



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**NOELLY BASTOS CAVALCANTE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO, OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR  
SÍNTESE VERDE A PARTIR DE *Jatropha mollissima* (EUPHORBIACEAE) E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

**RECIFE-PE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**RENORBIO**

**NOELLY BASTOS CAVALCANTE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO, OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR  
SÍNTESE VERDE A PARTIR DE *Jatropha mollissima* (EUPHORBIACEAE) E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida - UNIVASF  
Linha de pesquisa: Biotecnologia de Produtos Naturais

**RECIFE-PE**  
**2019**

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

C376e Cavalcante, Noelly Bastos

Estudo fitoquímico, obtenção de nanopartículas de prata por síntese verde a partir de *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae) e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica / Noelly Bastos Cavalcante. – 2019.

181 f. : il.

Orientador: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2019. Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Inclui referências e anexo(s).

1. Química vegetal 2. Nanopartículas 3. Síntese verde 3. Agentes Antiinfecciosos I. Almeida, Jackson Roberto Guedes da Silva, orient.  
II. Título

CDD 620.8

# TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

NOELLY BASTOS CAVALCANTE

**Estudo fitoquímico, obtenção de nanopartículas de prata por síntese verde a partir de *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae) e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica**

## BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 04 de junho de 2019

Orientador:

---

Prof. Dr. *Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida*  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Examinadores:

---

Prof. Dr. *Mário Adriano Ávila Queiroz*  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

---

Prof. Dr. *Vitor Prates Lorenzo*  
Instituto Federal do Sertão Pernambucano - IF Sertão PE

---

Prof. Dra. *Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo*  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

---

Prof. Dra. *Larissa Araújo Rolim*  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

**RECIFE-PE**

**2019**

*Nos momentos de dificuldade, de cansaço e de ausência, a imagem, o sorriso, a compreensão e o amor de vocês me fizeram continuar. Aos meus pais, Davina e Umberto, à minha irmã, Marielly, e ao meu noivo Marcosuel, por fazerem parte de mim, com amor.*

*Na busca dos saberes, junto a eles é onde mais aprendo.*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amar e por permitir que eu tenha forças para lidar com as adversidades. Por permitir que eu possa aprender a ser uma pessoa melhor a cada dia. E, principalmente, por me compreender nas falhas e por sempre me dar a oportunidade de corrigi-las.

Aos meus pais, Davina e Umberto, pelo amor e apoio incondicional, pelos exemplos e ensinamentos que me mostraram a importância da honestidade, da disciplina e da força de vontade.

À minha irmã, Marielly, presente de Deus em minha vida, sempre tão próxima em todas as minhas aflições e alegrias, sempre tão disposta a me ajudar e a me levantar sempre que eu necessito.

Ao meu grande amor, Marcosuel, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido ainda mais viva. Obrigada pelo amor, carinho, companheirismo e por sua capacidade de me trazer paz na correria do dia a dia.

A todos os meus familiares que, mesmo à distância, me apoiaram e torceram por mim.

Ao professor Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, pela valiosa orientação, pela confiança, paciência, comprometimento e pelas oportunidades proporcionadas durante esses quatro anos de trabalho.

Ao professor Henrique Douglas Melo Coutinho (Universidade Regional do Cariri - Crato/CE), e seus queridos alunos Raimundo, Cris, Saulo e Débora, pela receptividade, boas ideias e valiosa ajuda nos testes de atividade antibacteriana e moduladora.

À professora Larissa Araújo Rolim (CAFMA/UNIVASF) e à Izabel Cristina Casanova Turatti (Universidade de São Paulo/USP - Ribeirão Preto), pelas análises de CG-EM e LC-MS realizadas, fundamentais para este trabalho.

Ao professor Helinando Pequeno de Oliveira pelo apoio de sempre e pelo auxílio nos experimentos de MEV, UV-Vis e Potencial Zeta.

À Anelize Bauermeister (Universidade de São Paulo/USP - Ribeirão Preto/SP) pelas análises de networking molecular realizadas, além da paciência e disponibilidade para tirar todas as minhas dúvidas. Serei eternamente grata pelo seu apoio!

À Isabela Amariz, da Central de Análises de Fármacos e Medicamentos (CAFMA - UNIVASF) e Layanne Feitosa, do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas

Medicinais (NEPLAME - UNIVASF) pelo auxílio na interpretação dos dados de CG-MS e LC-MS.

À professora Claudia do Ó Pessoa e à querida Francilene Silva, do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE - Universidade Federal do Ceará-UFC), pelo auxílio na investigação da atividade citotóxica, além do apoio e atenção de sempre.

À professora Aurea Wischral e à Sandra Morgado, do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela competência, disponibilidade e receptividade presentes em todas as vezes que as procurei.

Aos professores da minha banca de qualificação, Dr. Mário Queiroz, Dra. Maria Helena Tavares e Dra. Edigênia Cavalcante, por todos os ensinamentos, críticas construtivas e excelentes considerações.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO, que contribuíram imensamente para a minha formação.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica da UNIVASF e do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais (NEPLAME), em especial Mayara Amariz, Michelle Cruz, Celuane Moura, Ana Paula Oliveira, Raimundo Júnior, Rafela Melo e Amanda, por toda a aprendizagem em conjunto, pelas dificuldades que dividimos e superamos e, principalmente, pela amizade e companheirismo em todas as horas.

Às instituições de ensino e pesquisa: Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE - Recife/PE), Universidade Regional do Cariri (URCA - Crato/CE), Universidade Federal do Ceará (UFC - Fortaleza/CE) e Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto/SP) pelo incentivo profissional e oportunidade de crescimento pessoal.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida e aos demais órgãos de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro utilizado para manutenção da infraestrutura dos laboratórios.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E, finalmente, agradeço ao mundo por estar em constante evolução, sempre mudando as coisas, por nunca fazê-las iguais... pois, se assim fosse, não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer, pois é isso que nos move e dá sentido à nossa vida.

Muito obrigada!

*“Um trabalho te dá um propósito e um significado. A vida é vazia sem ambos.”*

*Stephen Hawking*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Área de ocorrência do bioma Caatinga .....	27
<b>Figura 2</b> - Distribuição da família Euphorbiaceae no mundo .....	31
<b>Figura 3</b> - Ocorrência do gênero <i>Jatropha</i> no mundo .....	35
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas dos compostos Jatromultona A-I isolados de <i>J. multifida</i> .....	37
<b>Figura 5</b> - <i>Jatropha mollissima</i> – Inflorescência .....	45
<b>Figura 6</b> - <i>Jatropha mollissima</i> – Planta inteira .....	45
<b>Figura 7</b> - <i>Jatropha mollissima</i> – Folha .....	46
<b>Figura 8</b> - <i>Jatropha mollissima</i> – Fruto .....	46
<b>Figura 9</b> - Estrutura química dos flavonoides em comum nos extratos aquosos de <i>J. gossypifolia</i> e <i>J. mollissima</i> detectados através de análises por CLAE-DAD .....	48
<b>Figura 10</b> - Estrutura química dos flavonoides encontrados no extrato aquoso de <i>J. mollissima</i> detectados através da análise por CLAE-DAD-MS/MS .....	49
<b>Figura 11</b> - Esquema da interação de uma nanoesfera metálica com a luz. O campo eletromagnético da luz induz uma oscilação dipolar da condução eletrônica através da partícula .....	57
<b>Figura 12</b> - Esquema de síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) .....	62
<b>Figura 13</b> - Exsicata da espécie <i>Jatropha mollissima</i> depositada no Herbário Vale do São Francisco - HVASF .....	65
<b>Figura 14</b> - Sistema de fracionamento do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) por cromatografia líquida a vácuo .....	67
<b>Figura 15</b> - Cromatograma de íons totais do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) de <i>J. mollissima</i> .....	86
<b>Figura 16</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no extrato etanólico bruto de <i>J. mollissima</i> .....	89
<b>Figura 17</b> - Cromatograma de íons totais da fase hexânica (Jm-Hex) de <i>J. mollissima</i> .....	90
<b>Figura 18</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase hexânica de <i>J. mollissima</i> .....	91
<b>Figura 19</b> - Cromatograma de íons totais da fase clorofórmica (Jm-CHCl <sub>3</sub> ) de <i>J. mollissima</i> .....	92

<b>Figura 20</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase clorofórmica de <i>J. mollissima</i> .....	95
<b>Figura 21</b> - Cromatograma de íons totais da fase acetato de etila (Jm-AcOEt) de <i>J. mollissima</i> .....	96
<b>Figura 22</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase acetato de etila de <i>J. mollissima</i> .....	98
<b>Figura 23</b> - Cromatograma de íons totais da fase metanólica (Jm-MeOH) de <i>J. mollissima</i> .....	99
<b>Figura 24</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase metanólica de <i>J. mollissima</i> .....	100
<b>Figura 25</b> - Aplicação de networking molecular baseado no modo positivo de ionização por electrospray de CLAE-DAD-IT-MS/MS nas fases clorofórmica (Jm-CHCl <sub>3</sub> ) e acetato de etila (Jm-AcOEt) de <i>J. mollissima</i> .....	106
<b>Figura 26</b> - Estrutura química do Triaccontanol .....	108
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> ,100 MHz) .....	110
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135° de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> ,100 MHz) .....	111
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> ,400 MHz) .....	112
<b>Figura 30</b> - Expansões do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> 400 MHz) .....	113
<b>Figura 31</b> - Espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HSQC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	114
<b>Figura 32</b> - Expansão 1 do espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HSQC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	115
<b>Figura 33</b> - Expansão 2 do espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HSQC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	116
<b>Figura 34</b> - Espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HMBC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	117
<b>Figura 35</b> - Expansão 1 do espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HMBC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	118
<b>Figura 36</b> - Expansão 2 do espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C - HMBC de JM-1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz e 100 MHz) .....	119
<b>Figura 37</b> - Estrutura química do β-sitosterol .....	121
<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de JM-2 (CDCl <sub>3</sub> ,100 MHz) .....	123
<b>Figura 39</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C DEPT 135° de JM-2 (CDCl <sub>3</sub> ,100 MHz) .....	124
<b>Figura 40</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de JM-2 (CDCl <sub>3</sub> ,400 MHz) .....	125

<b>Figura 41</b> - Expansão 1 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ 400 MHz) .....	126
<b>Figura 42</b> - Expansão 2 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ 400 MHz) .....	127
<b>Figura 43</b> - Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HSQC de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz) .....	128
<b>Figura 44</b> - Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - HMBC de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz) .....	129
<b>Figura 45</b> - Espectro de correlação $^1\text{H}$ COSY de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) .....	130
<b>Figura 46</b> - Avaliação do potencial modulador do extrato etanólico bruto (e fases) das folhas de <i>J. mollissima</i> sobre o efeito antibacteriano de antibióticos contra espécies multirresistentes .....	137
<b>Figura 47</b> - Reação de biossíntese de nanopartículas de prata com mudança de coloração .....	146
<b>Figura 48</b> - Curvas de formação representativas das medidas de absorvância no UV-Vis de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde .....	148
<b>Figura 49</b> - Representação da distribuição das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde em meio aquoso .....	151
<b>Figura 50</b> - Imagens de MEV de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde ..	154
<b>Figura 51</b> - Espectros de EDS para identificação de componentes químicos presentes nas amostras de nanopartículas de prata .....	155

