

 <p>UFAL</p>	<p><b>Universidade Federal de Alagoas</b> Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p><b><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i></b> <i>PPGQB</i></p>	 <p>IQB</p>
---	---	--

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* MARTIUS (RHAMNACEAE)**

Cláudia Cavalcante de Matos

Maceió – AL

Julho de 2010

CLÁUDIA CAVALCANTE DE MATOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
BIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Ziziphus joazeiro* MARTIUS  
(RHAMNACEAE)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química e Biotecnologia da  
Universidade Federal de Alagoas  
para a obtenção do título de *Mestre  
em Química e Biotecnologia*.

Orientador:  
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart  
Sant'Ana.

Maceió – Alagoas

Julho de 2010

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Maria Auxiliadora Gonçalves da Cunha**

M433e Matos, Cláudia Cavalcante de.  
Estudo fitoquímico e avaliação do potencial biológico das folhas de Ziziphus  
joazeiro Martius (Rhamnaceae) / Cláudia Cavalcante de Matos, 2010.  
102 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de  
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 87-102.

1. Ziziphus joazeiro. 2. S. aureus MDR. 3. Esteróide. 4. Flavanóide.  
5. Linfócitos. 6. NO. I. Título.

CDU:547.9



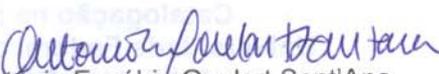
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

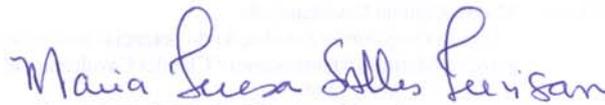


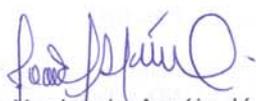
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384  
email: cpqgb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Dissertação da mestranda *Cláudia Cavalcante de Matos*, intitulada: “**Estudo Fitoquímico e Avaliação do Potencial Biológico das Folhas de *Ziziphus joazeiro* MARTIUS (RAMNACEAE)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 23 de julho de 2010, às 8h30min na Sala de Aulas do PPGQB/ UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Teresa Trevisan  
DQOI/UFC

  
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior  
PPGQB/ESENFAR/UFAL

Dedico aos meus pais, em especial à minha  
amada mãe, pelo exemplo de coragem,  
força e dignidade.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Antônio Euzébio por me receber e auxiliar sempre que preciso;
- Aos meus pais, Cláudio e Rita; minhas irmãs, Wanessa e Waleska; meu marido Renato; e toda a família, que, cada um ao seu modo, sempre fizeram tudo por mim;
- Aos Professores e funcionários do IQB;
- Aos alunos e professores dos laboratórios que colaboraram com os experimentos biológicos, incluindo os laboratórios de Biodiesel e de RMN da UFAL, gratidão especial aos Professores Edson e Simone, e às alunas Amélia, Raquel e Monique;
- Aos amigos **queridos** do LPqRN: Mari, Daniel Lira, Daniel Melo, Pedro, Ninha Lucila, Dani, Edilson, Milena, Aldy, D. Margarida, Luciana, Alessandro, Érica, Ísis e demais colegas, pela convivência, atenção, alegria e tudo mais.
- Aos amigos sempre presentes, de faculdade e da vida, em especial à Krys, Laiza, Sílvia, Cris, Thaiane e Karol;
- À FAPEAL, pelo auxílio concedido;
- À Deus, por tudo que existe!

## RESUMO

Desde a pré-história até os dias atuais diversas culturas conhecem e utilizam o potencial terapêutico das plantas no tratamento de doenças. Dentre as espécies comumente utilizadas em práticas caseiras da medicina, odontologia e cosmética do Nordeste brasileiro destaca-se *Ziziphus joazeiro* Martius (Rhamnaceae), também objeto de exploração comercial altamente valorizado por indústrias farmacêuticas. Nesse trabalho, investigamos o perfil fitoquímico das folhas de *Z. joazeiro* e seu potencial biológico, através de bioensaios tripanocida, leishmanicida, moluscicida, de reversão da resistência de *Staphylococcus aureus* à antibiótico, de inibição na produção de óxido nítrico e na proliferação de linfócitos ativados. Na investigação fitoquímica, o extrato bruto etanólico foi submetido à partição líquido-líquido para obtenção das frações hexânica, clorofórmica, em acetato de etila e aquosa. Alguns componentes da fração clorofórmica foram separados e purificados por cromatografia em coluna (CC). As amostras puras ou semipuras foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia na região do Infravermelho (IV), sendo possível a identificação de um flavonoide, a quercetina, e de uma mistura dos fitoesteroides glicosilados sitosterol e estigmasterol. Pelos ensaios biológicos, foi possível sugerir que o extrato etanólico bruto das folhas de *Z. joazeiro* apresentou atividade de reversão da resistência de *S. aureus* à ciprofloxacina, enquanto sua partição clorofórmica e subfrações atuaram como imunomoduladores, inibindo a linfoproliferação e a produção de NO *in vitro*. Resultados positivos não foram obtidos para as atividades moluscicida, tripanocida e leishmanicida.

Palavras-chave: *Ziziphus joazeiro*, *S. aureus* MDR, esteroide, flavonoide, linfócitos, NO.

## ABSTRACT

From pre-history to the present day diverse cultures know and use the therapeutic potential of plants to treat diseases. Among the species commonly used in home practice of medicine, dentistry and cosmetic in Northeast Brazil stands out *Ziziphus joazeiro* Martius (Rhamnaceae), also commercially exploited highly valued by pharmaceutical companies. In this study, we investigated the phytochemical profile of the leaves of *Z. joazeiro* and its biological potential, through the bioassays trypanocidal, leishmanicidal, molluscicide, reversal of resistance of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic, inhibiting the production of nitric oxide and the proliferation of activated lymphocytes. In phytochemical study, the crude ethanol extract was subjected to liquid-liquid partition to obtain the hexane, chloroform, ethyl acetate and water fractions. Some components of the chloroform fraction were separated and purified by column chromatography (CC). The pure or semipures samples were analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and in the region of infrared (IR), with the possible identification of a flavonoid, the quercetin, and a mixture of glycosylated phytosteroids sitosterol and stigmasterol. For biological assays, it was possible to suggest that the ethanol crude extract of the leaves of *Z. joazeiro* demonstrated activity of reversal of resistance of *S. aureus* to ciprofloxacin, while its partition chloroform and subfractions acted as immunomodulators, inhibiting lymphocyte proliferation and NO production *in vitro*. Positive results were not obtained for the molluscicidal activity, trypanocidal and leishmanicidal.

Keywords: *Ziziphus joazeiro*, *S. aureus* MDR, steroid, flavonoid, lymphocyte, NO

## LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

<b>Esquema 1.</b> Obtenção do extrato etanólico bruto de <i>Z. joazeiro</i> e sua partição líquido-líquido	42
<b>Esquema 2.</b> Fracionamento da parte clorofórmica de <i>Z. joazeiro</i>	45
<b>Figura 1.</b> <i>Ziziphus joazeiro</i>	26
<b>Figura 2.</b> Metabolismo do MTT	53
<b>Figura 3.</b> Mecanismo da reação de Griess	54
<b>Figura 4.</b> Espectro na região do infravermelho das substâncias ZJFIIa e b	59
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de ZJFII a e b	63
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de ZJFII a e b	64
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias ZJFII a e b e comparação com o espectro de $^{13}\text{C}$	65
<b>Figura 8.</b> Espectro de correlações HSQC de ZJFIIa e b ( $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ )	66
<b>Figura 9.</b> Espectro na região do infravermelho da substância ZJFIII	67
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$ e $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)	71
<b>Figura 11.</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$ e $\text{DMSO-d}_6$ , 400MHz)	72
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$ e $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Compostos isolados de <i>Ziziphus joazeiro</i>	30
<b>Tabela 2.</b> Atividades biológicas para extratos de <i>Ziziphus joazeiro</i>	35
<b>Tabela 3.</b> Amostras bioensaiadas	49
<b>Tabela 4.</b> Prospecção fitoquímica das folhas de <i>Ziziphus joazeiro</i>	57
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN das substâncias ZJFIIa e ZJFIIb (CD <sub>3</sub> OD e CDCl <sub>3</sub> ) e comparação com os dados citados na literatura	62
<b>Tabela 6.</b> Tabela de correlações extraídas do HSQC de ZJFII a e b	66
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN da substância ZJFIII (400 MHz) e comparação com os dados da literatura	69
<b>Tabela 8.</b> Atividade antibacteriana do extrato de <i>Ziziphus joazeiro</i> frente a cepas susceptíveis e resistentes de <i>S. aureus</i> com ou sem antibiótico	75
<b>Tabela 9.</b> Percentual de mortalidade de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> frente às amostras ensaiadas.	79
<b>Tabela 10.</b> Percentual da inibição da produção de NO e de linfoproliferação das amostras oriundas de <i>Z. joazeiro</i> .	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

CL – concentração letal

Con A – concavalina A

COSY – “Correlation Spectroscopy”

d – duplete

DAP – diâmetro à altura do peito

dd – duplo duplete

DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

DMEM – “Dulbeco’s Modified Eagle Medium”

DO – densidade óptica

HMBC – “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”

HSQC – “Heteronuclear Single Quantum Coherence”

IFN-  $\gamma$  – Interferon- $\gamma$

IL-1 – Interleucina I

IMSEAR – Instituto do Milênio do Semi-árido

IV - Infravermelho

$J$  – Constante de acoplamento

LPS – Lipopolissacarídeo

m – multiplete

MDR – “multiple drugs resistance”

MS – Ministério da Saúde

NAPRALERT – “Natural Products Alert”

OMS – Organização Mundial de Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – simpleto

TNF – “Tumor necrosis factor”

UFC – Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Esquemas e Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
1. Introdução	12
1.1. Plantas Medicinais	13
1.2. Considerações gerais sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.3. Considerações gerais sobre doenças negligenciadas	19
1.4. Considerações gerais sobre imunopatologias	22
1.5. Família Rhamnaceae	24
1.6. Gênero <i>Ziziphus</i>	25
1.7. <i>Ziziphus joazeiro</i> Martius	25
1.7.1. Características gerais	25
1.7.2. Composição química	27
1.7.3. Uso popular e propriedades biológicas	28
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. Material e métodos	39
3.1. Solventes, materiais e equipamentos	40
3.2. Materiais botânico	41
3.3. Estudo fitoquímico	41
3.3.1. Obtenção dos extratos e frações	41
3.3.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos	42
3.3.3. Prospecção fitoquímica dos extratos	46
3.3.3.1. Teste para fenóis e taninos	46
3.3.3.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	46
3.3.3.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	47
3.3.3.4. Teste para flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas	47
3.3.3.5. Teste para esteróides e triterpenóides	48

3.3.3.6. Teste para saponinas	48
3.3.3.7. Teste para alcalóides	48
3.4. Estudo Biológico	49
3.4.1. Extrato e frações utilizadas nos ensaios	49
3.4.2. Avaliação da atividade de reversão da resistência de <i>S. aureus</i> a múltiplas drogas	49
3.4.3. Avaliação da atividade moluscicida	50
3.4.4. Avaliação da citotoxicidade	51
3.4.5. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	52
3.4.6. Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
3.4.7. Avaliação da atividade inibitória da produção de NO	54
3.4.8. Avaliação da atividade inibitória de linfoproliferação	55
4. Resultados e discussão	56
4.1. Análise de prospecção fitoquímica	57
4.2. Identificação estrutural dos compostos isolados	58
4.2.1. ZJFI	58
4.2.2. ZJFII	58
4.2.3. ZJFIII	67
4.3. Avaliação da atividade de <i>Ziziphus joazeiro</i> na reversão da resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> MDR	74
4.4. Avaliação da atividade moluscicida de <i>Ziziphus joazeiro</i>	76
4.5. Avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida de <i>Ziziphus joazeiro</i>	78
4.6. Avaliação da atividade de <i>Ziziphus joazeiro</i> na inibição da proliferação de linfócitos e na produção de NO	80
5. Conclusões	85
6. Referências Bibliográficas	87

## **1. Introdução**

---

## 1.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é toda a espécie vegetal que tem um valor de caráter curativo para determinada comunidade, ou seja, que possua uma propriedade real ou imaginária, aproveitada pela comunidade para um ou mais fins específicos de prevenção, tratamento ou cura de distúrbios, disfunções e doenças do homem e animais (AMOROZO, 1996).

Compostos obtidos a partir do metabolismo vegetal podem ser reunidos em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários, tais como compostos fenólicos, terpenoides, óleos essenciais e alcaloides. Esses não estão envolvidos nas funções vitais da planta, mas atuam no mecanismo de defesa, sendo também responsáveis pelas propriedades terapêuticas ou tóxicas dos vegetais. Algumas plantas aumentam a produção de metabólitos secundários como estratégia de sobrevivência sob condições adversas, como ocorre na caatinga durante os longos períodos de estiagem (SILVA, 2008).

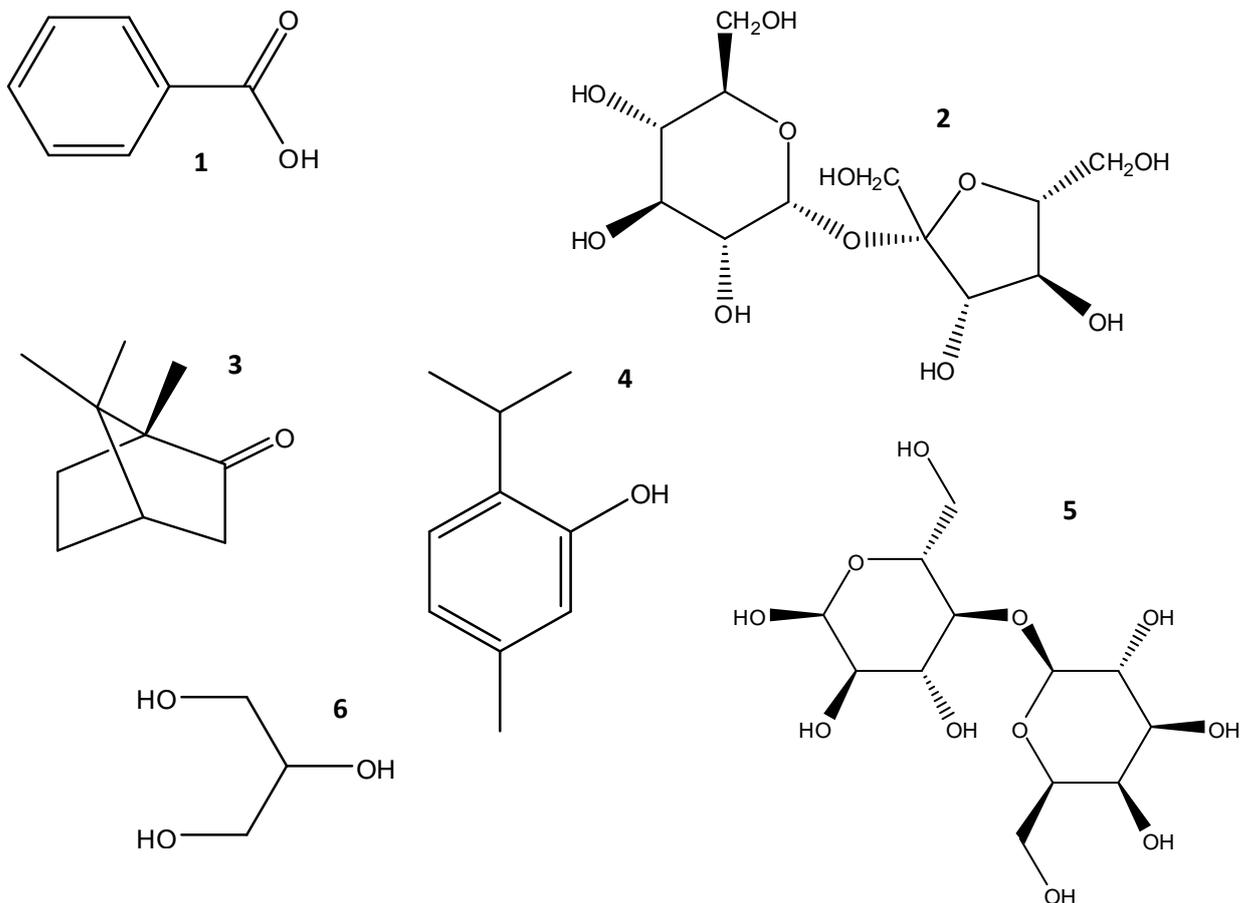
Numa perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso das plantas medicinais. Antes de 1800, quando entrou na era científica, a medicina tradicional utilizava plantas e era considerada como a base inquestionável para todos os livros-texto clássicos de farmacologia. Apenas com o advento da chamada “ciência médica” a fitoterapia foi relegada ao plano de uma modalidade alternativa (SCHULZ *et al.*, 2002).

Há registros históricos comprovando que os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C., eles acreditavam na existência de uma planta apropriada ao tratamento de cada enfermidade. O uso era baseado na crença popular e realizado de forma empírica. Ainda hoje, muitas plantas são empregadas e não foram completamente substituídas por fármacos sintéticos (COWAN, 1999; NIERO *et al.*, 2003).

Somente no final do século XVIII, o homem começou a isolar e identificar os constituintes químicos de fontes naturais. Embora já tivessem sido isolados o ácido benzoico (1), a sacarose (2), a cânfora (3) e o timol (4), foram os trabalhos do sueco Scheele (1742-1786) que deram início a esta nova etapa, com a obtenção de vários ácidos orgânicos e ainda da lactose (5) e glicerina (6). A partir do final do século

passado, com o isolamento dos constituintes dotados de ação farmacológica, entra-se numa nova fase da utilização científica das plantas medicinais, com a substituição progressiva destas e de seus extratos por compostos reconhecidos como responsáveis pela ação farmacológica (<http://www.antoniopecunha.com.sapo.pt>).

Segundo Lorenzi & Matos (2002), até o século XX, o Brasil era um país essencialmente rural, com amplo uso da flora medicinal, tanto a nativa quanto a introduzida. Com o início da industrialização e subsequente urbanização do país, o conhecimento tradicional passou a ser posto em segundo plano. O acesso a medicamentos sintéticos e o pouco cuidado com a comprovação das propriedades farmacológicas das plantas tornou o conhecimento da flora medicinal sinônimo de atraso tecnológico e muitas vezes charlatanismo.



O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial. Apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras de uso, em ambos os casos, o homem percebeu a existência de algo com propriedade de provocar reações benéficas ao organismo,

seja administrado sob a forma de mistura complexa como nos chás, garrafadas, tinturas e pós, ou como substância pura isolada, transformado-a em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas (LORENZI & MATOS, 2002).

Várias espécies de plantas estão sendo utilizadas sob a forma de extratos brutos, infusões ou emplastros, para tratar infecções comuns, embora muitas vezes não haja nenhuma evidência sobre sua eficácia (SANT'ANA *et al.*, 2006). Por outro lado, diversas pesquisas têm comprovado a potencialidade de várias plantas medicinais no tratamento dessas infecções (COWAN, 1999; NADINIC *et al.*, 2002). Newmann *et al.* (2003) relatam que aproximadamente 50% dos fármacos empregados para o tratamento de infecções são de origem natural ou semi-sintética, modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos, e 19,4% utilizam produtos naturais como protótipos para medicamentos sintéticos.

Na literatura, existem várias abordagens para a seleção de espécies vegetais que serão objeto de estudos multidisciplinares, três tipos se destacam (BRUHNS, 1994):

a) abordagem randômica – seleção da espécie sem qualquer critério, de modo aleatório, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta no local. Exemplo: pesquisadores no Panamá utilizaram um desdobramento deste procedimento para estudar as plantas de um bosque tropical, partindo de uma lista de plantas já estudadas em 50 hectares. Uma nova lista de espécies foi criada e os resultados foram bastante satisfatórios, uma vez que se identificou uma boa diversidade de plantas com atividades anti-oxidante e anti-tumoral (CALDERÓN *et al.*, 2000);

b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção de espécies correlacionadas com a ocorrência de uma dada classe química em um gênero ou família que se tenha algum conhecimento fitoquímico. Um bom exemplo são as espécies do gênero *Bauhinia* que possuem substâncias químicas em comum como glicosídeos, triterpenos, lactonas e flavonoides (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002); e,

c) abordagem etnofarmacológica e etnobotânica - seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico.

De acordo com a abordagem randômica, 10000 diferentes tipos de plantas simbolizam 50000 - 100000 possibilidades estruturais de produtos naturais (CORDELL, 1995). As probabilidades de novas descobertas a respeito de substâncias inéditas, bioativas ou não, é, sem dúvida, maior na seleção randômica. A seleção etnofarmacológica, no entanto, favorece a descoberta de novas substâncias bioativas. A descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, se traduz na economia de tempo e dinheiro, dois dos fatores mais perseguidos pelas sociedades ocidentais (MACIEL *et al.*, 2002).

Um caminho recentemente apontado à descoberta de novos fármacos é baseado em estudos de comportamento animal com primatas (KRIEF *et al.*, 2004), chamada de abordagem etológica, que tem como princípio básico avaliar a utilização de metabólitos secundários ou outras substâncias não nutricionais dos vegetais por animais, com finalidade de combater ou controlar doenças (CARRAI *et al.*, 2003). Evidências a partir do uso de plantas por grandes símios africanos sinalizam positivamente para essa nova rota de investigação. Folhas de *Trichilia rubescens* Oliver, consumidas por chimpanzés de Uganda, revelaram atividade antimalárica *in vitro* suportando a hipótese de que a dieta de chimpanzés contém metabólitos secundários de interesse médico (KRIEF *et al.*, 2004).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais de residências. De maneira indireta, este tipo de cultura desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, a etnobotânica, a farmacologia e a fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural que é a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

## **1.2. Considerações gerais sobre *Staphylococcus aureus***

As bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos de humanos e outros mamíferos. *Staphylococcus aureus* é considerada

um dos principais causadores de infecções no ambiente hospitalar, com manifestações clínicas desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves, potencialmente fatais, como pneumonias, endocardites e meningites (JAWETZ, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, reduzindo drasticamente a mortalidade causada por estas doenças. Por outro lado, o processo evolutivo natural acompanhado da disseminação do uso de antibióticos fez com que as bactérias desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com a consequente seleção de cepas com resistência à múltiplas drogas - MDRs (COHEN, 1994).

O principal mecanismo de resistência presente em *S. aureus* é a chamada bomba de efluxo. Genes mutantes super expressam as proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias do meio citoplasmático, fazendo com que a expulsão do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente do fármaco para atuar como bloqueador das funções celulares. O gene NorA é um desses exemplos, pois, quando super expresso, codifica a proteína NorA de efluxo de norfloxacina e outras drogas (COSTA *et al.*, 2008).

