

**MARIA DO SOCORRO FERNANDES MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATO DO FRUTO, FOLHA E CASCA DE CAULE  
DO *Zizyphus joazeiro* MART.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e identificação de composto bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

**ALFENAS-MG**

**2010**

**MARIA DO SOCORRO FERNANDES MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATO DO FRUTO, FOLHA E CASCA DE CAULE  
DO *Zizyphus joazeiro* MART.**

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção e identificação de composto bioativos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco - Presidente  
Instituição: UNIFAL-MG

---

Prof. Dra. Claudete Rodrigues Paula  
Instituição: USP

---

Prof. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias  
Instituição: UNIFAL-MG

**Dedico a Deus, aos meus filhos Juliana, André e Amanda, ao meu esposo José Mourivaldo e aos meus pais e amigos pelo apoio na realização deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades

Ao meu orientador, professor Dr. Jorge Kleber Chavasco, meu agradecimento mais que especial, pela simplicidade, humildade, apoio, compreensão e exemplo de pessoa. Sua confiança e orientação foram fontes de meu bem estar e de êxito neste trabalho. Muito obrigado.

A Donatila Abud que sempre me apoiou com palavras de conforto, incentivo e suas orações que tanto me confortaram e me ajudaram nessa caminhada.

A amiga Maria Betânia de Freitas com sua mão amiga nos primeiros passos.

Ao amigo e Engenheiro Agrônomo Leonardo Rodrigues Silva pelo precioso apoio no envio das amostras de *Zizyphus joazeiro* Mart. e ajuda com as exsiccatas.

Ao prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, pela colaboração neste trabalho e por ceder o espaço físico do laboratório LFQM, bem como todo o necessário para a realização das análises fitoquímica. Aos meus colegas e amigos Claudia Rocha e Olivia Domingos por todo apoio durante os trabalhos de laboratório.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas Marcelo de Vieira de Souza, Antonio Bernardes de Souza e Marta Miranda de Figueiredo que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL, por permitir o desenvolvimento deste trabalho. Às instituições colaboradoras nas análises de Ressonância Magnética. Muito obrigada.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O estudo de plantas medicinais possibilita a descoberta de novos compostos bioativos. O aparecimento de microrganismos resistentes aos antibióticos reforça essa pesquisa. Dentre os microrganismos resistentes o *Mycobacterium tuberculosis* apresenta mutação contínua mudando seu perfil de sensibilidade, acarretando insucesso no tratamento. A busca de propriedades antimicrobianas de extratos de plantas e seus constituintes têm sido incentivada e intensificada. Sendo assim, entre inúmeras espécies vegetais a serem investigadas, destaca-se a *Zizyphus joazeiro* Mart., pertencente à família Rhamnaceae, que apresenta em sua composição química uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos, destacando-se triterpenóides e alcalóides de grande interesse medicinal. Sua característica principal é que esta árvore resiste muito bem às secas do sertão nordestino, tornando-se dessa forma muito útil tanto para os homens, fornecendo sombra e frutos, como para animais que comem suas folhas mucilaginosas. O objetivo do trabalho, foi avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro* de extratos de folhas, frutos e casca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. contra leveduras e bactérias Gram positivas, Gram negativas e *M. bovis*. utilizando a técnica de difusão em agar. Todos os extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana. Dos microrganismos utilizados somente *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* mostraram-se sensíveis. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade contra *Mycobacterium bovis*

Palavras-chave: *Zizyphus*, Extratos vegetais, Produtos de ação antimicrobiana.

## ABSTRACT

The study of medicinal plants enables the discovery of new bioactive compounds. The emergence of microorganisms resistant to antibiotics reinforces this research. Among the microorganisms resistant *Mycobacterium tuberculosis* shows continuous change by changing their susceptibility profile, resulting in treatment failure. The search for antimicrobial properties of plant extracts and their constituents have been encouraged and intensified. Thus, among many plant species to be investigated, we highlight the juazeiro. Belonging to the family Rhamnaceae, which presents in its composition a wide variety of bioactive secondary metabolites, especially terpenoids, alkaloids of great medical interest. Its main feature is that this tree resists drought very well in the northeastern and became so useful to men, providing shade and fruit, and animals that eat their leaves mucilage. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity *in vitro* of extracts juazeiro front of microorganisms, including yeasts, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacterium *Mycobacterium bovis* using the technique of agar diffusion. All extracts showed antimicrobial activity. Among the microorganisms evaluated only *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were sensitive. None of the evaluated extracts had antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis*

Key word : *Zizyphus*. Plant Extracts. Antimicrobial products.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Planta adulta do <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	21
Figura 2 –	Folhas e flores <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	21
Figura 3 –	Detalhe do galho com frutos, folhas <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	22
Figura 4 –	Detalhe do Espinho da Planta <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	22
Figura 5	Detalhe da casca do tronco de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.	22
Figura 6 –	Estruturas química de Terpenóides da flora paraibana (I a X)	23
Figura 7 –	Fotos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart. e material coletado	25
Figura 8 –	Exsicata depositada no Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o registro nº 15638.	26
Figura 9 –	Estrutura química do Lupeol	38
Figura 10 –	Halos de inibição de crescimento <i>Bacillus subtilis</i> em agar Mueller-Hinton.	40
Figura 11 –	Prova para avaliação da atividade antimicobacteriana frente a <i>Mycobacterium bovis</i> em meio de Lowenstein–Jensen.	41
Figura 12–	Ilustração do método de microdiluição com caldo Mueller Hinton. em placa contendo 96 poços, testando a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	42
Gráficos 1–	Espectro de Infra Vermelho para EHF- 01 (Lupeol) (KBr, cm <sup>-1</sup> )	34
Gráficos 2–	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, 400, 13 MHz, do Lupeol (EHF-01) em CDCl <sub>3</sub>	35
Gráficos 3–	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do Lupeol (EHF-01), em CDCl <sub>3</sub> a 100,32 M	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Relação de frações obtidas por cromatografia em coluna aberta do extrato hexânico das folhas de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart..	29
Tabela 02	Prospecção fitoquímica realizada nos extratos hidroalcolicos de casca do caule, folhas, fruto verde , em maturação e maduro de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart	33
Tabela 03	Dados de RMN de <sup>13</sup> C de Lupeol (EHF-01) comparados com a literatura.	37
Tabela 04	Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart..	41

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
$\mu\text{g}$	Micrograma
AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American type culture collection
BHI	Infusão de cérebro e coração
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% de organismo vivo
EHF-01	Substância extraída do extrato hexânico da folha
<i>J</i>	Constante acoplamento
IV	Infravermelho
mg	Miligrama
NA	Não ativo
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TB	Tuberculose
XDR	Extensivamente Resistentes

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1	PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITO ANTIMICROBIANO .....	16
3.2	RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	17
3.3	RESISTÊNCIA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18
3.4	FAMILIA RHAMNACEAE.....	20
<b>3.4.1</b>	<b><i>Zizyphus joazeiro</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	25
<b>4.1.1</b>	<b>Identificação do material vegetal.....</b>	<b>26</b>
4.2	MICROORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS.....	27
4.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	<b>27</b>
4.4	ABORDAGEM FITOQUÍMICA.....	28
4.5	OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE <i>Zizyphus joazeiro</i> Mart.....	29
4.6	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	30
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE A <i>Mycobacterium bovis</i> .....	30
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.1	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	32
5.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	33
5.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFÊRENCIA BLIOGRÁFICA.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido imensa variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos. As mudanças na capacidade de sobrevivência dos microrganismos aos medicamentos é um grande desafio enfrentado pelos serviços de saúde no Brasil e em todo mundo, o que resulta em aumento da mortalidade da população, tempo de internação e o custo do tratamento (ANVISA, 2007).

Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos microrganismos resistentes está crescendo e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (COUTINHO et al., 2004). Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais como terapêuticos e, principalmente, com atividade antibiótica devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas ou adaptar as já existentes para que voltem a ter atividade.

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelo para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inesgotável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996).

O conhecimento do uso terapêutico dos recursos naturais pelo homem, ao longo dos tempos, possivelmente garantiu sua sobrevivência e foi objeto de especial cuidado por parte das populações tradicionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizam plantas medicinais como principais recursos no atendimento básico de saúde incluindo populações que usam *in natura* (por opção ou por ser a única alternativa disponível) e os sistemas de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa (YUNES; CECHINEL, 2001).

Na zona da mata pernambucana, Gilberto Freyre registrou que o início desses conhecimentos se deu por intermédio do caboclo, do índio e do negro, principalmente o foragido, que se faziam íntimos da natureza da região para poder sobreviver e assim passavam a conhecer cada árvore e suas utilidades (FERRAZ; MEURIER; ALBUQUERQUE, 2008).

Graças à suas atividades metabólicas secundárias, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microorganismos, insetos e herbívoros (GOTLIEB, 1981).