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Potencial químico e biológico de espécies da família Euphorbiaceae estudadas no ano de 2018 (Janeiro a Julho) .....	33
<b>Tabela 2</b> - Diterpenos isolados e identificados no gênero <i>Jatropha</i> e atividades biológicas .....	38
<b>Tabela 3</b> - Eluentes e reveladores utilizados para a caracterização do perfil fitoquímico cromatográfico do extrato etanólico e fases obtidas a partir das folhas de <i>Jatropha mollissima</i> .....	68
<b>Tabela 4</b> - Condições cromatográficas nos experimentos de LC-MS .....	72
<b>Tabela 5</b> - Origem bacteriana e perfil de resistência .....	75
<b>Tabela 6</b> - Descrição das linhagens celulares e concentrações utilizadas na investigação da atividade citotóxica .....	77
<b>Tabela 7</b> - Descrição e identificação das amostras utilizadas na investigação da atividade citotóxica .....	77
<b>Tabela 8</b> - Descrição das classes de metabólitos secundários investigados nos extratos e fases de <i>J. mollissima</i> .....	83
<b>Tabela 9</b> - Constituintes químicos do extrato etanólico bruto das folhas de <i>J. mollissima</i> .....	87
<b>Tabela 10</b> - Constituintes químicos da fase hexânica de <i>J. mollissima</i> .....	90
<b>Tabela 11</b> - Constituintes químicos da fase clorofórmica de <i>J. mollissima</i> .....	92
<b>Tabela 12</b> - Constituintes químicos da fase acetato de etila de <i>J. mollissima</i> .....	96
<b>Tabela 13</b> - Constituintes químicos da fase metanólica de <i>J. mollissima</i> .....	99
<b>Tabela 14</b> - Comparação com os dados espectrais de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do fitoesterol $\beta$ -sitosterol encontrados na literatura (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	104
<b>Tabela 15</b> - Atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto (e fases) obtido a partir das folhas de <i>J. mollissima</i> .....	120
<b>Tabela 16</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> (concentração única) de extratos de <i>J. mollissima</i> contra linhagens de células tumorais .....	134
<b>Tabela 17</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> ( $\text{CI}_{50}$ ) de extratos de <i>J. mollissima</i> contra linhagens de células tumorais .....	141
<b>Tabela 18</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> ( $\text{CI}_{50}$ ) de extratos de <i>J. mollissima</i> contra linhagens de células tumorais .....	142

<b>Tabela 19</b> - Dados obtidos por análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	149
<b>Tabela 20</b> - Potencial Zeta das nanopartículas obtidas por síntese verde utilizando o extrato aquoso de <i>J. mollissima</i> como agente de redução .....	151
<b>Tabela 21</b> - Atividade antibacteriana de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde .....	156
<b>Tabela 22</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde contra linhagens de células tumorais .....	159
<b>Tabela 23</b> - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> ) de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde contra linhagens de células tumorais .....	160

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> - Aplicações de técnicas hifenadas na área de produtos naturais .....	51
<b>Quadro 2</b> - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl <sub>3</sub> e Jm-AcOEt .....	70
<b>Quadro 3</b> - Rendimento das fases obtidas através do processo de fracionamento por cromatografia líquida à vácuo .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ATCC</b>	<i>American type cell collection</i>
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CC</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCDA</b>	Cromatografia em camada delgada analítica
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CG-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
<b>CTT</b>	Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>ESI</b>	Ionização por eletrospray
<b>eV</b>	Eletrovolt
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<b>HR-ESI-MS</b>	<i>High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry</i>
<b>HVASF</b>	Herbário Vale do São Francisco
<b>IR</b>	Índice de retenção
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
<b>MTT</b>	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>Rf</b>	<i>Retention factor</i>
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RMN de <sup>13</sup>C</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>δC</b>	Deslocamento químico de carbono em ppm
<b>δH</b>	Deslocamento químico de hidrogênio em ppm
<b>Å</b>	Ângstron
<b>δ</b>	Deslocamento químico
<b>μL</b>	Microlitro

**OBS.:** As abreviaturas e os símbolos citados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## RESUMO

*Jatropha mollissima* é uma planta arbustiva da família Euphorbiaceae, endêmica do bioma Caatinga. É uma espécie que pouco se tem referência, no entanto é utilizada na medicina popular principalmente para o tratamento de úlceras e picadas de cobra. Os objetivos principais deste trabalho foram: realizar o estudo fitoquímico de *J. mollissima*, obter nanopartículas de prata por síntese verde utilizando seu extrato aquoso e avaliar sua capacidade antibacteriana e citotóxica. Neste trabalho foi relatado pela primeira vez o extrato aquoso de *J. mollissima* como redutor de íons prata. O material vegetal (folhas) foi coletado no município de São Raimundo Nonato-PI, em época chuvosa e, após o processo de secagem e maceração do material, foi obtido o extrato etanólico bruto (Jm-EEB). Após esse procedimento, o Jm-EEB foi particionado utilizando o método de cromatografia líquida a vácuo com solventes em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as fases hexânica (Jm-Hex), clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (Jm-AcOEt) e metanólica (Jm-MeOH). O extrato aquoso para a biossíntese de nanopartículas de prata, por sua vez, foi obtido utilizando 10 g do pó das folhas imersos em água bidestilada, sendo a mistura, em seguida, submetida à fervura por dez minutos. O material foi centrifugado, filtrado e armazenado a 4 °C. O extrato bruto e as fases foram submetidos à análise por CG-EM para a identificação dos seus constituintes químicos. As fases clorofórmica e acetato de etila foram submetidas ao fracionamento por cromatografia líquida em coluna utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol individualmente ou em misturas binárias. Além disso, todos os extratos foram submetidos aos testes biológicos de atividade antimicrobiana (CIM e da CBM) e atividade citotóxica, para determinação da CI<sub>50</sub> frente a três linhagens de células tumorais. O fracionamento cromatográfico possibilitou o isolamento de duas substâncias que, após submetidas a análises por RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H uni e bidimensionais, foram identificadas como triacontanol e β-sitosterol. As análises por CG-EM revelaram a presença de 51 picos para Jm-EEB, 24 picos para Jm-Hex, 60 picos para Jm-CHCl<sub>3</sub>, 36 picos para Jm-AcOEt e 16 picos para Jm-MeOH, sendo os compostos da classe dos terpenos os mais representativos. Foram identificados diversos constituintes, tais como fitol, lupeol, ácido palmítico, ácido linolênico e α-tocoferol, todos com atividades biológicas importantes relatadas na literatura. Também foram realizadas análises por CLAE-MS/MS e aplicação de networking molecular, tornando possível a identificação de oito flavonoides descritos pela primeira vez na espécie. No teste de atividade antimicrobiana, *J. mollissima* foi capaz de promover uma inibição moderada de espécies bacterianas de importância clínica, sendo *Serratia marcescens* a espécie mais sensível. Nos testes de atividade modulatória com antibióticos, ficou evidenciado que *J. mollissima* estabeleceu uma relação antagônica com o antibiótico Norfloxacin, que faz parte da classe das fluoroquinolonas. As nanopartículas de prata obtidas por síntese verde, por sua vez, obtiveram atividade antibacteriana significativa contra todas as cepas testadas. Com relação à atividade citotóxica, *J. mollissima* apresentou um forte potencial antiproliferativo, principalmente contra linhagens celulares de câncer de próstata (CI<sub>50</sub> < 30 µg/mL). O mesmo pôde ser observado para as nanopartículas de prata biossintetizadas, cuja melhor CI<sub>50</sub> foi 2,93 µg/mL, também contra a linhagem de câncer de próstata. Estes resultados são inéditos para a espécie, o que incentiva ainda mais os estudos com esta planta, a fim de elucidar possíveis mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** *Jatropha mollissima*; Fitoquímica; Nanopartículas de prata; Síntese verde; Atividade antibacteriana; Atividade citotóxica.



## ABSTRACT

*Jatropha mollissima* is a shrubby plant of the Euphorbiaceae family, endemic to the Caatinga biome. It is a species that has little reference, however it is used in folk medicine mainly for the treatment of ulcers and snake bites. The main objectives of this work were: to perform the phytochemical study of *J. mollissima*, to obtain silver nanoparticles by green synthesis using its aqueous extract and to evaluate its antibacterial and cytotoxic capacity. In this work the aqueous extract of *J. mollissima* was reported for the first time as a silver ion reducer. The plant material (leaves) was collected in the city São Raimundo Nonato-PI, in the rainy season and, after the drying and maceration of the material, crude ethanol extract (Jm-CEE) was obtained. After this procedure, the Jm-CEE was partitioned using the vacuum liquid chromatography method with solvents in increasing order of polarity, obtaining the hexane (Jm-Hex), chloroform (Jm-CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (Jm-AcOEt) and methanol (Jm-MeOH). The aqueous extract for biosynthesis of silver nanoparticles, in turn, was obtained using 10 g of the powder of the leaves immersed in doubly distilled water, the mixture being then boiled for ten minutes. The material was centrifuged, filtered and stored at 4 °C. The crude extract and phases were submitted to GC-MS analysis for the identification of their chemical constituents. The chloroform and ethyl acetate phases were subjected to fractionation by column liquid chromatography using the solvents hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol individually or in binary mixtures. In addition, all extracts were submitted to biological tests of antimicrobial activity (MIC and MBC) and cytotoxic activity, to determine the IC<sub>50</sub> against the three tumor cell lines. The chromatographic fractionation allowed the isolation of two substances that, after being subjected to the uni and bidimensional <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR analyzes, were identified as triacontanol and β-sitosterol. GC-MS analyzes revealed the presence of 51 peaks for Jm-CEE, 24 peaks for Jm-Hex, 60 peaks for Jm-CHCl<sub>3</sub>, 36 peaks for Jm-AcOEt and 16 peaks for Jm-MeOH, the compounds of class of the most representative terpenes. Several constituents were identified, such as phytol, lupeol, palmitic acid, linolenic acid and α-tocopherol, all with important biological activities reported in the literature. Analyzes by HPLC-DAD-IT-MS / MS and molecular networking application were also performed, making it possible to identify eight flavonoids described for the first time in this species. In the antimicrobial activity test, *J. mollissima* was able to promote a moderate inhibition of bacterial species of clinical importance, being *Serratia marcescens* the most sensitive species. In the tests of modulatory activity with antibiotics, it was evidenced that *J. mollissima* established an antagonistic relation with the antibiotic Norfloxacin, that is part of the class of fluoroquinolones. The silver nanoparticles obtained by green synthesis, in turn, obtained significant antibacterial activity against all strains tested. Regarding the cytotoxic activity, *J. mollissima* showed a strong antiproliferative potential, mainly against prostate cancer cell lines (IC<sub>50</sub> < 30 μg/mL). The same could be observed for the biosynthesized silver nanoparticles, whose best IC<sub>50</sub> was 2.93 μg/mL, also against the prostate cancer lineage. These results are unprecedented for the species, which further encourages studies with this plant, in order to elucidate possible mechanisms of action.