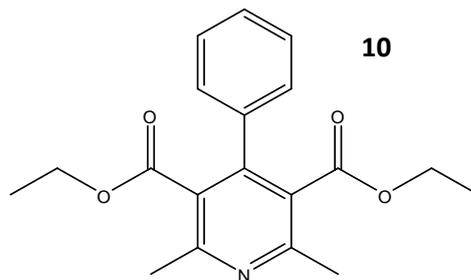
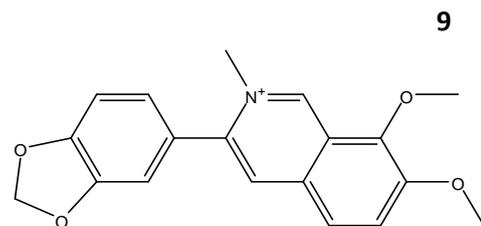
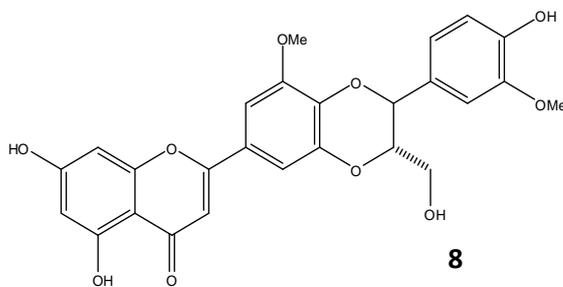
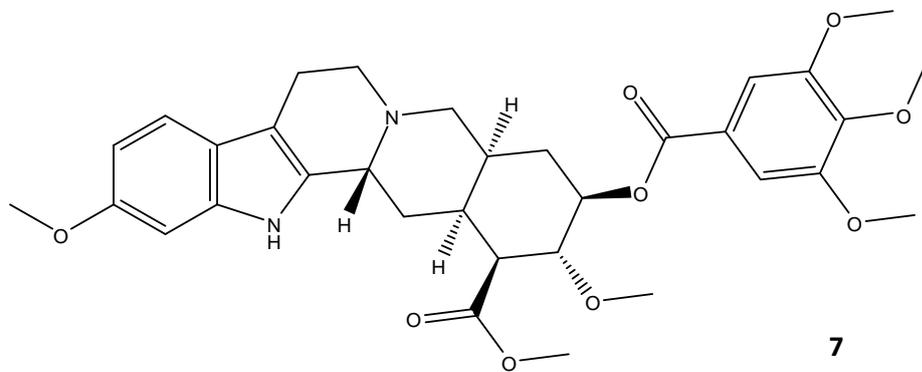
Em particular, as plantas têm demonstrado possuir diversos inibidores de proteínas de efluxo, podendo-se citar a reserpina (**7**), um dos primeiros inibidores de bombas revelados para potencializar antibióticos em bactérias gram-positivas (STAVRI *et al.*, 2007).

O óleo da copaíba, assim como os extratos brutos da casca do caule de *Schinus terebinthifolius* e *Lafoensia pacari*, das cascas e folhas de *Serjania lethalis* e dos rizomas de *Jatropha elliptica*, mostraram, particularmente, forte inibição do crescimento de cepas suscetíveis e resistentes NorA e MsrA (que codificam o mecanismo de resistência mediado por bombas de efluxo) da bactéria *S. aureus* com valores de concentração inibitória mínima (MIC)  $\leq 100\text{mg/mL}$  (SANT'ANA *et al.*, 2006).

Stermitz *et al.* (2000) analisaram o potencial de ação da 5'-metoxihidnocarpina (5'-MHC) (**8**) associado à berberina (**9**) contra *S. aureus* resistente. Ambos foram extraídos de plantas do gênero *Berberis* e isoladamente não apresentaram boa atividade antibiótica, mas, agindo sinergicamente, tiveram suas ações fortemente

potencializadas. O 5<sup>7</sup>- MHC conseguiu penetrar a membrana da bactéria e inativar o efeito dos genes *NorA*, permitindo a passagem e permanência da berberina dentro da célula.

Em um trabalho paralelo, Márquez *et al.* (2005) identificaram o composto ativo do extrato etanólico de *Jatropha elliptica* como sendo 2,6-dimetil-4-fenil-piridina-3,5-dicarboxilato de dietila (**10**). O mesmo não demonstrou atividade antimicrobiana, mas retomou o efeito dos antibióticos ciprofloxacina e morfloxacina, entre outros, contra bactérias resistentes, sugerindo que seu mecanismo de ação incide sobre a bomba de efluxo provocando a reversão da resistência de *S. aureus*.

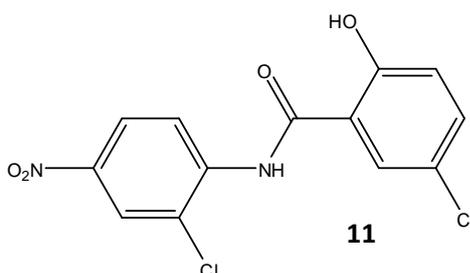


### 1.3. Considerações gerais sobre doenças negligenciadas

Doenças negligenciadas são um grupo de doenças tropicais, endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina, que contribuem para o quadro de desigualdade social e dificultam o desenvolvimento dos países. Como exemplos destas doenças, podemos citar: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, mais de um bilhão de pessoas estão infectados com uma ou mais doenças negligenciadas, a cada dia, cerca de três mil são vítimas fatais. Um dos motivos para o número elevado de óbitos é a falta de ferramentas adequadas para o diagnóstico e tratamento destas enfermidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Dentre as doenças mais negligenciadas está a esquistossomose. De etiologia infecciosa parasitária, é causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma* que vive na corrente sanguínea de seu hospedeiro definitivo, o homem. É a mais grave forma de parasitose por organismo multicelular, matando centenas de milhares de pessoas por ano em todo o mundo. A transmissão da doença depende da existência de caramujos de água doce, os hospedeiros intermediários. No Brasil, as três espécies envolvidas na transmissão são *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, por ordem de importância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Além do tratamento dos pacientes infectados e de medidas educacionais voltadas para a população, uma forma de evitar a transmissão da esquistossomose é através do controle do caramujo vetor. Hoje, apenas a niclosamida (**11**) se encontra disponível comercialmente para uso em programas de controle, mas possui alto preço, custo operacional dispendioso e provoca danos ao ambiente ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos\\_cap\\_7.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos_cap_7.pdf)).

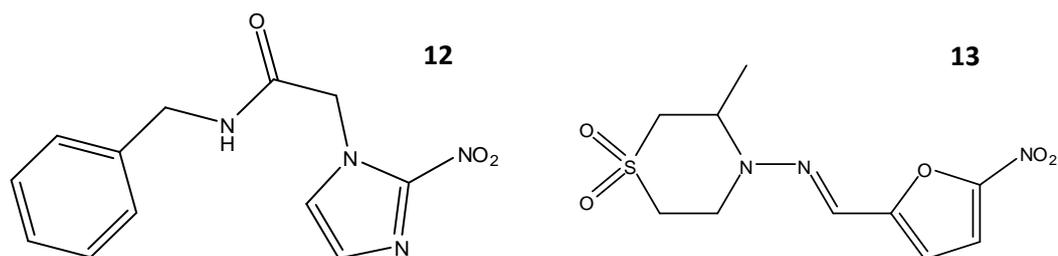


A busca por um controle químico malacológico sintético e/ou extratos vegetais é constante, os produtos ideais devem ser eficazes em baixas concentrações, ter baixo custo, não ser tóxico ao homem, aos outros animais e plantas, além de ser de fácil manipulação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outro grande problema de saúde pública é a doença de Chagas. A patologia é uma das consequências da infecção humana produzida pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. As formas habituais de transmissão para o homem são: vetorial, através do contato do homem suscetível com as excretas contaminadas dos triatomíneos, também conhecidos como barbeiros ou chupões; transfusional, transplacentária (congênita) e a transmissão por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados pelo protozoário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O *T. cruzi* infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo os seres humanos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos. A incidência anual é 200 mil casos em quinze países latino-americanos (BRENER & ANDRADE, 2000). No Brasil, existem cerca de 2.500.000 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, as condições precárias de habitação favorecem a disseminação da doença, sobretudo em áreas rurais (AMATO NETO & PASTERNAK, 2009).

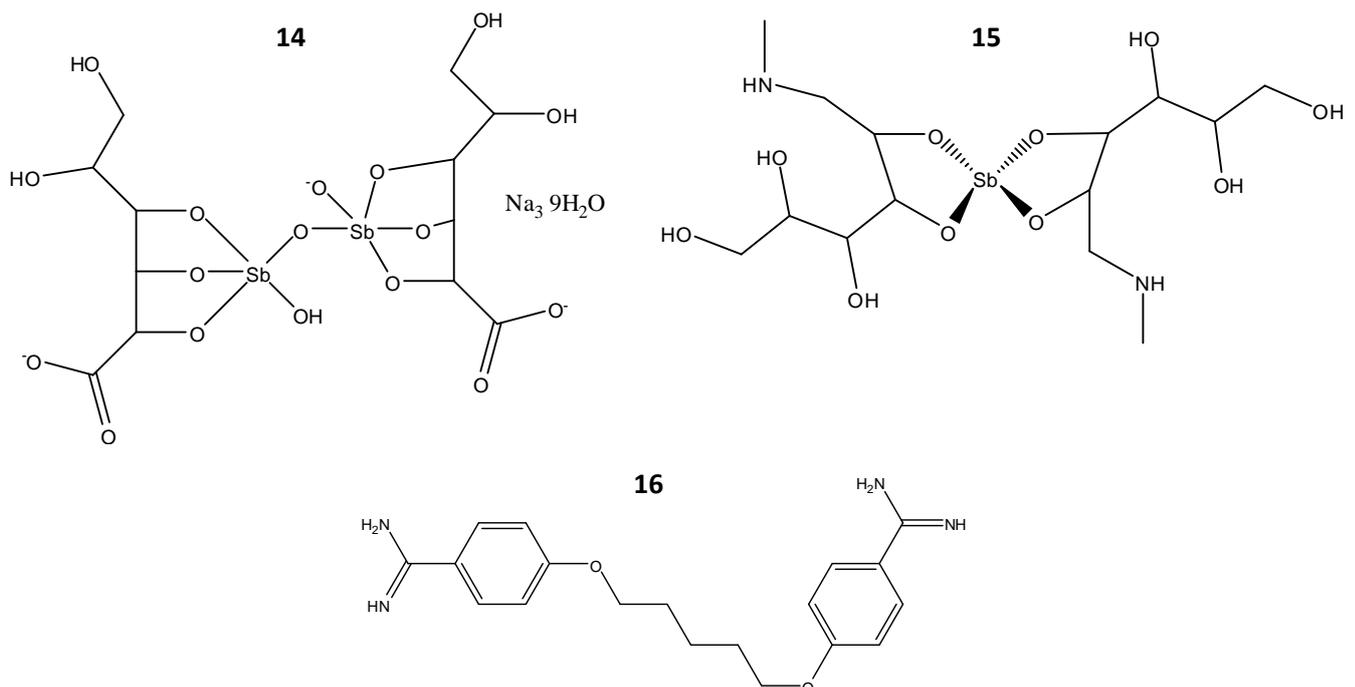
O Benzonidazol (**12**) é o fármaco disponível para o tratamento específico da doença de Chagas. Nifurtimox (**13**) também pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ao Benzonidazol, embora seja um medicamento de difícil obtenção. Ambos são eficientes na fase aguda ou crônica recente da doença, mas podem induzir efeitos colaterais tóxicos aos pacientes, como tontura, cefaleia, anorexia, depleção medular, entre outros (URBINA & DO CAMPO, 2003). Assim, é de extrema importância a busca de novas substâncias para o tratamento da doença que apresentem resultados também na fase crônica e uma menor toxicidade.

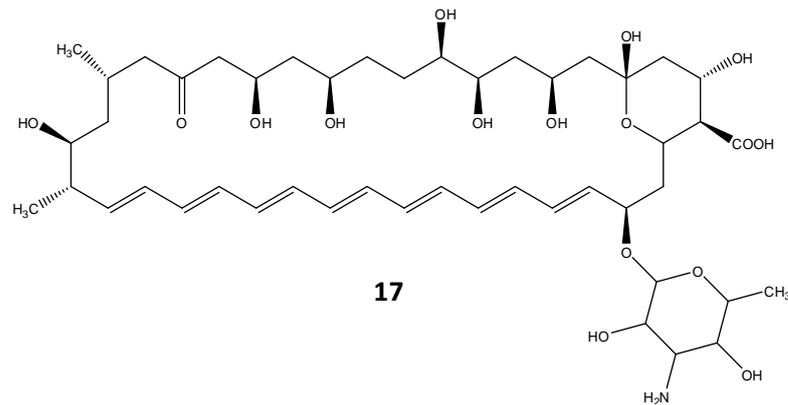


As leishmanioses, por sua vez, representam um conjunto de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De modo geral, essas enfermidades se dividem em tegumentares, menos graves, que atacam a pele e as mucosas, e viscerais, que atacam os órgãos internos, podendo levar a morte se não tratadas. A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O protozoário é transmitido ao homem e outros mamíferos por insetos vetores conhecidos como flebotomíneos. O aumento elevado na taxa de co-infecção em pacientes HIV positivos e o desenvolvimento de resistência dos parasitos às drogas existentes tem aumentado a importância desta doença na saúde pública (LEANDRO & CAMPINO, 2003).

Os medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (**14**) e o antimoniato de meglunina (**15**). A pentamidina (**16**) e a anfotericina B lipossomal (**17**) também podem ser utilizados quando não há resposta ao primeiro tratamento. Nestes casos, o paciente permanece internado em unidades de saúde para acompanhamento dos possíveis efeitos colaterais (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUES, 2001).





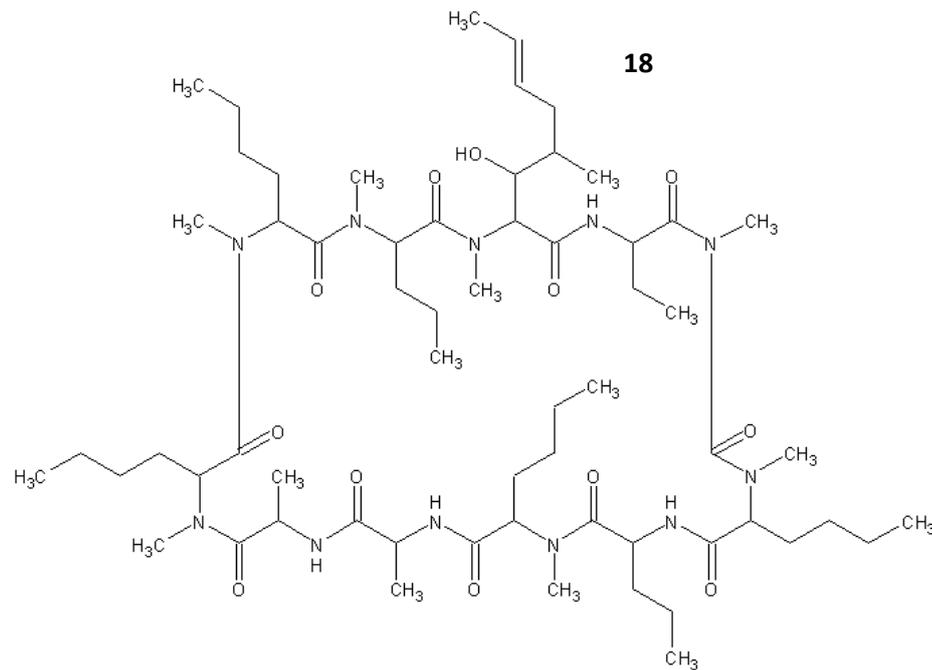
#### 1.4. Considerações gerais sobre imunopatologias

A capacidade técnica de efetuar transplantes bem sucedidos de muitos órgãos criou, em particular, um forte ímpeto pelo desenvolvimento de esquemas imunossupressores seguros e eficazes. Além disso, mais de 40 doenças consideradas como decorrentes de respostas imunológicas anormais são passíveis de tratamento com agentes capazes de inibir as respostas imunológicas (WINKELSTEIN, 2000).

Os imunomoduladores são compostos que modificam as respostas biológicas, afetando-as de modo positivo ou negativo. Um número cada vez maior de substâncias potenciais vem sendo examinado para uso terapêutico em uma variedade de distúrbios, incluindo neoplasias, estados imunodeficientes e doenças inflamatórias (HENNESSEY & BAKER, 2000). Com a descoberta dos imunomoduladores tornou-se possível a manipulação do sistema imune a favor de um estado saudável, na tentativa de reduzir os efeitos associados ou não à quimioterapia, rejeição de enxertos, doenças alérgicas, cancerígenas, entre outras (DUTTA, 2002).

É conhecido que os macrófagos estão envolvidos em todos os estágios da resposta imune, a ativação destes leva a produção de vários mediadores imunológicos solúveis, tais como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e radicais livres de oxigênio e de nitrogênio. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, produzido por uma família de enzimas em processos inflamatórios (ASLAN, 2002). Desse modo, substâncias capazes de inibir a ativação de macrófagos e a proliferação de linfócitos têm potencial utilização como imunomoduladores.

Fármacos – corticoides e ciclosporina (**18**), por exemplo – com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos têm sido amplamente utilizados para o controle de respostas imuno-inflamatórias indesejadas. Muitas vezes, porém, os efeitos adversos são graves, correspondendo a retardo do crescimento, osteopenia, necrose avascular da medula, hipertensão, hiperlipidemia e, com maior frequência, nefrotoxicidade (KRESNKY *et al.*, 2001).



As plantas produzem um vasto número de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Entre essas substâncias estão os flavonoides, polifenóis presentes em grande quantidade na dieta humana que possuem várias atividades biológicas, incluindo propriedades imunomodulatórias e atividades antioxidantes (IELPO *et al.*, 2000).

A meta final neste campo consiste em obter uma imunossupressão específica ou tolerância dirigida apenas para a resposta imunológica contra determinados antígenos, o que estimula a pesquisa de fármacos capazes de inibir respostas adversas (WINKELSTEIN, 2000).

## 1.5. Família Rhamnaceae

A família Rhamnaceae compreende 55 gêneros com aproximadamente 900 espécies. Possuindo ampla distribuição pelo mundo, ramnáceas são encontradas em todas as regiões, exceto nas frias. Na América do Sul já foram registradas 93 espécies, no Brasil, dos 9 gêneros presentes apenas um ocorre no Nordeste, com representantes na caatinga, cerrado e campos rupestre (GIULIETTI & QUEIROZ, 2006).

Morfologicamente, apresentam-se como plantas que podem ser árvores, arbustos, subarbustos, cipós e raras vezes ervas (GIACOMELLI, 2005). São caracterizadas pelas folhas simples, não lobadas, pelo ovário nitidamente médio, pelos estames opostos às pétalas e pelos óvulos basais. Suas flores são muito pequenas, não vistosas, em geral branco-amareladas. O fruto é uma drupa ou cápsula, às vezes com pseudofruto desenvolvido, como no gênero *Hovenia* (SCHULTZ, 1990).

Apesar do número relativamente pequeno, os vegetais desta família têm merecido a atenção dos estudiosos, especialmente sob o ponto de vista utilitário. As ramnáceas apresentam grande potencial econômico, embora ainda não devidamente explorado. Muitos de seus representantes são utilizados em ornamentações, na medicina popular, na fabricação de cosméticos e na alimentação de animais, sendo ainda a madeira usada na marcenaria e na produção de lenha e carvão. Os frutos, em algumas espécies são doces e já estão sendo introduzidos na alimentação humana sob a forma de doces e geleias (MONIZ, 2002).

Segundo Giacomelli (2005), dentre as espécies mais importantes desta família, citam-se as pertencentes aos gêneros *Discaria*, *Colletia*, *Gouania*, *Comdalia*, *Colubrina*, *Ziziphus*, *Crumenaria*, *Kentrothamnus*, *Retanilla*, *Rhamnus*, *Sageretia* e *Scutia*. Exemplos nativos do Brasil são *Ziziphus*, com o conhecido juazeiro do Nordeste, que resiste às mais desapiedadas secas, e *Colubrina*, com espécies de cerne vermelho, designadas saguaragi. Dentre as espécies cultivadas, destaca-se a passa-japonesa ou mata-fome, do gênero *Hovenia*, com seus pedúnculos frutíferos carnosos e doces, introduzida da Ásia (JOLY, 1985).

## 1.6. Gênero *Ziziphus*

Descrito por Miller em 1754, o gênero compreende cerca de 150 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Exemplos são comuns em regiões do Mediterrâneo, África, Austrália e América tropical (KATO & ALVARENGA, 1997).

Com exceção da região Sul, *Ziziphus* está difundido em todas as partes do Brasil. Lima (2000) indica para o gênero um padrão de distribuição restrito às áreas de Caatinga do Nordeste Brasileiro, mas *Ziziphus joazeiro*, embora típico da própria região, consegue ultrapassar esse limite chegando a habitar algumas áreas menos xéricas.

Espécies de *Ziziphus* são comumente usadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, tais como: distúrbios digestivos, fraqueza, hepatopatias, obesidade, problemas urinários, diabetes, infecções da pele, perda de apetite, febre, faringite, bronquite, anemia, diarreia e insônia (HAN & PARK, 2006).

Estudos fitoquímicos de diferentes espécies do gênero levaram ao isolamento e identificação de compostos pertencentes aos grupos dos alcaloides peptídicos e ciclopeptídicos, flavonoides, esteróis, taninos e triterpenoides (PAWLOWSKA *et al.*, 2009).

## 1.7. *Ziziphus joazeiro* Martius

### 1.7.1. Características gerais

Espécie nativa do bioma caatinga ocorre próximo aos vales sertanejos desde o Estado do Piauí até o norte de Minas Gerais, onde se mantém verde mesmo durante longas estiagens. É objeto de exploração comercial altamente valorizado devido à sua utilização por importantes indústrias farmacêuticas na fabricação de cosméticos, xampus anticaspa e creme dental (LIMA, 2000; MATOS, 2000).

Segundo Carvalho (2007), o codinome específico *joazeiro* teve sua origem no vocábulo indígena juá, do tupi, que significa frutos carnosos. A espécie tem como sinonímia botânica *Ziziphus guaranítica* Malme e *Ziziphus gardneri* Reissek, além de apresentar uma vasta lista de nomes vulgares, entre eles: joazeiro, juazeiro, juareiro,

juá, juá-bravo, juá-babão, juá-de-boi, joá-mirim, enjoá, enjuá, juá-espinho, juá-fruta, laranjeira-de-vaqueiro, loquiá e raspa de juá.

A árvore frondosa (Figura 1, p.26), de até 16 metros de altura, possui tronco de 39 a 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito) e ramos armados de fortes espinhos, a copa é mais larga do que alta. Perenifólia, graças ao amplo e profundo sistema radical (capaz de coletar a escassa umidade existente no subsolo), apresenta folhas inteiras, semicoriáceas, elípticas, com três nervuras bem visíveis partindo da base, de 3-7 cm de comprimento. As flores são pequenas, amarelo-esverdeadas, e os frutos do tipo drupa, globoso, amarelado, com caroço grande coberto por uma polpa mucilaginosa, branca e de gosto doce acidulado. Os frutos são muito apreciados pelos sertanejos em época de fome e pelos caprinos em qualquer época (LORENZI & MATOS, 2002).



**Figura 1.** *Ziziphus joazeiro* ([www.rain-tree.com/Plant-Images/juazeiro-pic.htm](http://www.rain-tree.com/Plant-Images/juazeiro-pic.htm), acessado em abril de 2010). A. Árvore frondosa. B. Flores. C. Frutos. D. Sementes. E. Casca. F. Madeira.

Essa espécie ocorre nos solos profundos e de boa fertilidade química, onde se apresenta frondosa. Prefere solos aluviais argilosos, mas desenvolve por toda a parte, inclusive nos tabuleiros mais áridos e pedregosos, onde adquire aspecto quase arbustivo. Em solos muito rochosos não se desenvolve com exuberância (CARVALHO, 2007). Lorenzi (1992) destaca a prática do cultivo de *Z. joazeiro* em pomares domésticos em todo o Brasil.

### 1.7.2. Composição química

Análises fitoquímicas registraram para os frutos, quando maduros, cerca de 25 mg de vitamina C por 100 g de polpa, mucilagem e açúcares. Para a casca, é citada a presença de estearato de glicerila, ácido betulínico (**20**), lupeol (**21**), cafeína (**22**), amfibina D (**29**), e, como principais substâncias, as saponinas chamadas jujubosídeos (**33**, **34**, **35**) (SOUZA *et al.*, 1991; KATO & ALVARENGA, 1997). O levantamento bibliográfico utilizando os bancos de dados Natural Products ALERT (NAPRALERT) e SciFinder Scholar resultou em uma tabela de compostos isolados de *Ziziphus joazeiro*, onde é possível destacar a frequente ocorrência da classe dos triterpenos, com destaque para presença de saponinas (Tabela 1, p. 30).

