M.A.; ARAÚJO, G.G.L.; FERREIRA, R.L.C.; SILVA, G.C. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 41 (11): 1643-1651, nov. 2006.
- NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4): 279-282, 2005.
- 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, n.7, p.693– 5, 2007.
- NISHIZAWA, K.; NAKATA, I.; KISHIDA, A.; AYER, W. A.; BROWNE, L. M. Some biologically activities tannins of *Nuphar variegatum*. **Phytochemistry**, v.29, n.8, p. 2491, 1990.

- NUNES, P.H.M., MARINHO, L.C., NUNES, M.L.R.L., SOARES, E.O. Antipyretic activity of an aqueous extract of *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.20, n.5, p.599-601. 1987.
- OLIVEIRA, A.F.M., SALATINO, A. Major constituents of the foliar apicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. **Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences** . v.55, n.9-10, p.688-92. 2000.
- OLIVEIRA, A.F., MEIRELLES, S. T., SALATINO, A. Epicuticular waxes from Caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.75, n.4, p.431-9. 2003.
- PAES, J. B.; MEDEIROS, V. M.; LIMA, C.R.: Resistência das madeira de aroeira (*Myracrodouon urundeuva*), cássia (*Senna Sianea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos. **Floresta e Ambiente**, v.9, n.1, p.135, 2002.
- PINHEIRO, F.; DINIZ, I. R.; COELHO, D.; BANDEIRA, M. P. S. Seasonal pattern of insect abundance in the Brazilian Cerrado. **Austral Ecology**, v.27, p.132, 2002.
- RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B. A vegetação do bioma Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (editores). **Vegetação e flora da Caatinga**. APNE – CNIP. 2002. p. 11-25. 176p.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of própolis: role caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, p. 21-29, 2002.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875, 1991.
- SCHÜHLY, W., HEILMANN, J., ÇALIS, I., STICHER, O. Novel Triterpene Saponins from *Zizyphus joazeiro*. **Helvetica Chimica Acta**, v.83, n.7, p. 1509-16. 2000.
- SCHUHLY, W; HEILMANN, J; CALIS, I, STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**, v.65, n.8, p. 740-3. 1999.
- SEJAS, L.M. et al . Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003 .
- SENA L.P., VANDERJAGT D.J., RIVERA C., TSIN A.T.C., MUHAMADU I., MAHAMADOU O., MILLSON M., PASTUSZYN A. AND GLEW R.H. Analysis of nutritional components of eight famine foods in the Republic of Niger. **Plant Food Hum. Nutr.** v.52, p.17-30, 1998.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPIN, J.C.; WICHERS, H.J. An easy fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochem. Anal.**, v.11, p.330-338, 2000.
- SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p. 351-355, 2007.
- STRATIL, P.; KLEDJUS, B.; KUBAN, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v.71, p.1741-1751, 2007.
- TABARELLI, M.; VICENTE, A. Lacunas de conhecimento sobre plantas lenhosas da Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (editores). **Vegetação e flora da Caatinga**. APNE – CNIP. 2002. p. 25-41. 176p.

SILVA, T.C.L. Avaliação comparativa de cascas e folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.

TROVÃO, D.M.B.M.; SILVA, S.C.; SILVA, A.B.; VIEIRA JÚNIOR, R.L. Estudo comparativo entre três fisionomias de Caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Rev. de Biologia e Ciências da Terra**. v.4, n.2, p.: internet, 2004.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales**. 2ª edição. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994. 300p.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e e resistência microbiana: guerra perdida? V. 1, n. 4, 2004. Disponível em : <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/HSE\\_URM\\_atb\\_0304.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/HSE_URM_atb_0304.pdf)>. Acesso em 07/04/2009.

WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. **Radiation Biology**. In: WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. Oral Radiology: principles and interpretation. St Louis: Mosby, 1999. Cap.2, p.22-40.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição, rev. e amp. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cap. 23, p. 577-614. 2004.