**Keywords:** *Jatropha mollissima*; Phytochemistry; Silver nanoparticles; Green synthesis; Antimicrobial activity; Cytotoxic activity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Objetivo geral .....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	27
3.1 Bioma Caatinga .....	27
3.2 Plantas medicinais do bioma Caatinga e sua importância .....	28
3.3 Considerações sobre a família Euphorbiaceae .....	31
3.4 Gênero <i>Jatropha</i> .....	34
3.5 Considerações sobre a espécie <i>Jatropha mollissima</i> .....	43
3.6 Química de plantas medicinais e a aplicação de técnicas hifenadas .....	50
3.7 A importância da nanotecnologia e a sua relação com produtos naturais ...	53
3.8 Nanopartículas metálicas .....	55
3.8.1 Métodos de caracterização de nanopartículas metálicas .....	55
3.8.1.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível e pico SPR .....	55
3.8.1.2 Potencial Zeta e espalhamento de luz dinâmico .....	58
3.9. Nanopartículas de prata (AgNPs) .....	59
4.0. Nanobiotecnologia verde: biossíntese de nanopartículas metálicas .....	61
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	65
4.1 Coleta e identificação do material botânico .....	65
4.2 Processamento do material botânico .....	66
4.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) .....	66
4.4 Triagem fitoquímica preliminar .....	67
4.5 Estudo fitoquímico clássico .....	69
4.5.1 Métodos cromatográficos .....	69
4.5.2 Fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl <sub>3</sub> e Jm-AcOEt .....	69
4.5.3 Investigação dos constituintes químicos por técnicas cromatográficas hifenadas .....	70
4.5.3.1 Análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) .....	70

4.5.3.2	Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-DAD-IT-MS/MS) e aplicação de networking molecular .....	71
4.6	Métodos espectrométricos .....	73
4.7	Investigação da atividade antibacteriana .....	74
4.8	Investigação da atividade moduladora de resistência a antimicrobianos ....	75
4.9	Investigação da atividade citotóxica .....	76
4.10	Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o extrato aquoso das folhas de <i>J. mollissima</i> como agente redutor .....	78
4.10.1	Preparação das amostras .....	78
4.11	Caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs) .....	79
4.11.1	Absorbância no UV-Visível .....	79
4.11.2	Tamanho das partículas e Potencial Zeta .....	79
4.11.3	Análise estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	79
4.12	Investigação das atividades antibacteriana e citotóxica das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde .....	80
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
5.1	Fracionamento do extrato etanólico bruto obtido a partir das folhas de <i>Jatropha mollissima</i> .....	82
5.2	Triagem fitoquímica preliminar .....	82
5.3	Estudo fitoquímico clássico .....	85
5.3.1	Métodos cromatográficos .....	85
5.3.1.1	Fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl <sub>3</sub> e Jm-AcOEt .....	85
5.3.2	Investigação dos constituintes químicos por técnicas cromatográficas hifenadas .....	85
5.3.2.1.	Análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) .....	85
5.3.2.2	Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-DAD-IT-MS/MS) e aplicação de Networking Molecular .....	102
5.4	Métodos espectrométricos – isolamento e caracterização estrutural de JM-1 e JM-2 .....	108

5.5	Investigação da atividade antibacteriana .....	131
5.6	Investigação da atividade moduladora da resistência à antimicrobianos ..	135
5.7	Investigação da atividade citotóxica .....	140
5.8	Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o extrato aquoso das folhas de <i>J. mollissima</i> como agente redutor .....	145
5.9	Caracterização das amostras de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde .....	146
5.9.1	Análise do pico SPR por absorvância no UV-Visível .....	146
5.9.2	Determinação do tamanho das partículas (DLS) e Potencial Zeta (PZ) .....	148
5.9.3	Análise estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de componentes químicos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) .....	153
5.10	Atividades antibacteriana e citotóxica das nanopartículas (AgNPs) de prata obtidas por síntese verde .....	156
5.10.1	Determinação das concentrações inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM) .....	156
5.10.2	Investigação da atividade citotóxica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde .....	158
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>164</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>166</b>

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A ciência e a tecnologia em nanoescala têm se destacado consideravelmente nos últimos anos, especialmente por oferecer inúmeros benefícios relacionados com a segurança do meio ambiente e da saúde humana (PUROHIT et al., 2017). São denominadas nanomateriais as estruturas que possuem dimensões na escala do nanometro (nm), ou seja, um bilionésimo ( $10^{-9}$ ) de um metro, com tamanho estabelecido entre 1 e 100 nanômetros. Em tais dimensões, estes materiais podem apresentar diferentes propriedades físicas, químicas e/ou biológicas, além de possuir uma maior área de superfície e aumentar a velocidade de reações químicas, abrindo um leque de novas possibilidades para a nanotecnologia (KARGOZAR; MOZAFARI, 2018; SUDARENKOV, 2012).

Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas metálicas (NPs) têm recebido atenção crescente, sobretudo devido às suas propriedades físico-químicas únicas, que diferem significativamente dos seus semelhantes em escalas maiores (VAHABI et al., 2011; KIRTH et al., 2012). Estudos recentes têm demonstrado que vários tipos de nanopartículas metálicas, com destaque para as nanopartículas de prata, possuem atividade biológica (BEHRAVAN et al., 2019; ALSAMMARRAIE et al., 2018), sendo eficientes no combate a diversos tipos de microrganismos, tais como bactérias, fungos e vírus (PHARTIBAN et al., 2018). Nos últimos anos, o surgimento de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente tem aumentado em um ritmo alarmante, tornando-se um sério problema em diferentes áreas da medicina, na indústria, na pecuária e em outros campos onde se faz necessário combater a proliferação desordenada de microrganismos. Bactérias, fungos e vírus, livres no meio ambiente, muitas vezes são patogênicos, podendo causar infecções em seres humanos, animais ou vegetais. Em virtude disso, há uma crescente necessidade de se buscar novas substâncias com potencial farmacológico de origem natural e atóxicos (DOODS, 2017; IRAVANI, 2011).

Nesse sentido, a utilização de sistemas biológicos – como os vegetais ou partes deles, tais como as biomoléculas – emerge como um novo e importante método para a síntese de nanopartículas metálicas. Sabe-se que muitos organismos, tanto unicelulares quanto pluricelulares, são capazes de produzir materiais inorgânicos intra ou extracelularmente, minimizando a toxicidade no processo de produção destas nanopartículas. A biossíntese de nanopartículas metálicas é mediada por componentes

biológicos capazes de reduzir o íon metálico, sem produzir resíduos tóxicos e sem impactos negativos ao meio ambiente (IRAVANI, 2011; THAKKAR, 2010).

O potencial de plantas superiores como fonte de novas substâncias bioativas ainda é pouco explorado e, dentre as 250.000 a 500.000 espécies de plantas estimadas, apenas uma pequena fração foi submetida a estudos de ordem biológica ou farmacológica. Diante disso, a busca por novas moléculas tem despertado grande interesse na investigação dos metabólitos secundários de inúmeras espécies de plantas, e o reconhecimento do papel desses metabólitos na interação das plantas com outros organismos também tem estimulado novos estudos (BERNSTEIN et al., 2018).

As substâncias oriundas a partir do metabolismo secundário das plantas – os metabólitos secundários – podem ser entendidas como aquelas substâncias que não têm um papel fundamental na manutenção da vida dos vegetais que os sintetizam, podendo, no entanto, ser fonte promissora de moléculas bioativas com atividades biológicas muito interessantes. Estes compostos têm diferentes funções e podem atuar na proteção das plantas contra potenciais herbívoros ou no combate à patógenos, proteção contra espécies competidoras, atração de polinizadores, promoção de interações com organismos simbiotes ou ainda para a promoção dos interesses da planta de outras maneiras, como resistência a estresses abióticos e sinalizações internas de estresse (JIA et al., 2018; DAVEY, 2017; CUNHA et al., 2016). Além disso, estes metabólitos podem ser excelentes agentes redutores e estabilizadores na biossíntese de nanopartículas metálicas (NPMs). Sabe-se que a biossíntese de NPMs por vegetais normalmente é realizada pela combinação de biomoléculas como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, além de metabólitos secundários como flavonoides, taninos e terpenoides. Por envolver diversos compostos, a biorredução é um processo relativamente complexo e ainda pouco conhecido (AKTAR, 2013; MITTAL, 2013; IRAVANI, 2011).

Desta forma, diante do potencial botânico da Caatinga e considerando o potencial biológico e farmacológico pobremente explorado das espécies vegetais deste bioma, o presente estudo teve como objetivos principais realizar a caracterização química da espécie *Jatropha mollissima*, promover a biossíntese de nanopartículas de prata utilizando o seu extrato aquoso como agente de redução, bem como avaliar seu potencial antibacteriano e atividade citotóxica *in vitro*.

*Objetivos*



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Realizar o estudo fitoquímico de *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae) e obter nanopartículas de prata através de um método simples de síntese verde, além de avaliar suas atividades antibacteriana e citotóxica *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Realizar a caracterização química e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos obtidos a partir das folhas de *J. mollissima*;
- Determinar o potencial modulador de resistência a antimicrobianos de *J. mollissima*;
- Identificar os constituintes majoritários dos extratos de *J. mollissima* através das técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massas (CG-EM e LC-MS);
- Explorar um procedimento simples para a biossíntese verde de nanopartículas de prata, à temperatura ambiente, a partir da ação do extrato aquoso de *J. mollissima* como agente de redução;
- Caracterizar as nanopartículas de prata produzidas utilizando as técnicas de Espectroscopia no UV-visível (UV-vis), Potencial Zeta e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar o potencial terapêutico dos extratos de *J. mollissima* e das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde no combate a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância para a saúde pública através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM);
- Determinar a atividade citotóxica dos extratos de *J. mollissima* e das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde sobre linhagens de células tumorais.

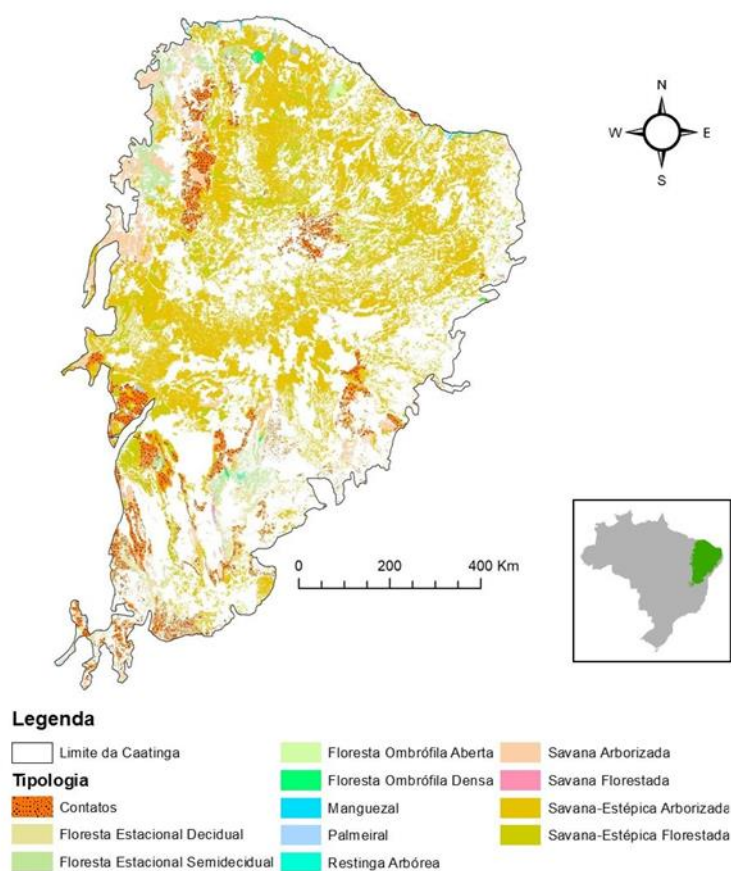
*Fundamentação*  
*teórica*

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Bioma Caatinga

A Caatinga está inserida na região semiárida do Brasil, no Nordeste, possuindo grande biodiversidade em sua fauna e flora, incluindo um número considerável de endemismos. É considerada a quarta maior formação vegetacional, caracterizada por espécies decíduas e abrange uma área que vai desde o estado do Piauí até o norte de Minas Gerais, ocupando 11% do território brasileiro (Figura 1). Suas características únicas a tornam um bioma exclusivo. Apesar disso, a Caatinga ainda é um tipo de vegetação constantemente negligenciada e pouco estudada cientificamente, sendo o seu potencial subestimado. Dessa maneira, os conhecimentos acerca de suas características e de sua importância permanecem incipientes (CARRIÓN et al., 2017; RIBEIRO et al., 2016; VIEIRA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2010; SILVA et al., 2004).