*Zizyphus joazeiro* Mart. é largamente distribuída em todo o Nordeste brasileiro e em todas as zonas ecológicas, sendo mais abundante no sertão, na caatinga e no agreste (SILVA e MATOS 1998). Conserva-se verde durante todo o ano e nunca perde toda a folhagem; as folhas e os frutos constituem um dos mais valiosos recursos alimentares para animais, nos períodos de seca. A infusão das folhas é popularmente utilizada como digestivo e as raspas da entrecasca são ricas em saponina, servindo de sabão, dentifrício e um excelente tônico capilar; a madeira é boa para mourões de cerca e para marcenaria (SILVA e MATOS, 1998). Atualmente têm sido registrados na literatura especializada vários trabalhos de pesquisa referente ao juazeiro, onde foi identificada grande variedade de triterpenos, saponinas, alcalóides (SCHUHLY et al.,1999); o ácido betulínico foi isolado da casca do caule e identificado por Mota et al., (2005). Estudos documentam que o ácido betulínico possui atividade antimicrobiana moderada que três ésteres derivados demonstraram notável atividade contra bactérias (PISHA et al., 1995). A atividade antifúngica de plantas medicinais brasileiras utilizadas no tratamento popular de micoses foi avaliada por Cruz et al., (2007). Os resultados demonstraram que extratos aquosos de *Zizyphus joazeiro* e *Caesalpineia pyramidalis* apresentaram significativa atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*. Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular é muito superior àquela derivada dos processos de síntese que apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada (GUERRA e NODARI,2004)

*Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose, doença infecciosa que atualmente mais flagela a humanidade. Depois de várias décadas, em que a incidência desta doença diminuiu continuamente, com o aparecimento da

AIDS varias estirpes micobacterianas multi-resistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) contribuíram para inverter esta tendência (SIMÕES, 2007).

A ocorrência de *Mycobacterium tuberculosis* resistente é sério problema por dois motivos principais: primeiro, como há apenas poucos fármacos efetivos disponíveis, a infecção pelo bacilo resistente pode levar a doença potencialmente intratável; segundo, embora apenas parte menor dos infectados venha a adoecer (5-10%), a doença é altamente contagiosa. Portanto, se houver número elevado de doentes tuberculosos portadores de germes resistentes a duas ou mais drogas do arsenal terapêutico contra a doença, a probabilidade de este número aumentar exponencialmente é grande, e estaremos de frente a sério problema com poucas possibilidades de solução (CAMPOS, 1999). Diante disso se faz necessário a pesquisa de novas substâncias que venham a ser seguras e eficazes contra diversas patologias. Baseado neste problema tão atual ocorreu-nos o estudo do *Zizyphus joazeiro* Mart como possível fonte de agentes antimicrobianos que no futuro possa a vir integrar o arsenal terapêutico para o tratamento de doenças.

## 2 OBJETIVOS

- 1- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato hidroalcoólico das folhas, frutos e casca de caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. frente a leveduras, bactérias Gram positivas, Gram negativas e *M. bovis* pelo método de difusão em agar.
- 2- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos com atividade.
- 3- Realizar prospecção fitoquímica de bioativos no extrato apolar .

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS ANTIMICROBIANO

A utilização das plantas como fonte de medicamentos para tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana remonta à idade antiga. São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo entre outros a morfina, a pilocarpina, os digitálicos e os curares. Além disso, também são de origem natural outros medicamentos usados no tratamento de patologias como o câncer, hipertensão, imunossuppressores e antibióticos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para a importância das plantas medicinais nos sistemas de saúde dos países em desenvolvimento (AKERELE, 1985). O programa de Medicina Tradicional da OMS ressalta a importância do estudo das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de verificar, tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de substâncias tóxicas. O Brasil, com mais de 120.000 variedades de plantas, possui enorme diversidade biológica sendo considerado, portanto, um dos últimos celeiros da flora e fauna do planeta. Nos últimos anos, numerosas pesquisas com plantas medicinais usadas como remédios ou venenos, na medicina popular, têm sido desenvolvidas no Brasil. As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos que, às vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas (LIMA, 2002). Assim quando determinadas espécies vegetais são agredidos por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes agressores rapidamente sintetizam substâncias de defesa, como resultado da interação entre os sistemas metabólicos do hospedeiro e do parasita. Essas substâncias, as fitoalexinas, são produzidas logo após a penetração do invasor e possuem a capacidade de inibir o crescimento do mesmo (LIMA, 2002). Entre os metabólitos secundários que constituem as fitoalexinas estão os fenóis, lignanas, isoflavanóides fenantrenóides, flavonóides, benzofuranos, naftoquinonas, poliacetilenos,

monoterpenos, diterpenos (LIMA, 2002) As fitoalexinas geralmente apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, sendo freqüentemente usadas na profilaxia e no tratamento de doenças causadas por microrganismos.

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas têm sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em ampla revisão sobre plantas medicinais, Lima et al. (2002) fizeram uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espécies fúngicas. Quanto ao potencial antibiótico destacaram os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol, ácido caurêmico, entre outros que, em baixas concentrações, exerceram inibição sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, *Mycobacterium*, leveduras e fungos filamentosos. Este estudo confirmou a grande importância que tais produtos possuem como perspectivas para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na medicina para a terapêutica de processos infecciosos (LIMA, 2002).

### 3.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA

A resistência microbiana tornou-se motivo de preocupação crescente entre profissionais da área de saúde, pois a cada ano observa-se o aumento de linhagens resistentes aos mais diversos agentes antimicrobianos. A resistência microbiana natural, ou adquirida, aos antibióticos vem aumentando em todo o mundo e, em particular, no ambiente hospitalar. O uso indiscriminado de antibióticos pode agravar o problema, facilitando o surgimento de bactérias e outros microrganismos mais resistentes, reduzindo a eficácia dos medicamentos. Um conceito que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz à resistência mas é um selecionador dos indivíduos mais resistentes no meio de uma população. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrência de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. (TRABULSI et al., 2005). São vários os mecanismos químicos que podem levar uma bactéria a se tornar resistente:

- 1) Produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano: a ação da  $\beta$ -lactamase, por exemplo, é uma enzima que cliva o anel  $\beta$ -lactâmico inativando a penicilina. Outras drogas podem ser inativadas em decorrência de modificações introduzidas pelo microrganismo, tais como a adição de grupamentos químicos. Assim, muitos microrganismos são capazes de promover a fosforilação ou acetilação de antibióticos.
- 2) Diminuição da permeabilidade celular: Muitas bactérias Gram negativas são resistentes à penicilina G por serem impermeáveis à droga, ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação à penicilina. No caso das sulfonamidas, o microrganismo pode também apresentar menor permeabilidade à droga.
- 3) Modificação de enzima alvo ou estrutura : alterações na molécula do rRNA 23S (no caso de resistência à eritromicina e cloranfenicol), alteração da enzima alvo, no caso de drogas que atuam no metabolismo, ou uso de vias metabólicas alternativa) alteração dos sítios alvos das drogas (por exemplo, uma simples troca de aminoácido pode ser suficiente para tornar um microrganismo resistente a determinados antibióticos macrolídeos );
- 4) Efluxo rápido (ejeção) da droga : o bombeamento da droga para fora da célula antes que possa tornar efetiva, como no caso da resistência às tetraciclina, em bactérias entéricas(TORTORA, 2005).

Internações mais longas, o uso de antibióticos mais caros e mais tóxicos são alguns dos prejuízos provocados pela resistência microbiana.

Para controlar essa resistência, é preciso mapear o perfil de sensibilidade dos organismos que atingem hospitais e população, ou seja, analisar o efeito do medicamento sobre esses microrganismos.

### 3.3 RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, um bastonete delgado e obrigatoriamente aeróbico. Os bastonetes crescem lentamente (20 horas ou mais de tempo de geração), algumas vezes formam filamentos e tendem a crescer em cachos. (TORTORA, 2005).

O bacilo da tuberculose pode ser considerado um exemplo de como uma espécie pode se adaptar aos meios adversos e se perpetuar como causador da doença infecciosa mais importante da história da humanidade, sendo o patógeno que segue produzindo maior número de mortes. Das diversas formas de resistência que podem adquirir os microrganismos, *Mycobacterium tuberculosis* apresenta apenas a mutação que cepas selvagens, desenvolvem como fruto de sua multiplicação contínua, fazendo com que um número de bacilos se modifique geneticamente, afetando o local de atuação de determinado medicamento, caracterizando, desta forma, a resistência natural (ROCHA et al., 2008).

A tuberculose é um grave problema de saúde pública mundial que ressurgiu na década de 1980 (SOUZA, 2009). Atualmente, é uma das doenças infecciosas que mais preocupam e matam no mundo. Essa doença, basicamente transmitida pelo ar, tem como alvo principal o pulmão. No entanto, o que se observou foi o reaparecimento da TB no início da década de 80 como um sério problema de saúde mundial. Vários foram os fatores responsáveis pelo ressurgimento da TB no mundo, dentre eles podemos destacar a não adesão dos pacientes ao tratamento, que contribui para o aparecimento de bactérias resistentes aos fármacos (SOUZA, 2009). Devido às proporções assustadoras da TB no cenário mundial, essa doença foi declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, um problema de proporções mundiais.

Destacam-se como principais fatores relacionados à multiresistência:

- a) utilização inadequada dos medicamentos, falta de adesão do paciente ao tratamento, irregularidade no uso das medicações, uso incorreto das medicações gerando sub-doses;
- b) absorção intestinal deficiente dos medicamentos (parasitoses e AIDS, por exemplo);
- c) prescrição medicamentosa de forma inadequada (utilização equivocada dos esquemas padronizados pelo Ministério da Saúde); falta de suspeição de resistência primária, por avaliação inadequada da história de contato; adição de outros medicamentos anti-tuberculose a esquemas ineficazes, de forma arbitrária, sem teste de sensibilidade e um bom histórico terapêutico
- d) A falta, ou falha, na provisão e distribuição dos medicamentos padronizados. (ROCHA et al., 2008).O conceito de tuberculose multirresistente baseia-se na identificação de *Mycobacterium tuberculosis* resistente *in vitro* a, pelo menos,

rifampicina e Isoniazida, os dois principais medicamentos utilizados, universalmente para o tratamento da doença.

Considerando o efeito que a resistência bacteriana tem na saúde humana e o impacto econômico que ela representa, muito esforço e investimento ainda serão necessários para vencer a guerra microbiológica contra os seres que ameaçam nossa existência.