As saponinas são muito utilizadas nos setores industriais têxtil, farmacêutico, alimentício, cosmético e na produção de bebidas, por suas propriedades emulsificante, espúmogena e detergente. Além disso, apresentam diversas atividades biológicas e alguns autores as consideram, junto com os polifenóis, responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos observados na medicina tradicional chinesa (SPARG *et al.*, 2004).

O ácido betulínico, por sua vez, é um triterpenoide pentacíclico de ocorrência natural que possui propriedades anti-retrovirais, anti-malarial, anti-inflamatória e anti-cancerígena, por atuar na inibição da topoisomerase (CHOWDHURY *et al.*, 2002). É o composto mais habitualmente isolado do juá (Tabela 1, p. 30). Ainda na tabela, é possível observar a ausência de estudos fitoquímicos utilizando as folhas, frutos e sementes de *Z. joazeiro*.

### 1.7.3. Uso popular e propriedades biológicas

Pela cultura popular, a planta é empregada como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos e na alimentação de animais, principalmente nos períodos de seca, além de apresentar importância ecológica (CARVALHO, 2007). Albuquerque *et al.* (2007) relatam o uso medicinal para limpeza dos dentes, caspa, asma, tosse, gripe, tuberculose, pneumonia, bronquite, constipação, inflamação da garganta, indigestão, escabiose, dermatite seborreica, coceira, problemas de pele, cicatrização e expectorante.

As cascas e as folhas são tradicionalmente usadas no nordeste do País na forma de extrato aquoso, usado por via oral para alívio de problemas gástricos, ou externamente, para limpeza dos cabelos, dos dentes, para clarear e amaciar a pele do rosto, sendo referido inclusive como tônico capilar anticaspa e remédio útil nas doenças da pele (BRAGA, 1960; SOUZA *et al.*, 1991).

As flores são importante fonte de recurso alimentar para abelhas indígenas sem ferrão da tribo *Meliponini*, as quais são utilizadas na meliponicultura, sendo atividade alternativa de renda para produtores de algumas áreas de Caatinga (NADIA *et al.*, 2007).

Com a vantagem de estarem sempre verdes, as folhas do juazeiro constituem valioso recurso alimentar para bovinos, caprinos e suínos nos períodos de seca, apresentando alto teor de proteína bruta, de 15,31 % a 18,10 %, e baixo teor de tanino, de 2,56 %. Os frutos são comestíveis, sendo muito consumidos ao natural, pelo sertanejo do nordeste. O juá maduro é muito estimado pelas crianças e adultos, pois alivia a fome e a sede em tempo de seca (LIMA, 1996).

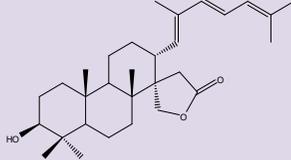
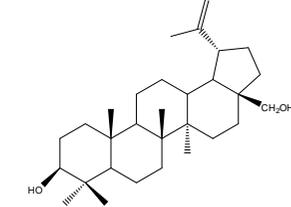
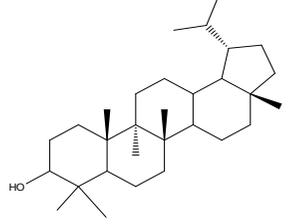
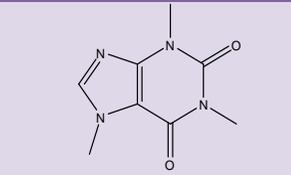
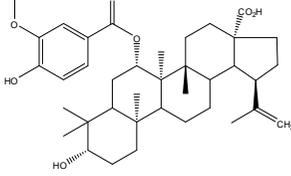
Embora a planta seja utilizada pela comunidade como medicamento eficaz e inofensivo, baseado em conhecimentos empíricos repassados ao longo dos anos, a determinação da real potencialidade fitoterápica e eventual toxicidade dessa espécie deve ser efetuada por meio de investigações fitoquímicas e farmacológicas específicas. A OMS reconhece a importância do uso tradicional, mas para a utilização de uma planta, é fundamental o estabelecimento de sua segurança, eficácia e garantia de qualidade das preparações (SILVA, 2008).

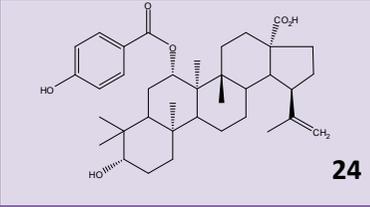
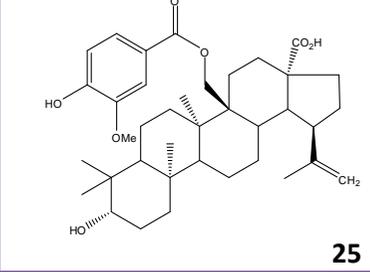
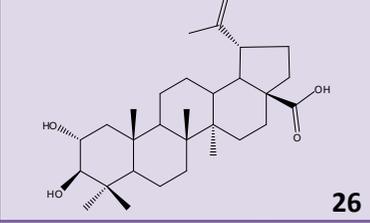
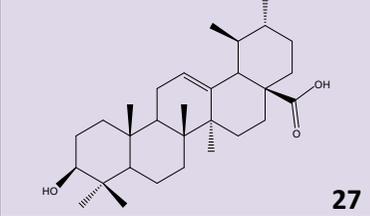
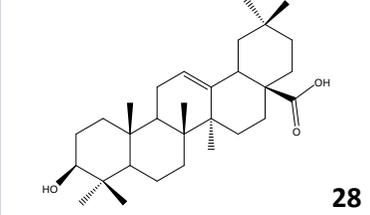
Pesquisas científicas vêm sendo realizadas para validar o uso de *Z. joazeiro* com finalidade terapêutica, em nível de saúde pública. Um resumo das propriedades

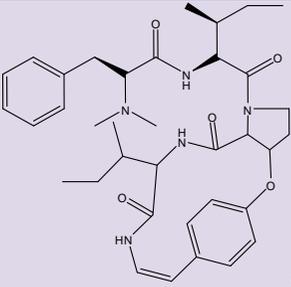
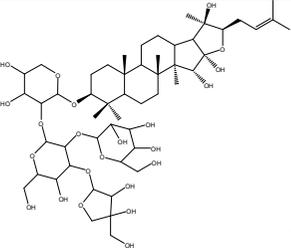
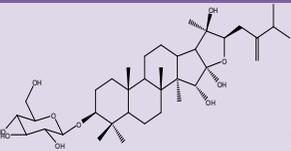
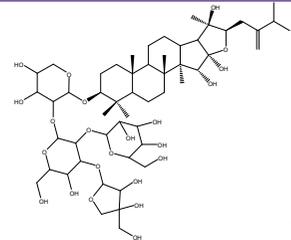
biológicas apresentadas pela planta até o momento pode ser observado na Tabela 2 (p. 35), onde também é possível analisar as partes da planta utilizadas em cada experimento, destacando-se o pequeno número de estudos realizados com as folhas de *Z. joazeiro*.

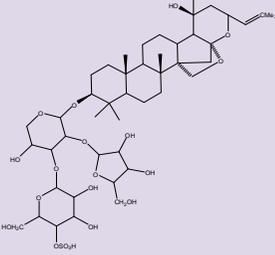
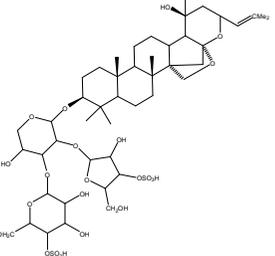
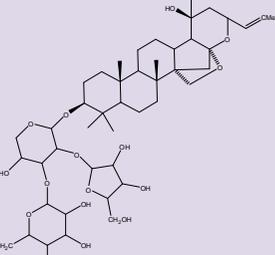
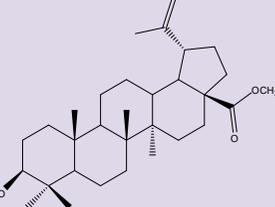
O amplo emprego dessa planta nas práticas caseiras da medicina, odontologia e cosmética aplicadas pelo povo é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos químicos e farmacológicos mais aprofundados, visando o seu melhor aproveitamento.

**Tabela 1.** Compostos isolados de *Ziziphus joazeiro*

Composto	Classe	Estrutura	Parte da Planta	Referências
Ebelina Lactona	Triterpeno	 <b>19</b>	Casca do caule	Barbosa Filho <i>et al.</i> (1985)
			Casca	Trigueiro <i>et al.</i> (1981)
				Soares <i>et al.</i> (1998)
Ácido Betulínico	Triterpeno	 <b>20</b>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
			Casca	Barbosa Filho <i>et al.</i> (1985)
				Leal <i>et al.</i> (2010)
Lupeol	Triterpeno	 <b>21</b>	Casca do caule	Kato & Alvarenga (1997)
Cafeína	Alcaloide	 <b>22</b>	Casca do caule	Kato & Alvarenga (1997)
Ácido [7-beta-(4-hidroxi-3'-metoxi-benzoiloxi)] Betulínico	Triterpeno	 <b>23</b>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)

Ácido [7-beta-(4-hidroxi-benzoiloxi)] Betulínico	Triterpeno	 <p>Chemical structure of Betulinic acid derivative (24), showing a pentacyclic triterpene core with a 4-hydroxybenzoate ester group at C-7 and a carboxylic acid group at C-28.</p> <p><b>24</b></p>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
Ácido [27-(4-hidroxi-3'-metoxi-benzoiloxi)] Betulínico,	Triterpeno	 <p>Chemical structure of Betulinic acid derivative (25), showing a pentacyclic triterpene core with a 4-hydroxy-3-methoxybenzoate ester group at C-27 and a carboxylic acid group at C-28.</p> <p><b>25</b></p>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
Ácido Alfaólico	Triterpeno	 <p>Chemical structure of Ursolic acid (26), showing a pentacyclic triterpene core with hydroxyl groups at C-3 and C-28.</p> <p><b>26</b></p>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
				Leal <i>et al.</i> (2010)
Ácido Ursólico	Triterpeno	 <p>Chemical structure of Ursolic acid (27), showing a pentacyclic triterpene core with hydroxyl groups at C-3 and C-28.</p> <p><b>27</b></p>	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
Ácido Oleanólico	Triterpeno	 <p>Chemical structure of Oleanolic acid (28), showing a pentacyclic triterpene core with hydroxyl groups at C-3 and C-28.</p> <p><b>28</b></p>	Casca do caule	Barbosa Filho <i>et al.</i> (1985)

Amfibina D	Alcaloide peptídico	 29	Casca	Tschesche <i>et al.</i> (1981)
Lotosídeo A	Saponina triterpênica	 30	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (2000)
Joazeirosídeo A	Saponina Triterpênica	 31	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (2000)
Joazeirosídeo B	Saponina Triterpênica	 32	Casca do caule	Schuhly <i>et al.</i> (2000)

<p>Jujubogenina-3-O-<math>\alpha</math>-l-arabinofuranosil-(1,2)-(<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-(1,3))-<math>\alpha</math>-L-arabinopiranoside,4'''-O-sulfato</p>	<p>Saponina Triterpênica</p>	 <p>33</p>	<p>Casca do caule</p>	<p>Higuchi <i>et al.</i> (1984)</p>
<p>Jujubogenin-3-O-<math>\alpha</math>-L-arabinofuranosil-(1,2)-(<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-(1,3))-<math>\alpha</math>-L-arabinopiranosideo, 3'', 4'''-di-O-sulfato</p>	<p>Saponina Triterpênica</p>	 <p>34</p>	<p>Casca do caule</p>	<p>Higuchi <i>et al.</i> (1984)</p>
<p>Jujubogenina-3-O-<math>\alpha</math>-l-arabinofuranosil-(1,2)-(<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-(1,3))-<math>\alpha</math>-L-arabinopiranosideo</p>	<p>Saponina Triterpênica</p>	 <p>35</p>	<p>Casca do caule</p>	<p>Higuchi <i>et al.</i> (1984)  Schuhly <i>et al.</i> (2000)</p>
<p>Betulinato de metila</p>	<p>Triterpeno</p>	 <p>36</p>	<p>Casca do caule</p>	<p>Leal <i>et al.</i> (2010)</p>

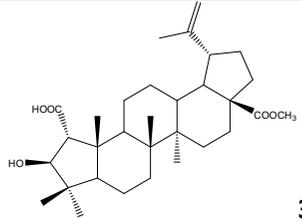
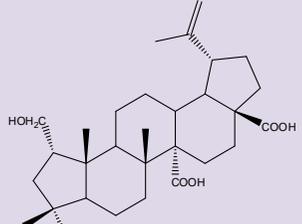
Ceanotato de metila	Triterpeno	 37	Casca do caule	Leal <i>et al.</i> (2010)
Ácido Epigouanico A	Triterpeno	 38	Casca do caule	Leal <i>et al.</i> (2010)

Tabela 2. Atividades biológicas para extratos de *Ziziphus joazeiro*

Atividade	Parte da Planta	Extrato	Substância	Referências
Atividade antipirética em coelhos. Febre induzida por <i>Escherichia coli</i>	Casca	Aquoso	--	Nunes <i>et al.</i> (1987)
Atividade moluscicida contra <i>Biomphalaria glabrata</i> (20 - 30% de mortalidade a 10 ppm)	Polpa do fruto casca do caule sementes	Aquoso	--	Barbosa & De Mello (1969)
Atividade moluscicida contra <i>B. straminea</i> (10% de mortalidade a 10 µg/mL)	Polpa do fruto casca do caule sementes	Aquoso	--	Barbosa & De Mello (1969)
Atividade moluscicida contra <i>Australorbis glabratus</i> (100 ppm)	Não especificado	Metanólico	--	Castillon & Altschul (1950)
Efeito estimulante em útero de ratas (estrog.)	Casca do caule	Etanólico	--	Barros <i>et al.</i> (1970)
Atividade antioxidante	Entrecasca	Aquoso	--	Alviano <i>et al.</i> (2008)
Atividade sobre os fungos <i>Candida albicans</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Semente Folhas Entrecasca	Aquoso	--	Cruz <i>et al.</i> (2007)
Atividade sobre as bactérias: <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , associadas a doenças periodontais; e, <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Lactobacillus casei</i> , bactérias cariogênicas	Entrecasca	Aquoso	--	Alviano <i>et al.</i> (2008)

<b>Atividade contra bactérias Gram-positivas</b>	Casca do caule	Diclorometano	Ácidos betulínico (20), alfitaólico (26), ursólico (27), e derivados do ácido betulínico	Schuhly <i>et al.</i> (1999)
<b>Atividade frente à tirosinase extraída de cogumelo (13% de atividade x controle positivo)</b>	Casca	Propileno glicol: Água (1:1)	--	Baurin <i>et al.</i> (2002)
<b>Efeito cardiotônico direto, ação hipotensora e relaxante na musculatura lisa da traqueia</b>	Casca do caule	--	Ebelina Lactona (19)	Barbosa-Filho (1997)
<b>Toxicidade contra <i>Artemia salina</i> (CL<sub>50</sub> média de 168,92 µg/mL)</b>	Casca do caule	Etanólico	--	Estevam <i>et al.</i> (2007)
<b>Ativo frente a linhagens susceptíveis e resistentes de <i>S. aureus</i></b>	Casca do caule	Etanólico	Ceanotato de metila (37)	LEAL <i>et al.</i> (2010).
<b>Ação antimutagênica quando em associação com Doxurrubicina</b>	Cascas e folhas	Hidroalcoólico	--	Resende <i>et al.</i> (2009)

## **2.Objetivos**

---

## 2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visou investigar o perfil fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas de *Ziziphus joazeiro*, além de testar seu potencial biológico.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar os constituintes químicos da folha de *Ziziphus joazeiro*;
- Investigar a atividade anti-parasitária e imunomoduladora *in vitro* do extrato bruto e subfrações de *Ziziphus joazeiro*, através dos ensaios: tripanocida, leishmanicida, moluscicida e de inibição da produção de óxido nítrico e proliferação de linfócitos ativados;
- Avaliar o potencial de reversão da resistência à antibiótico de *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas.

### **3. Materiais e métodos**

---

### 3.1. Solventes, materiais e equipamentos

- Na preparação do extrato utilizou-se Percolador de aço INOX;
- Os solventes utilizados (acetato de etila, clorofórmio, etanol, hexano e metanol) foram adquiridos de grau P. A. ou de grau comercial destilados no próprio laboratório;
- Nas preparações cromatográficas em coluna utilizou-se sílica gel 60 (230-400 mesh, da Merck) e Sephadex LH-20 (Farmacia). A quantidade adicionada de sílica gel foi de 20 a 30 vezes o peso da amostra de trabalho;
- A concentração das soluções contendo grandes volumes foi efetuada em evaporador rotativo (BÜCHI, Modelo R-210) e as de pequeno volume à temperatura ambiente, em capela de exaustão (Permutation). Em ambos os casos a água residual foi removida em dessecador.
- Nas cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck;
- Os cromatogramas foram revelados através de irradiação com luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 356 nm e borrifração com solução ácida de sulfato cérico.
- Nas solubilizações utilizou-se ultra-som da Branson (Modelo 1210);
- Na secagem das vidrarias utilizou-se estufa de esterilização universal, modelo 219;
- As pesagens foram efetuadas em balança eletrônica analítica (Modelo AX 200) e semi-analítica, das marcas Shimadzu e Bel, respectivamente;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H: 400 MHz e <sup>13</sup>C: 100 MHz) foram obtidos em espectrômetro da Bruker Avance 400 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alagoas. A referência interna utilizada foi o solvente que solubilizou a amostra ou Tetrametilsilano (TMS). Em alguns casos, foi indispensável a realização dos espectros HSQC e DEPT135.
- Os espectros no comprimento de onda na região do infravermelho foram obtidos através da técnica ATR utilizando o instrumento Varian 660 – IR, FT – IR Spectrometer presente no Laboratório de Biodiesel e Nanotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas.

## 3.2. Material botânico

As folhas de *Ziziphus joazeiro* foram fornecidas pelo projeto IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido). A coleta foi realizada pela botânica Dr<sup>a</sup> Tânia Ribeiro em 09/04/2002 na estrada Urandi, Fazenda Palmeiras, a 6 Km do município de Urandi, estado da Bahia, 14°16'S 42°37'W. A planta se encontra registrada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob o número de série 65975.

Segundo dados da exsicata o espécime coletado se apresentava com cerca de 6 metros de altura, com folhas levemente descolores, glabras, e os frutos maduros amarelos.

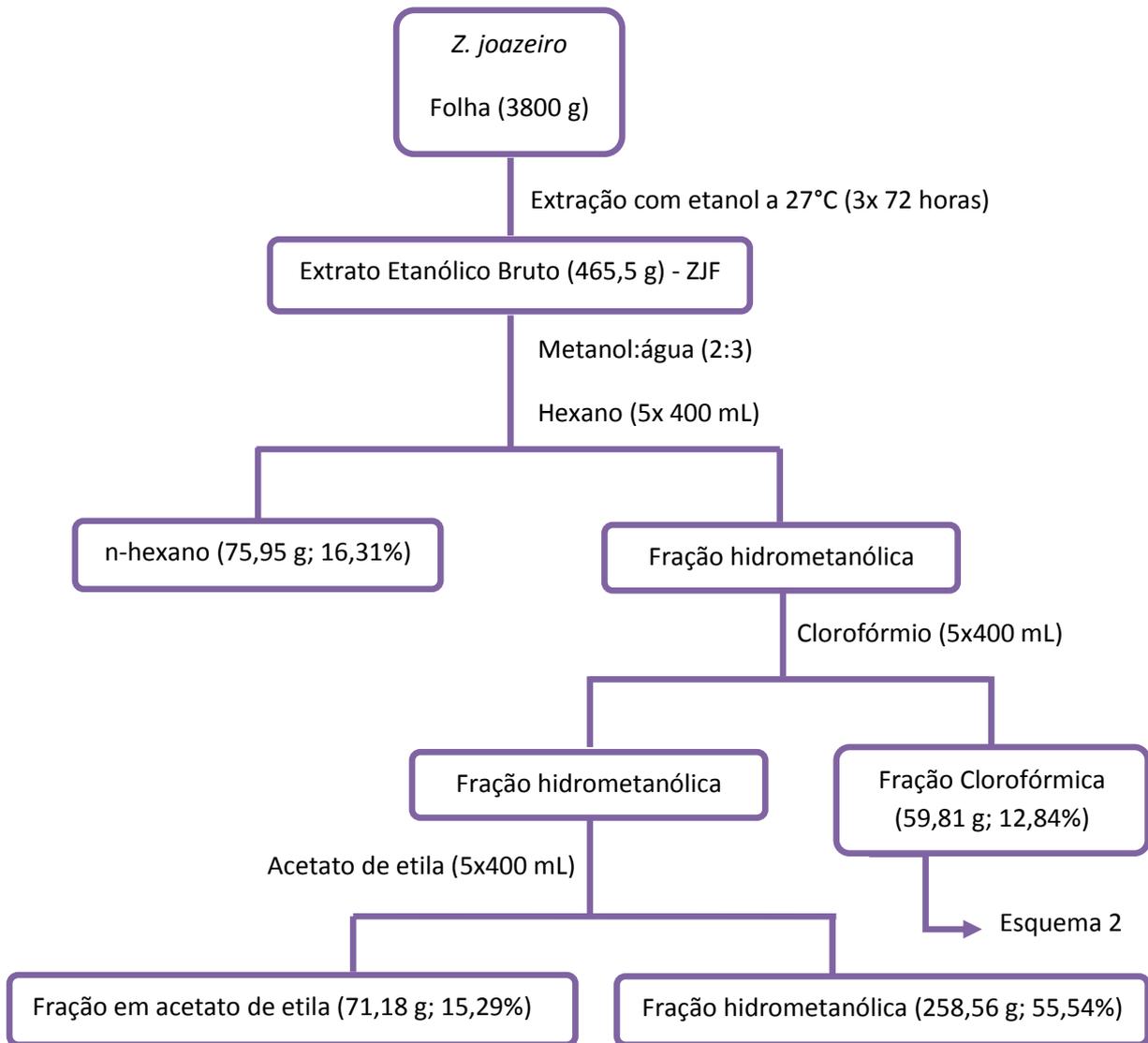
## 3.3. Estudo Fitoquímico

### 3.3.1. Obtenção dos extratos e frações

Na preparação do extrato etanólico bruto, 3,8 kg de folhas de *Ziziphus joazeiro* foram secas ao ar livre, trituradas em máquina forrageira e submetidas à extração exaustiva com etanol 95% em percolador à temperatura ambiente (27°C, +/- 1°C). O solvente foi eliminado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperaturas inferiores a 60°C. Ao final, o extrato resultante foi denominado ZJF.

Depois de pesado (465,5 g; 12,2% de rendimento) o extrato ZJF foi suspenso em mistura metanol:água (2:3), usando uma quantidade mínima de solução para diluição do material, e submetido ao processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Foram obtidas as frações hexânica (75,95 g – 16,31%), clorofórmica (59,81 g – 12,84%), em acetato de etila (71,18 g – 15,29%) e aquosa (258,56 g – 55,54%), como pode ser observado no Esquema 1 (p. 42). As amostras foram concentradas em evaporador rotativo, recuperando-se o solvente.

**Esquema 1.** Obtenção do extrato etanólico bruto de *Z. joazeiro* e sua partição líquido-líquido



### 3.3.2. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

A fração clorofórmica foi selecionada para os trabalhos de purificação por ter apresentado um bom rendimento (59,81 g – 12,84%) e por ter sido apontada pelo IMSEAR como sendo a amostra que demonstrou os melhores resultados em ensaios de atividade imunomoduladora realizados em uma primeira triagem.