**Figura 1.** Área de ocorrência do bioma Caatinga.



Fonte: Sistema Nacional de Informações Florestais - SNIF (2018)

As condições ambientais e climáticas do bioma Caatinga são severas. A pluviosidade anual geralmente é baixa (250-750 mm), com chuvas torrenciais, temperaturas médias anuais altas (cerca de 27 °C) e umidade relativa do ar baixa, geralmente inferior a 50% (GANEM, 2017). Atualmente, sabe-se que existem cerca de 510 gêneros e 5344 espécies de plantas vasculares no bioma Caatinga, dentre os quais 18 gêneros e 318 espécies são endêmicos (SILVA et al., 2014).

Áreas de Caatinga sofreram uma forte influência humana durante séculos e a combinação do clima árido, típico da região, com as consequências derivadas de ações antrópicas, relacionadas principalmente à remoção de lenha nativa e ao estabelecimento de pastagens e campos agrícolas, ocasionou extrema degradação em grandes extensões do bioma, dando origem aos chamados núcleos de desertificação (ALTHOFF et al., 2018). Diante disso, o investimento em estudos científicos e elaboração de métodos de preservação da biodiversidade da Caatinga, além do desenvolvimento de estratégias sustentáveis e planos de prevenção ao desmatamento, são medidas que se fazem extremamente necessárias para sua conservação (SILVA et al., 2014; ALBUQUERQUE et al., 2005).

A exploração insustentável e em larga escala da Caatinga têm incentivado a criação e expansão de unidades de conservação no bioma. Em 2012, cerca de 7,5% da área coberta pela Caatinga foi protegida por iniciativas governamentais. Essas unidades destinam-se a proteger os ambientes naturais, garantindo que populações, habitats e ecossistemas significativos e ecologicamente viáveis sejam adequadamente representados no bioma (MMA, 2014).

De acordo com o Centro Nordestino de Informações sobre Plantas (CNIP), são conhecidas, até o momento, 1.041 espécies de angiospermas pertencentes ao bioma Caatinga. As leguminosas (plantas que normalmente apresentam frutos em forma de vagem) representam o maior número de espécies, com 40% das plantas conhecidas, seguidas das euforbiáceas (ALBUQUERQUE et al., 2010), tendo como exemplo *Jatropha mollissima*, conhecida popularmente como pinhão-bravo e planta utilizada como objeto de estudo no presente trabalho.

### **3.2 Plantas medicinais do bioma Caatinga e sua importância**

O conhecimento sobre a diversidade e a utilização sustentável da flora da Caatinga está comprometido pela perda gradual de sua biodiversidade. Esse bioma, de

características únicas, abriga espécies endêmicas e muitas apresentam um forte potencial medicinal, além de serem um celeiro para a prospecção de importantes substâncias bioativas. No entanto, a vasta exploração dos seus recursos, de forma inadequada, tem reduzido a população vegetal drasticamente, tornando-se cada vez mais necessário o planejamento e execução de ações prioritárias de conservação para o bioma, pois as que já existem cobrem menos de 8% do seu território. Em relação ao conhecimento das plantas medicinais da Caatinga, diversos estudos evidenciam a rica flora desse bioma, apontando os seus mais variados usos na medicina popular. Muitas espécies já são amplamente conhecidas e continuam sendo estudadas, principalmente por sua composição química e atividades biológicas significativas (CARTAXO, 2009; MELO-BATISTA e OLIVEIRA, 2014; MMA, 2014).

Galvão e colaboradores, em 2018, desenvolveram no Brasil um estudo com a espécie *Myracrodruon urundeuva*, pertencente à família Anacardiaceae e popularmente conhecida como aroeira. Esta planta é típica do bioma Caatinga e atualmente está em risco de extinção, devido à exploração indiscriminada de sua madeira, altamente resistente. No estudo, foi realizada a caracterização química da espécie e a avaliação de suas atividades anti-inflamatória, gastroprotetora e citotóxica, esta última *in vitro*. O extrato hidroalcoólico obtido a partir do caule, cascas e folhas foi caracterizado quimicamente através da técnica de cromatografia líquida de ultra-performance acoplada à espectrometria de massas (UPLC-ESI-QTOF-MS/MS). As atividades gastroprotetora e anti-inflamatória dos extratos (nas doses de 700 e 1000 mg/kg) foram avaliadas em lesões gástricas induzidas por etanol e edema de orelha induzido em ratos, respectivamente. Com a caracterização química foi possível detectar a presença de chalconas, flavonoides e taninos no extrato. A planta demonstrou um bom potencial citotóxico e atividades gastroprotetora e antiinflamatória significativas (GALVÃO et al., 2018).

Em 2017, o extrato dos frutos da espécie *Libidibia ferrea* (Pau-ferro; família Fabaceae) foi avaliado quanto à sua capacidade antiproliferativa, pois há algum tempo esta planta tem sido utilizada na medicina popular para prevenção do câncer. Para a realização dos testes, foi utilizada a linhagem de câncer colorretal humano HT29. Os resultados revelaram um alto potencial antiproliferativo com indução de apoptose e atividade de inibição tumoral. Além disso, *L. ferrea* revelou também possuir capacidade antioxidante e efeitos quimioprotetores em células saudáveis. Dessa forma, os autores demonstraram que *L. ferrea* possui efeito anticancerígeno significativo e pode ser

considerada uma candidata promissora para o tratamento do câncer colorretal (GUERRA et al., 2017).

Magalhães e colaboradores (2018) realizaram um estudo com a espécie *Mimosa tenuiflora*, endêmica do bioma Caatinga e popularmente conhecida como jurema preta. *M. tenuiflora* pertence à família Fabaceae e é utilizada na medicina popular principalmente contra bronquite, febre, dor de cabeça e inflamações. Para avaliar o efeito antinociceptivo orofacial desta espécie, os extratos etanólicos das folhas, ramos, cascas e raízes foram submetidos a testes *in vitro* de atividade antioxidante. Os extratos foram particionados e submetidos à prospecção química preliminar, GC-MS, dosagem de conteúdo fenólico e testes de citotoxicidade. A fração não tóxica com maior atividade antioxidante foi submetida a testes de nocicepção orofacial aguda e crônica e atividade locomotora. Utilizando camundongos nos testes *in vivo*, os pesquisadores observaram que a fração acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico das cascas de *M. tenuiflora*, foi a que apresentou maior potencial antioxidante e nenhuma toxicidade, sendo a benziloxiamina o seu principal constituinte (34,27%). Essa fração não alterou o sistema locomotor dos camundongos e reduziu significativamente o comportamento nociceptivo orofacial induzido por formalina, glutamato, capsaicina, cinamaldeído ou solução salina ácida em comparação ao grupo controle. Também inibiu a nocicepção temporomandibular induzida por formalina ou óleo de mostarda. Concluiu-se que *Mimosa tenuiflora* tem potencial farmacológico para o tratamento da dor orofacial aguda e neuropática (MAGALHÃES et al., 2018).

Outra espécie bastante conhecida no bioma Caatinga e amplamente utilizada na medicina popular é a umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*), também pertencente à família Fabaceae. Em 2017, foi realizado no Brasil um estudo para isolamento e caracterização estrutural de compostos fenólicos que foram detectados na resina de *A. cearensis* (16 isoflavonas, 11 flavanonois, 3 chalconas, 1 isoflavonolignana e 1 isoflavoquinona). A isoflavonolignana e a isoflavona foram identificados como compostos inéditos (OLIVEIRA et al., 2017).

Diante do exposto, pode-se perceber o vasto potencial químico e biológico da flora da Caatinga, necessitando, portanto, de maiores investimentos em pesquisas científicas que colaborem com a disseminação do conhecimento acerca deste bioma, contribuindo com sua preservação, uso sustentável e com a mitigação dos impactos ambientais, advindos principalmente de ações antrópicas.

### 3.3 Considerações sobre a família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae é considerada a quinta maior família do reino vegetal (Figura 2), englobando cerca de 8100 espécies (LASTRA e HENAO, 2009), que se subdividem em aproximadamente 317 gêneros e 5 subfamílias em todo o mundo. No Brasil sua distribuição é ampla, com espécies representantes da família presentes em todos os diferentes tipos de vegetação (SÁTIRO et al., 2008), sendo que a região Nordeste é considerada o grande centro de diversidade desta família no país. Estima-se que 240 espécies distribuídas em 50 gêneros, se encontram, em sua grande maioria, nas áreas de Caatinga, onde ocorre um grande número de endemismos (OLIVEIRA, 2013). É uma das famílias mais complexas da ordem Malpighiales e mostra uma morfologia altamente diversificada (FÉLIX-SILVA et al., 2018), sendo considerada também uma família muito antiga, com cerca de 60 milhões de anos (OPENSHAW, 2000).

**Figura 2.** Distribuição da família Euphorbiaceae no mundo.



Fonte: Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares

Os hábitos e as características morfológicas da família Euphorbiaceae são consideravelmente variáveis, impedindo, dessa forma, que se estabeleça um padrão geral de diagnóstico, embora esse detalhe eleve as perspectivas de pesquisas com relação à família (LASTRA e HENAO, 2009). O botânico francês Antoine Laurent de

Jussieu, em 1729, foi o primeiro a fazer descrição da família Euphorbiaceae, na obra *Genera Plantarum*, agrupando os gêneros por grau de semelhança.

Atualmente, a família Euphorbiaceae é caracterizada por possuir indivíduos com hábitos que variam do herbáceo ao arbóreo, às vezes cactiforme ou lianescente, com presença de látex (pode ser colorido, transparente ou leitoso) e indumento bastante variado, de ausente a composto por tricomas simples, malpighiáceos, escamiformes, dendríticos, estrelados, glandulares ou urticantes. As folhas possuem morfologia muito variada, podendo ser pecioladas ou sésseis, com estípulas inconspícuas, bem desenvolvidas ou ausentes. A filotaxia é geralmente alterna, mas podem ser encontradas espécies com folhas opostas ou, mais raramente, verticiladas. O limbo pode variar em forma (simples ou composto) e pode possuir margens que variam de inteira a variadamente serrada. Frequentemente é possível observar glândulas no ápice do pecíolo ou no limbo foliar. As inflorescências podem ser terminais e/ou axilares, tirsos ou, mais raramente, racemos. As flores são unissexuais (em espécies monoicas ou dioicas), geralmente actinomorfas, podendo ser aclamídeas, monoclamídeas ou, mais raramente, diclamídeas, e frequentemente portam nectários (disco nectarífero) (WEBSTER, 1994; SILVA, 2014).