### 3.4 FAMÍLIA RHAMNACEAE

A Família Rhamnaceae compreende 58 gêneros com, aproximadamente, 900 espécies em todo mundo. O gênero *Zizyphus* compreende cerca de 40 espécies de árvores espinhosas e pequenas que estão distribuídas em regiões temperadas e subtropicais em todo o mundo. As espécies mais conhecidas são *Zizyphus zizyphus* (*Jujuba*), e outras espécies, como *Zizyphus spina-christi* do sudoeste da Ásia, *Zizyphus lotus* da região do Mediterrâneo e Ber (*Zizyphus mauritiana*) que é encontrado na África Ocidental e na Índia. Na América do Sul, são encontradas várias espécies, entre elas *Zizyphus joazeiro* Mart. que cresce em áreas de caatinga do Brasil. São plantas arbóreas, de folhas inteiras, em disposição alternada; flores pequenas branco-amareladas, dispostas em inflorescência (JOLY, 1983). As espécies *Zizyphus* spp. são exemplos de plantas multiuso com grande potencial etnomedicinal em todo o mundo.

#### 3.4.1 *Zizyphus joazeiro* Mart.

De todas as árvores do nordeste brasileiro, o juazeiro é a mais tipicamente sertaneja, uma planta-símbolo das caatingas que habita a região Norte e Nordeste, mas, principalmente, os Estados do Ceará e Piauí, até o Norte de Minas Gerais (CRUZ, 1979). Dentre uma vasta sinonímia vulgar, tem-se; juá e laranjeira de vaqueiro (MATOS, 2002). Árvore bastante disseminada no nordeste brasileiro, utilizada como agente de higienização bucal, em substituição aos produtos

comerciais, utilizando-se folhas e fragmentos de casca do caule, que são mastigados ou friccionados contra os dentes, essa operação produz abundante quantidade de espuma, devido ao elevado teor de saponinas presente nessa espécie. As folhas e ramos jovens são utilizados na alimentação do gado na época da seca. *Zizyphus joazeiro* Mart. é uma árvore frondosa, de até 16m de altura, (FIG.1) de tronco reto ou tortuoso, espinhoso, com ramos flexuosos, que produz sombra em abundância. Folhas alternadas, pecioladas, coriáceas e elípticas, verde-luzentes, seriadas na base, com três a cinco nervuras inferiormente pubescentes. As flores são pequenas, amarelo – esverdeadas e reunidas em inflorescência cimosas(FIG 2.) Frutos esféricos (FIG. 3) também pequenos, de cor amarelada, com um caroço, envolto em polpa mucilaginosa, doce e branca (LORENZI; MATOS, 2002).



FIGURA 1 - Planta adulta do *Zizyphus joazeiro* Mart.

Fonte : [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)



FIGURA 2- Folhas e flores de *Zizyphus joazeiro* Mart.

Fonte : [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)



FIGURA 3- Detalhe do galho com frutos e folhas de *Zizyphus joazeiro* Mart .  
Foto realizada na Estação Ecológica de Aiuaba (ESEC).

Fonte: [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)



FIGURA 4- Detalhe do espinho de *Zizyphus joazeiro* Mart

Fonte : [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)



FIGURA 5- Detalhe da casca do tronco de *Zizyphus joazeiro* Mart. Foto realizada na Estação Ecológica de Aiuaba.

Fonte : [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br)

O fruto é usado nas perturbações do estômago e as cascas são usadas na cicatrização de ferimentos, febres intermitentes e infecções dos pulmões. A infusão das folhas é digestiva e usada nos problemas estomacais. As rasas da entrecasca, rica em saponina, servem de sabão, dentífrico e, em macerado ou infuso, dão excelente tônico capilar, e a chamada água de juá é bastante empregada para amaciar e clarear a pele do rosto (BRAGA, 1976).

Dentre suas ações e propriedades documentadas, incluem: adstringente, antimicrobiano, diurético, cardiotônico, antiinflamatória e analgésica. Em um estudo *in vivo* com coelhos, a administração de solução oral de perfusão da casca do caule do juá apresentou redução da febre induzida por toxinas bacterianas (NUNES, 1987). Na medicina herbária brasileira, o decocto do caule é utilizado contra bronquite crônica, infecções no trato respiratório superior e urogenital, dores de garganta, febres e placas dentárias, como expectorante, pois fluidifica as secreções brônquicas facilitando a expectoração; útil nas bronquites crônicas, tosses secas, etc. empregado nas febres intermitentes e icterícias (COIMBRA, 1958).

Externamente, a tintura é usada em loções capilares e o decocto no tratamento de úlceras. Em doses elevadas, produz vômitos, cólicas e forte irritação do tubo gastrointestinal. As formas farmacêuticas habituais são infuso, decocto, extrato fluído, tintura, poções, etc.(COIMBRA, 1958). Os estudos farmacológicos realizados com a saponina mostraram efeitos cardiotônicos, ação hipotensora e ação relaxante na musculatura lisa da traquéia. Estudos de toxicidade em ratos demonstraram DL50 de 400 mg/kg, via oral (v.o.) ou 190 mg/kg via intraperitoneal (BARBOSA-FILHO, 1997)

No levantamento bibliográfico acerca das propriedades fitoquímicas de *Zizyphus joazeiro* Mart foi citado o isolamento de vários metabólitos secundários. Nas cascas desta planta é citada a presença de estearato de glicerila, triterpenóides ácido betulínico e lupeol, cafeína, um alcalóide, a amfibina-D e, como principais substâncias, as saponinas chamadas jujubosídeos (SOUSA et al., 1991; KATO et al., (1995 a e b ,1996,1997 a e b). Barbosa-Filho (1997) em estudo químico do extrato hidroalcoólico do referido vegetal levou ao isolamento e identificação do ácido betulínico (I), ácido oleanólico (IV) e saponina (XI).

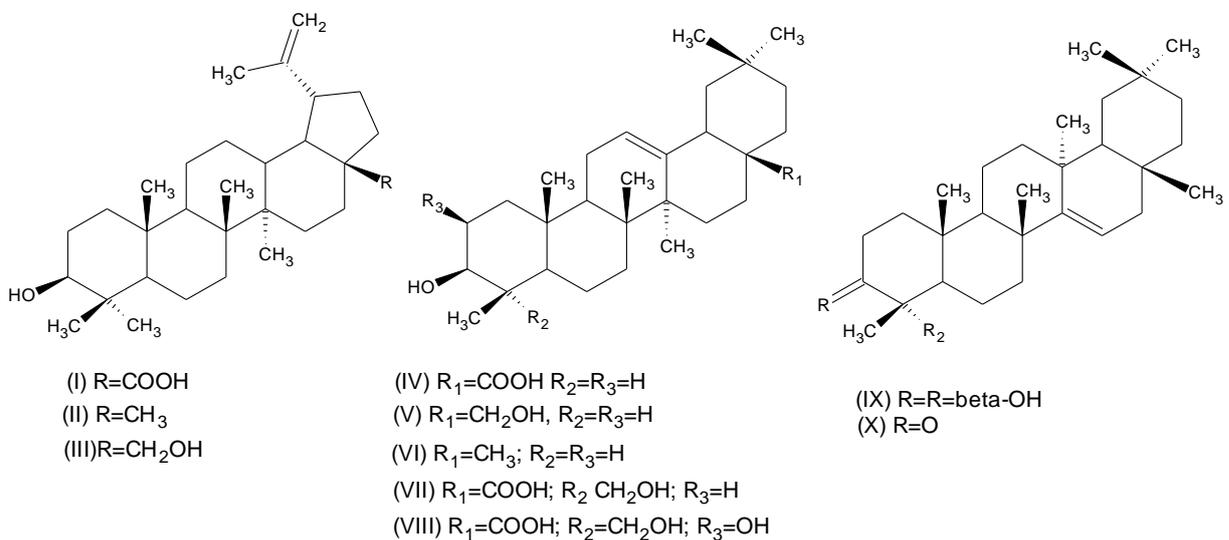


FIGURA 6- Estruturas química de Terpenóides da flora paraibana (I a X)

(Fonte: BARBOSA-FILHO,1997)

Devido ao grande uso pela população nordestina e a identificação de componentes químicos encontrados no *Zizyphus joazeiro* Mart ( juazeiro), Mollo, Alcalá, Ferreira, Lima; (1998) apresentaram na 15<sup>a</sup> Reunião da SBPQO resumo sobre a ação antibacteriana de um extrato bruto de folhas, frente a cepas de *Shighella flexineri* (ATCC12022), *Streptococcus mutans* (ATCC2937) e *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P). O extrato bruto das folhas reduziu a carga bacteriana desses microrganismos mostrando ser eficiente contra os mesmos.

Entre os ensaios de atividade antimicrobiana podemos citar: Lima, (2008) avaliou atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico da folhas de *Z. joazeiro*

Mart. com houve inibição das seguintes bactérias: *Salmonella cholerasuis* e *Staphylococcus aureus*.

A atividade antifúngica de plantas medicinais brasileiras utilizadas no tratamento popular de micoses foi avaliada por Cruz et al. (2007). Os resultados demonstraram que extratos aquosos de *Ziziphus joazeiro* Mart. e *Caesalpineia pyramidalis* apresentaram significativa atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas, frutos e casca do caule *Zizyphus joazeiro* Mart foram coletados no município de Pombos, Zona da Mata Sul de Pernambuco pelo Engenheiro Agrônomo Leonardo Rodrigues Silva da Sociedade Nordestina de Ecologia – SNE.