O trabalho de separação e isolamento dos compostos químicos teve início com uma filtração rápida em funil de separação (Esquema 2, p. 45), utilizando gel de

Sílica como suporte, que originou 5 subfrações de acordo com a polaridade das fases móveis empregadas, como mostra o quadro abaixo:

**Quadro 1.** Frações e sistemas de eluentes utilizados na Filtração 1.

Frações	Eluentes
1	Hexano/CHCl <sub>3</sub> (50%)
2	CHCl <sub>3</sub> (100%)
3	Acetato de Etila (100%)
4	Acetato de Etila/MeOH (5%)
5	MeOH (100%)

Através de monitoramento das frações por CCD e por ensaios de atividade imunomoduladora, foi conveniente selecionar a fração 3 (23,66 g – 41%) para a realização de uma coluna cromatográfica em gel de sílica que também implicou em 5 subfrações de acordo com os eluentes utilizados, em gradiente crescente de polaridade (Quadro 2 e Esquema 2, p. 45).

**Quadro 2.** Subfrações e sistemas de eluentes utilizados na Coluna 1.

Frações	Eluentes
1	Hex/AcoEt (70%)
2	Hex/AcoEt (50%)
3	AcoEt (100%)
4	Hex/MeOH (10%)
5	MeOH (100%)

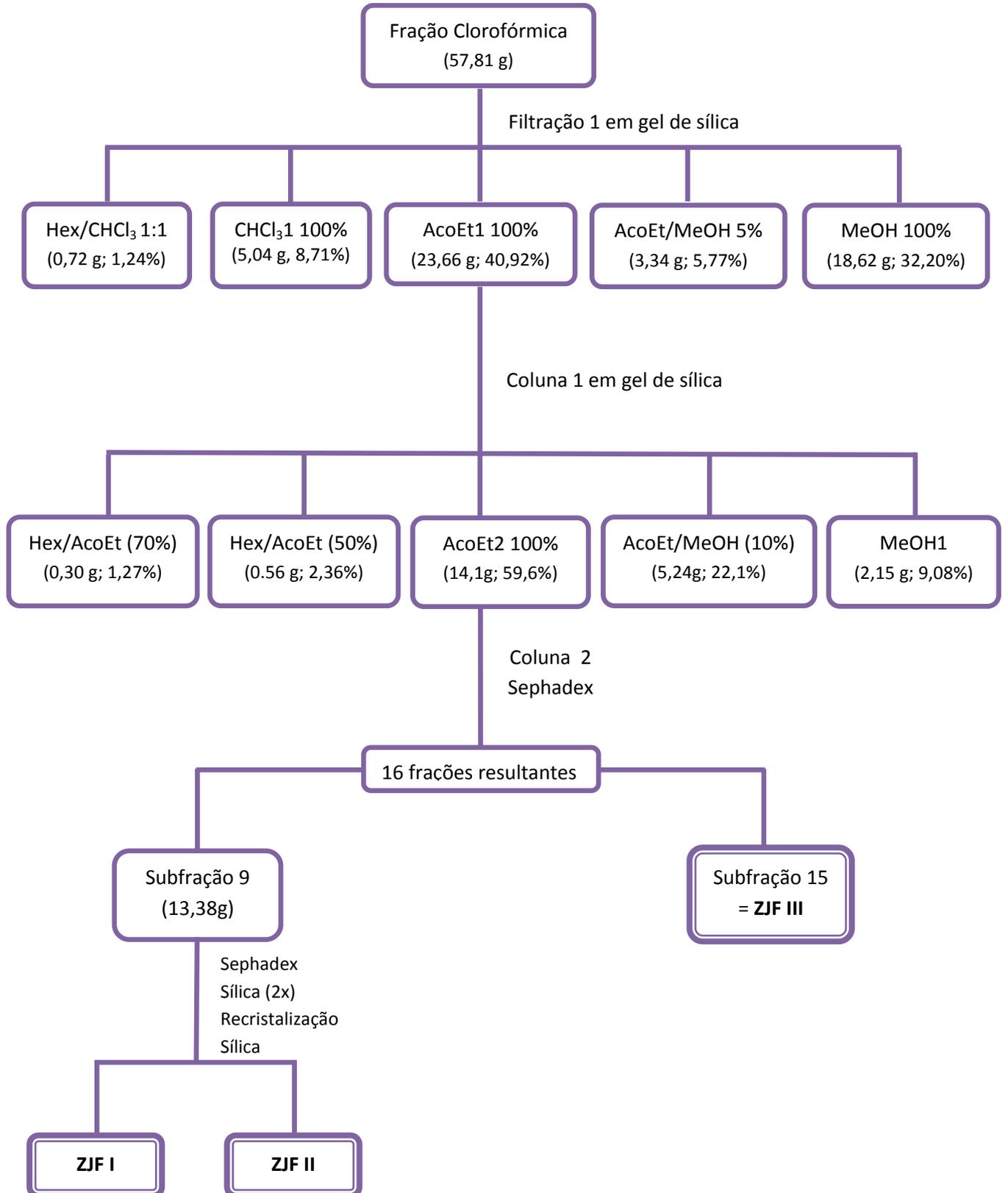
Com 14 g da subfração 3 (melhor rendimento, 59,6%), proveniente da coluna 1, foi realizada uma nova coluna cromatográfica. Desta vez, o suporte empregado foi Sephadex LH-20 utilizando metanol 100% como eluente. Foram coletadas 53 frações em alíquotas de 10 mL cada que após análise comparativa através de CCD, fazendo uso de diferentes sistemas de eluentes e revelação com sulfato cérico, foram reunidas em 16 frações. A subfração de número 9 (correspondente a reunião

das amostras de 9 a 24) revelou-se com bom rendimento (95%) e a purificação foi continuada (Esquema 2, p. 45). Sucessivas colunas em sílica gel, Sephadex e recristalizações com etanol foram realizadas com a mesma subfração, resultando em duas amostras potencialmente puras denominadas ZJFI e ZJFII que foram encaminhadas para a análise das espectroscopias na região do infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Ambas as substâncias foram obtidas como sólido amorfo e de cor branca.

Os espectros de RMN demonstraram para ZJFI ser uma fração de difícil análise e ainda impura. Para remoção de impurezas insaturadas, a amostra foi alvo de uma coluna em gel de sílica ativada com KOH.

Como mostra o Esquema 2 (p. 45), ainda na coluna de Sephadex 2 a subfração de número 15 (reunião das amostras 50 a 52) apresentou uma única mancha na cromatografia de placas, quando eluída no sistema de solventes AcoEt:MeOH (20%), e recebeu o nome de ZJFIII. A mesma foi obtida como sólido amorfo, de cor amarela, e encaminhada para a análise das espectroscopias na região do infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

**Esquema 2.** Fracionamento da parte clorofórmica de *Z. joazeiro*



### 3.3.3. Prospecção fitoquímica dos extratos

O extrato bruto etanólico e a fração clorofórmica resultante da partição líquido-líquido da folha de *Ziziphus joazeiro* foram submetidos a uma triagem fitoquímica, seguindo a descrição de MATOS (1997). A metodologia propõe a detecção dos diferentes constituintes químicos presentes nos extratos e frações através de reações de coloração e/ou formação de precipitado. Os testes são rápidos e dão resultados qualitativos apesar de não conclusivos, pois a presença de um determinado constituinte pode mascarar a cor indicativa de outro.

Para a realização dos testes, sete porções de 3-4 mL do material vegetal solubilizado em etanol foram separados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

#### 3.3.3.1. Teste para fenóis e taninos

No tubo de ensaio número 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  1 mol/L. Agitou-se bem e observou-se variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste branco, utilizando água e cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ).

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde à presença de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos).

A solução de  $\text{FeCl}_3$  foi preparada adicionando-se 9 g do reagente em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 mol/L. Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3 mol/L foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico.

#### 3.3.3.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Houve utilização dos tubos de ensaio 2, 3 e 4. O tubo número 2 foi acidulado a pH 3 com a adição de HCl 3 mol/L e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados

respectivamente a pH 8,5 e 11 com NaOH 1 mol/L. A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir:

Constituintes	Cor do meio		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

#### 3.3.3.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Acidulou-se o tubo 5 pela adição de HCl 3 mol/L até pH 1-3 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1 mol/L até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Foi observada modificação na coloração, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como se segue:

Constituintes	Cor do meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

#### 3.3.3.4. Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

No tubo de número 7 foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim

da efervescência. A comparação foi feita observando-se a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos.

#### 3.3.3.5. Teste para esteroides e triterpenoides

Adicionou-se 10 mL da solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou secar em banho-maria. O resíduo seco de cada Becker foi extraído três vezes com porções de 1-2 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Separaram-se os extratos em tubos diferentes e algumas gotas de  $\text{CHCl}_3$  foram acrescentadas. A solução clorofórmica, filtrada em um pequeno funil fechado com um pouco de algodão coberto com miligramas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, foi transferida para um tubo de ensaio bem seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitado suavemente. Adicionou-se cuidadosamente três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Agitou-se suavemente e o rápido desenvolvimento de cores foi então observado.

A coloração azul seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres. Coloração de parda a vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

#### 3.3.3.6. Teste para saponinas

Tomaram-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução por dois a três minutos e observou-se a formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

#### 3.3.3.7. Teste para alcaloides

Os extratos em análise foram colocados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcaloides.

### 3.4. Estudo Biológico

#### 3.4.1. Extrato e frações utilizadas nos ensaios

As amostras submetidas a cada ensaio biológico estão dispostas na Tabela a seguir, suas obtenções podem ser revistas nos Esquemas 1 e 2 (p. 42 e 45).

**Tabela 3.** Amostras bioensaiadas

Amostras \ Ensaios	<i>S. aureus</i> MDR	Moluscicida	Citotoxicidade	Leishmanicida	Tripanocida	Inibição de NO	Inibição de Linfoproliferação
ZJF	X	X					
F. clorofórmica			X	X	X	X	X
Hex/CHCl <sub>3</sub> 1:1			X	X	X	X	X
CHCl <sub>3</sub> 1			X	X	X	X	X
AcoEt1			X	X	X	X	X
AcoEt/MeOH 5%			X	X	X	X	X
MeOH			X	X	X	X	X
ZJFIII			X	X	X	X	X

#### 3.4.2. Avaliação da atividade de reversão da resistência de *Staphylococcus aureus* à múltiplas drogas

As cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas foram a SA1199 (*wild type*), a SA25923 da ATCC® (ambas susceptíveis a terapia padrão de antibióticos) e a cepa MDR NorA, utilizada nos testes de reversão da resistência. Todas as cepas foram obtidas em estado de dormência e ativadas por cultura overnight, com crescimento em estufa a 37 °C.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços automaticamente por meio de sistema robótico Biomek 2000 (Beckman Coulter). Nos poços contendo o meio de cultura Mueller-Hinton (MH, Bio-Rad) e a bactéria ( $10^6$  UFC/mL), num volume final de 200  $\mu$ L, foi adicionado 2  $\mu$ L da solução do extrato com DMSO, cuja concentração final foi de 100  $\mu$ g/mL. O controle negativo foi elaborado utilizando DMSO (2  $\mu$ L), enquanto o controle positivo foi feito com o uso de ampicilina (16 mg/L). O mesmo procedimento foi efetuado nos ensaios para avaliar a reversão de resistência, onde a ciprofloxacina (4  $\mu$ g/mL) foi adicionada juntamente com o extrato em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C e o crescimento bacteriano foi monitorado através da densidade óptica (DO) em leitor de placas com comprimento de onda de 650 nm após 1, 2, 8 e 24 h.

O extrato foi considerado muito ativo (++) se não houve crescimento após 24 h, ativo (+) se o crescimento foi inferior a 10% do controle negativo, e, inativo (-) se o crescimento bacteriano foi superior a 10%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Esses testes foram realizados no *Laboratoire de Synthèse Selective Organique et Produits Naturels Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, França*, sob a supervisão do Prof<sup>o</sup> Jean Pierre Genet.

### 3.4.3. Avaliação da atividade moluscicida

Os moluscos utilizados da espécie *Biomphalaria glabrata*, com diâmetro entre 13-18 mm, provenientes do Instituto René Rachou, de Belo Horizonte (MG), foram mantidos em aquários sob circulação contínua de água desclorada e temperatura de 28°C, no laboratório de bioensaios da UFAL. A metodologia utilizada está de acordo com a descrita na literatura (DOS SANTOS & SANT'ANA, 1999).

O ensaio consistiu na imersão do caramujo em uma solução aquosa a 0,1 % de DMSO do extrato etanólico bruto das folhas de *Z. joazeiro*, por 24 horas, nas concentrações apropriadas. Decorrido esse período, os moluscos foram lavados, introduzidos em água desclorada e alimentados, permanecendo sob observação por mais 24 horas, com registro e retirada dos caramujos mortos.

Foram utilizados cinco caramujos em 125 mL de solução, em concentrações que variaram de 100  $\mu$ g/mL a 10  $\mu$ g/mL, sendo cada concentração testada em duplicata.

Os extratos que apresentaram atividade moluscicida em concentrações abaixo de 100 µg/mL foram considerados ativos e submetidos a testes posteriores onde foram utilizados 10 caramujos, mantendo sempre a relação de 25 mL de solução por caramujo, sendo cada concentração testada em triplicata. Paralelamente, foram realizados testes de controle com solução aquosa de DMSO a 0,1% e com o moluscicida Niclosamida® a 3 mg/mL. Para cálculo de CL<sub>50</sub> foi utilizado o programa Probit versão 1.5.

A morte dos caramujos foi considerada pela ausência de contrações musculares, descoloração, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo. As desovas foram examinadas e contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico sendo consideradas mortas quando suas células tornavam-se opacas ou desagregavam-se.

#### 3.4.4. Avaliação da citotoxicidade

Os camundongos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz – Bahia. Preferencialmente foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, com idade aproximada de oito semanas, sendo as linhagens C57Bl/6, CBA e Swiss Webster também utilizadas.

Para a determinação das concentrações atóxicas para células de mamíferos, extratos e frações foram avaliados em diferentes concentrações – 0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL e eventualmente a 0,05 e 0,005 mg/mL. Células de baço ( $6 \times 10^5$ /poço) de camundongos isogênicos foram incubadas na presença dos extratos e de timidina tritiada durante 24 horas. Cada concentração foi avaliada em triplicata em placa de 96 poços, utilizando estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura de células de baço foi feita em meio de cultura Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo, suplementado com soro bovino fetal a 10% e gentamicina a 50 µg/mL. Os extratos foram diluídos no meio de cultura no dia da realização do experimento e a timidina tritiada foi adicionada de forma a obter uma concentração final de 1 µCi por poço.

Para este ensaio, dois controles foram feitos: um controle sem tratamento, no qual incubou-se somente células e timidina tritiada, e um controle de células tratadas com saponina (concentração final de 0,05%), substância com reconhecida atividade

citotóxica. Após o período de incubação, as células foram coletadas em um filtro de fibra de vidro utilizando-se um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado pela comparação dos valores de radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. As concentrações dos extratos e frações utilizadas para os ensaios posteriores foram as mais elevadas possíveis, limitando até 30% de toxicidade.

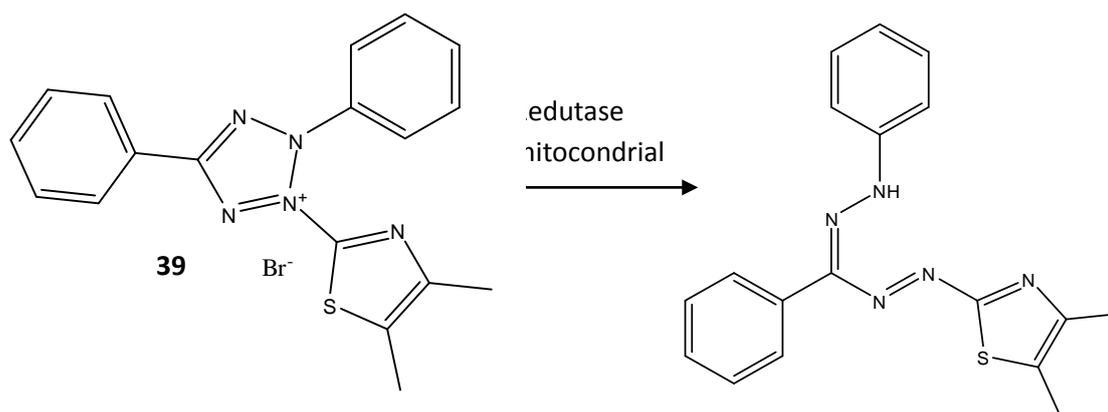
O teste de citotoxicidade e os descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz, no Estado da Bahia, sob a supervisão da Prof. Dr<sup>a</sup> Milena Botelho. Os dados obtidos nestes bioensaios foram analisados com o auxílio do programa GraphPad InStat (ANOVA).

#### 3.4.5. Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*

Para os testes foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura axênica em meio LIT completo, enriquecido com soro bovino fetal a 10% e gentamicina a uma concentração final de 50 µg/mL. Os parasitas foram incubados na presença dos extratos ou frações vegetais em placas de 96 poços. Foram plaqueados  $5 \times 10^6$  parasitas/poço em volume final de 200 µL, sendo cada substância avaliada em triplicata.

Dois controles foram utilizados: um sem tratamento, consistindo apenas da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e um controle de leishmanias tratadas com anfotericina B (**17**) a 25 µg/mL, droga com atividade leishmanicida e tripanocida. Os parasitos foram incubados junto à droga por um período de 24 horas a 26°C. Ao final do processo foi adicionado MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-2,5-brometodifeniltetrazolio (**39**) – e o material foi novamente incubado a 26°C por duas horas, após o período realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda 570 nm.

A viabilidade dos parasitos foi avaliada com base no metabolismo do MTT (Figura 2), sendo a mesma proporcional ao valor de absorvância obtido. Os percentuais de atividade anti-*L. amazonensis* foram definidos comparando os valores das absorvâncias dos poços incubados com os extratos e os valores do controle não tratado.



**Figura 2.** Metabolismo do MTT.

### 3.4.6. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de cultura axênica em meio de cultura LIT completo. Os parasitos foram inoculados em placas de 96 poços em uma média de  $10^7$  parasitos/poço, em volume final de 200  $\mu$ L. Foi realizado um controle apenas com o parasita em meio de cultura LIT completo e outro tratado com anfotericina B (**17**) a 25  $\mu$ g/mL.

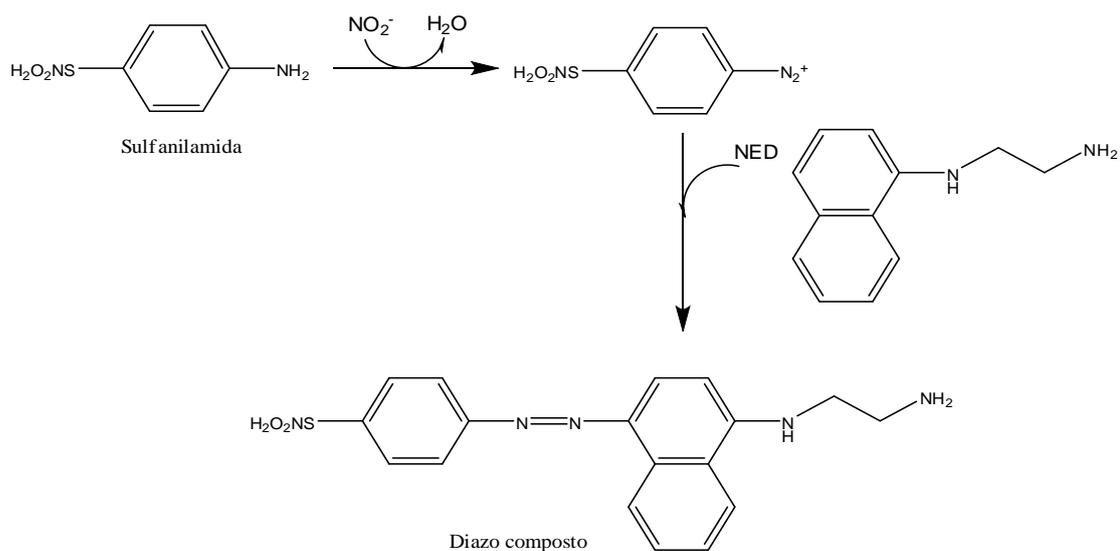
Os parasitos foram incubados por 24 horas a 26 °C junto aos extratos ou frações vegetais. Logo após foi adicionado o MTT (**39**) e novamente incubado a 37 °C durante 3 horas. A leitura foi elaborada a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando os valores das absorvâncias dos poços incubados com os extratos e os valores do controle não tratado.

### 3.4.7. Avaliação da atividade inibitória da produção de NO

Macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos injetados com tioglicolato a 3% em salina (intraperitoneal) foram utilizados no bioensaio. Uma lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, foi realizada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL) em meio DMEM completo, na presença ou não das amostras vegetais. Após 24 horas, 50 µL do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess (DING *et al*, 1988).

A reação de Griess (Figura 3) consiste na adição de 50 µL do sobrenadante/poço com um após um período de 4-5 dias da injeção do tioglicolato.

As células do exsudato peritoneal permaneceram incubadas em placas de cultura de 96 poços (2x10<sup>5</sup> células/poço) durante duas horas em estufa úmida a volume igual do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloreto naftiletileno diamina – NED – 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,3 M). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 570nm. A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada amostra foi determinada comparando os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes da cultura de células não tratadas com drogas.



**Figura 3.** Mecanismo da reação de Griess

### 3.4.8. Avaliação da atividade inibitória de linfoproliferação

Células totais de baço de camundongo foram cultivadas em meio DMEM completo em placas de 96 poços ( $4 \times 10^5$  por poço), na presença ou não dos extratos/frações, e estimuladas com o mitógeno concavalina A (Con A – 1  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), lectina de origem vegetal (*Canavalia ensiformis*), com propriedade de provocar ativação policlonal de linfócitos. Cada amostra foi testada em triplicata.

As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 48 horas, adicionou-se timidina tritiada (1  $\mu\text{Ci/poço}$ ) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições por 12-48 horas. Em seguida as células foram coletadas para quantificação da radioatividade beta, através da comparação da incorporação da timidina em culturas de células estimuladas com Con A somente ou em presença do material vegetal.

## **4. Resultados e discussão**

---

#### 4.1 Análise de prospecção fitoquímica

Análises fitoquímicas, associadas a outros estudos, podem oferecer novas alternativas efetivas e economicamente viáveis para o tratamento das mais diversas enfermidades, além de favorecer o uso sustentável do vegetal e contribuir para sua preservação.

As prospecções fitoquímicas do extrato bruto etanólico de *Ziziphus joazeiro* e de sua fração clorofórmica foram realizadas seguindo a metodologia proposta por Matos (1997), classes químicas como saponinas, fenóis, esteroides e triterpenos foram observadas, como descritas na Tabela 4. Sousa *et al.* (2007), utilizando a mesma metodologia, também registraram a presença das saponinas no extrato etanólico da casca e das folhas do juá, por outro lado, não foram detectadas as classes dos taninos, flavonoides, catequinas e xantonas, dentre outros metabólitos secundários, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Silva (2008), utilizando cromatografia de placas e reveladores específicos, analisou os extratos metanólicos do caule e das folhas de *Z. joazeiro*, onde identificou saponinas, mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e açúcares; flavonoides estiveram presentes somente nas folhas, enquanto derivados cinâmicos e moléculas de cumarinas foram observados apenas no caule de exemplares adultos.

A metodologia proposta por Matos (1997) apesar de simples e rápida é considerada não conclusiva, pois a presença de uma determinada classe química pode mascarar a cor indicativa de outra, ao contrário do método utilizado por Silva (2008), mais específico, que permitiu inclusive a detecção de flavonoides nas folhas de *Z. joazeiro*.