As flores estaminadas podem possuir de um a vários estames, com filetes livres ou conados e anteras geralmente rimosas. O pólen na família em geral é tricolporado, mas também podem ser encontrados pólenes inaperturados com o padrão crotonoide. As flores pistiladas possuem ovário súpero, tricarpelar e trilocular, cada lóculo com apenas com um óvulo. Os estiletos podem ser inteiros ou variadamente ramificados, com regiões estigmáticas ou estigmas diferenciados. Os frutos, conhecidos como tricocas, são cápsulas com deiscência septicida e loculicida, na maioria das vezes em três mericarpos (cocas) bivalvados, com exocarpo que pode se apresentar de aparência lisa a variadamente ornamentado. Cada mericarpo porta apenas uma semente, com formato e ornamentação bastante variados, endosperma abundante, com um embrião reto e cotilédones achatados e amplos (WEBSTER, 1994; SILVA, 2014).

Entre os principais gêneros pertencentes à família Euphorbiaceae, ocupa posição de destaque o gênero *Jatropha* L. (5º lugar entre os gêneros mais representativos da família) que pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Jatropheae. Este é representado por cerca de 200 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da África e das Américas (FÉLIX-SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).



A família Euphorbiaceae é conhecida por suas espécies possuírem um grande potencial químico e biológico, além da sua importância etnobotânica e taxonômica. Diversos estudos no mundo inteiro têm sido realizados a cada ano, demonstrando a importância desta família (SECCO, 2005). A Tabela 1 lista vinte e duas publicações relevantes com espécies da família Euphorbiaceae estudadas no ano de 2018 quanto ao seu potencial químico (moléculas isoladas e identificadas) e biológico (atividades bioativas).

**Tabela 1.** Potencial químico e biológico de espécies da família Euphorbiaceae estudadas no ano de 2018 (Janeiro a Julho).

Espécie	Origem (parte usada)	Molécula isolada	Classe	Atividade biológica	Referência
<i>Manniophyton fulvum</i>	Camarões (ramos)	3 $\alpha$ ,28-dihidroxifriedelan-1-ona; maniotaraxerol A e maniotaraxerol B	Triterpeno	Ativ. citotóxica	Mbeunkeu et al., 2018
<i>Croton anisodontus</i>	Brasil (cascas do caule)	2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona	Acetofenona	Ativ. antimicrobiana	Santiago et al., 2018
<i>Croton campestris</i>	Brasil (óleo essencial)	$\beta$ -cariofileno	Sesquiterpeno	Ativ. anti-inflamatória e anti-edematogênica	Oliveira-Tintino et al., 2018
<i>Euphorbia pterococca</i>	Argélia (partes aéreas e raízes)	Cicloartenil-2'E,4'E-decadienoato; Cicloartenil-2'E,4'Z-decadienoato; 24-metilenocicloartenil-2'E,4'Z-tetradecadienoato e 24-oxo-29-norcicloartanil-2'E,4'Z-hexadecadienoato	Triterpeno	Ativ. citotóxica e efeito tripanocida	Benabdelaziz et al., 2018
<i>Croton crassifolius</i>	China (raízes)	Cracosons D-H	Diterpeno	Ativ. citotóxica	Qiu et al., 2018
<i>Euphorbia helioscopia</i>	China (partes aéreas)	Eufelionolida A-N, 16-epi-18-hidroxi-abeokutona, Eufeliotriol A e B	Diterpeno	Ativ. citotóxica	Wang et al., 2018
<i>Ricinus communis</i>	Paquistão (planta inteira)	Ricinusóideo A e Ricinusóideo B	Sesquiterpeno	Ativ. sedativa e antinociceptiva	Farooq et al., 2018
<i>Euphorbia nicaeensis</i>	Sérvia (látex)	Nicaeenina A-G	Diterpeno	Modulação da resistência	Krstić et al., 2018
<i>Macaranga trichocarpa</i>	Indonésia (folhas)	4'-O-metilmacagigantina e macatricocarpina H	Flavonoide/ estilbeno	Ativ. citotóxica	Tanjung et al., 2018
<i>Euphorbia neriifolia</i>	China (cascas do caule)	Euforantinas S-T e Euforneroides A-D	Diterpeno	Ativ. anti-HIV	Yan et al., 2018
<i>Trigonostemon thyrsoideus</i>	China (folhas)	Tirsoidepenos B-G	Diterpeno	Ativ. inibitória do óxido nítrico	Liu et al., 2018

<i>Euphorbia ebracteolata</i>	China (raízes)	H-1,6-tigliadieno-3,13-diona	Diterpeno	Ativ. inibitória da enzima carboxilesterase	Wang et al., 2018
<i>Euphorbia characias</i>	Turquia (partes aéreas)	Quercetina-3-O-ramnosídeo; quercetina-3-O-galactosídeo e quercetina-3-O-arabinosídeo	Flavonoide glicosilado	Ativ. cicatrizante e anti-inflamatória	Özbilgin et al., 2018
<i>Macaranga pustulata</i>	China (galhos)	Deheiculatina M, N e O	Diterpeno	Ativ. citotóxica	Luo et al., 2018
<i>Jatropha multifida</i>	China (caule)	Jatromultonas A - I	Diterpeno	Ativ. citotóxica	Zang et al., 2018
<i>Trigonostemon howii</i>	China (caule e folhas)	Trigonohowino	Derivado do tetraidrofurano	Ativ. anti-HIV	Liu et al., 2018
<i>Phyllanthus glaucus</i>	China (raízes)	Filanglina A-C	Diterpeno	Ativ. anti-inflamatória	Wu et al., 2018
<i>Euphorbia ebracteolata</i>	China (raízes)	Ebractenoides O-S	Diterpeno	Ativ. anti-tuberculose	Yu et al., 2018
<i>Trigonostemon reidioides</i>	Tailândia (raízes)	Trigonoreidon B	Diterpeno	Ativ. anti-inflamatória	Utaipan et al., 2018
<i>Euphorbia helioscopia</i>	China (partes aéreas)	Euforbatrines A-G	Triterpeno	Ativ. citotóxica	Li et al., 2018
<i>Euphorbia helioscopia</i>	China (planta inteira)	Helioscopianoides A-Q	Diterpeno	Ativ. neuroproteroa	Mai et al., 2018
<i>Euphorbia helioscopia</i>	China (partes aéreas)	Euforpina A-F	Diterpeno	Atividade hipoglicemiante	Li et al., 2018

Fonte: Autoria própria.

Diante do exposto, pode-se perceber que a família Euphorbiaceae é complexa e muito diversificada, tornando-se necessária a realização de estudos multidisciplinares que versem sobre suas características químicas, propriedades biológicas, importância etnobotânica e sobre sua taxonomia, pois, apesar de a família ser amplamente distribuída no mundo, muitas espécies ainda não foram estudadas, inclusive espécies medicinais, que não foram sequer catalogadas. Dessa maneira, estes estudos irão contribuir com a ampliação do conhecimento sobre a família e sobre seu potencial, abrindo um leque de possibilidades em diversas áreas (TRINDADE e LAMEIRA, 2014).

### 3.4 Gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* L. pertence à família Euphorbiaceae e atualmente possui cerca de 175 espécies descritas. Originou-se na América tropical e atualmente distribuiu-se ao longo de todo o território da Ásia e da África (MONIRUZZAMAN et al., 2016) (Figura 3, página 35). O nome "*Jatropha*" é derivado das palavras gregas "*jatros*", que significa "médico" e "*trophe*", que significa "comida", expressões que também estão associadas aos seus usos medicinais (JONATHAN et al., 2012).

O gênero *Jatropha* é morfologicamente diverso e apresenta importância econômica, etnobotânica e etnofarmacológica. Várias de suas espécies têm sido objeto importante de estudo, sendo relatadas ao longo dos anos no que concerne aos seus usos medicinais, constituintes químicos e atividades biológicas. Como exemplos, podemos citar *Jatropha curcas* (THAKRE e BHATT, 2017), *Jatropha gossypifolia* (PAPALIA et al., 2017), *Jatropha tanjorensis* (SHOJI et al., 2017), *Jatropha neopauciflora* (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017), *Jatropha multifida* (ZHANG et al., 2018), *Jatropha mollissima* (FÉLIX-SILVA et al., 2018; SERRANO-GALLARDO et al., 2017), dentre outras.

**Figura 3.** Ocorrência do gênero *Jatropha* no mundo.



Fonte: LAVIOLA et al., 2017

Na indústria energética, o gênero *Jatropha* se destaca com relação à produção de biodiesel como uma importante fonte renovável de energia. A espécie *Jatropha curcas* é a mais estudada do gênero nesse sentido, pelo fato de suas sementes serem ricas em óleo, que tem sido o principal objeto de estudo nas pesquisas relacionadas ao biodiesel. O óleo de *J. curcas* possui as qualidades adequadas para uso na produção de biodiesel, tais como baixa acidez, boa estabilidade à oxidação em comparação ao óleo da soja, e menor viscosidade que o óleo da mamona. Diversos trabalhos reportam a importância

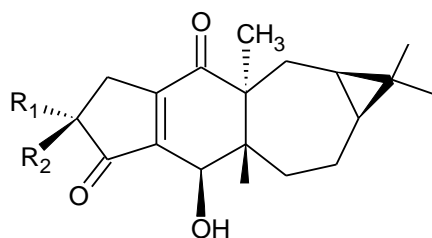
econômica de espécies do gênero *Jatropha* como biocombustível, sendo este considerado uma alternativa sustentável que contribui com a preservação ambiental (KAMEL et al., 2018; GONZÁLES, 2012).

Em virtude da importância do gênero, diversos estudos no mundo todo também têm sido realizados com o objetivo de se conhecer o perfil químico das espécies de *Jatropha*, contribuindo com a sistemática do gênero e buscando compreender a relação entre as possíveis atividades biológicas já conhecidas e seus constituintes químicos, também objetivando elucidar possíveis mecanismos de ação. Dentre as diversas classes de moléculas químicas já identificadas no gênero *Jatropha* - oriundas do metabolismo secundário das plantas que o compõe - os terpenos ocupam posição de destaque, sendo os diterpenos a classe com o maior número de moléculas já isoladas, identificadas e testadas.

Os diterpenos são moléculas formadas pela união de quatro unidades isoprênicas (C<sub>5</sub>), possuindo, portanto, vinte carbonos na constituição de seu esqueleto básico. São provenientes de uma unidade de geranylgeranyl difosfato (GGPP – precursor direto de todos os diterpenos) e, apesar de serem constituintes típicos de plantas e fungos, esta classe de terpenos também pode ser sintetizada por algumas espécies de organismos marinhos e insetos. Certos tipos de enzimas são responsáveis por reações de ciclização do GGPP, promovendo rearranjos moleculares que podem levar aos mais variados núcleos diterpênicos, tais como: cauranos, traquilobanos, beieranos e atisanos (BARBOSA e VEGA, 2017).

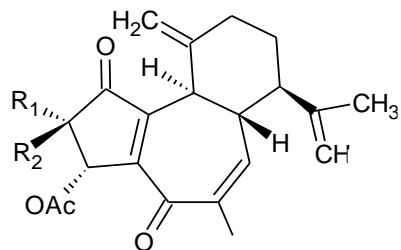
Em estudo recente, realizado na China por Zhang e colaboradores (2018), foram isolados e identificados nove diterpenos macrocíclicos inéditos, oriundos da fase acetato de etila obtida através da partição do extrato etanólico bruto do caule da espécie *Jatropha multifida*. As estruturas dos novos compostos, denominados Jatromultonas A, B, C, D, E, F, G, H e I (Figura 4, página 37), inclusive suas configurações absolutas, foram elucidadas pela combinação de análises espectroscópicas com os resultados da difração de raios X e observação das correlações químicas.