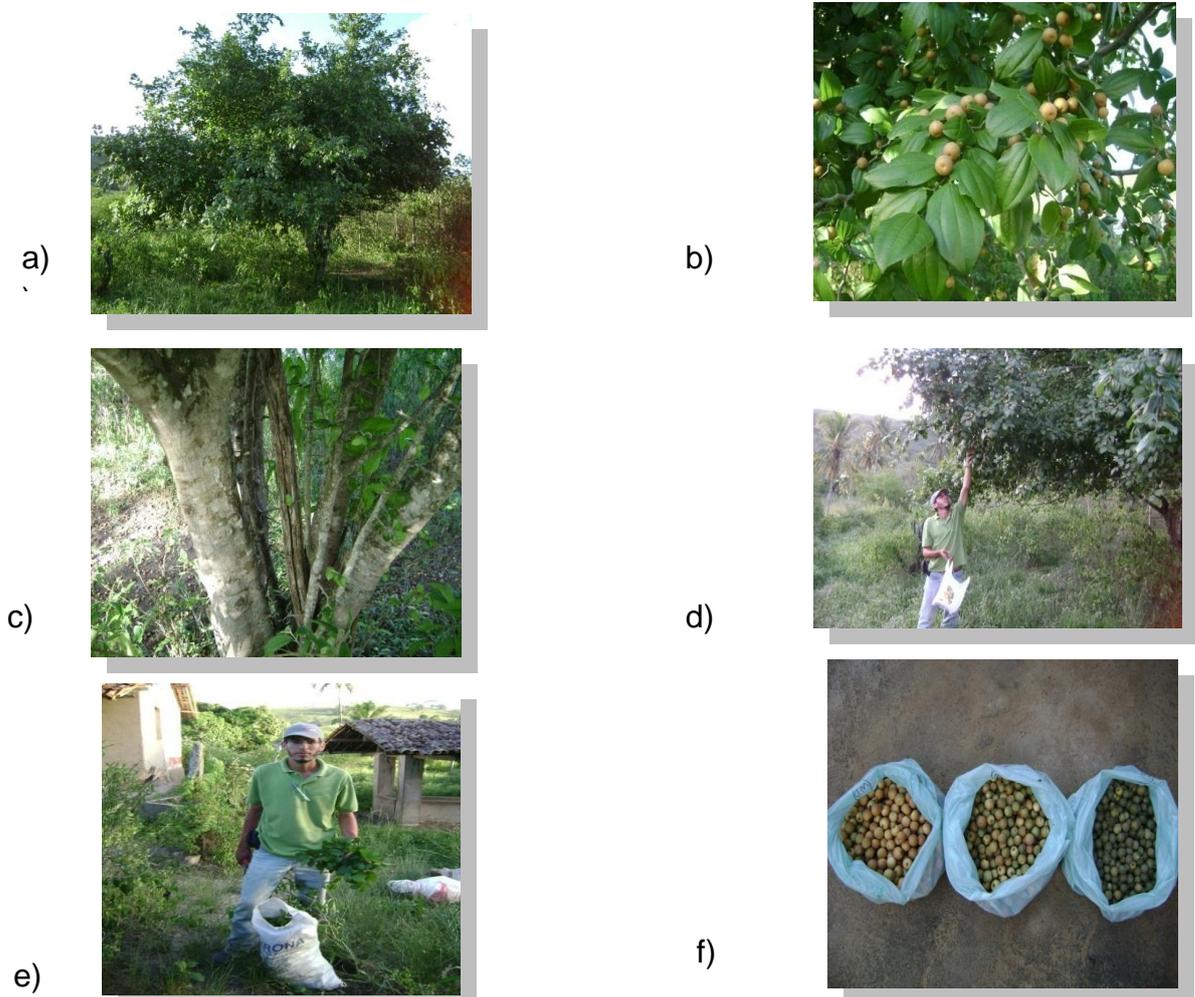


FIGURA 7 - Fotos de *Zizyphus joazeiro* Mart. e material coletado

- a) Árvores da coleta
- b) Ramos com frutos de *Zizyphus joazeiro* Mart.
- c) Tronco de *Zizyphus joazeiro* Mart com múltiplos caules
- d) Coleta de frutos de *Zizyphus joazeiro* Mart
- e) Frutos e folhas de *Zizyphus joazeiro* Mart coletados
- f) Frutos de *Zizyphus joazeiro* Mart coletados (verde, em maturação e maduro)

Fonte: Leonardo Rodrigues Silva, SNE, 2008

#### 4.1.1 Identificação do material vegetal

O material foi identificado no Herbário Sergio Tavares do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e depositado neste, sob o registro nº 15638.



FIGURA 8- Exsicata depositada no Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob o registro nº 15638.

## 4.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS.

Os microrganismos testados foram cepas-padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) mantidas no Laboratório de Microbiologia Básica da UNIFAL-MG e recomendadas para testes de suscetibilidade à antimicrobianos (CLSI, 2009). Foram os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ; *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella tiphy* (ATCC 14028); *Proteus mirabilis* ( ATCC 25933); *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633 ); *Candida albicans* (ATCC 10231) , *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e *Mycobacterium bovis* (IAL1850)

## 4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas, frutos e cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. foram coletados no município de Pombos, Zona da Mata Sul, em Pernambuco.

Para obtenção dos extratos utilizamos a técnica descrita por Cáceres et al. (1995). As partes aéreas (casca do caule, folhas e frutos ) de *Zizyphus joazeiro* Mart foram trituradas em moinho para obtenção do pó. Após a trituração, 200 g de cada parte foi suspensa em 800 mL de etanol a 70% em água sendo as mesmas colocadas em recipientes de vidro com capacidade para 2000 mL, tampados, protegidos da luz e à temperatura ambiente, para maceração durante sete dias, com uma agitação diária. Os extratos foram filtrados em filtro de “nylon”. Foi realizada a concentração dos extratos em evaporador rotatório à temperatura de 60° C e pressão negativa de 500 a 400 mmHg. Alíquotas de 20 mL de cada extrato concentrado no rota evaporador foram liofilizadas. Foi determinado o peso seco de cada alíquota. Na hora do uso, os mesmos foram ressuspensos em água destilada estéril num volume 10 vezes menor que o original. Antes do uso todos os extratos foram esterilizados por filtração em filtro Millipore de 0,45 µm

#### 4.4 ABORDAGEM FITOQUÍMICA

Os extratos hidroalcoólico da casca do caule, folhas e frutos de *Zizyphus joazeiro* Mart foram submetidos a uma investigação dos constituintes químicos por classe metabólica. As classes de metabólitos secundários testados foram: saponinas, alcalóides, taninos, flavonóides, esteróides e triterpenos. Estes testes foram realizados em triplicata e de acordo com Matos (2008).

##### a) Teste para alcalóides

Foram dissolvidos 10,0 mg do extrato em 4mL de HCl 1%

Duas porções de 2mL foram separadas em tubos de ensaios diferentes e adicionou 5 gotas dos reagentes: Dragendorff (tubo 1) e Mayer (tubo 2).

Na presença de alcalóides ocorre:

- Reativo de Dragendorff: precipitado vermelho tijolo
- Reativo de Mayer: precipitado branco

##### b) Testes para saponinas

Foram distribuídos 10,0mg do extrato em três tubos de ensaio, Em seguida adicionou-se 15mL de água destilada em cada recipiente. Procedeu-se agitação vigorosa durante 2 minutos em tubo fechado. Se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo para saponina

##### c) Teste para esteróides e triterpenos ( Liebermann-Burchard)

Em 10,0mg do extrato foram dissolvidos em 3mL de clorofórmio e adicionou –se 2mL de anidrido acético. Agitou-se vagorosamente e pelas paredes do tubo de ensaio foram adicionados 1mL de ácido sulfúrico concentrado. Observar se há rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente que indicam resultado positivo

##### d) Teste para flavonóides

Foram dissolvidos 10,0mg do extrato em 3mL de metanol. Adicionou 1mL de ácido clorídrico concentrado. Introduziu à solução 1cm de fita de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

## e) Teste para taninos

Foram dissolvidos 10,0 mg do extrato em 4mL de água destilada. E adicionou gotas de gelatina 0,5%. Formação de um precipitado durante o teste indicador positivo

#### 4.5 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Zizyphus joazeiro* MART.

As folhas secas e moídas (132,45 g) de *Zizyphus joazeiro* Mart. foram submetidas à extração por maceração, utilizando como solvente extrator hexano. O extrato hexânico das folhas de *Zizyphus joazeiro* Mart. foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando hexano – clorofórmio – metanol como eluentes, em varias concentrações, em ordem crescente de polaridade. Frações de 15 mL foram coletadas em frascos de vidro e analisadas, individualmente, em cromatografia de camada delgada (CCD) e reunidas conforme suas semelhanças entre os R<sub>f</sub>s (Fator de retenção) das frações que estão relatadas na tabela 1.

#### TABELA 1

Relação de frações obtidas por cromatografia em coluna aberta, do extrato hexânico das folhas de *Zizyphus juazeiro* Mart.