**Tabela 4.** Prospecção fitoquímica das folhas de *Ziziphus joazeiro*

<i>Material vegetal</i>	Fenóis	Antocianinas, antocianidinas e flavonoides	Leucoantocianidina, catequinas e flavononas	Flavonóis, flavonas e xantonas	Esteroides e triterpenoides	Saponinas	Alcaloides
ZJF - Extrato bruto	+	-	-	-	+	+	-
CHCl <sub>3</sub> - Fração clorofórmica	+	-	-	-	+	+	-

+ = presença, - = ausência

## 4.2 Identificação estrutural dos compostos isolados

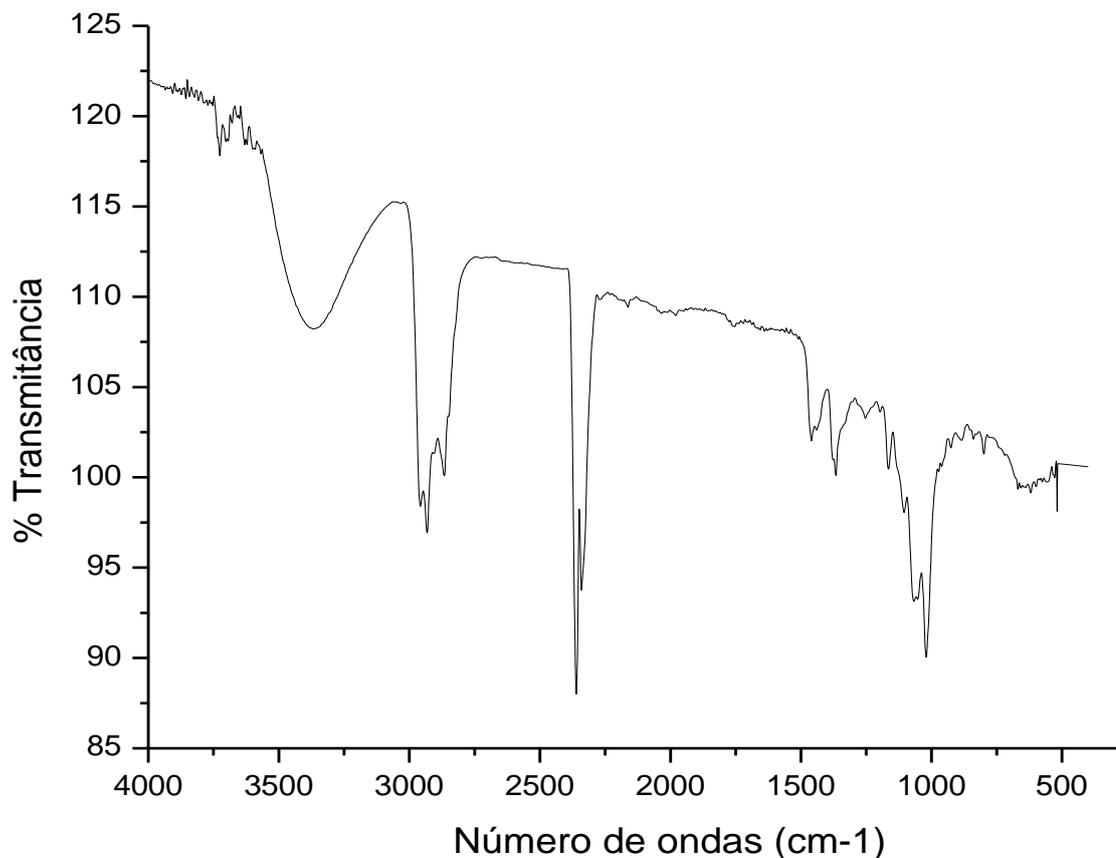
### 4.2.1 ZJFI

A substância ZJFI foi obtida como sólido amorfo de cor branca, sendo analisada através das espectroscopias na região do infravermelho e de RMN, através dos espectros unidimensionais de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , e DEPT135, e dos bidimensionais HSQC, HMBC e COSY, cujos resultados demonstraram ser um composto de estrutura bastante complexa e pertencente à classe dos triterpenos. Sem elucidação estrutural até o momento, os dados obtidos a partir de ZJFI não serão discutidos neste trabalho.

### 4.2.2 ZJFII

O composto ZJFII, obtido sob o aspecto de sólido amorfo e de cor branca, foi submetido à análise das espectroscopias na região do comprimento de onda do infravermelho, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , onde foi verificada a ocorrência de uma mistura binária. As substâncias presentes na mistura foram codificadas como ZJFIIa (componente majoritário) e ZJFIIb (componente minoritário). Para a elucidação estrutural foi necessária a obtenção dos espectros de RMN DEPT135 e HSQC.

O espectro na região do comprimento de onda do infravermelho (Figura 4, p. 59) sugeriu para estas substâncias a presença de grupo hidroxila (frequência de  $3400\text{ cm}^{-1}$ ), ligação dupla ( $1500\text{ cm}^{-1}$ ), além de bandas de absorção condizentes com uma cadeia alifática saturada ( $2900, 2800, 1400$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ ).



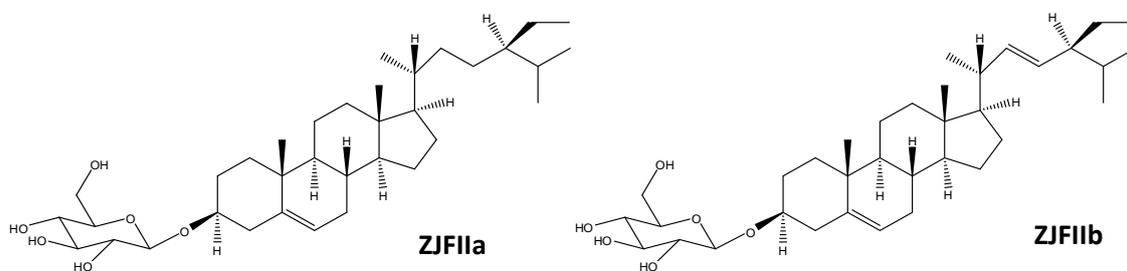
**Figura 4.** Espectro na região do infravermelho das substâncias ZJFIla e ZJFIlb

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 5, p. 63) em mistura de  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz, observou-se sinais cujos valores de deslocamento químico e multiplicidade são característicos da existência de núcleo esteroidal, destacando-se a presença de sinais para hidrogênio carbinólico [ $\delta$  3,37 (m)] e hidrogênios olefínicos [ $\delta$  5,15 (s),  $\delta$  4,93 (dd  $J = 8.6$  e  $15.1$  Hz) e  $\delta$  4,79 (dd  $J = 8.6$  e  $15.1$  Hz)], além de sinais intensos na região entre  $\delta$  0,48 e 0,81 correspondente à 6 metilas. A presença de unidade monossacarídica foi indicada através de um duplete referente à hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,18 ( $J = 7.8$  Hz) e por um conjunto de absorções entre  $\delta$  3,5 e 4,0, característica desse grupo.

Por meio da análise comparativa entre os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Figuras 6 e 7, p. 64 e 65), em mistura de  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{CDCl}_3$ , foi possível reconhecer a natureza dos sinais correspondentes aos átomos de carbono primário ( $6\text{CH}_3$ ), secundário ( $12\text{CH}_2$ ), terciário ( $16\text{CH}$ ) e quaternário (3C). Para cada substância foram

indicados 35 sinais, onde é possível sugerir a presença de 29 átomos de carbono referentes ao esqueleto esteroidal e 6 sinais referentes a unidade glicosídica. Com o auxílio do espectro de correlações HSQC (Figura 8 e Tabela 6, p. 66), foram evidenciadas absorções em regiões condizentes com carbonos carbinólicos, com deslocamentos químicos em  $\delta$  100,98 (anomérico de açúcar); 77,43; 76,37; 70,05 e 75,80, referentes a unidade glicosídica. Uma absorção em  $\delta$  61,59, relativo a carbono metilênico oxigenado, sugere para esta unidade a molécula da  $\beta$  glicose. Dupla ligação foi evidenciada, para os dois componentes, pelos sinais em  $\delta$  140,20 e 121,91, correspondendo, respectivamente, aos carbonos 5 e 6 do esqueleto de esteroides como o sitosterol e/ou estigmasterol. Outra dupla ligação, com sinais de menor intensidade em  $\delta$  138,18 e 129,14, refere-se possivelmente aos carbonos 22 e 23 de ZJFIIb, o componente minoritário (Tabela 6, p. 66).

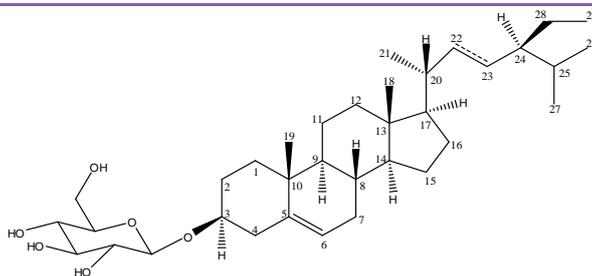
A análise conjunta dos dados espectrais discutidos, bem como a comparação com compostos correspondentes na literatura nos permite sugerir, para ZJFIIa, a estrutura do fitoesteroide 3-O- $\beta$  glicosil sitosterol, e para ZJFIIb, o fitoesteroide conhecido como estigmasterol glicosilado (Tabela 5, p. 62). As duas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez em *Ziziphus joazeiro*.



No gênero, o sitosterol glicosilado já foi encontrado em várias espécies, onde é possível citar os frutos de *Z. jujuba* (SHENG *et al.*, 2009), o caule e a raiz de *Z. clinopodioides* Lam (YANG *et al.*, 2008), a casca de *Z. sativa* (DEVI *et al.*, 1987), as sementes de *Z. jujuba* var. *spinosa* (HE *et al.*, 2006) e as folhas de *Z. glabrata* e *Z. spina-christi* (GANAPATY *et al.*, 2006; WEINGES & SCHICK, 1995). O estigmasterol glicosilado, por sua vez, foi identificado em extratos da raiz de *Z. jujuba* Miller (LEE, 1995) e da casca de *Z. nummularia* (SHARMA, 1983). Em ambos os casos, a substância foi identificada em mistura binária junto com o sitosterol glicosilado, assim como neste trabalho.

Fitoesteroides são importantes produtos agrícolas para as indústrias farmacêuticas e alimentícias. Eles são emulsificantes úteis para a produção de cosméticos e suprem a maior parte de intermediários esteroidais e precursores à produção de hormônios farmacêuticos. Atividades hipocolesterolêmicas de alguns fitoesteróis (por exemplo, esteroides da soja, componentes de óleos vegetais e sitosterol) foram documentadas, oferecendo benefícios cardiológicos (ABIDI, 2001). Estudos *in vivo* em animais demonstraram que o  $\beta$ -sitosterol glicosilado apresenta atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imuno modulatória (BOUIC *et al.*, 1999).

**Tabela 5.** Dados de RMN das substâncias ZJFIIa e ZJFIIb (CD<sub>3</sub>OD e CDCl<sub>3</sub>) e comparação com os dados citados na literatura



	ZJFIIa	Sitosterol glicosilado	ZJFIIb	Estigmasterol glicosilado
	$\delta$ C	$\delta$ C (CD <sub>3</sub> OD) Silva, 2004	$\delta$ C	$\delta$ C (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) El-Askary, 2005
1	37,11	37,5	37,11	37,4
2	29,40	30,3	29,40	28,5
3	78,94	78,6	78,94	78,1
4	39,62	39,3	39,62	39,2
5	140,20	140,9	140,20	140,8
6	121,91	121,9	121,91	121,9
7	31,74	32,2	31,74	32,1
8	30,44	32,2	30,44	32,0
9	50,07	50,3	50,07	50,3
10	36,55	36,9	36,55	36,9
11	20,89	21,3	20,89	21,2
12	38,49	40,0	38,49	39,9
13	42,16	42,5	42,16	42,5
14	56,62	56,8	56,62	56,8
15	24,09	24,5	24,09	24,5
16	28,06	28,6	28,06	29,4
17	55,91	56,3	55,91	56,2
18	11,57	12,0	11,57	12,0
19	19,03	19,4	19,03	19,4
20	35,90	36,4	35,90	36,4
21	18,50	19,0	18,50	19,0
22	33,77	34,2	138,18	137,3
23	25,87	26,4	129,14	128,3
24	45,72	46,0	45,72	46,0
25	28,98	29,5	28,98	26,3
26	18,69	19,2	18,69	20,0
27	19,47	20,0	19,47	19,2
28	22,88	23,4	22,88	29,9
29	11,89	12,2	11,89	12,2
1'	100,98	102,6	100,98	102,4
2'	75,80	75,3	75,80	75,0
3'	77,43	78,5	77,43	78,2
4'	70,05	71,7	70,05	71,5
5'	76,37	78,1	76,37	78,1
6'	61,59	62,8	61,59	62,7

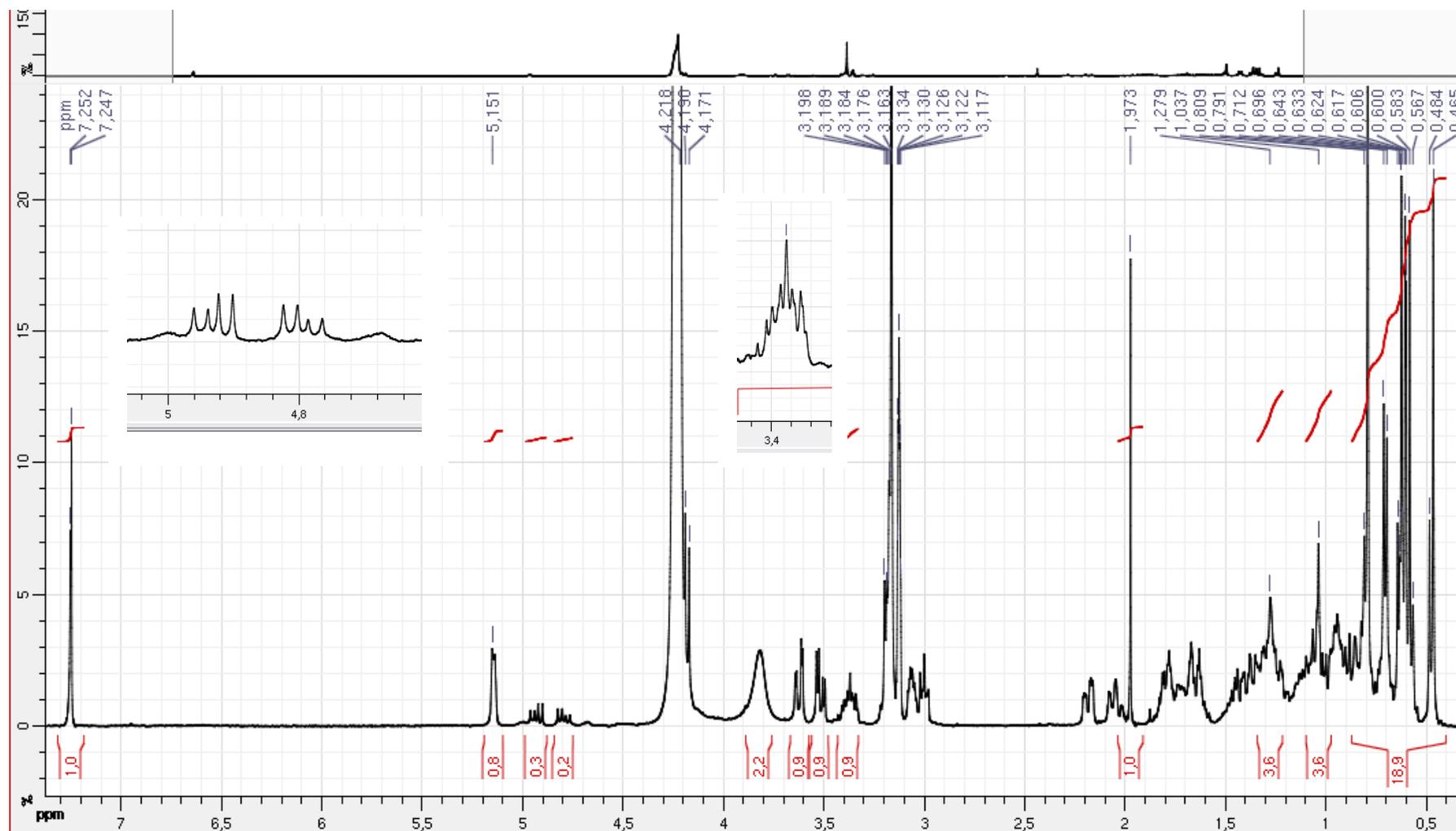


Figura 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias ZJFIIa e ZJFIIb

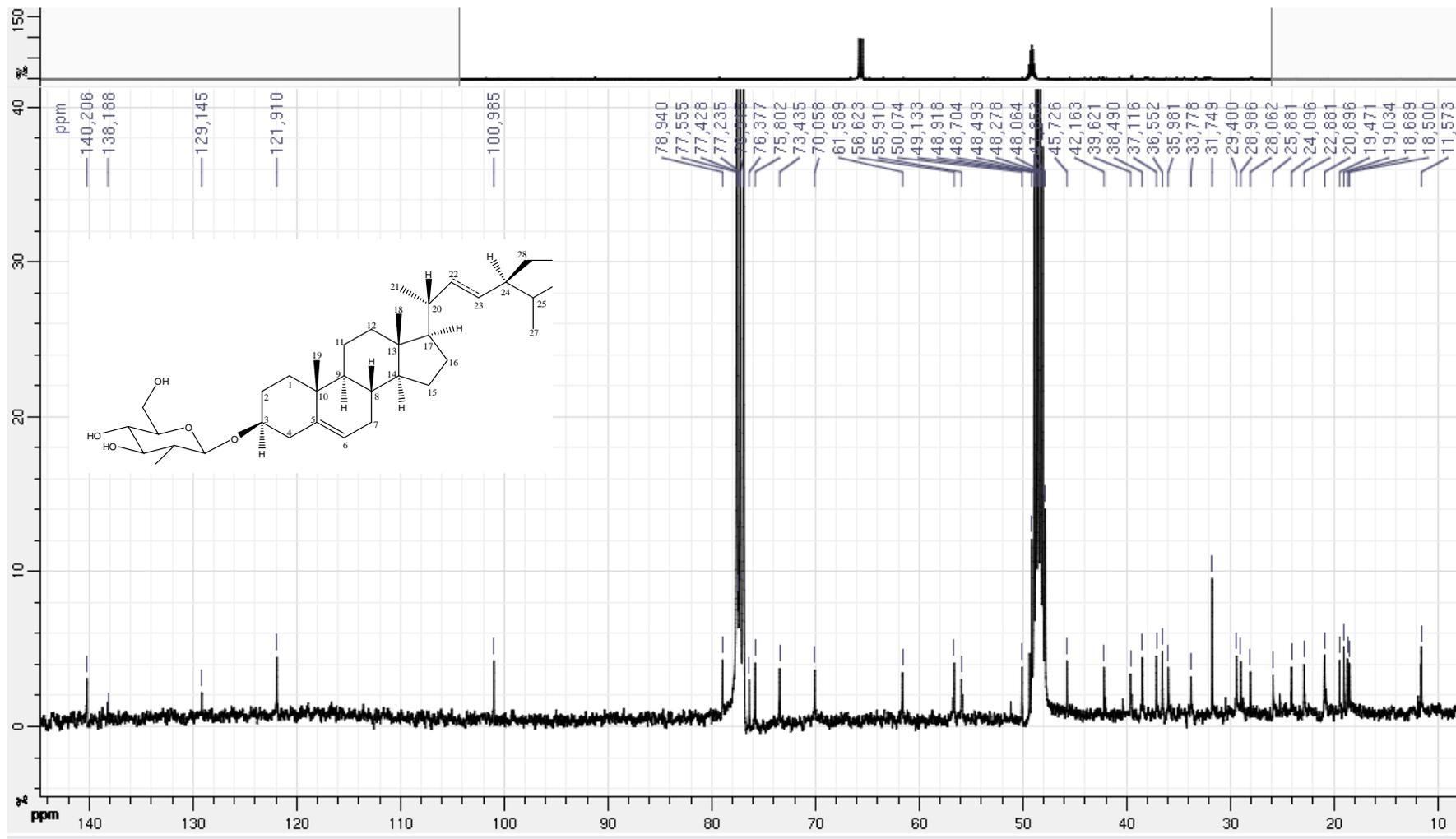
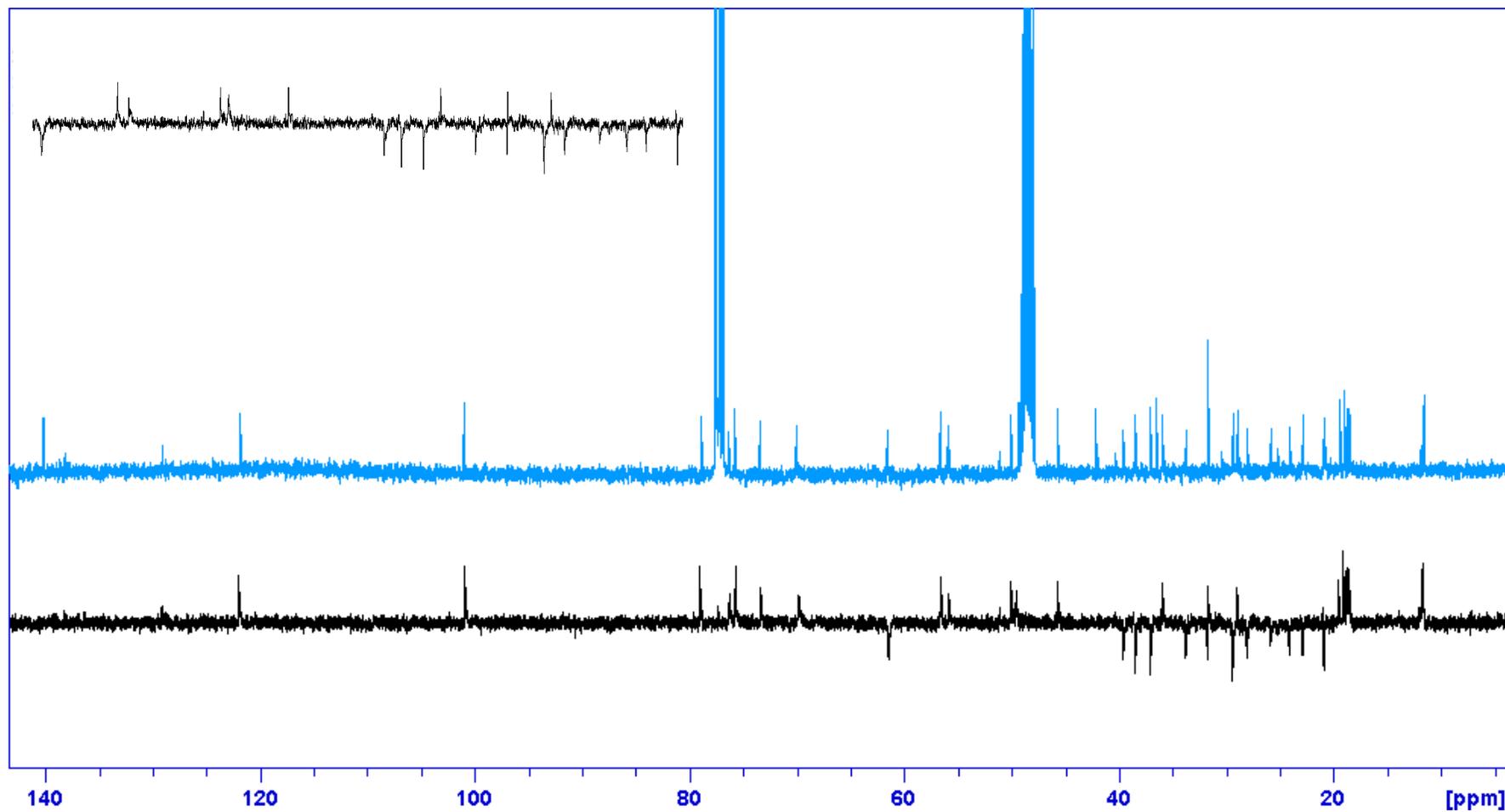
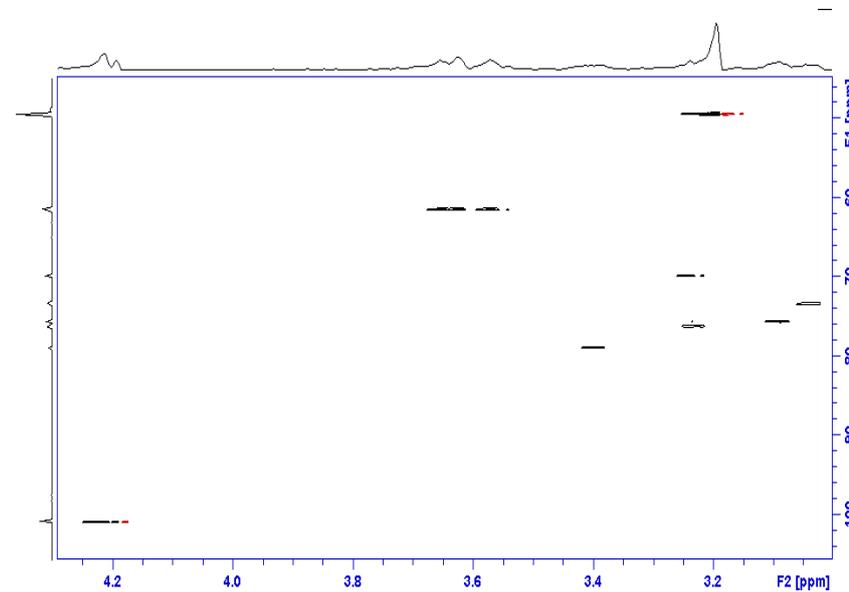
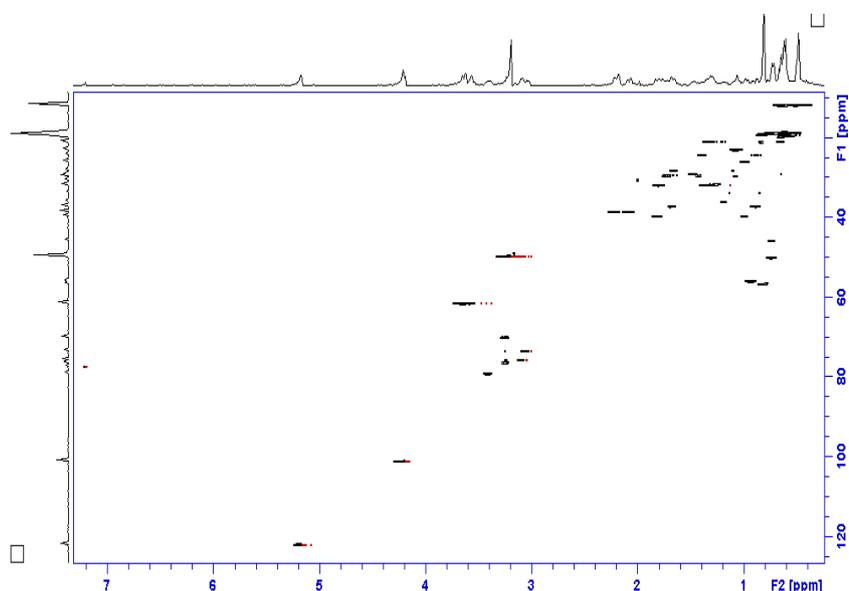