**Figura 4.** Estruturas químicas dos compostos Jatromultona A-I isolados de *J. multifida*.



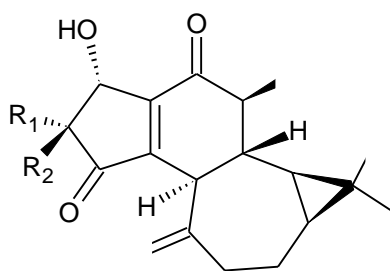
Jatromultona A:  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

Jatromultona B:  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{OH}$



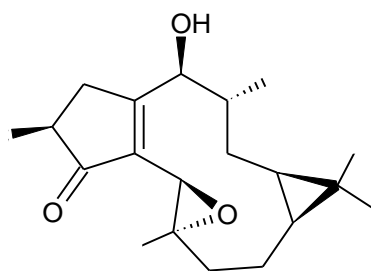
Jatromultona C:  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

Jatromultona D:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

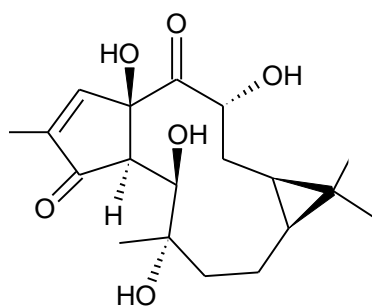


Jatromultona E:  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

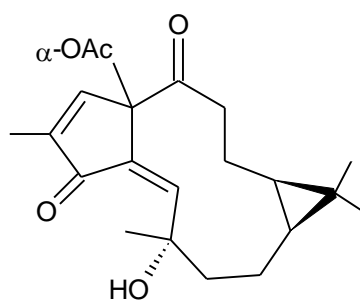
Jatromultona F:  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$



Jatromultona G



Jatromultona H



Jatromultona I

Todos os compostos foram investigados quanto à sua capacidade antiproliferativa (atividade citotóxica) frente a cinco linhagens celulares de câncer humano (A549, HELA, HEPG2, MDAMB231, HEPG2/DOX), incluindo uma linhagem resistente aos fármacos atualmente disponíveis. Dos nove compostos, sete apresentaram atividade citotóxica significativa. Este trabalho atual é mais um a demonstrar a importância do gênero *Jatropha* e a destacar a presença dos diterpenos na composição química de suas espécies, sendo estes responsáveis por atividades biológicas muito interessantes.

Para fins de conhecimento, a Tabela 2 detalha o número de moléculas da classe dos diterpenos identificadas no gênero *Jatropha* ao longo dos anos, desde o primeiro trabalho publicado (em 1979) até o final do ano de 2018, destacando em quais espécies estas moléculas foram encontradas, onde o estudo foi desenvolvido e qual parte da planta foi utilizada no trabalho, indicando também se a molécula foi ou não testada para alguma atividade biológica e a referência do estudo.

**Tabela 2.** Diterpenos isolados e identificados no gênero *Jatropha* e atividades biológicas.

Nº e nome	Espécie	Origem (parte usada)	Atividade Biológica	Referência
1 Jatrogrossidiona	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (casca de raiz)	Não avaliada	Jakupovic et al., 1988
	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
2 2- <i>epi</i> - jatrogrossidiona	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (casca de raiz)	Não avaliada	Jakupovic et al., 1988
3 Caniojano	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (casca de raiz)	Não avaliada	Jakupovic et al., 1988
4 1,11- bisepticariojano	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (casca de raiz)	Não avaliada	Jakupovic et al., 1988
5 Jatrogrossidion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004
	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2012
6 Isojatrogrossidion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004
	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2012
7 2- <i>epi</i> - hidroxiiisojatro grossidion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda- Hirschmann et al., 2012

	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004
<b>8</b> 2-hidroxiisojatrogrossidion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda-Hirschmann et al., 2012
	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>9</b> 2- <i>epi</i> -isojatrogrossidion	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004
<b>10</b> Jatrophalactona	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2012
<b>11</b> Jatrophalona	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2012
<b>12</b> Jatrophadiquetona	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2012
<b>13</b> <i>Epi</i> -isojatrogrossidiona	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004
<b>14</b> 1,5-dioxo-2,3-dihidroxiramnofola-4(10),6,11(18),15-tetraeno	<i>J. integerrima</i>	Tailândia (raízes)	Ativ. antiplasmodial, citotóxica e antimicrobiana	García et al., 2006
<b>15</b> Curcusona A	<i>J. curcas</i>	Tailândia (raízes)	Não avaliada	Naengchomnong et al., 1986
	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>16</b> Curcusona B	<i>J. curcas</i>	Tailândia (raízes)	Não avaliada	Naengchomnong et al., 1986
	<i>J. gossypifolia</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
	<i>J. gossypifolia</i>	Tailândia (não informada)	Efeito anti-metastático	Muangman et al., 2005
	<i>J. gossypifolia</i>	Indonésia (casca do caule)	Ativ. antiproliferativa	Sahidin et al., 2013
<b>17</b> Curcusona C	<i>J. curcas</i>	Tailândia (raízes)	Não avaliada	Naengchomnong et al., 1986
	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Não avaliada	Yang et al., 2013
	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>18</b> Curcusona D	<i>J. curcas</i>	Tailândia (raízes)	Não avaliada	Naengchomnong et al., 1986
	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Não avaliada	Yang et al., 2013
	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>19</b> 3-dehidroxi-2- <i>epi</i> -caniojano	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>20</b> Curcusona E	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>21</b> Curcusona F	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>22</b> Curcusona G	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>23</b> Curcusona H	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>24</b> Curcusona I	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>25</b> Curcusona J	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>26</b> 4- <i>epi</i> -curcusona E	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2013
<b>27</b> 2-hidroxi-3-	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Não avaliada	Yang et al., 2013

dehidroxicaniojano				
<b>28</b> 4E-jatrogrossidentadion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda-Hirschmann et al., 2012
<b>29</b> 15- <i>epi</i> -4E-jatrogrossidentadion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda-Hirschmann et al., 2012
	<i>J. podagrica</i>	China (folhas)	Ativ. citotóxica e Antimicrobiana	Liu et al., 2014
<b>30</b> 4Z-jatrogrossidentadion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda-Hirschmann et al., 2012
<b>31</b> 15- <i>epi</i> -4Z-jatrogrossidentadion	<i>J. grossidentata</i>	Paraguai (raízes)	Não avaliada	Schmeda-Hirschmann et al., 2012
<b>32</b> Japodagrina	<i>J. podagrica</i>	Nigéria (raízes)	Ativ. antibacteriana	Aiyelaagbe et al., 2007
<b>33</b> Multifolona	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Não avaliada	Das et al., 2008
<b>34</b> (4E)-jatrogrossidentadiona acetato	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Não avaliada	Das et al., 2008
<b>35</b> Multidiona	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Não avaliada	Das et al. 2009 a
	<i>J. multifida</i>	India (caule)	Não avaliada	Das et al., 2009 a
<b>36</b> Multifidanol	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Não avaliada	Kanth et al., 2011
<b>37</b> Multifidenol	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Ativ. citotóxica e Antimicrobiana	Kanth et al., 2011
<b>38</b> Jatrowediol	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
	<i>J. weddelliana</i>	Brasil (caule)	Não avaliada	Brum et al., 2001
<b>39</b> Jatrowediona	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Ativ. citotóxica	Brum et al., 1999
<b>40</b> Multifidona	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Ativ. citotóxica	Das et al., 2009
<b>41</b> 14-deoxi-1 $\beta$ -hidroxi-4(4E)-jatrogrossidentadiona	<i>J. multifida</i>	Nigéria (cascas do caule)	Ativ. antileishmania, antimicrobiana e antimalária	Falodun et al., 2014
<b>42</b> 15-deoxi-1 $\beta$ -hidroxi-4(4E)-jatrogrossidentadiona	<i>J. multifida</i>	Nigéria (cascas do caule)	Ativ. antileishmania, antimicrobiana e antimalária	Falodun et al., 2014
	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>43</b> Jatrocursenona A	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>44</b> Jatrocursenona B	<i>J. curcas</i> cv. <i>Nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>45</b> Jatrocursenona C	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>46</b> Jatrocursenona D	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
<b>47</b> Jatrocursenona E	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015



48 A	Japodagriconona	<i>J. podagrica</i>	China (folhas)	Ativ. citotóxica e Antimicrobiana	Liu et al., 2015
49 B	Japodagriconona	<i>J. podagrica</i>	China (folhas)	Ativ. citotóxica e antimicrobiana	Liu et al., 2015
50	Jatrontelona A	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
51	Jatrontelona B	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
52	Jatrontelona C	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
53	Jatrontelona D	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
54	Jatrontelona E	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
55	Jatrontelona F	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
56	Jatrontelona G	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
57	Jatrontelona H	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
58	Jatrontelona I	<i>J. integerrima</i>	China (caule)	Não avaliada	Zhu et al., 2015
59	<i>Jatropha</i> fator C <sub>1</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Haas et al., 2002
60	<i>Jatropha</i> fator C <sub>2</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Roach et al., 2012
61	<i>Jatropha</i> fator C <sub>3</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Roach et al., 2012
62	<i>Jatropha</i> fator C <sub>4</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Roach et al., 2012
63	<i>Jatropha</i> fator C <sub>5</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Roach et al., 2012
64	<i>Jatropha</i> fator C <sub>6</sub>	<i>J. curcas</i>	Áustria (sementes)	Não avaliada	Haas et al., 2002
		<i>J. curcas</i>	Índia (sementes)	Ativ. molusciscida	Roach et al., 2012
65	Hidroxijatrofona	<i>J. ribifolia</i>	Brasil (caule e raízes)	Não avaliada	Batista et al., 2014
66	Jatrofenona	<i>J. gossypifolia</i>	Índia (pó da planta)	Ativ. antibacteriana	Ravindranath et al., 2003
67	Jatrofona	<i>J. isabellei</i>	Paraguai (rizoma)	Ativ. citotóxica e efeito gastroprotetor	Pertino et al., 2007
		<i>J. gossypifolia</i>	Indonésia (casca do caule)	Ativ. citotóxica	Sahidin et al., 2013
		<i>J. podagrica</i>	Nigéria (raízes)	Ativ. antibacteriana	Aiyelaagbe et al., 2007
		<i>J. isabellei</i>	Estados Unidos (raízes)	Ativ. antimalárica	Hadi et al., 2013
		<i>J. ribifolia</i>	Brasil (raízes)	Ativ. citotóxica	Fernandes et al., 2013