Fração	Sistema de solvente	Substância
I	Hexano	Mistura de substâncias
II	Hexano:CHCl <sub>3</sub> (80:20)	Mistura de substâncias
III	CHCl <sub>3</sub>	Mistura de substâncias
IV	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (90:10)	Mistura de substâncias
V	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (70:30)	lupeol
VI	CHCl <sub>3</sub> :MeOH (90:10)	Mistura de substâncias

#### 4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os extratos foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, contra leveduras e bactérias. Utilizou-se o método de difusão em ágar que é, atualmente, recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003) com ligeiras modificações e que se baseia no método descrito por Bauer et al. (1966). Foram preparadas placas de ágar Mueller-Hinton para bactérias e ágar Mueller-Hinton com 1,0 % de glicose para leveduras e, posteriormente foram feitos poços de 4 mm de diâmetro na superfície do ágar com auxílio de um tubo de metal. Foram preparadas suspensões microbianas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mc Farland. Esta suspensão foi inoculada na superfície do ágar com auxílio de “swab”. Após secagem do inóculo, foram colocadas nos poços do ágar os extratos de folhas, frutos verde, maduro e em maturação e casca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. concentrado 10 vezes. Um controle positivo com solução de gluconato de clorexidina a 0, 2% e um controle negativo com água destilada foram do mesmo modo, preparados. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação foi feita a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano em volta dos poços.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA FRENTE À *Mycobacterium bovis*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente ao *Mycobacterium bovis* (IAL1850) foi empregado o método da difusão baseado na técnica anteriormente descrita, utilizando discos de papel de filtro estéreis com 6 mm de diâmetro impregnados com os extratos de *Zizyphus joazeiro* Mart. e com as soluções controle, ou seja, solução de rifamicina a 50 µg/mL e água destilada. Os discos de papel estéril receberam 10 µL dos extratos e soluções-controle e deixados secar a 37° C por 2 horas em estufa. Foi preparada uma suspensão bacteriana de *M. bovis* em soro fisiológico com turvação equivalente ao

tubo 0,5 da Escala de Mac Farland e inoculada na superfície do meio de Lowenstein–Jensen. O meio foi acondicionado em garrafas plásticas para cultura de células nos quais foram colocados os discos-teste na superfície. Cada garrafa recebeu um disco. As garrafas com meio de Lowenstein–Jensen inoculadas com *Mycobacterium bovis* foram incubadas a 37°C por 4 semanas. No final, foram avaliados os halos de inibição formados ao redor dos discos. Todos os testes foram feitos em triplicata.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS

A concentração inibitória mínima foi determinado nos extratos que apresentaram atividade inibitória no teste de difusão em ágar. Os testes foram realizados em microplacas nas quais foram colocados 150 µL do caldo Mueller Hinton concentrado 2 vezes e concentrações decrescentes do extrato. Foram inoculados nos poços, 10 µL da suspensão microbiana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland. Também foram realizados os seguintes controles: controle de esterilidade do caldo (M.H.); controle da promoção do crescimento de cada microrganismo avaliado, controle da esterilidade dos extratos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi feita a partir do último tubo onde não houve turvação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item os resultados seguidos de discussão, serão apresentados na seguinte ordem:

- a) Prospecção fitoquímica
- b) Composição química do extrato hexânico das folhas
- c) Análise da atividade antimicrobiana, pelo método difusão em ágar e determinação do CIM dos extratos hidroalcoólico em que houve halos de inibição

A determinação estrutural do metabolito isolado das folhas foi estabelecida com base na interpretação de dados espectrais, principalmente de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em combinação com dados da literatura.

### 5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica dos 05 extratos utilizados neste estudo, estão representados na TAB. 2. Na análise fitoquímica da casca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart constatou a presença de saponinas, esteróide e triterpenos. Esses metabólitos também foram identificados em estudos realizados por Braga, (1976).

A presença de saponina, esteróides e triterpenos foram observadas nas folhas e frutos maduros confirmando resultados encontrados por Silva (2008) que no estudo do perfil fitoquímico de *Zizyphus joazeiro* Mart. relata a presença de saponinas, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides em todas as partes vegetais, moléculas de cumarina e derivados cinâmicos apenas no caule de plantas adultas e flavonóides nas folhas, dados esses que diferem dos nossos e estão na Tabela 2. A presença de flavonóides foi verificada somente nos frutos e estes compostos podem atuar na maximização do potencial da referida espécie para tratar gastrites e ferimentos, já atribuídos às saponinas, por sua ação antifúngica, antibacteriana (TAIZ & ZEIGER, 1991), antiinflamatória e antiviral (SCHENKEL, 2003), As cumarinas também apresentam propriedades antioxidantes e os derivados cinâmicos auxiliam na cicatrização (NEGREL; POLLET, 1996).

Os taninos foram detectados nas folhas e frutos verdes. SANCHES et al. (2005) relatam que taninos têm efeitos inibitórios sobre bactérias e fungos e existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana. A primeira hipótese pressupõe a inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo. Finalmente, a terceira hipótese menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos.

Os resultados das análises fitoquímicas feitas por Sousa (2007) registraram a presença de saponinas, taninos, flavonóides, catequinas e xantonas. O resultado positivo para alcalóides nas folhas diferem de resultados obtidos por Silva (2008) e presença de alcalóides nos frutos maduros, e em maturação, de *Zizyphus joazeiro* Mart. não foi relatado na literatura consultada para comparação.

## TABELA 2

Prospecção fitoquímica realizada nos extratos hidroalcológicos de casca do caule, folhas, fruto verde, em maturação e maduro de *Zizyphus joazeiro* Mart.

Metabólitos Amostras	Alcalóides	Saponinas	Flavonóides	Esteróides Triterpenos	Taninos
Casca do caule	- -	+	-	+	-
Folhas	++	+	-	++	+
Fruto verde	- -	-	+	-	+
Fruto maturação	+ -	-	+	- -	-
Fruto maduro	++	+	+	+	-

(-) reação negativa, (+) reação positiva, (++) reação positiva intensa

## 5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

O extrato hexânico das folhas de *Zizyphus joazeiro* foi obtido por cromatografia em coluna aberta de sílica gel, sendo obtidas seis frações (TAB. 1). Da fração **V** foi

isolada a substância EHF-01 através das técnicas cromatográficas. Essa substância foi tratada com hexano, diversas vezes, até recristalização de um composto branco. Esse metabólito foi identificado utilizando métodos espectroscópicos convencionais (infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e foi realizada comparação com dados registrados na literatura (MAHATO E KUNDU (1994).

A substância EHF-01 isolada do extrato hexânico das folhas de *Zizyphus joazeiro*, apresentou-se como sólido branco com temperatura de fusão de 290-292  $^{\circ}\text{C}$  e resultado conclusivo para triterpenos pentacíclicos no teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do infravermelho (GRAF. 1) apresenta uma banda larga em 3309  $\text{cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de O-H e bandas em 1014 e 982  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à deformação angular fora do plano C-H de alquenos.

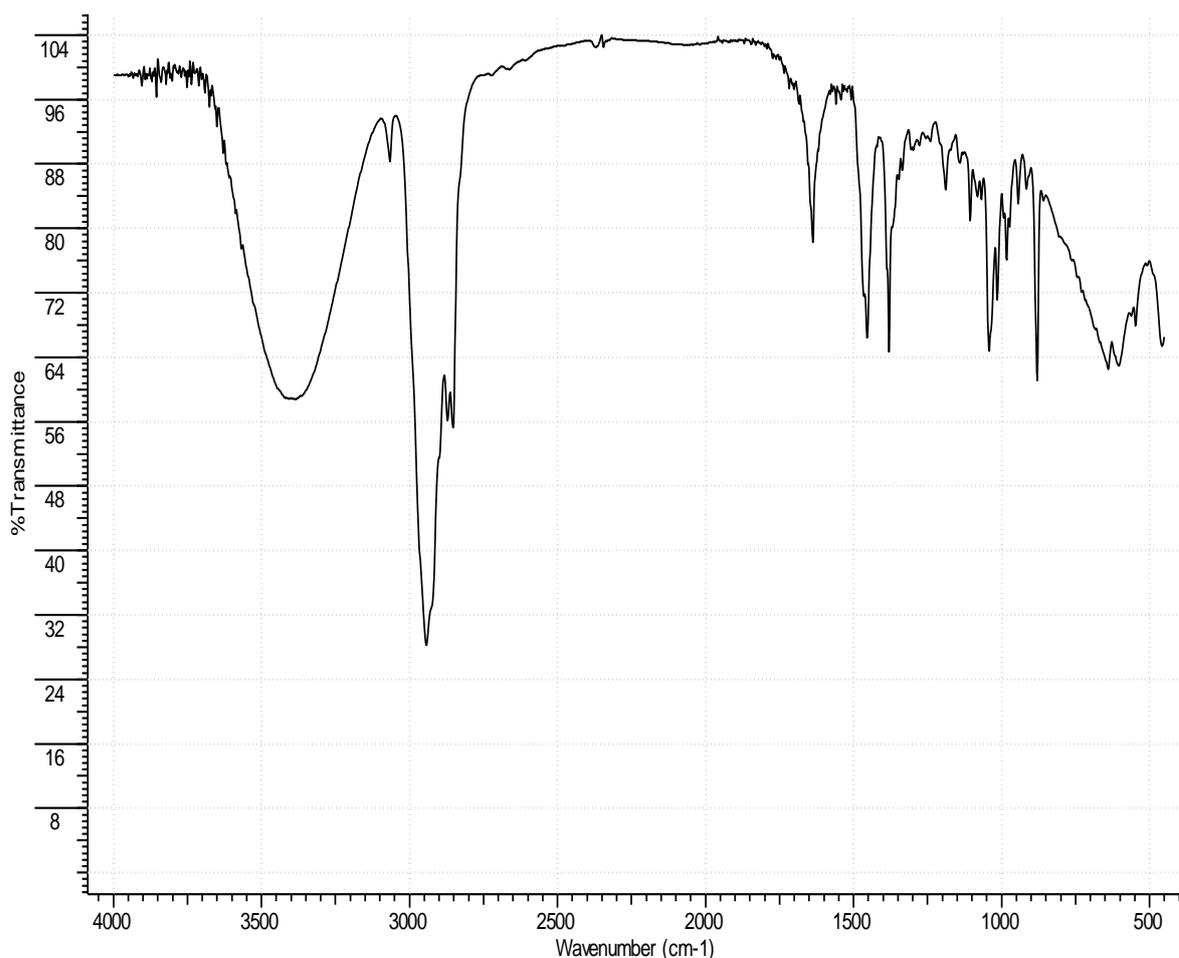


GRÁFICO 1- Espectro no infravermelho para EHF- 01 (Lupeol) ( $\text{KBr}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (GRAF. 2) de substância EHF-01 é característico de composto triterpênicos. Na região entre 0,70 e 1,80 ppm observa-se sinais referentes aos sete grupos metílicos presentes em EHF-01, a 0,75; 0,78; 0,83; 0,95; 1,15; 1,17 ppm. Os hidrogênios da dupla ligação presentes na estrutura EHF-01 são identificados pelos sinais em 4,57 e 4,68 ppm. O hidrogênio ligado ao átomo do carbono quiral (C-3), tem um deslocamento químico de 3,18 ppm e aparece na forma de um duplo dubleto ( $^1\text{H}$ ,  $J=8$  e  $12\text{Hz}$ ) pois acopla com os hidrogênios diastereotópicos em C-2.