Figura 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OH}$ ) das substâncias ZJFIa e ZJFIb



**Figura 7.** Espectro de RMN DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias ZJFIla e ZJFIlb e comparação com o espectro de  $^{13}\text{C}$  (em azul). No detalhe, ampliação da região de  $\text{CH}_2$ .

**Tabela 6.** Tabela de correlações extraídas do HSQC de ZJFIIa e ZJFIIb

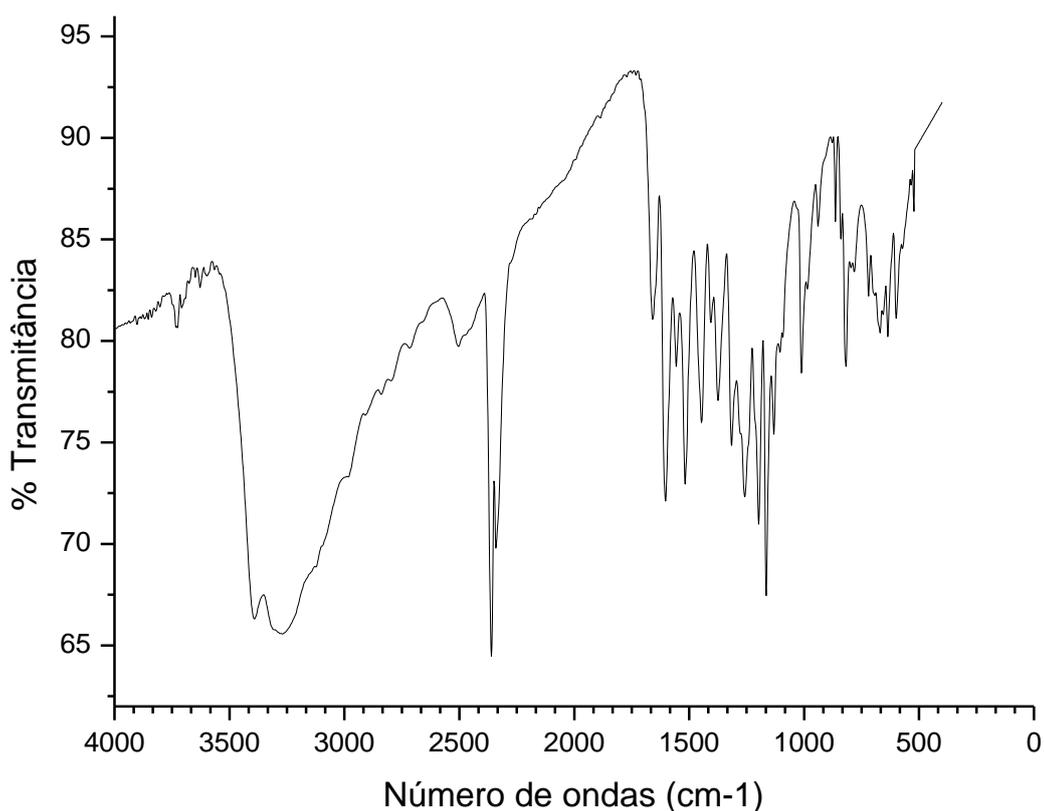
	$C^{13}$	$H^1$
Carbonos	$\delta C^{13}$	$\delta H^1$
C	140,20	
CH	138,18	
CH	129,14	
CH	121,91	5,16
CH	100,98	4,18
CH	78,94	3,38
CH	77,43	
CH	76,38	3,22
CH	75,80	3,09; 3,23
CH	70,05	3,22
CH <sub>2</sub>	61,59	3,62; 3,57
CH	56,62	0,80
CH	55,91	0,90
CH	50,07	0,73
CH	45,73	0,73
C	42,16	
CH <sub>2</sub>	39,62	0,97; 1,82
CH <sub>2</sub>	38,49	2,18; 2,06
CH <sub>2</sub>	37,12	
C	36,55	1,18
CH	35,90	
CH <sub>2</sub>	33,78	0,83; 0,98; 1,14
CH <sub>2</sub>	31,75	1,78; 1,30
CH	30,44	1,98
CH <sub>2</sub>	29,40	1,06; 1,42; 1,71
CH	28,98	1,47
CH <sub>2</sub>	28,06	1,65; 1,09
CH <sub>2</sub>	25,88	0,98
CH <sub>2</sub>	24,09	1,39; 0,89
CH <sub>2</sub>	22,88	1,07
CH <sub>2</sub>	20,89	1,30; 0,83
CH <sub>3</sub>	19,47	0,64
CH <sub>3</sub>	19,03	0,81; 0,63
CH <sub>3</sub>	18,69	0,61
CH <sub>3</sub>	18,50	0,72
CH <sub>3</sub>	11,89	0,60
CH <sub>3</sub>	11,57	0,64; 0,48

**Figura 8.** Espectro de correlações HSQC de ZJFIIa e ZJFIIb ( $CDCl_3$  e  $CD_3OD$ ), espectro completo acima e expansão na figura abaixo.

### 4.2.3 ZJFIII

A substância ZJFIII foi obtida como sólido amorfo de cor amarela. A amostra foi analisada através de espectroscopia na região do comprimento de onda do infravermelho e pelos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

De acordo com Silverstein *et al.* (1994), o espectro na região do infravermelho revelou a presença de uma banda larga de absorção em  $3400\text{ cm}^{-1}$  relativo ao grupo hidroxila. Outra banda de absorção, menos extensa, surgiu entorno de  $1660\text{ cm}^{-1}$ , indicativo de carbonila conjugada. Absorções na região entre  $1400$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , características de insaturação, sugeriram a presença de sistemas aromáticos (Figura 9).

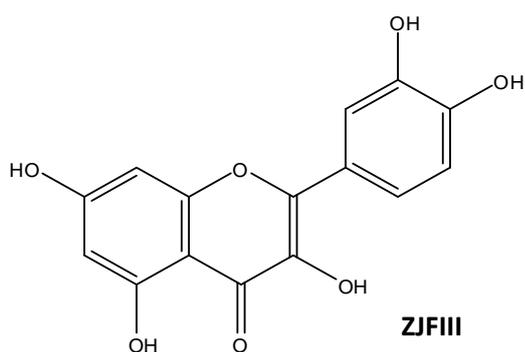


**Figura 9.** Espectro na região do infravermelho da substância ZJFIII

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ZJFIII, obtido a uma frequência de 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , permitiu observar a existência de vários sinais na região de hidrogênios aromáticos:  $\delta$  7,75; 7,63; 6,92; 6,41 e 6,20 (Figuras 10 e 11, p. 71 e 72). Valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento estão compatíveis com esqueleto de um flavonoide com anéis aromáticos tetrassubstituído [ $\delta$  6,41 (d,  $J= 2,1$  Hz) e  $\delta$  6,20 (d,  $J= 2,1$  Hz)] e trissubstituído [ $\delta$  7,75 (d,  $J= 2,2$  Hz),  $\delta$  7,63 (dd,  $J=8,5$  e  $2,2$  Hz),  $\delta$  6,92 (d,  $J= 8,5$  Hz)]. A ausência de um simpleto entre  $\delta$  6,0 – 6,90, típico do H-3 em flavonas, descarta este tipo de esqueleto.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em mistura de  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-d}_6$  a 100 MHz revelou a presença de 15 sinais de carbono (Figura 12, p. 73). A intensidade e o valor dos deslocamentos químicos desses sinais permitiram sugerir que dez deles são carbonos não hidrogenados e cinco são monohidrogenados. Dentre os carbonos não hidrogenados, observaram-se sete com valores de deslocamentos químicos sugerindo a presença de carbonos  $\text{sp}^2$  oxigenados ( $\delta$  165,55; 162,46; 158,17; 148,91; 148,00; 146,36 e 137,34), um carbonílico ( $\delta$  177,33) e dois carbonos  $\text{sp}^2$  não oxigenados ( $\delta$  104,62 e 124,13).

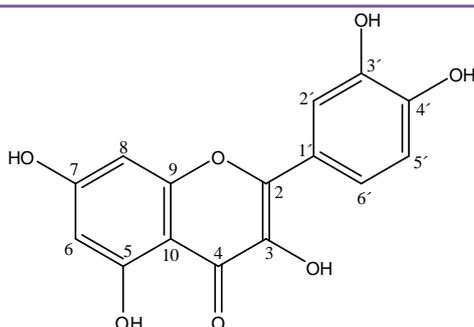
A comparação dos dados espectrais obtidos com o descrito na literatura para o composto correspondente (Tabela 7, p. 69) permite propor para ZJFIII a estrutura do flavonol 3,5,7,3',4'-penta-hidroxi-flavona, conhecido como quercetina.



A quercetina é um destacado integrante do grupo de flavonoides facilmente extraídos de plantas, onde existe em grande quantidade. Os flavonoides são compostos que contêm grupos hidroxila fenólicos que lhes conferem uma ação antioxidante com bom potencial terapêutico, e por essa ação antioxidante, o

desempenho terapêutico da quercetina tem sido mencionado por vários autores no combate ao estresse oxidativo (MILTERSTEINER *et al.*, 2003).

**Tabela 7.** Dados de RMN da substância ZJFIII (400 MHz) e comparação com os dados da literatura



Posição	ZJFIII CD <sub>3</sub> OD e DMSO-d <sub>6</sub>		Quercetina CD <sub>3</sub> OD (Krogh, 2001)	
	$\Delta c$	$\delta H$	$\delta C$	$\delta H$
2	148,00	-	145,26	-
3	137,34	-	135,95	-
4	177,33	-	176,05	-
5	162,46	-	165,95	-
6	99,45	6,20 (d, $J=2,1$ Hz)	98,40	6,27 (d)
7	165,55	-	164,10	-
8	94,67	6,41 (d, $J=2,1$ Hz)	93,40	6,52 (d)
9	158,17	-	156,43	-
10	104,62	-	103,30	-
1'	124,13	-	122,33	-
2'	116,27	7,75 (d, $J=2,2$ Hz)	115,39	7,82 (d)
3'	146,36	-	145,26	-
4'	148,91	-	147,89	-
5'	116,60	6,92 (d, $J=8,5$ Hz)	115,89	7,01 (d)
6'	121,79	7,63 (dd, $J=8,5; 2,2$ Hz)	120,35	7,68 (dd)

Segundo a literatura disponível, este é o primeiro relato de quercetina em *Ziziphus joazeiro*. No gênero, já foi isolado dos frutos de *Ziziphus spina-christi* (SHAHAT *et al.*, 2001), das partes aéreas de *Z. taurica* (KAPETANIDIS *et al.*, 1988), da casca de *Z. rugosa* (TRIPATHY *et al.*, 1988), da casca da raiz de *Z. mauritiana* (SINGH *et al.*, 2007) e das raízes de *Z. jujuba* Mill (LEE *et al.*, 1995), além dos derivados glicosilados estarem presentes nas folhas da mesma (SOULELES *et al.*, 1988). SILVA (2008), através de prospecção fitoquímica, confirma a presença da classe dos flavonoides em extratos metanólicos das folhas de *Ziziphus joazeiro*.

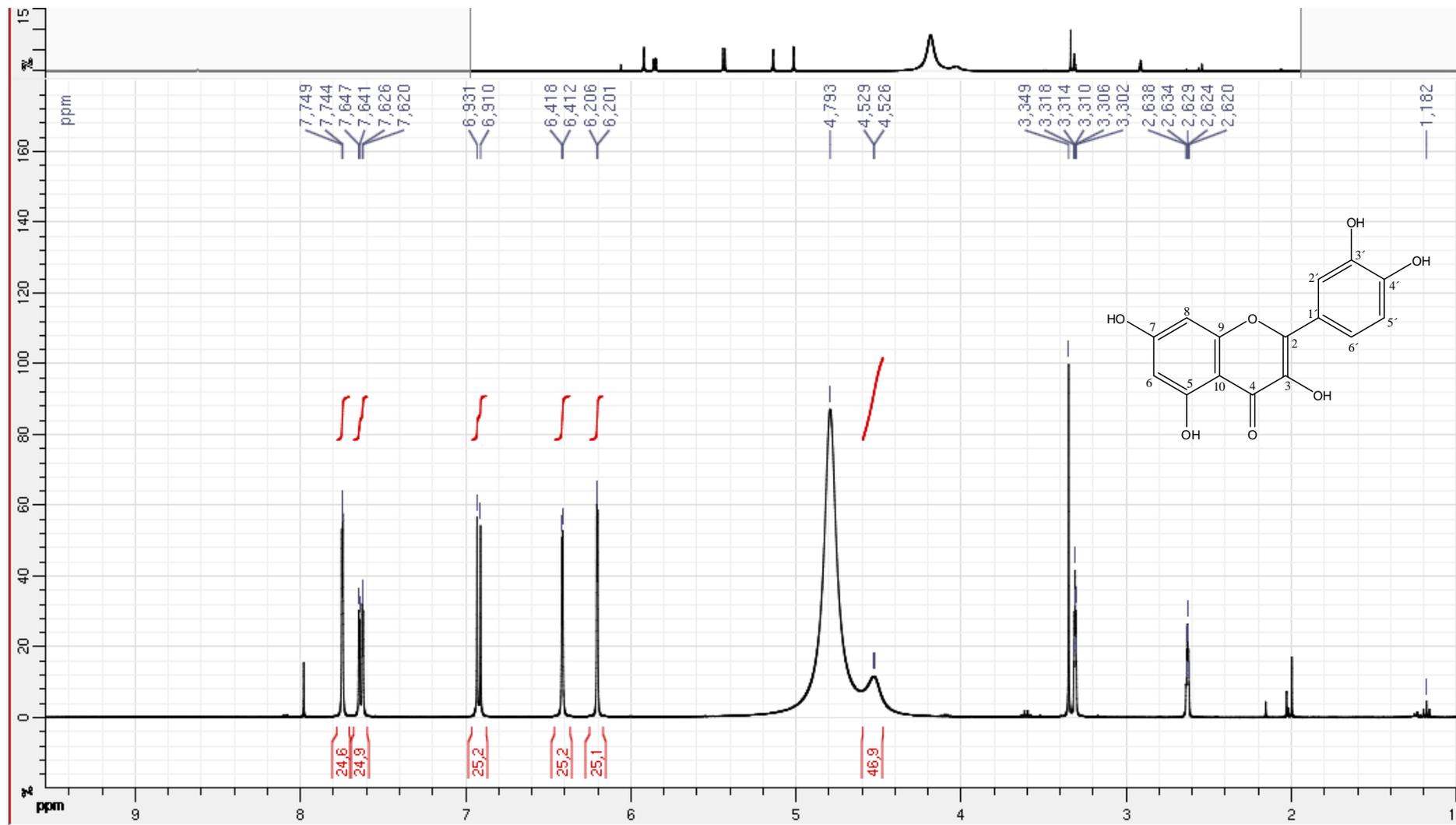


Figura 10. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)

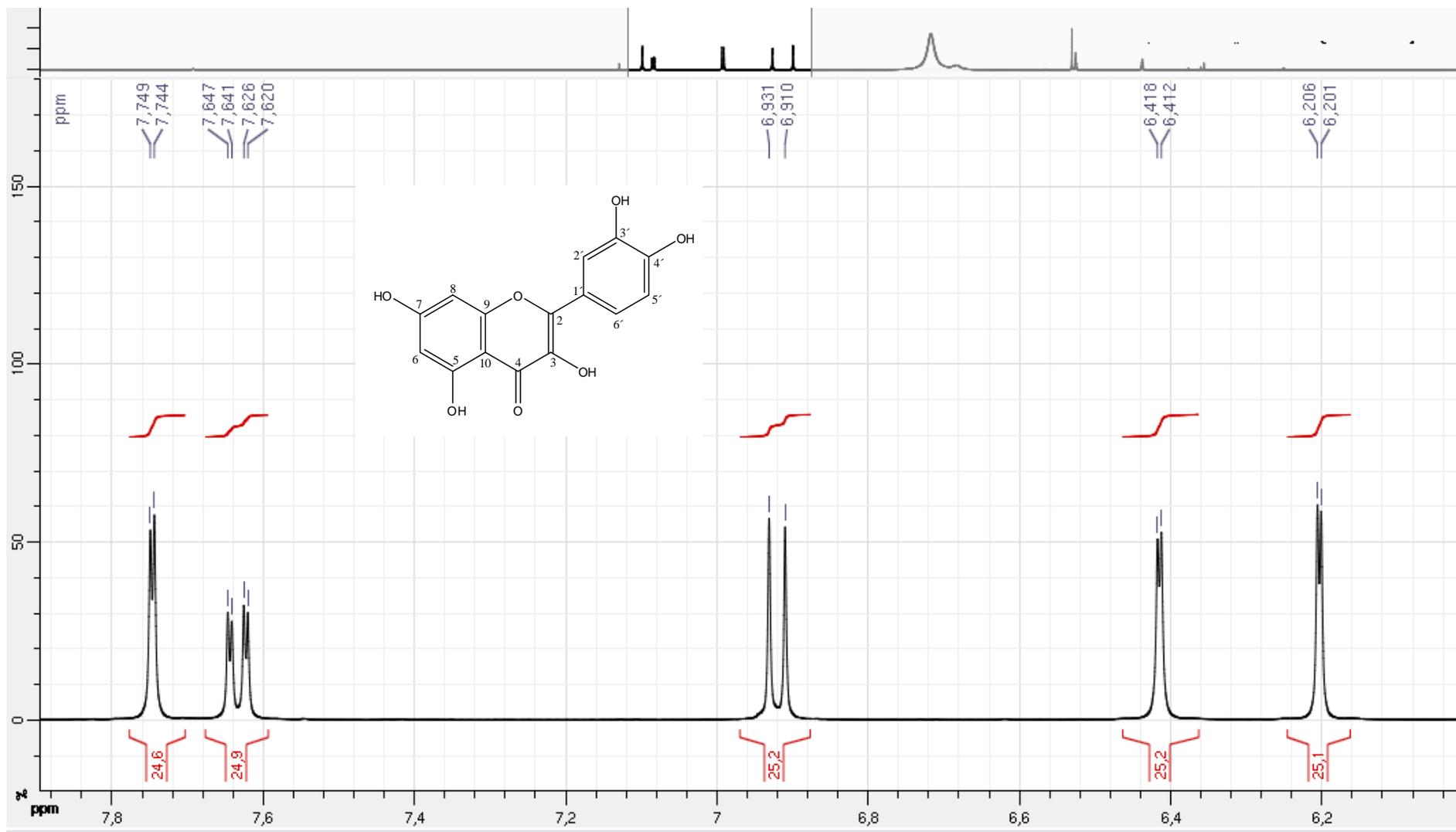


Figura 11. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz)

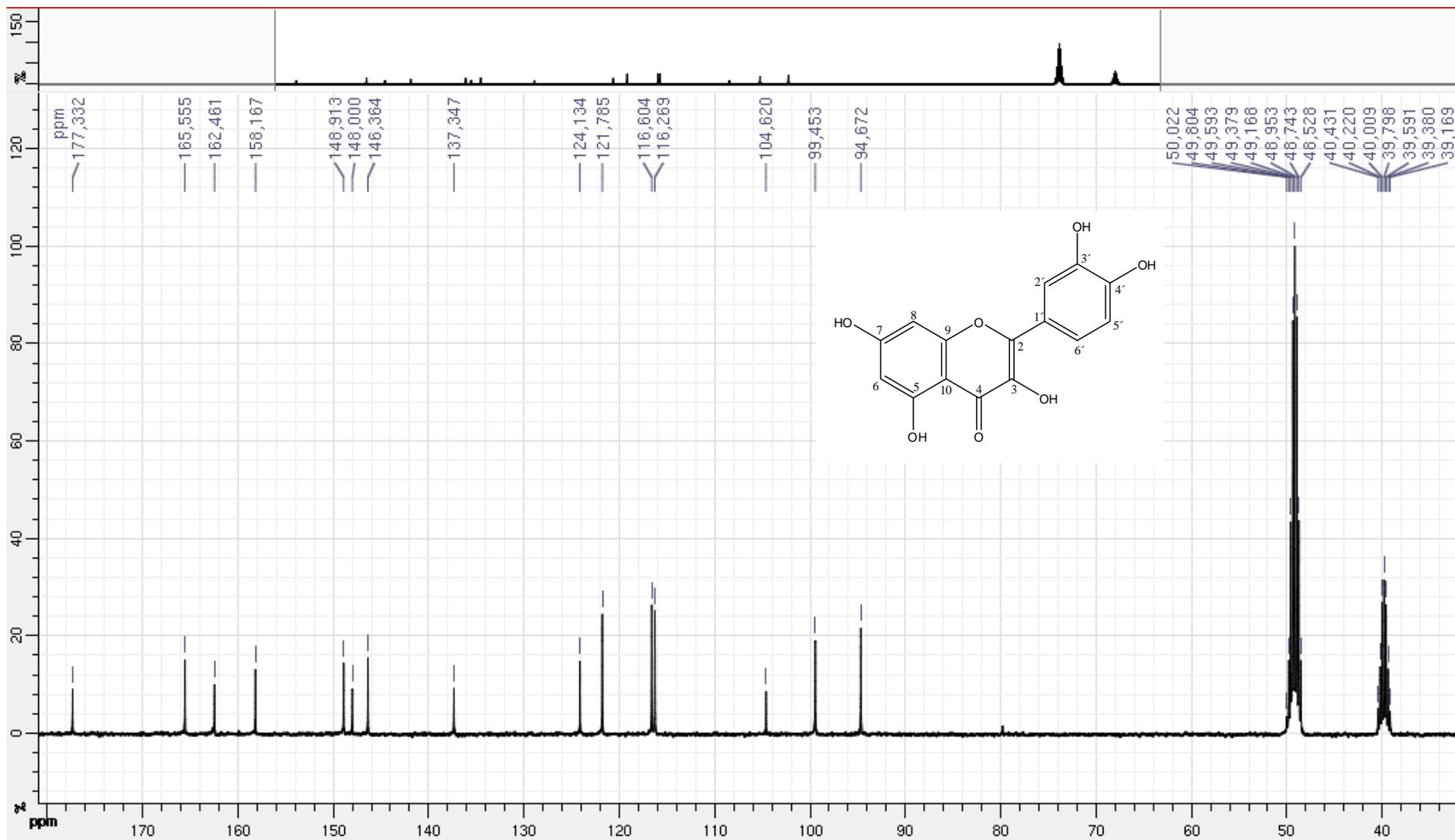


Figura 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de ZJFIII ( $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz)

### 4.3 Avaliação da atividade de *Ziziphus joazeiro* na reversão da resistência de *Staphylococcus aureus* MDR

A administração indiscriminada de antibióticos, junto ao processo evolutivo natural, provocou mudanças que permitiram selecionar organismos patogênicos resistentes à múltiplas drogas (COHEN, 1994). Desde então, pesquisas têm se voltado para os produtos naturais em busca de novos compostos químicos que utilizados em associação com os antibióticos já existentes sejam capazes de reativar ou potencializar a ação destes.