<b>68</b> Japodagrone	<i>J. podagrica</i>	Nigéria (raízes)	Ativ. antibacteriana	Aiyelaagbe et al., 2007
<b>69</b> 9 $\beta$ ,13 $\alpha$ - dihidroxiisabelione	<i>J. isabellei</i>	Chile (rizoma)	Ativ. citotóxica e efeito gastroprotetor	Pertino et al., 2007
<b>70</b> 15- <i>O</i> -acetil japodagrone	<i>J. multifida</i>	Índia (caule)	Não avaliada	Das et al., 2009
<b>71</b> Jatrolona A	<i>J. gossypifolia</i>	Índia (raízes)	Não avaliada	Purushothaman e Chandrasekharan, 1979
	<i>J. isabellei</i>	Paraguai (rizoma)	Ativ. citotóxica e efeito gastroprotetor	Pertino et al., 2007
	<i>J. isabellei</i>	Estados Unidos (não informada)	Ativ. antimalárica e citotóxica	Hadi et al., 2013
	<i>J. gossypifolia</i>	Indonésia (casca do caule)	Ativ. citotóxica	Sahidin et al., 2013
<b>72</b> Jatrolona B	<i>J. isabellei</i>	Paraguai (rizoma)	Ativ. citotóxica e efeito gastroprotetor	Pertino et al., 2007
	<i>J. isabellei</i>	Estados Unidos (não informada)	Ativ. antimalárica e citotóxica	Hadi et al., 2013
	<i>J. gossypifolia</i>	Índia (raízes)	Não avaliada	Purushothaman e Chandrasekharan, 1979
	<i>J. dioica</i>	México (raízes)	Não avaliada	Burgueño-Tapia et al., 2017
<b>73</b> 2 $\alpha$ - hidroxijatrolona	<i>J. integerrima</i>	Tailândia (raízes)	Ativ. antiplasmodial, citotóxica e antimicrobiana	Sutthivaiyakit et al., 2009
<b>74</b> 2 $\beta$ - hidroxijatrolona	<i>J. integerrima</i>	Tailândia (raízes)	Ativ. antiplasmodial, citotóxica e antimicrobiana	Sutthivaiyakit et al., 2009
<b>75</b> <i>epi</i> -jatrolol	<i>J. curcas</i>	China (cascas de raiz)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2012
<b>76</b> Jatrolaldeido	<i>J. curcas</i>	China (cascas de raiz)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2012
<b>77</b> <i>epi</i> -jatrolaldeido	<i>J. curcas</i>	China (cascas de raiz)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2012
<b>78</b> 3 $\beta$ -Acetoxi-12- metoxi-13-metil- podocarpa-8,11,13- trieno-7-ona	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004 b
<b>79</b> 3 $\beta$ -12-hidroxi-13- metil-podocarpa- 8,10,13-trieno	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004 b
<b>80</b> Jatromulona A	<i>J. multifida</i>	China (folhas e caule)	Ativ. inibitória da TrxR	Zhu et al., 2017
<b>81</b> Espruceanol	<i>J. divaricata</i>	Jamaica (partes aéreas)	Não avaliada	Denton et al., 2001
<b>82</b> Clestantol	<i>J. divaricata</i>	Jamaica (partes aéreas)	Não avaliada	Denton et al., 2001
<b>83</b> ent-3 $\beta$ ,14 $\alpha$ - hidroxipimara- 7,9(11),15-trieno-12- ona	<i>J. divaricata</i>	Jamaica (partes aéreas)	Não avaliada	Denton et al., 2001
<b>84</b> ent- 15(13 $\rightarrow$ 8)abeo-	<i>J. divaricata</i>	Jamaica (partes aéreas)	Não avaliada	Denton et al., 2001

8β(etil)-pimarano					
85	Jatrocurcadiona A	<i>J. curcas</i>	China (galhos)	Ativ. antioxidante	Bao et al., 2015
86	Jatrocurcadiona B	<i>J. curcas</i>	China (galhos)	Ativ. antioxidante	Bao et al., 2015
87	Latiranlactona	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
88	Jatrophodiona A	<i>J. multifida</i>	China (folhas e caule)	Ativ. inibitória da TrxR	Zhu et al., 2017
89	Jatrophodiona B	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
90	Jatrophodiona C	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
91	Jatrophodiona D	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
92	Jatrophodiona E	<i>J. curcas</i> cv. <i>nigroviensrugosus</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Liu et al., 2015
93	Jatrophalactam	<i>J. curcas</i>	China (raízes)	Ativ. citotóxica	Whang et al., 2009
94	Heudelotinona	<i>J. curcas</i>	Índia (partes aéreas)	Não avaliada	Ravindranath et al., 2004 b
		<i>J. multifida</i>	China (folhas e caule)	Ativ. inibitória da TrxR	Zhu et al., 2017
95	Riolozatriona	<i>J. dioica</i> var. <i>sessiliflora</i>	México (raízes)	Ativ. antibacteriana	Dominguez et al., 1980
96	6- <i>epi</i> -riolozatriona	<i>J. dioica</i>	México (raízes)	Ativ. citotóxica	Melchor-Martínez et al., 2017
97	Jatromultona A	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
98	Jatromultona B	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
99	Jatromultona C	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
100	Jatromultona D	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
101	Jatromultona E	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
102	Jatromultona F	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
103	Jatromultona G	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
104	Jatromultona H	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018
105	Jatromultona I	<i>J. multifida</i>	China (caule)	Ativ. citotóxica	Zhang et al., 2018

Fonte: Autoria própria.

### 3.5 Considerações sobre a espécie *Jatropha mollissima*

*Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill., conhecida popularmente como pinhão bravo, é uma planta arbustiva da família Euphorbiaceae, endêmica do bioma Caatinga e amplamente distribuída no semiárido brasileiro. A casca do seu caule é lisa e em tons de dourado, desprendendo-se em finas lâminas horizontais. Os ramos são suculentos e moles. As folhas constituem-se de cinco lobos (pontas) com margens denteadas e longos pecíolos. As flores masculinas são vermelhas, possuindo pólen e néctar, e as femininas alvo-amareladas, possuindo apenas néctar. O fruto (3 cm), quando verde, possui seis quinhas e, após secar, tem deiscência explosiva (explode ao liberar as três

sementes, processo conhecido como autocoria). O látex geralmente é empregado no tratamento de úlceras e contra picadas de cobra.

Há relatos de que o látex e as folhas têm efeito cicatrizante, sendo usados na medicina popular para tratar ferimentos. Ainda na medicina popular, as folhas são descritas como antirreumáticas e o óleo extraído das suas sementes tem uso veterinário, como purgante, e é empregado na fabricação de sabões, tintas, iluminação e como lubrificante e combustível (biodiesel). Nas raízes foram identificadas substâncias eficazes no tratamento de tumores e leucemia (CASTRO e CAVALCANTE, 2011).

Vasconcelos et al. (2014) e Leal e Agra (2005) realizaram estudos para caracterização morfológica de *J. mollissima*, com o objetivo principal de compreender os mecanismos de desenvolvimento e crescimento da espécie, verificando possíveis padrões morfológicos e anatômicos comuns entre táxons, promovendo correta interpretação e classificação dos mesmos e fornecendo subsídios para colaborar com a solução de problemas na identificação de determinadas espécies. Foram realizadas descrições, ilustrações e morfodiagnoses macroscópicas, analisando diversos aspectos morfológicos em diferentes fases do desenvolvimento da planta. Por fim, os autores concluíram que a espécie apresenta um padrão característico das plantas pertencentes à família Euphorbiaceae (Figuras 5-8).

*Jatropha mollissima* é comumente encontrada em vários estados brasileiros e em áreas semiáridas se revestem de elevada importância, principalmente pelas possibilidades de fácil cultivo, adaptação a solos pouco férteis e degradados e pela tolerância à seca (QUEIROZ et al, 2013). Diversas localidades do interior do Nordeste têm o nome pinhão ou pinhões, atestando também a importância cultural desta planta (CASTRO e CAVALCANTE, 2011).

**Figura 5.** *Jatropha mollissima* - Inflorescência



**Figura 6.** *Jatropha mollissima* - Planta inteira



Fonte: Autoria própria.



**Figura 7.** *Jatropha mollissima* - Folha



**Figura 8.** *Jatropha mollissima* - Fruto



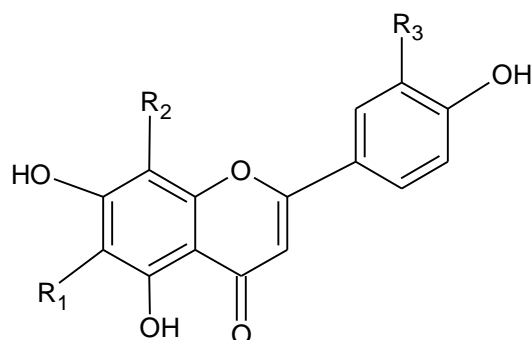
Fonte: Aatoria própria.

*Jatropha mollissima* é uma planta pouco estudada cientificamente e são relativamente poucos os trabalhos na literatura que versam sobre sua importância etnobotânica, química e biológica. No entanto, estudos importantes já realizados demonstram que esta espécie possui efeito antibacteriano (ROCHA e DANTAS 2009), anti-helmíntico (RIBEIRO et al., 2014), antioxidante (MELO et al. 2010), atividade citotóxica (MELO et al. 2010), atividade anti-inflamatória (LYRA et al., 2011) e efeito antifídico, sendo utilizada como tratamento contra picadas de cobra tanto em seres humanos quanto em animais (GOMES et al., 2016).

Em estudo recente, realizado no Brasil por Félix-Silva e colaboradores (2018), foi feita uma comparação entre as espécies *Jatropha mollissima* e *Jatropha gossypifolia* em relação à capacidade de inibição de edemas (atividade edematogênica) em locais atingidos pelo veneno da espécie de cobra *Bothrops erythromelas*, além de avaliar o perfil químico das duas espécies. O objeto de estudo foi o extrato aquoso obtido a partir das folhas de ambas as espécies e, para a realização dos testes, foram utilizados camundongos albinos Swiss. A atividade edematogênica foi avaliada a partir dos resultados do ensaio de indução de edema de pata, onde a dose do veneno de *Bothrops erythromelas* foi escolhida com base em ensaios-piloto. A espessura individual da pata traseira direita foi medida imediatamente antes da injeção de veneno (valor basal) e em intervalos de tempo selecionados após a indução do edema (15, 30, 60, 90 e 120 min). O tamanho do edema foi expresso como a diferença entre a espessura da pata depois e antes (valores basais) da injeção do veneno. Um grupo de animais recebeu apenas uma injeção subplantar de PBS (solução tampão) e foi utilizado como controle negativo. Os autores concluíram que a dose utilizada induziu significativamente o edema da pata sem produzir hemorragia (FÉLIX-SILVA et al., 2018).

Ainda neste trabalho, foi realizado também um estudo fitoquímico preliminar (triagem fitoquímica), buscando detectar, através de ensaios colorimétricos, as principais classes químicas presente nos extratos das duas espécies. As análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), usando diferentes reagentes, sugeriram a presença de alcaloides, compostos fenólicos, esteroides e/ou terpenoides, flavonoides e taninos em *J. gossypifolia*, e compostos fenólicos, flavonoides e saponinas em *J. mollissima*. Os extratos também foram submetidos à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde foi possível identificar quatro flavonoides em comum nas duas espécies (Figura 9).

**Figura 9.** Estrutura química dos flavonoides em comum nos extratos aquosos de *J. gossypifolia* e *J. mollissima* detectados através da análise por CLAE-DAD.



Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Isoorientina	Glc	H	OH
Orientina	H	Glc	OH
Vitexina	H	Glc	H
Isovitexina	Glc	H	H

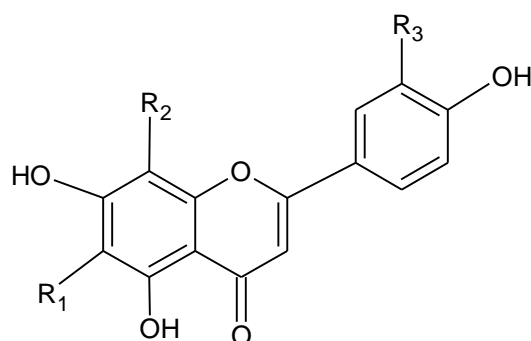
Como resultado do trabalho, ficou demonstrado que as duas espécies possuem atividade antiedematogênica significativa, sendo seus efeitos muito semelhantes aos da dexametasona, um fármaco com atividade anti-inflamatória e antialérgica. Com relação à *J. mollissima*, o melhor resultado de inibição dos edemas foi detectado no grupo de animais que recebeu o tratamento via oral (o efeito foi semelhante ao do fármaco dexametasona), enquanto que em *J. gossypifolia* o melhor resultado foi observado pela via de administração intraperitoneal, sendo o seu efeito, inclusive, mais eficaz que o efeito da dexametasona.