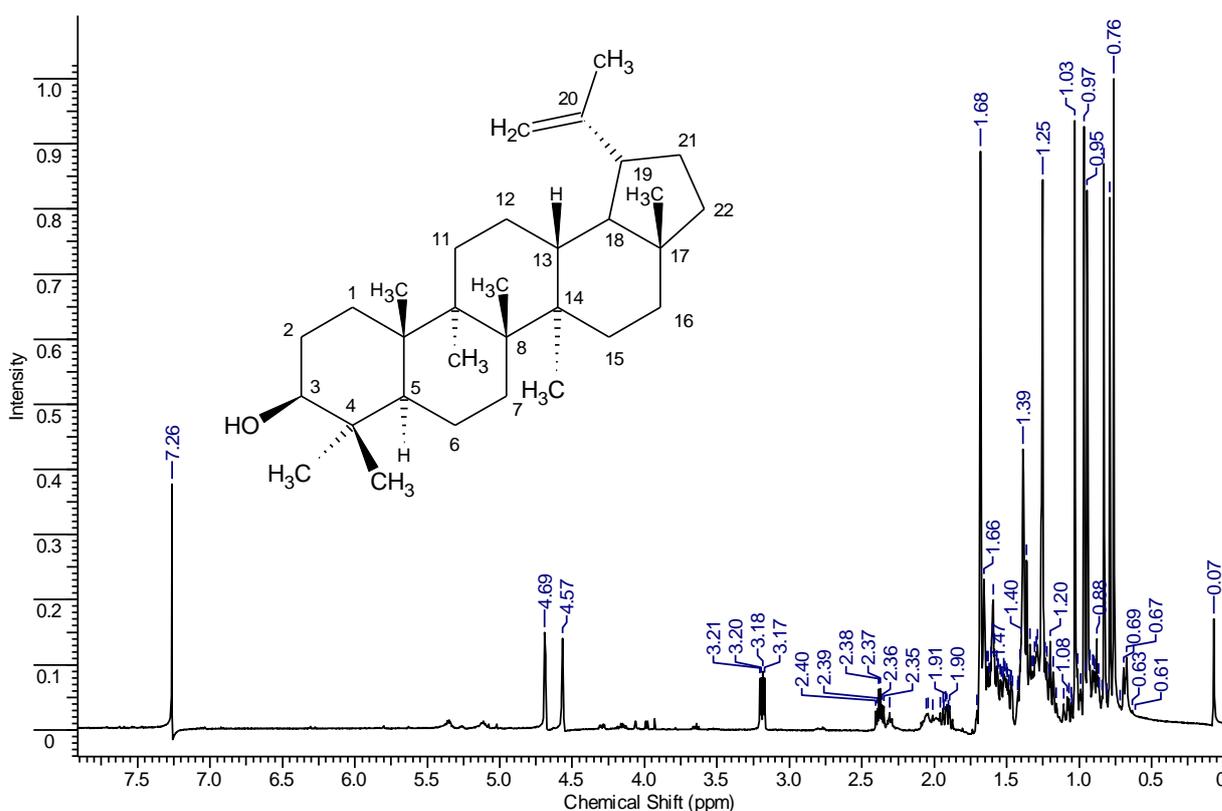


GRÁFICO 2- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 400, 13 MHz, do Lupeol (EHF-01) em  $\text{CDCl}_3$

Analisando – se o espectro de carbono de RMN de  $^{13}\text{C}$ , (GRAF. 3) verifica-se a presença de 26 carbonos, sendo quatro sinais sobrepostos, que se refere as metilas 24, 26 e 27 com deslocamento químico em 15,4 ppm, o carbono 1 e 4 em 38,8 ppm, os carbonos 2 e 15 em 27,4 ppm. Por meio destas análises, comprovou – se tratar do terpeno lupeol (EHF-01).

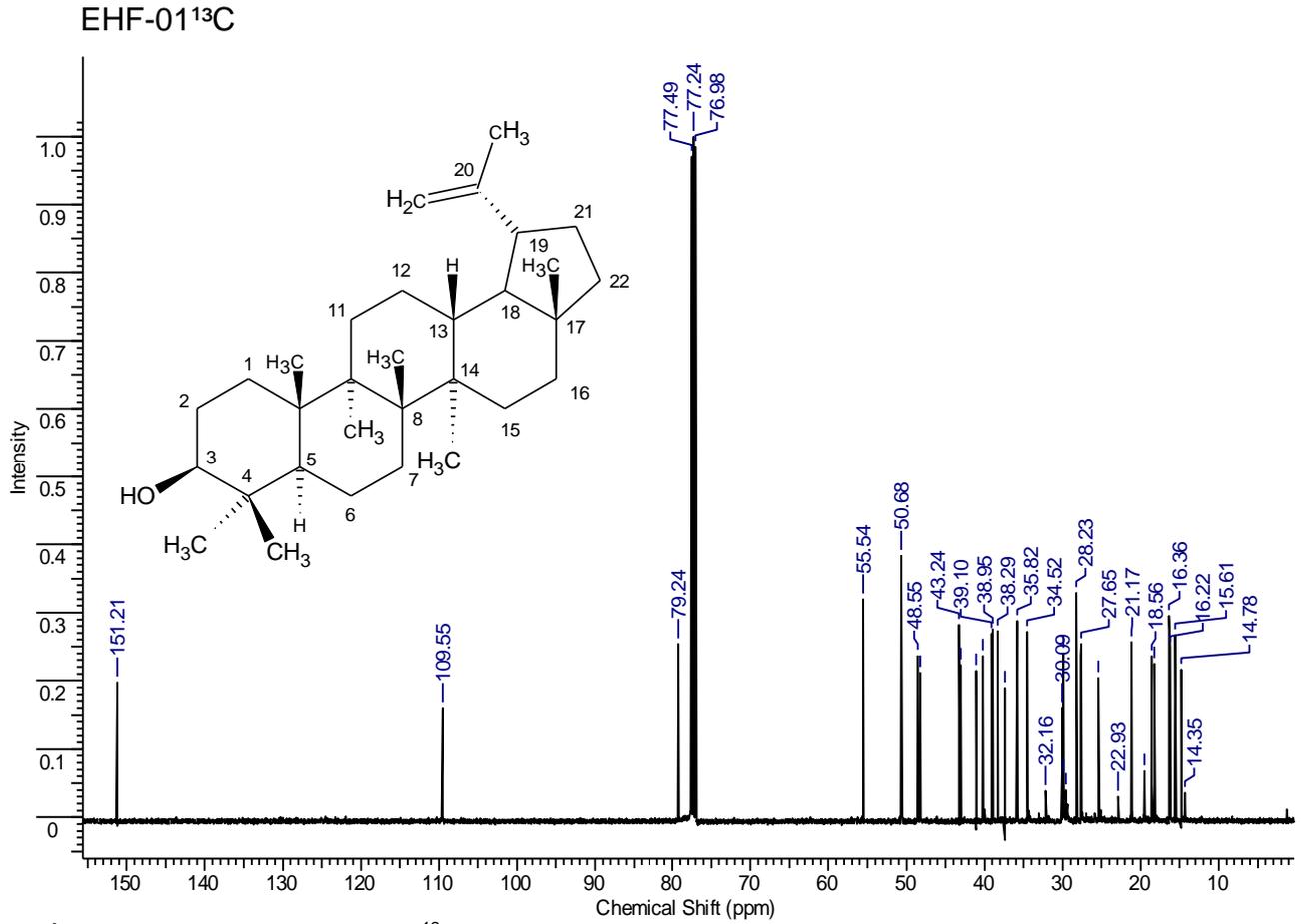


GRÁFICO 3- Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do Lupeol (EHF-01), em CDCl<sub>3</sub> a 100,32 MHz

**TABELA 3**Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Lupeol (EHF-01) comparados com a literatura

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do EHF-01 determinados	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) do EHF-01 literatura* (MAHATO e KUNDU, 1994)
1	38,7	38,8
2	27,4	27,5
3	79,2	79,1
4	38,8	38,8
5	55,2	55,4
6	18,3	18,4
7	34,2	34,4
8	40,8	40,9
9	50,4	50,6
10	37,1	37,2
11	20,9	21,0
12	25,1	25,3
13	38,0	38,2
14	42,8	42,9
15	27,4	27,5
16	35,5	35,7
17	43,0	43,0
18	48,2	48,5
19	47,9	48,0
20	150,9	150,9
21	29,8	29,7
22	40,0	40,1
23	28,0	28,0
24	15,4	15,4
25	16,1	16,1
26	15,9	15,9
27	14,5	14,5
28	18,0	18,0
29	109,3	109,3
30	19,3	19,4

Identificação da substância da fração V codificada como EHF-01

A partir do estudo fitoquímico de *Zizyphus joazeiro* foi possível identificar composto EHF-01 como um triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano denominado lupeol (fig 11) presente no extrato hexânico das folhas (SOUSA et al., 1991 e KATO et al.,

1997 a e b). Os triterpenos apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais destacam-se: cardioprotetora (SUDHAHAR et al., 2007), gastroprotetora (PERTINO et al., 2007), antiinflamatória (MEDEIROS et al., 2007), antitumoral (BRAGA et al., 2007), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ et al., 2008) e anti-hiperglicêmica (SATO et al., 2007) A atividade antimicrobiana do mesmo não foi avaliada, uma vez que a quantidade isolada foi insuficiente para os ensaios.