Recentemente, foi descrito pela primeira vez a atividade antibacteriana *in vitro* de *Ziziphus joazeiro*. O extrato etanólico da casca do caule foi ensaiado frente a 17 cepas bacterianas isoladas de pesquisas clínicas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à meticilina. Uma das frações mais ativas é composta pelos triterpenos ácido betulínico (**20**), ácido alfaólico (**26**), betulinato de metila (**36**), ceanotato de metila (**37**) e ácido epigouanico A (**38**). Os compostos ácido alfaólico e ceanotato de metila demonstraram ser os princípios ativos, inibindo todas as cepas testadas com uma concentração mínima de 32 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente, mas sem menção de atividade de reversão das cepas MDRs (LEAL *et al.*, 2010).

Dentro de uma perspectiva maior, neste trabalho, o extrato etanólico bruto das folhas de *Ziziphus joazeiro* foi testado frente a duas cepas susceptíveis de *S. aureus*, ATCC 25923 e 1199. Os resultados demonstraram que tal extrato não apresentou ação antibiótica (Tabela 8. p. 75).

Com o objetivo de evidenciar a atividade de reversão da resistência de *S. aureus* MDR, outro ensaio foi realizado utilizando a estirpe multirresistente NorA. Desta vez, o extrato etanólico foi testado na presença e na ausência do antibiótico comercial ciprofloxacina<sup>®</sup> (4 µg/mL), já não mais eficiente frente a esta linhagem. Os dados mostraram que, na presença do antibiótico, o extrato foi considerado ativo, uma vez que o crescimento microbiano observado após 24 horas de incubação foi pelo menos 10 vezes menor que o referente ao controle negativo (presença exclusiva de DMSO). Na ausência de ciprofloxacina não houve inibição do crescimento bacteriano, o que reforçou a inatividade antimicrobiana do extrato (Tabela 8, p. 75). Sendo assim, é possível sugerir, pela primeira vez, um relativo potencial de *Ziziphus*

*joazeiro* para reversão da bomba de efluxo existente em cepas de *S. aureus* resistentes à múltiplas drogas.

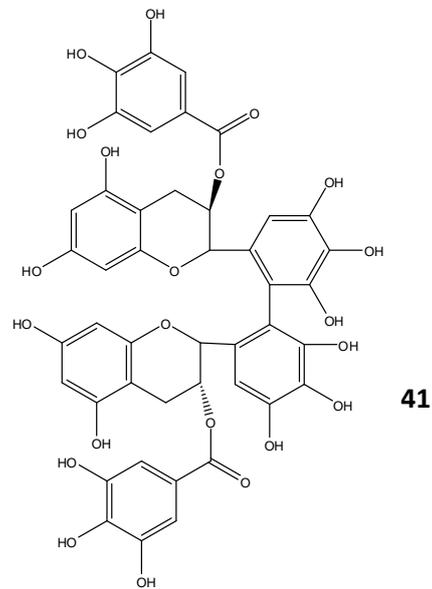
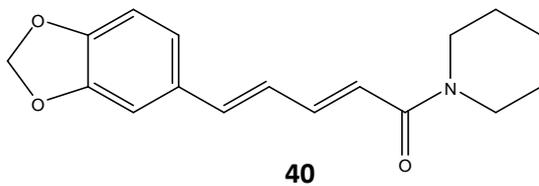
**Tabela 8.** Atividade antibacteriana do extrato das folhas de *Ziziphus joazeiro* frente a cepas susceptíveis e resistentes de *S. aureus* (100 µg/mL) com ou sem antibiótico

Extrato	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> 1199	<i>S. aureus</i> NorA	
			Com ciprofloxacina (4 µg/mL)	Sem ciprofloxacina
<b>Extrato bruto etanólico de <i>Ziziphus joazeiro</i></b>	-	-	+	-

+,  $0,1 \leq DO_{24} \leq 0,5 \times DO_{T24}$ ; -,  $DO_{24} > 0,5 \times DO_{T24}$ .  $DO_{24}$  = densidade ótica da cultura bacteriana durante 24h e  $DO_{T24}$  = densidade ótica do crescimento do controle sem antibiótico durante 24h.

NorA é um dos principais transportadores MDR em *S. aureus*, sendo responsável pela diminuição da suscetibilidade de algumas cepas à fluoroquinolonas (NEYFAKH *et al.*, 1993). Segundo dados de Schmitz *et al.* (1998), as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos ciprofloxacina, moxifloxacina e esparfloxacina reduziram em até 4 vezes quando cada um foi utilizado em associação com a reserpina (7) frente à cepa de *S. aureus* multiresistente. No presente trabalho, não houve determinação dos valores de concentração inibitória mínima, mas é possível sugerir que o mecanismo de ação do extrato etanólico bruto das folhas do juá seja semelhante ao proporcionado pela reserpina, substância isolada pela primeira vez da raiz de *Rauwolfia vomitoria* e conhecidamente inibidora de bombas de efluxo (STAVRI *et al.*, 2007).

Outra substância em destaque para esta atividade é a piperina (40), alcaloide de maior ocorrência dentro da família Piperaceae, que atua aumentando o acúmulo de ciprofloxacina dentro da membrana bacteriana, proporcionando resultados similares à reserpina (KHAN *et al.*, 2006). Os trabalhos de Hatano *et al.* (2005) também revelaram os princípios ativos na supressão de cepas de *S. aureus* resistentes, desta vez à metilicina, onde foram identificados a theasinensina A (41), obtida dos frutos de *Ziziphus jujuba*, e proantocianidinas poliméricas, da casca e dos frutos de *Zanthoxylum piperitum*.



O combate as MDRs requer compreensão detalhada da base, da evolução e da disseminação molecular da resistência; novos produtos químicos com propriedades antibióticas para superar as limitações dos antibióticos tradicionais; e, estratégias inovadoras que possam estender a vida de moléculas antibióticas existentes, controlando o crescimento do patógeno (WRIGHT & SUTHERLAND, 2007).

#### 4.4. Avaliação da atividade moluscicida de *Ziziphus joazeiro*

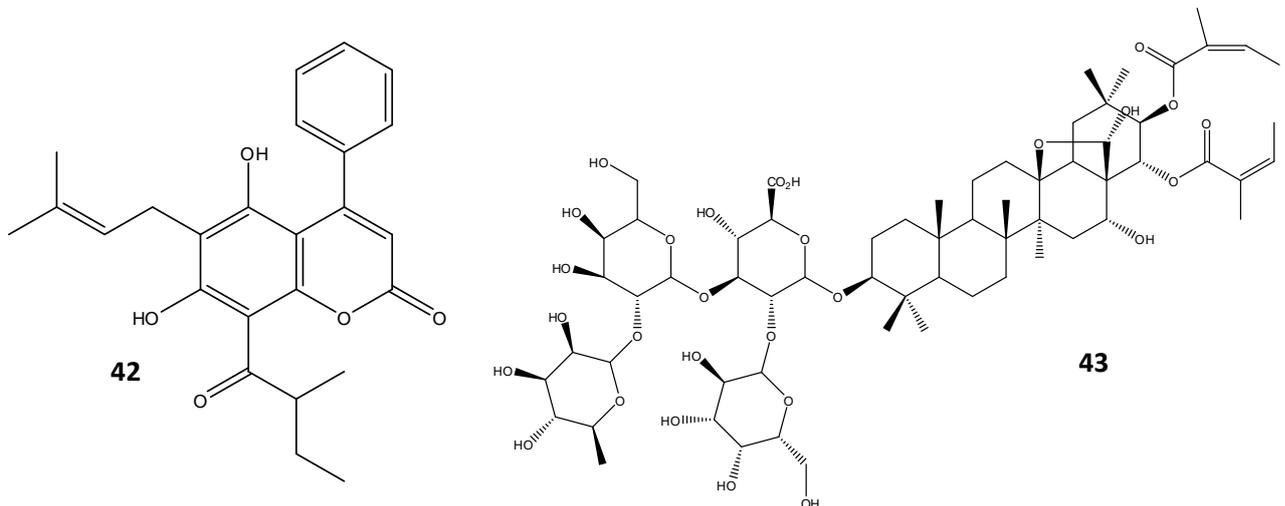
A esquistossomose mansônica continua sendo um grave problema de Saúde Pública no Brasil, com áreas de concentração no Nordeste e no Estado de Minas Gerais, onde os índices elevados da doença correspondem, na grande maioria dos casos, à presença da espécie *Biomphalaria glabrata*, mais importante vetor do *Schistosoma mansoni* nas Américas (COUTO, 2005).

A pesquisa por um controle químico malacológico sintético ou a partir de produtos naturais é frequente, Gasparotto *et al.* (2005), estudando o extrato diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae) observaram a significativa atividade do mesmo frente a *B. glabrata*, revelando a cumarina (-)-mammea A/BB (42) como princípio ativo. Saponinas são também altamente tóxicas para moluscos e, por essa razão, têm sido investigadas para controle de schistosomíases (SPARG *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a atividade do extrato bruto etanólico das folhas de *Ziziphus joazeiro* (ZJF) foi verificada frente a caramujos da espécie *B. glabrata*. A análise dos resultados permitiu sugerir que ZJF não causou a morte de moluscos adultos na concentração de 100 ppm, não sendo, portanto, realizados testes apurados.

Em 2005, Luna *et al.* constataram a ausência de atividade moluscicida do extrato etanólico da madeira de *Z. joazeiro*, o que reafirma os resultados atuais. De fato, estudos já haviam demonstrado a baixa taxa de mortalidade de *B. glabrata* e *B. straminea* provocada pelos extratos etanólico e aquoso da casca do caule, dos frutos e das sementes do juá (BARBOSA & DE MELLO, 1969; PINHEIRO DE SOUSA & ROUQUAYROL, 1974). Entretanto, ensaios moluscicidas utilizando o extrato metanólico da mesma planta evidenciaram resultados positivos frente à *Australorbis glabratus*, sinônimo de *Biomphalaria glabrata* (CASTILLON & ALTSCHUL (1950).

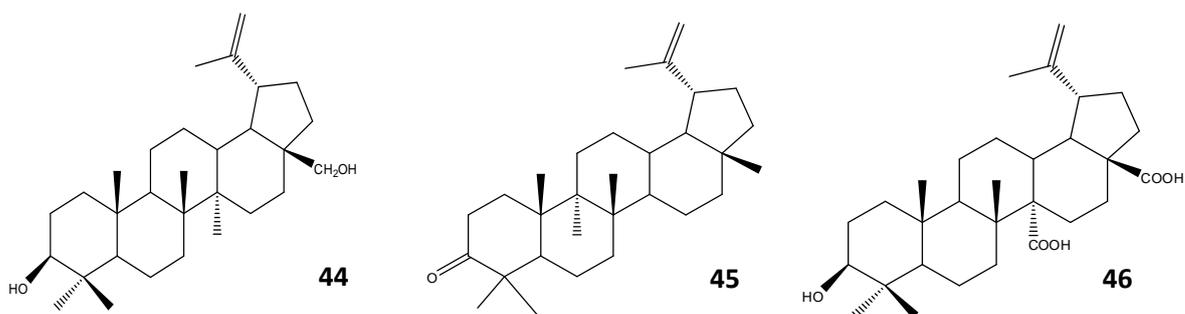
Apers *et al.* (2001) testaram a atividade moluscicida de 10 saponinas isoladas de *Maesa lanceolata* (Maesaceae) frente a *Biomphalaria glabrata*. Os valores da CL<sub>50</sub> para a mistura foram muito satisfatórios (1,25 mg/mL), no entanto, maesasaponina V12 (**43**), de forma isolada, foi responsável pela mesma letalidade em concentração de 0,5 mg/mL. Apesar da presença marcante de saponinas em todas as partes de *Z. joazeiro*, a ocorrência de outras classes químicas em grande quantidade ou a baixa toxicidade das mesmas tornou o extrato da folha inativo para moluscos do gênero *Biomphalaria*.



#### 4.5. Avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida de *Ziziphus joazeiro*

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças negligenciadas que acometem grande parte dos habitantes de baixa renda dos países em desenvolvimento. O *Trypanosoma cruzi*, agente causador do mal chagásico, é um protozoário hemoflagelado que infecta quase 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens, o parasita é membro da mesma ordem das *Leishmania*, causadoras das leishmanioses (BRENER & ANDRADE, 2000). Apesar da grande diferença existente entre as duas enfermidades, é relevante a procura por novas substâncias, efetivas e seguras, para o tratamento em ambos os casos.

Pensando nisso, Rosas *et al.* (2007) estudaram as atividades tripanocidas de diferentes extratos e frações de *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). A espécie vegetal foi selecionada devido à presença acentuada de triterpenos pentacíclicos, classe reconhecidamente eficaz contra *Trypanosoma cruzi*. Os resultados indicaram que *A. amazonicus* é uma fonte em potencial de compostos bioativos para formas tripomastigotas do parasita, frações contendo principalmente betulina (44), lupenona (45) e ácido melaleucico (46) demonstraram a melhor atividade do extrato.



Para *Ziziphus joazeiro*, os dados obtidos através do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz não apresentaram resultados positivos no que confere às atividades leishmanicida e tripanocida (Tabela 9, p. 79). Nenhuma das frações testadas, incluindo o flavonoide quercetina (ZJFIII), apresentou atividade significativa *in vitro* frente aos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. As amostras vegetais foram utilizadas na maior concentração possível, como indicado na tabela, limitando até

30% de citotoxicidade em células de mamíferos. De forma similar, os extratos aquoso e metanólico da casca, raiz e folhas de *Ziziphus spinachristi* e *Ziziphus abyssinica* não foram ativos frente ao parasita *Trypanosoma brucei brucei* (WUROCHEKKE & NOK, 2004). Ali *et al.* (2002) também evidenciaram a inatividade do extrato etanólico das folhas e frutos de *Z. spinachristi* frente a *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiense*.

**Tabela 9.** Percentual de mortalidade de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* frente às amostras ensaiadas. Os parasitas foram incubados na presença ou ausência das amostras vegetais durante 24 horas. A viabilidade foi mensurada com base do metabolismo do MTT. Foram testadas a partição clorofórmica das folhas de *Z. joazeiro*, suas subfrações diretas e a substância isolada quercetina (ZJFIII)

	[mg/mL]	%Tripanocida	%Leishmanicida
CHCl <sub>3</sub>	0,001	-	-
Hex/CHCl <sub>3</sub> 1:1	0,01	-	-
CHCl <sub>3</sub> (1)	0,01	13,47	1,14
AcoEt (1)	0,01	-	-
AcoEt/MeOH (5%)	0,1	-	-
MeOH	0,01	2,80	-
ZJFIII	0,01	-	0,51

Frações consideradas ativas quando a mortalidade for  $\geq 50\%$

No que tratam os estudos de plantas medicinais frente à leishmanias, enquanto as frações oriundas do extrato etanólico das folhas de *Z. joazeiro* não foram eficazes contra o parasita, Tonkal *et al.* (2005) obtiveram resultados anti-leishmania positivos utilizando os extratos etanólico e aquoso das folhas de *Ziziphus spinachristi* e duas linhagens diferentes de leishmania: *L. major* e *L. donovani*, parasitas pertencentes ao mesmo gênero explorado neste trabalho. Outro estudo descreveu uma triagem de 19 espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra formas amastigota axênica e promastigota de *Leishmania amazonensis*, e formas epimastigota de *Trypanosoma cruzi in vitro* na concentração de 100 µg/ml. *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Mikania glomerata*, *Ocimum gratissimum*, *Piper regnellii*, *Prunus domestica*, *Psidium guajava*, *Sambucus canadensis*, *Stryphnodendron adstringens*, *Tanacetum parthenium*, e *Tanacetum*

*vulgare* apresentaram efeito significativo contra um ou ambos parasitas, com a porcentagem de inibição de crescimento entre 49,5 e 99% (LUIZE *et al.*, 2005), provando o potencial das plantas medicinais como fontes alternativas de novos compostos clinicamente ativos contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

#### **4.6 Avaliação da atividade de *Ziziphus joazeiro* na inibição da proliferação de linfócitos e na produção de NO**

As imunopatologias constituem um problema de saúde mundial e a incidência destas doenças tende a crescer junto com o aumento da expectativa de vida da população, fato que exige rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos (ROEP, 2003).

O óxido nítrico é uma das moléculas que possuem uma grande variedade de funções e atuam em muitos processos fisiológicos, incluindo a regulação do sistema imune. Além disso, faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, tendo demonstrada sua ação antibiótica, antiviral e antiparasitária (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Segundo Lima (2004), o emprego clínico dos agentes imunomoduladores propicia efeitos de grande utilidade na prática clínica. A imunoestimulação tem aplicação no auxílio ao sistema imune em casos de imunodeficiências e no combate aos processos infecciosos. A imunossupressão, por sua vez, é indicada em casos de doenças autoimunes, hipersensibilidades e, principalmente, no controle do sistema imune com vistas a evitar o processo de rejeição em indivíduos transplantados.

O emprego de experimentos biológicos *in vitro* permite avaliar as células do sistema imune no desenvolvimento da resposta de defesa (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Várias são as metodologias que permitem a observação desta resposta imune com o objetivo de determinar sua estimulação ou supressão. Algumas técnicas de avaliação são realizadas a partir do isolamento inicial de populações linfocitárias do sangue periférico humano. Quando o estudo é realizado em modelo animal, as metodologias geralmente empregam células esplênicas de camundongos (ROITT *et al.*, 1999).

Os dados obtidos através do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz para a verificação da atividade

imunomoduladora do extrato etanólico bruto das folhas de *Ziziphus joazeiro* estão apresentados na Tabela 10 (p. 83). A fração clorofórmica, particionada do extrato bruto, demonstrou pouca atividade inibitória na linfoproliferação na dose 0,001 mg/mL, concentrações mais altas não foram avaliadas devido a sua maior toxidez.

Como mostrado no Esquema 2 (p. 45), a partir da fração clorofórmica foi realizada uma filtração em gel de Sílica onde se obtiveram as frações hexano/clorofórmio [1:1], clorofórmica (1), acetanólica (1), acetato/metanol (5%) e metanólica, representadas respectivamente na tabela. Pode-se dar especial destaque a fração clorofórmica (1) por sua especificidade e eficiência na inibição dos linfócitos, apresentando um percentual de 94,76 na concentração de 0,01 mg/mL, resultado satisfatório quando comparado com a fração AcoEt/MeOH (5%) que revelou uma inibição de 99,22% em concentração 10 vezes maior (0,1 mg/mL).

No que trata a atividade de inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos ativado por LPS, índices moderados foram observados. Os percentuais variaram de 5,23 (substância isolada quercetina) a 71,40 [fração AcoEt/MeOH (5%)], não havendo expressiva atividade inibitória, mas talvez o suficiente para auxiliar em um processo antiinflamatório (Tabela 10, p. 83). Amostras de *Ziziphus lotus* foram também investigadas quanto ao efeito inibidor de NO, as saponinas presentes na amostra e, notadamente, o extrato metanólico das folhas inibiram significativamente a produção de nitrito, sugerindo semelhanças com a fração AcoEt/MeOH (5%) oriunda do extrato etanólico do juá, rico em saponinas. Ao contrário do ocorrido com as folhas, o extrato da casca da raiz de *Z. lotus* apresentou um efeito somente moderado a 100 mg/mL, mas, de forma surpreendente, em concentrações de 50 mg/mL o efeito da atividade foi revertido e ambos os extratos estimularam a produção de NO (BORGHI *et al.*, 2008).

Apesar da fração clorofórmica ter apresentado pouca ou nenhuma atividade imunomoduladora, suas subfrações diretas apresentaram bons resultados. Esta diferença poderá ser justificada através de uma avaliação fitoquímica posterior das amostras. A princípio, é possível propor que uma maior quantidade de compostos, de diferentes classes químicas, tenha influenciado de forma a diminuir o potencial da fração originária para estas atividades diferente do que ocorreu com as subfrações mais puras. Este resultado é ainda justificável através da comparação das diversas concentrações utilizadas.

Compostos presentes em *Ziziphus joazeiro* têm sido relacionados à atividade imunossupressora. Os flavonoides apresentam atividade inibitória na proliferação de células esplênicas murinas, e, de forma similar, os triterpenoides demonstram efeito imunossupressor na proliferação de linfócitos T (GAO *et al.*, 2008). López-Posadas *et al.* (2008) demonstraram que os flavonoides apigenina, canferol, crisina, daidzeína, diosmetina, genisteína, hesperetina, luteolina e quercetina apresentaram potente efeito antiproliferativo frente às células esplênicas de ratos na presença e na ausência do mitógeno ConA. Os dados da literatura corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde o único flavonoide isolado, a quercetina, exibiu 77,31% de atividade na inibição da divisão celular induzida pela mesma lectina vegetal, além disso, a prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto das folhas do juá e de sua partição clorofórmica evidenciaram a presença da classe química dos triterpenoides, substâncias que também podem estar contribuindo para a expressão de tal atividade nas demais frações analisadas.