Dados da literatura registram que lupeol não apresenta atividade antimicrobiana frente aos seguintes microrganismos testados: *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Sporotrix schencki* (CAVALCANTI, 2008)

Giacomelli (2006) em estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae isolou o lupeol e avaliou atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos e o mesmo não apresentou atividade inibitória frente aos microrganismos testados. Entre os microrganismos investigados encontram-se os mesmo utilizados por Cavalcanti, 2008.

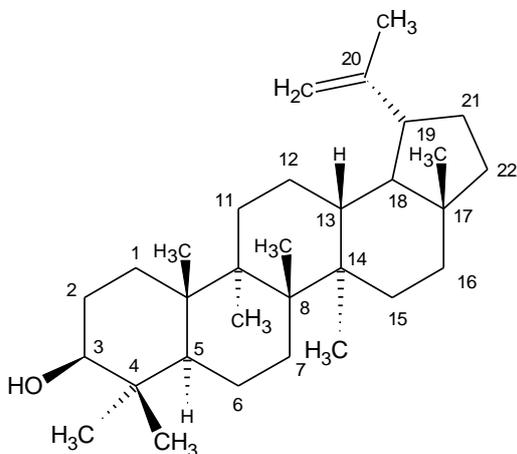


FIGURA 9- Estrutura química do Lupeol

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos com extrato hidroalcoólico das folhas, casca do caule e frutos do *Zizyphus joazeiro* Mart., após a realização dos ensaios de difusão em ágar, revelaram inibição microbiana (FIG.10). Estes dados são apresentados na Tabela 4.

Os diferentes extratos hidroalcoólicos de *Zizyphus joazeiro* Mart. utilizados não demonstrou eficácia sobre os seguintes microrganismos: *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* e *Saccharomyces cerevisiae*.

O extrato de fruto verde utilizado foi efetivo apenas para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), enquanto o extrato de fruto maduro apresentou atividade inibitória contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) com halo de 6 mm. Na literatura não há relato para comparação de resultados de atividade antimicrobiana para extratos de frutos mas, somente, para casca de caule e folhas.

Nos resultados obtidos com extrato bruto da casca de caule verificou-se atividade frente a *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*, com halos de inibição de 12 mm, 10 mm e 12 mm de diâmetro, respectivamente, confirmando o resultado obtido por Cruz et al. (2007). Os autores observaram atividade inibitória dos extratos de folhas e entrecasca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. frente aos seguintes fungos: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Fonsecaea pedrosoi*.

No nosso trabalho, o extrato de folhas apresentou resultados positivos apenas para *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) para o qual o halo de inibição foi de 7 mm.

Lima (2008) relata testes feitos com o extrato hidroalcoólico da folhas de *Z. joazeiro* Mart. O qual inibiu *Salmonella choleraesuis*, apresentando halo de inibição 7,7mm e *Staphylococcus aureus*, com halo de inibição 7,25 mm. Estes resultados diferem dos obtidos pois não houve inibição desses microrganismos. Mollo et al. (1998) testaram a ação antibacteriana do extrato bruto de folhas *Zizyphus joazeiro* Mart. frente a cepas de *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Streptococcus mutans* (ATCC 2937), Neste trabalho, os resultados indicaram efeito bactericida para as cepas de *Shigella flexneri* conseguindo-se redução crescente do numero de colônias de 59% para 97%, do primeiro para o décimo minuto. No mesmo intervalo de tempo, a redução de colônias de *Streptococcus mutans* variou-se de 45% a 97%. O mesmo extrato apresentou menor

ação bactericida sobre microrganismos da espécie *Staphylococcus aureus*, evidenciando-se redução significativa somente após 5 minutos de exposição, quando ocorreu uma redução de 39% do total inicial de colônias, já para 10 minutos essa redução eleva-se para 78%, Mollo et al. (1998).

Lima (2008) observou que o extrato hexânico e extrato etanólico das partes aéreas de *Zizyphus joazeiro* Mart. apresentou atividade antimicrobiana significativa para *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*, dados estes, diferentes dos nossos. O extrato aquoso de folhas *Zizyphus joazeiro* Mart. utilizado por Lima (2008) não inibiu o crescimento dos microrganismos utilizados. Vários fatores podem interferir na atividade biológica de extratos vegetais, principalmente, o local e o período da coleta. Desta forma, pesquisas de frações bioativas com atividade antimicrobiana deverão ser realizadas em *Zizyphus joazeiro* Mart.. Nenhum dos extratos utilizados demonstrou atividade contra *Mycobacterium bovis* (FIG.11).

Em relação à avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas apenas os microrganismos que inicialmente mostraram-se sensíveis aos extratos ou seja: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 4). Na determinação da concentração inibitória mínima (FIG.12) apenas o extrato da casca do caule apresentou atividade antimicrobiana, sendo esta limitada ao *Bacillus subtilis* cuja CIM foi de 80 mg/mL. Os outros extratos não foram efetivos, talvez, pela impossibilidade de se usar concentrações maiores. A alta viscosidade inviabiliza a filtração para esterilização do mesmo. Testes posteriores poderão ser aplicados utilizando a técnica de radiação gama para esterilização de soluções concentradas.

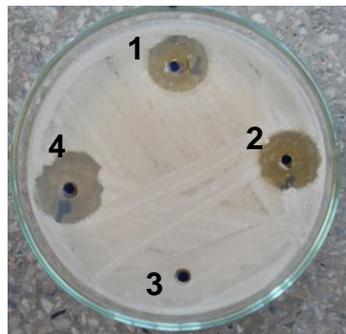


FIGURA 10 - Halos de inibição de crescimento *Bacillus subtilis* em agar Mueller-Hinton.  
 1 e 2- Extratos casca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. concentrado 10 vezes  
 3 - Água destilada (controle negativo)  
 4- Solução de gluconato de clorexidina a 0, 2% (controle positivo)

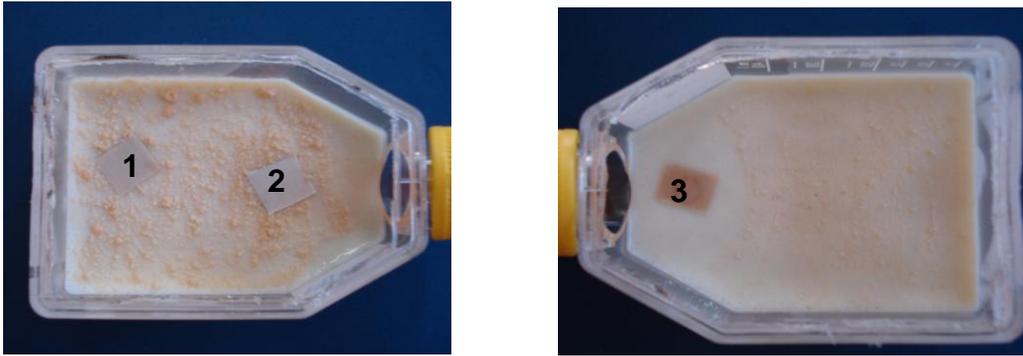


FIGURA 11 – Prova para avaliação da atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium bovis* em meio de Lowenstein–Jensen.  
 1 e 2- Extratos da casca do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. concentrado 10 vezes. Não houve halo de inibição.  
 3- Solução de rifamicina a 50 µg/mL (controle positivo)

TABELA 4

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólico de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Halos de inibição em mm)

EXTRATOS MICRORGANISMOS	Casca do caule	Folhas	Frutos verdes	Fruto maduro	Clorexedina 0,2%	Água destilada
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0	0	0	0	12	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	7	0	6	15	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	13	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	0	21	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	0	0	0	0	9	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	0	0	0	14	0
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	0	0	0	0	10	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	0	8	0	16	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	0	0	0	15	0
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	0	0	0	0	18	0

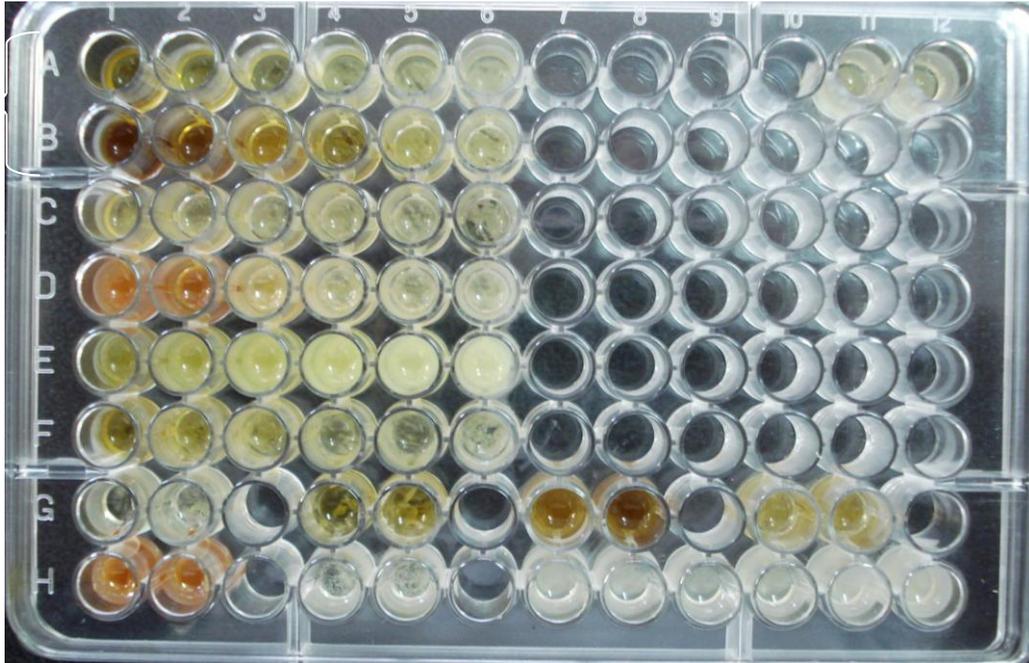


FIGURA 12 - Ilustração do método de microdiluição com caldo Mueller Hinton. em placa contendo 96 poços, testando a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Zizyphus joazeiro* Mart. frente aos seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*

A : *Bacillus subtilis* e extrato da casca do caule (concentração seriada do extrato: 160; 80; 40; 20; 10; 5mg/ml ).

B: *Bacillus subtilis* e extrato da folha (concentração seriada do extrato: 290; 145; 72,5; 36; 18; 9mg/ml).

C: *Bacillus subtilis* e extrato fruto maduro (concentração seriada do extrato: 820; 410; 205; 102; 51; 25mg/ml).

D: *Staphylococcus aureus* e extrato do fruto verde (concentração seriada do extrato: 520; 260; 130; 65; 32; 16mg/ml).

E: *Pseudomonas aeruginosa* e extrato da casca do caule e (concentração seriada do extrato: 160; 80; 40; 20; 10; 5mg/ml )

F: *Candida albicans* e extrato da casca do caule e (concentração seriada do extrato: 160; 80; 40; 20; 10; 5mg/ml )

G/H: Controle de esterilidade do meio de cultura e dos extratos

G1 / G2: Esterilidade do meio de cultura

G4 / G5: Esterilidade do extrato do caule

G 7 /G8: Esterilidade do extrato da folha

G10 /G11: Esterilidade do extrato do fruto maduro

H1 /H2: Esterilidade do extrato do fruto verde

H4/H5: Controle de crescimento *Candida albicans*.

H7/H8: Controle de crescimento *Staphylococcus aureus* .

H9/H10: Controle de crescimento *Bacillus subtilis*.

H11/H12: Controle de crescimento *Pseudomonas aeruginosa* .

## 6 CONCLUSÕES

A avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas dos extratos hidroetanólico de *Zizyphus joazeiro* Mart. permitiu concluir que:

- Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana.
- Dos microrganismos utilizados, somente *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* mostraram-se sensíveis.
- Nenhum dos extratos testados apresentou atividade antimicobacteriana sobre *Mycobacterium bovis*
- A prospecção fitoquímica permitiu constatar a presença de saponinas, esteróides e triterpenos na casca do caule. Flavonóides foram identificados nos frutos e taninos foram observados nas folhas e frutos.
- A substância isolada da fração V do extrato do hexano das folhas é um triterpeno (lupeol) pertencente à classe dos lupanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AKERELE, O. **The word health organization tradicional medicine programme: policy and implementation.** Genebre: OMS, 1985. v. 1, p. 1-3.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa lança edital de pesquisa sobre resistência microbiana.** Edital n.1, de 31 jan. 2007. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/>>. Acesso em: 21 ago. 2009

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 85-102, 1997.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BRAGA, F. et al. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 248, n. 1, p. 147-152, 2007.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Mossoró: Editora Universitária da UFRN, 1976. 540 p.

CAMPOS, H. S. Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência? **Bol. Pneumol. Sanit.**, v. 17, n. 1, p. 51-64, jun. 1999. Disponível: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo> > Acesso em: 20 set. 2009.

CÁCERES, A. et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 85-88, Oct. 1995.

CAVALCANTI, S. C. H. **Isolamento, síntese e relação estrutura-atividade de compostos obtidos da *Phoradendron piperoides*.** Relatório (projeto de pesquisa) - Universidade Federal de Sergipe. Aracajú, 2008, 12 p.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute) Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline – second edition. M27A2 CLSI (ISBN 1-56238-469-4).2003.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI).

Metodologia dos testes de sensibilidade a agents antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma aprovada – sexta edição – M7-A6 2003.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. 429p.

COUTINHO, H.D.M. BEZERRA D.A.C., LÔBO K, BARBOSA I.JF. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Rev. Conceitos** 6, p. 77-85, 2004.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro : Civilização Brasileira, 1979, 559 p.

CRUZ, M.C.S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 409-410, 2007.

DELGADO-MENDEZ, P. et al. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1425-1430, 2008.

FERRAZ J. S. F.; MEURIER, I. M. J.; ALBUQUERQUE U. P. **Os usos medicinais das árvores de mata ciliar da caatinga**. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br/>> Acesso em: 20 mar. 2008.

GIACOMELLI, S. R. et al. Atividade antimicrobiana de triterpenos isolados de *Colletia paradoxa*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 2006

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Américas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v. 6, p. 22-29, 1981.

GUERRA, R.O. ; NODARI, M. P. *Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos*. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. cap. 1, p. 13 – 28.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Nacional, 1983, 777p.

KATO, E. T. M. Estudo farmacognóstico da droga e do extrato fluido da raspa-de-juá - *Ziziphus joazeiro* Martius. **Lecta**, v. 14, p. 9, 1996.

KATO, E. T. M. **Estudo farmacognóstico da droga e do extrato fluido da raspa-de-juá - *Ziziphus joazeiro* Martius - Rhamnaceae**. Tese [Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995b

KATO, E. T. M. Revisão do gênero *Ziziphus* Miller - Rhamnaceae. **Lecta**, v. 15, p. 23, 1997a.

KATO, E. T. M., ALVARENGA, M. A. Estudo químico de *Ziziphus joazeiro* Martius. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, v. 33, p. 47, 1997b.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. p. 482-501. In YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica química medicinal moderna**. Chapecó: Agros, 2002. 500 p.

LIMA, P. M.. **Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma oncocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus***. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-241.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A compilation and some salient features". **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4. ed, Fortaleza:Editora UFC, 2002. 267 p.

MATOS, F. J. A.; **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza : Ed. da UFC, 2008,148 p.

MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2-3, p. 227-235, 2007

MOLLO, V. M. H. et al. Ação antimicrobiana de um extrato hidroalcoólico de *Zizyphus joazeiro* Martius. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 15, **Resumo...** Aguas de Lindóia, 1998.

MOTA, S. G. R. et al. Estudo químico das cascas do caule de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) IN: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 6. 2005. João Pessoa. Anais....João Pessoa, 2005.

NEGREL J.; POLLET B.; LAPIERRE C. Ether-linked ferulic amides in natural and wound peridermis of potato tuber. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1195-1199, 1996.

NUNES, PH, et al. "A atividade antipirético de um extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)." **J. Med. Biol.**,;v. 20,n.5, p.599-601, 1987.

PERTINO, M. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 553-559, 2007.

PISHA, E. et al.. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nat. Med.**, v. 1, p. 1046-1051 1995.

ROCHA, J. L. et al. Tuberculose multirresistente. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 27-32 2008.

SANCHES, A. C. C. et al. **Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth.**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]., v.41, n.1, pp. 101-107. 2005

SATO, H. et al. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 4, p. 793-798, 2007.

SCHENKEL, E. P. et al. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre : Ed. UFRGS, 2003,1102p.

SCHÜHLY, W., et al. "New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro* ." *Planta Med.* 1999; 65(8): 740-3. "New triterpenóides com atividade antibacteriana de *Zizyphus joazeiro*." ***Planta Med.***, v. 65, n. 8, p. 740-743, 1999.

SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P., Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. -Rhamnaceae). ***Revista Brasileira de Sementes***, Brasília, v. 20, n. 2, p. 263-269, 1998.

SILVA, M. D. **Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

SIMÕES, M. F. Efeito de anti-inflamatório não esteróides no *Mycobacterium tuberculosis*. IN: CONGRESSO COMUNICAÇÃO. TEMA CIÊNCIAS BÁSICAS (Basic.Science) , 8., 2007., Lisboa .**Anais...**, Lisboa, 2007.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. ***J. Ethnopharmacol.***, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.**Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Imprensa Universitária/UFC. 1991. 416 p.

SOUSA, T. S. Análise fitoquímica e ação antioxidante de *zizyphus joazeiro* e *zizyphus undulata*. IN: SEMANA UNIVERSITÁRIA, 7. ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA, 16., 2007, Fortaleza. **Resumo ...**, Fortaleza : Universidade Federal do Ceará, 2007.

SOUZA, M. V. N., A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Far-Manguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. ***Rev. Virtual Quim.***, *Rio de Janeiro*., v.1, n. 1, p. 9-16, 2009.

SUDHAHAR, V. et al. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. ***Vascular Pharmacology***, v. 46, n. 6, p. 412-418, 2007

TAIZ L. ; ZEIGER E. (Ed.). Surface protection and secondary metabolites defense compounds. In: TAIZ, L. ; ZEIGER, E. (Ed.). ***Plant Physiology***. Califórnia: Cummins Company, 1991. p. 318-345.

TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 779-780.

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo : Atheneu , 2005,718 p.

WALL, M. E. ; WANI, M. C. “Camptothecin and Taxol: from Discovery to Clinic”. **J. Ethnopharmacol**, v. 51, p. 239-254, 1996.

YUNES, R.A. ; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó : Argos, 2001. p. 17-46.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG**



**MARIA DO SOCORRO FERNANDES MELO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATO DO FRUTO, FOLHA E CASCA DE CAULE  
DO *Zizyphus joazeiro* MART.**

**ALFENAS-MG**

**2010**