Em geral, a medida da imunossupressão baseia-se na detecção do crescimento celular resultante de uma ativação ou de condições da cultura, sendo que a inibição pode ocorrer quando as células têm seus fatores de crescimento suprimidos, ou quando há indução de energia ou apoptose celular (CHAGAS *et al.*, 2010). Como a fração que apresentou melhor percentual de atividade neste bioensaio foi a menos citotóxica, sendo utilizada na concentração de 0,1 mg/mL, é possível que sua atuação incida sobre os mediadores do crescimento e não na indução de morte celular. Esta correlação foi feita também por Punzon *et al.* (2003) que utilizou extratos hidrometanólicos de *Phlebodium decumanum* Willd. (Polypodiaceae), demonstrando que a inibição do crescimento celular foi acompanhada pela diminuição dos níveis de IL-1 e TNF. A redução da atividade biológica dessas citocinas pode levar à diminuição dos fatores que controlam genes proinflamatórios e de óxido nítrico sintetase induzível, sendo considerados interessantes como agentes antiinflamatórios, principalmente para o tratamento de artrite reumatoide.

Todas as subfrações oriundas de CHCl<sub>3</sub> inibiram de forma efetiva a proliferação de linfócitos em diferentes concentrações (Tabela 10, p. 83). Dados comparativos da espécie ou do gênero *Ziziphus* não foram encontrados na literatura disponível, apesar de existirem vários estudos propagando a avaliação imunossupressora de diversas espécies de plantas. Segundo Ibrahim *et al.* (2002), o suco das folhas da

*Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) apresentou atividade imunossupressora, inibindo a proliferação de linfócitos. O extrato metanólico das folhas de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) também inibiu a atividade linfoproliferativa *in vitro*, cuja atividade foi atribuída a um poliacetileno posteriormente isolado (PEREIRA *et al.*, 1999).

Independentemente do modo de ação das drogas, a inibição da proliferação celular parece estar associada a uma atividade antiinflamatória, pois a redução do crescimento celular implica em diminuição de receptores solúveis produzidos por estas células e de proteases que convertem precursores inativos em ativos (CHAGAS *et al.*, 2010).

**Tabela 10.** Percentual de inibição da produção de NO e de linfoproliferação das amostras oriundas de *Z. joazeiro*. A linfoproliferação foi observada através da incorporação de timidina tritiada e a produção de NO através da quantificação de nitrito seguindo a reação de Griess. Foram testadas a partição clorofórmica, suas subfrações diretas e a substância isolada quercetina (ZJFIII).

	[mg/mL]	%Inib.Linfo.ConA	%Inib. NO
CHCl <sub>3</sub>	0,001	55,64	-
Hex/CHCl <sub>3</sub> 1:1	0,01	70,83	48,81
CHCl <sub>3</sub> (1)	0,01	94,76	37,58
AcoEt (1)	0,01	84,94	28,60
AcoEt/MeOH (5%)	0,1	99,22	71,40
MeOH	0,01	79,62	32,91
ZJFIII	0,01	77,31	5,23

Frações consideradas ativas quando a inibição da produção de NO for  $\geq 70\%$  e da linfoproliferação  $\geq 80\%$ .

Apesar de já citados no gênero, a pesquisa nos bancos de dados NAPRALERT e Scifinder revelou a ausência de estudos demonstrando a identificação do flavonoide e dos dois fitoesteroides apresentados neste trabalho em extratos e frações oriundas do juá, sendo, portanto, a primeira vez que estes compostos são relatados em *Ziziphus joazeiro*.

As três substâncias foram isoladas a partir da partição clorofórmica do extrato etanólico bruto das folhas, fração utilizada também nos testes de atividade antiparasitária e imunomoduladora. Nesse revelou-se com bom potencial, mas no

que trata a atividade antiparasitária, todas as amostras testadas apresentaram baixos índices de citotoxicidade, tanto para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* quanto para as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

O flavonoide identificado, a quercetina, pertence a uma classe química conhecida por possuir diversas propriedades biológicas, podendo-se destacar as atividades antioxidante e imunomoduladora (IELPO *et al.*, 2000). Neste trabalho, a quercetina promoveu moderada inibição na proliferação de linfócitos ativados, mas não exerceu influência significativa sobre a produção de NO. De fato, parte da atividade remetida à fração AcoEt 1 (84,94% de inibição da linfoproliferação) se deve a presença da quercetina em sua composição, é possível que existam outros flavonoides ou até mesmo outras substâncias bioativas que, em conjunto, potencializaram a ação desta subfração.

A literatura, além de apontar a atividade imunossupressora da classe dos flavonoides e dos terpenos, tem demonstrado que os esteroides, principalmente os corticoesteroides, possuem atividade imunossupressora multifatorial cujo emprego na terapia pós-transplante é muito bem definido (SCHULAK, 2004; GAO *et al.*, 2008; LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008). Outros autores destacam que os fitoesteroides, incluindo o sitosterol e o estigmasterol glicosilados, são importantes para a indústria de cosméticos por serem utilizados como emulsificantes, além disso, apresentam atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imunomoduladora (BOUIC *et al.*, 1999). Diversos estudos anteriores relatam o uso popular e por indústrias farmacêuticas de *Ziziphus joazeiro* para a higiene pessoal e/ou produção de cosméticos. Autores atribuem principalmente às saponinas o potencial utilitário do juá (KATO & ALVARENGA, 1997), mas é possível que os esteroides contribuam para esta característica da planta e também para a atividade imunossupressora aqui obtida.

No caso da linfoproliferação, é importante salientar que existe a possibilidade de uma ação inespecífica das substâncias presentes nas frações, tendo em vista que algumas moléculas podem estar agindo de forma a impedir que o mitógeno utilizado (concaivalina A) ligue-se às moléculas que levariam à estimulação dos linfócitos, e não por um mecanismo direto de inibição de ativação linfocitária. Para confirmar o efeito supressor, é necessária a submissão das frações a testes com antígenos mais específicos (COSTA, 2004).

## **5. Conclusões**

---

Após a avaliação fitoquímica e biológica realizada com as folhas de *Ziziphus joazeiro* pode-se concluir que:

- A prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico e da parte clorofórmica revelou a presença das seguintes classes de compostos: saponinas, fenóis, esteroides e triterpenos;
- O estudo fitoquímico da fase clorofórmica de *Z. joazeiro* levou ao isolamento e identificação estrutural de um flavonoide, a quercetina, e dois fitoesteroides glicosilados, o sitosterol e o estigmasterol. Um triterpeno encontra-se em análise;
- O teste de reversão da resistência à antibiótico de *S. aureus* revelou o potencial do extrato ao demonstrar inatividade frente às cepas susceptíveis e resistentes na ausência de ciprofloxacina e inibir o crescimento microbiano quando associado ao mesmo antibiótico;
- Na investigação anti-parasitária, o extrato etanólico e subfrações não foram ativos frente à *Biomphalaria glabrata*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*;
- *Z. joazeiro* demonstrou boa atividade imunomoduladora *in vitro* ao inibir a proliferação de linfócitos ativados a diminuir a produção de NO.

## **6. Referências Bibliográficas**

---

<http://antoniopcunha.com.sapo.pt>, acessado em maio de 2010.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos\\_cap\\_7.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/moluscos_cap_7.pdf), acessado em maio de 2010.

[http:// www.rain-tree.com/Plant-Images/juazeiro-pic.htm](http://www.rain-tree.com/Plant-Images/juazeiro-pic.htm), acessado em abril de 2010

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª Ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

ABIDI, S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, 935, p. 173-201, 2001.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A., L. S.; MARCELINO MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114, p. 325–354, 2007.

ALI, H.; KÖNIG, G. M.; KHALID, S. A.; WRIGHT, A. D.; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, 83 (3), p. 219-228, 2002.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. 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**, 53(6), p. 545-52, 2008.

AMATO NETO, V. & PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública** [online], 43(2), pp. 381-382, 2009.

AMOROZO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. Botucatu: UNESP, 1996.p. 47-68.

APERS, S.; BARONIKOVA, S.; SINDAMBIWE, J. B.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; VANDEN BERGHE, D.; VAN MARCK, E.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure–activity relationships, **Planta Med**, 67, p. 528, 2001.

ASLAN, M. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Immunological Research**, 26, p. 107-118, 2002.

BARBOSA, F. S.; DE MELLO, D. A. Molluscicidal activity of vegetal products. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, p. 364-366, 1969.

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

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

BARROS, G. S. G.; MATOS, F. J. A.; VIEIRA, J. E. V.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C. Pharmacological Screening Of Some Brazilian Plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 22 (2), p. 116-122, 1970.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q., T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 82, p. 155-158, 2002.

BORGI, W.; RECIO, M., C.; RÍOS, J., L.; CHOUCANE, N. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam **South African Journal of Botany**, 74 (2), p. 320-324, 2008.

BRAGA, R. A. **Plantas do nordeste, especialmente do ceará**. Fortaleza, Impr. Oficial, 1960. 540 p.

BRENER, Z. & ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRUHNS, A. *The Ottawa Citizen*, 1994.

BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant sterol and sterolins: A review of their immune - modulating properties. **Alternative Medicine Review**, v. 4, p. 170-177, 1999.

CALDERÓN, AI.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panama. **Economic Botany**, 54, p. 278-294, 2000.

CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S. M.; HUFFMAN, M. A.; BARDI, M. Increase in tannin consumption y sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for elf medication in prosimians? **Primates**, 44, p. 61-66, 2003.

CARVALHO, P. E. R. *Ziziphus joazeiro*. **Circular técnica 139**. Embrapa. 2007.

CASTILLON, L. E.; ALTSCHUL, A. M. Preparation of water-soluble combination products of gossypol and their toxicity to aquarium fish. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**, 74 (3), p. 623-626, 1950.

CHAGAS, A. P.; MÜLLER, A. R.; SOARES, M. B. P; GARCEZ, L. M. Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saude**, 1 (1), p. 117-124, 2010.

CHAN-BACAB, M. J. & PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, 18, p. 674-688, 2001.

CHOWDHURY, A. R.; MANDAL, S.; MITTRA, B.; SHARMA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and

development of more potent derivatives. **Medical Science Monitor**, 8 (7), p. 254-265, 2002.

COHEN, D.; YU, L.; RZEPKA, R.; HORWITZ, S. B. Identification of Two Nuclear Protein Binding Sites and Their Role in the Regulation of the Murine Multidrug Resistance *mdr1a* Promoter. **DNA and Cell Biology**, 13(6): 641-649, 1994.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, 40, p. 1585-1612, 1995.

COSTA, José Fernando Oliveira. **Investigação de Atividades Anti-*Leishmania amazonensis*, Anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas do semi-árido brasileiro**. Salvador, 2004. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia.

COSTA, V. V. O.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; DA SILVA, M. S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18 (2), p. 245-248, 2008.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38 (4), p. 301-304, 2005.

COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4), p. 564–582, 1999.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, A. M. JR; DE MELO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of ethnopharmacology**, 111(2), p. 409-12, 2007.

DEVI, S.; PANDEY, V. B.; SHAH, A. H. Chemical studies on the bark of *Zizyphus sativa*. **Fitoterapia**, 58(1), p. 58-59, 1987.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, 141, p. 2407-2412, 1988.

DUTTA, R.C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, p. 1-9, 2002.

EL-ASKARY, H. I. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. **Molecules**, 10, p. 971–977, 2005.

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, **Resumo**, Recife, 2007.

FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica do Brasil**, 46, p. 265-271, 2000.

GANAPATY, S.; THOMAS, P. S.; RAMANA, K. V.; KARAGIANIS, G.; WATERMAN, P. G. Dammarane and ceanothane triterpenes from *Zizyphus glabrata*. **Chemical Sciences**, 61(1), p. 87-92, 2006.

GAO, X.; DEEB, D.; DANYLUK, A.; MEDIA, J; LIU, Y.; DULCHAVSKY, S., A.; GAUTAM, S. C. Immunomodulatory activity of synthetic triterpenoids: inhibition of lymphocyte proliferation, cell-mediated cytotoxicity, and cytokine gene expression through suppression of NF-kappaB. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, 30 (3), p. 581-600, 2008.

GASPAROTTO, A. JR.; BRENZAN, M. A.; PILOTO, I. C.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, A. G. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). **Quimica Nova**, 28(4), p. 575-578, 2005.

GIACOMELLI, Sandro Rogério. **Estufo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia***. Santa Maria, 2005. 333p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Santa Maria.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife, Associação Plantas do Nordeste, 2006. p. 423-425.

HAN, B. H., & PARK, M. H. In Folk medicine: The art and science. Washington: **The American Chemical Society**, p. 206, 1986.

HATANO, T.; KUSUDA, M.; INADA, K.; OGAWA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, 66(17), p. 2047-2055, 2005.

HE, F.; PAN, Q.; MIN, Z. A novel lupane triterpene from the seeds of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa*. **Zhongcaoyao**, 37(2), p. 168-171, 2006.

HENNESSEY, L. R. & BAKER, J. R. JR. Imunomoduladores. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro, Ed Guanabara Koogan, 2000. 9ª Ed, p. 649-660.

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

IBRAHIM, T.; CUNHA, J. M. T.; MADI, T.; FONSECA, L. M. B.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L. G. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology** (2), p. 875-883, 2002.

IELPO, M. T.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M. M.; RICCIARDI, L.; VUOTTO, M. L. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, 71, p. 101-109, 2000.

JAWETZ, E. **Micologia Médica**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 253-270.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo, Ed. Nacional, 1985. p. 446-448.

KAPETANIDIS, J.; KOKKALOU, E. Flavonoids from the aerial parts of *Ziziphora taurica* Marsch. Bieb. ssp. *cleonioides* (Boiss.) P. H. Davis (Lamiaceae). **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 63(7), p. 206-8, 1988.

KATO, E. T. M.; ALVARENGA, M. A. Chemical constituents of stem bark of *Ziziphus joazeiro* Martius. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 33(1), p. 47-51, 1997.

KHAN, I. A.; MIRZA, Z., H.; KUMAR, A. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 50, p. 810–12, 2006.

KRESNKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN e GILMAN'S, 2001. 20<sup>a</sup> ed., New York: McGraw Hill Companies, 2001.

KRIEF, S.; MARTIN, M.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild

chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 48, p. 3196-3199, 2004.

KROGH, Renata. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae). Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico**. Florianópolis, 2001. 173p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

LEAL, I. C. R.; NETTO DOS SANTOS, K. R.; ITABAIANA, I. JR.; ANTUNES, O. A. C.; PORZEL, A. W. L.; KUSTER, R. M. Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro* - an anti-staphylococcal evaluation. **Planta Medica**, 76(1), p. 47-52, 2010.

LEANDRO, C. & CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 22, p.352-357, 2003.

LEE, S.; LIN, B.; CHEN, K. C. Chemical constituents from the roots of *Zizyphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu. (II). **Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei)**, 47(6), p. 511-519, 1995.

LIMA, H. C. Imunologia clínica dos imunomoduladores. In: LIMA, H. C. Ed **Tópicos em Imunodeficiência Clínica**. São Paulo: Segmaneto Farma; 2004.

LIMA, J. L. S. de. **Plantas forrageiras das caatingas**: usos e potencialidades. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1996. 43 p.

LIMA, R. B. **A família Rhamnaceae no Brasil**: diversidade e taxonomia. 2000. 292 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2000.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on

rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, 76, p. 495-506, 2008.

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil**. São Paulo, Instituto Plantarum, 1992.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Local, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512 p.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L. amazonensis)* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 41 (1), p. 85-94, 2005.

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 larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, p. 199-206, 2005.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. JR. Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, 25 (3), p. 429-438, 2002.

MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N.; GENET, J. P.; DOS SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell Arg. **Phytochemistry**, (66), p. 1804-1811, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza, Edições UFC, 1997. 141p.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2ª ed. Fortaleza: UFC. 2000.

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**, 18 (3), p. 232, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, 44 (1), p. 200-202, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: SVS / MS, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ª Edição. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: SVS / MS, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª Edição. Série A. **Normas e manuais técnicos**. Brasília: SVS / MS, 2005.

MONIZ, Kátia Lidiane de Almeida. **Caracterização morfológica de sementes e frutos e estudos da germinação da espécie *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae)**. Feira de Santa, 2002. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana.

NADIA, T. L.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Fenologia reprodutiva e sistema de polinização de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): atuação de *Apis mellifera* e de visitantes florais autóctones como polinizadores. **Acta Botanica Brasilica**, 21, p. 835-845, 2007.

NADINIC, E.; PENNA, C.; SAAVEDRA, C.; COUSSIO, J.; GUTKIND, G.; DEBENEDETTI, S. Aislamiento de compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg.) Ho & Liu. (Gentianaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 21(2), p. 123–130, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, 66, p. 1022-1037, 2003.

NEYFAKH, A. A; BORSCH, C. M; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone Resistance Protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a Multidrug Efflux Transporter. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 37 (1), p. 128-129, 1993.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL-FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: **Bresolin**, TMB. Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, p. 10-56, 2003.

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**, 20 (5), p. 599-601, 1987.

PAWLOWSKA, A. M.; CAMANGI, F.; BADER, A.; BRACA, A. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. **Food Chemistry**, 112, p. 858–862, 2009.

PEREIRA, R. L.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; DA SILVA, A. J.; GONCALVES DE MORAES, V. L. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, (43), p. 31–37, 1999.

PINHEIRO DE SOUSA, M.; ROUQUAYROL, M. Z. Molluscicidal Activity Of Plants From Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, 7 (4), p. 389-394, 1974.

PUNZON, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptores. **International Immunopharmacology**, 3 (9), p. 1293-1299, 2003.

RESENDE, M. R.; ALVES, V. E.; SOUZA, L. S.; LOPES, J. R. G.; BORIOLLO, M. F. G. Ensaio mutagênicos e antimutagênicos de *Ziziphus joazeiro* Mart. através do teste do micronúcleo em medula óssea de roedores. **Brazilian Oral Research**, 23 (1), p. 92-110, 2009.

ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, 46, p. 305-321, 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5ª Ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSAS, L. V.; CORDEIRO, M. S. C.; CAMPOS, F. R.; NASCIMENTO, S. K. R.; JANUARIO, A. H.; FRANCA, S. C.; NOMIZO, A.; TOLDO, M. P. A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P. S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40(5), p. 663-670, 2007.

SANTOS, A. F. dos; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicide activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **Phytotherapy Research**, 13, p. 660, 1999.

SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; DOS SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; GENET, J.; MARQUEZ, B; NEUVILLE, L. & MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethno-pharmacology**, 105, p. 137-147, 2006.

SCHMITZ, F. J.; FLUIT, A. C.; LUCKEFAHR, M. *et al.* The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 42, p. 807–810, 1998.

SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; CALIS, I.; STICHER, O. New Triterpenoids With Antibacterial Activity From *Zizyphus joazeiro*. **Planta Med**, 65 (8), p. 740-743, 1999.

SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; CALIS, I.; STICHER, O. Novel Triterpene Saponins From *Zizyphus joazeiro*. **Helvetica Chimica Acta**, 83 (7), p. 1509-1516, 2000.

SCHULAK, J. A. Steroid immunosuppression in kidney transplantation: a passing era. **Journal of Surgical Research**, 117 (1), p. 154-162, 2004.

SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. Porto Alegre, Sagra & Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990. 414 p.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. **Fitoterapia Racional**. São Paulo, Editora Manole, 2002. 386 p.

SHAHAT, A. A.; IETERS, L.; APERS, S.; NAZEIF, N. M.; ABDEL-AZIM, N. S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Chemical and Biological Investigations on *Zizyphus spina-christi* L. **Phytotherapy Research**, 15, p. 593–597, 2001.

SHARMA, S. C.; KUMAR, R. Chemical examination of *Zizyphus nummularia*. **Pharmazie**, 38 (1), p. 65, 1983.

SHENG, G.; YU-PING, T.; JIN-AO, D.; SHU-LAN, S.; DA-WEI, Q. Chemical constituents from the fruits of *Zizyphus jujuba*. **Formulae Research**, 7(2), p. 115-118, 2009.

SILVA, M. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, 25: p. 449-454, 2002.

SILVA, Michele Feitoza. **Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Solanum gilo* Raddi – “jiló”**. Rio de Janeiro, 2004. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SILVA, Milena Dutra. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. Recife, 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSELER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª edição. Editora Guanabara-Koogan. RJ, 1994, 387 p.

SINGH, A. K.; PANDEY, M. B.; SINGH, V. P.; PANDEY, V. B. Flavonoids of *Zizyphus* species. **Journal of the Indian Chemical Society**, 84(3), p. 297-298, 2007.

SOARES, F. P.; RONCONI, C. A. V.; DA CUNHA, E. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, M. D.; BRAZ-FILHO, R. Four Known Triterpenoids Isolated From Three Brazilian Plants: 1h And 13c Chemical Shift Assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 36 (8) p. 608-614, 1998.

SOULELES, C.; SHAMMAS, G. Flavonoids from the leaves of *Zizyphus jujuba*. **Fitoterapia**, 59(2), p 154, 1988.

SOUSA, T. S.; DE MORAIS, S. M.; DE LIMA, K. S. B.; DE LIMA, Y. C; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, M. G. S. Análise fitoquímica e ação antioxidante de *Zizyphus joazeiro* e *Zizyphus undulata*. In: XVI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA Ciências Exatas e da Terra. **Resumo**. Ceará, 2007.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Impr universitária/ UFC, Fortaleza. 416pp. 1991;

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, 94 (2-3), p. 219-243, 2004.

STERMITZ, F. R.; LORENZ, P.; TAWARA, J. N.; ZENEWICZ, L. A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-

methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings National Academy of Science of USA**, 97 (4), p. 1433-1437, 2000.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59, p. 1247–1260, 2007.

TONKAL, A. K.; SALEM, H. S.; JAMJOOM, M. B.; ALTAIEB, A. M.; AL-BAR, H. A.. Preliminary Study on the Effect of *Ziziphus spina christi*. on Selected *Leishmania spp.* **Journal of Al-Azhar Medical Faculty (Girls)**, 26 (1), 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTATHUM, F.; GOMPertz, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 421-422.

TRIGUEIRO, J. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; CHERIYAN, U. O. Chemical Constituents of *Zizyphus joazeiro*. **Ciência e Cultura** (São Paulo), 33, p. 44-45, 1981.

TRIPATHY, Y. C.; DEVI, S.; PANDEY, V. B.; SHAH, A. H. Phytochemical study of *Zizyphus rugosa*. **Fitoterapia**, 59(2), p. 58, 1988.

TSCHESCHE, R.; SHAH, A. H.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; VON RADLOFF, M.; ECKHARDT, G. Alkaloids of Rhamnaceae. Part 33. **Pharmazie**, 36 (7), p. 511, 1981.

URBINA, J. A. & DO CAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, 19, p. 495-501, 2003.

WEINGES, K.; SCHICK, H. Dodecaacetylprodelphinidin b3 from the dried leaves of *Zizyphus spina-christi*. **Phytochemistry**, 38 (2), p. 505-507, 1995.

WINKELSTEIN, A. Terapia Imunosupressora. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro, Ed Guanabara Koogan, 2000. 9ª Ed, p. 634-648.

WRIGHT, G. D. & SUTHERLAND, A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, 13 (6), p. 260-267, 2007.

WUROCHEKKE, A. U.; NOK, A. J. *In vitro* anti trypanosomal activity of some medicinal plants used in the treatment of trypanosomosis in Northern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, 3 (9), p. 481-483, 2004.

YANG, X.; LI, n.; MENG, D.; LI, W.; LI, X. Isolation and identification of chemical constituents from *Ziziphora clinopodioides* Lam. **Shenyang Yaoke Daxue Xuebao**, 25(6), p. 456-458, 2008.