Em 2016, *J. mollissima* já havia sido estudada quanto à sua atividade inibitória contra venenos de cobra, demonstrando atividade significativa especialmente contra venenos de espécies do gênero *Bothrops*. Em estudo realizado no Brasil por Gomes e colaboradores, parâmetros como hemorragia cutânea, edema local, migração de leucócitos e miotoxicidade foram analisados, demonstrando uma inibição significativa destes pelo extrato aquoso das folhas. Foi realizado um estudo fitoquímico preliminar desse extrato, sendo possível detectar a presença de flavonoides pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Seis flavonoides foram posteriormente identificados pela técnica de CLAE-DAD acoplada à espectrometria de massas (Figura 10).



Semelhante ao estudo de Félix-Silva (2018), foram utilizados nas análises camundongos albinos Swiss, com idades entre 6 e 8 semanas, de ambos os sexos, pesando de 30 a 35 gramas. O extrato aquoso foi administrado em concentrações entre 50 e 200 mg/kg, sendo administrados pela via intraperitoneal. Testes de inibição de hemorragia local, indução de edema de pata, inibição de migração celular e inibição da atividade miotóxica foram realizados. Os resultados obtidos demonstraram que *J. mollissima* possui potencial inibitório significativo contra efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca*. Os parâmetros de hemorragia cutânea local, edema local, migração de leucócitos e miotoxicidade foram significativamente inibidos pelo extrato. Estes resultados demonstram que o extrato de *J. mollissima* possui alto potencial inibitório, especialmente contra venenos botrópicos, sugerindo sua utilização como adjuvante no tratamento de acidentes ofídicos.

**Figura 10.** Estrutura química dos flavonoides encontrados no extrato aquoso de *J. mollissima* detectados através da análise por CLAE-DAD-MS/MS.



Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Isoschaftosida	Arab	Glc	H
Schaftosida	Glc	Arab	H
Isoorientina	Glc	H	OH
Orientina	H	Glc	OH
Vitexina	H	Glc	H
Isovitexina	Glc	H	H

Com o potencial do extrato das folhas já observado e comprovado através de estudos recentemente realizados, há ainda relatos na medicina popular de que o látex de

*J. mollissima* também é utilizado contra venenos de cobra, além de possuir efeito cicatrizante, anti-hemorrágico e até mesmo contra doenças causadas por carrapatos. A planta produz uma grande quantidade de látex, que é atóxico, de aspecto leitoso, com coloração que varia entre o branco e o amarelado (CAMELO, 2015).

### **3.6 Química de plantas medicinais e a aplicação de técnicas hifenadas**

As plantas em geral representam uma importante fonte de compostos bioativos com atividades biológicas interessantes e, por estarem disponíveis em abundância (COSTA-LOTUFO et al., 2010), oferecem ótimas possibilidades para se encontrar substâncias de interesse terapêutico. Nesse sentido, é muito importante que os extratos brutos sejam submetidos à triagem química e biológica, para que se possa traçar o perfil metabólico destes extratos. No entanto, esta é uma tarefa difícil de ser realizada, pois as plantas comportam uma imensa variedade de constituintes químicos, com diversas estruturas químicas presentes. Sendo assim, novas estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso das chamadas ‘técnicas hifenadas’, possibilitando o estudo dos extratos vegetais e a busca por substâncias inéditas e/ou de valor agregado (substâncias bioativas), sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos, de ampla ocorrência e em quantidades mínimas (RODRIGUES et al., 2006).

Nos últimos anos, as técnicas hifenadas vêm sendo consideradas o principal meio para resolver problemas analíticos complexos. A combinação de tecnologias de separação com técnicas espectroscópicas tem sido demonstrada ao longo dos anos em análises quantitativas e qualitativas de compostos desconhecidos, em extratos ou frações de produtos naturais complexos (JOSHI et al., 2012). O termo ‘técnicas hifenadas’ refere-se à combinação de duas ou mais técnicas analíticas, usadas para detectar e separar substâncias químicas de soluções, com o objetivo de se obter uma ferramenta de análise mais eficiente, sensível e rápida do que as técnicas não combinadas. As técnicas analíticas mais empregadas na análise de produtos naturais são a cromatografia (cromatografia líquida e cromatografia gasosa), espectroscopia no ultravioleta (UV), espectroscopia no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) (RODRIGUES et al., 2006). O Quadro 1 lista as principais técnicas hifenadas adotadas na química de produtos naturais, bem como suas características e principais aplicações.

**Quadro 1** - Aplicações de técnicas hifenadas na área de produtos naturais.

<b>Técnicas hifenadas</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos de aplicações na área de produtos naturais</b>
<b>GC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificação de compostos;</li> <li>- Fornece informação estrutural da molécula;</li> <li>- Permite comparação com bibliotecas espectrais;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo da sazonalidade de classes de metabólitos secundários;</li> <li>- Caracterização de aromas;</li> <li>- Identificação de terpenoides;</li> <li>- Análise de flavonoides;</li> </ul>
<b>GC-MS/MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Confirmação estrutural de moléculas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análise de fragrâncias.</li> </ul>
<b>LC-DAD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análise de flavonoides;</li> <li>- Controle de qualidade de plantas medicinais;</li> <li>- Busca de metabólitos ativos;</li> <li>- Estudos de ecologia química e quimiossistemáticos.</li> </ul>
<b>LC-MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes é acoplado com LC-DAD para fornecer informações estruturais complementares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análise de antocianinas.</li> </ul>
<b>LC-MS/MS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinação de novos compostos, com a incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinação de flavonoides e saponinas.</li> </ul>
<b>LC-RMN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fornece informações estruturais (espectro <math>^1\text{H-RMN}</math>). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinação de alcaloides e flavonoides.</li> </ul>

Fonte: RODRIGUES et al., 2006.

Pela facilidade no manuseio do efluente gasoso do cromatógrafo, a cromatografia gasosa foi a primeira técnica a ser acoplada a um detetor de massas. É uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal graças à variedade de bibliotecas espectrais disponíveis atualmente. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é indicada para a análise de matrizes nas quais os seus componentes são voláteis e termicamente estáveis, pois precisam suportar as temperaturas elevadas às quais são submetidos durante o processo de separação cromatográfica (RODRIGUES et al., 2006; CHIARADIA et al., 2008).

As características de funcionamento do cromatógrafo gasoso são compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas, pois ao se utilizar colunas capilares em CG, é possível fazer uma conexão direta entre a saída da coluna à fonte do espectrômetro, de modo que, em condições normais de funcionamento, o sistema de bombeamento do espectrômetro de massas seja capaz de captar todo o eluente da coluna. Nesse sentido, os compostos que são voláteis, pequenos e estáveis à altas temperaturas podem ser facilmente analisados por CG-EM. Os espectros de massas obtidos através desta técnica oferecem informações estruturais baseadas na interpretação da fragmentação das moléculas. Os íons fragmentados podem então ser comparados com os espectros presentes nos bancos de dados das bibliotecas do aparelho (PATEL et al., 2010; CHIARADIA et al., 2008).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por sua vez, é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Apesar de ser excelente no processo de separação, é necessário acoplar a esta técnica uma outra técnica, confirmatória, quando a análise qualitativa (confirmação da identidade química) for também necessária. Dentre as várias opções existentes no momento, a espectrometria de massas (EM) é a técnica que melhor se adequa a essa realidade, fornecendo as informações necessárias. O acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa de compostos naturais: a LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas) (LANÇAS, 2009). A LC-MS é uma técnica analítica onde os compostos são separados no sistema cromatográfico e direcionados para o analisador do espectrômetro de massas através de um separador de fluxo, onde sofrem ionização, para depois serem separados no analisador de massas de acordo a sua razão massa/carga. É considerada uma técnica sensível e com grande potencial para identificação e quantificação de substâncias de origem vegetal, realizando as análises

com rapidez, sensibilidade, seletividade e utilizando quantidades mínimas de amostra (CABRAL, 2010).

Com a exigência cada vez maior com relação à qualidade dos produtos obtidos a partir de fontes vegetais, é necessário que se faça uso de técnicas analíticas sensíveis, seletivas e eficientes, que possam promover com segurança a identificação e quantificação das diferentes classes de compostos naturais. Nesse sentido, as técnicas hífenadas assumem esse importante papel e a tendência é que, no futuro, novas e mais sofisticadas técnicas surjam devido ao grande avanço tecnológico (RODRIGUES et al., 2006), colaborando ainda mais com o estudo dos produtos naturais.

### **3.7. A importância da nanotecnologia e sua relação com produtos naturais**

O termo “nanotecnologia” (ou nanociência) está relacionado à pesquisa, desenvolvimento e aplicação de materiais em uma escala muito reduzida, denominada nanoescala (1 a 100 nm). Tais materiais, devido à sua versatilidade, podem ser utilizados de forma muito eficiente em vários campos da Ciência, principalmente em química, biologia, medicina, ciência dos materiais, entre outros. Esses campos envolvem principalmente o *design*, a preparação, a caracterização e a aplicação de diferentes tipos de nanomateriais. As pesquisas em nanotecnologia realizadas atualmente têm se dedicado principalmente ao desenvolvimento e à construção de nanomateriais com o objetivo de usufruir de suas características únicas, tais como menor peso, maior resistência mecânica, melhor comportamento sob a ação da luz e excelente reatividade química, diferentemente dos seus semelhantes em escalas maiores (KEÇILI et al., 2019).

Os nanomateriais são definidos como uma categoria de materiais avançados que, por serem produzidos em escala nanométrica (1 nm: bilionésima parte do metro ou  $10^{-9}$  m), possuem um comportamento muito diferente se comparados a materiais tradicionais de dimensões maiores, que excedam 100 nm. Nesse sentido, os nanomateriais são considerados os blocos de construção para o século XXI e, suas diversas áreas de atuação, como nanotecnologia, biotecnologia, tecnologia da informação e comunicação, são considerados referências para o progresso e civilização das nações, com avanços em inúmeros setores. Os nanomateriais variam de acordo com suas fontes, tais como materiais orgânicos, inorgânicos, naturais ou sintéticos (MISHRA et al., 2019; ABDIN et al., 2018).

Atualmente, no Brasil, os estudos relacionados à nanotecnologia vêm sendo incentivados pela Política Nacional de Incentivo à Ciência, Tecnologia e Inovação (PNCTI), a qual é administrada pelo governo federal. A princípio, o incentivo específico na área de nanotecnologia foi uma iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). Aliado a isso, existem também as políticas públicas principais em vigor no país para a nanotecnologia, onde destacam-se a implementação dos Institutos Nacionais de Incentivo à Ciência e Tecnologia (INCTs), a Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia (IBN) e a criação do Sistema Nacional de laboratórios em Nanotecnologia (SISNano). Com o intenso e acelerado crescimento da nanotecnologia em todo o mundo, o Brasil é um dos países que tem investido sua economia nessa tecnologia e que, hoje, possui prioridade no depósito de patentes relacionadas à nanobiotecnologia (SOUSA et al., 2018; ABDI, 2016).

A relação da nanotecnologia com os produtos naturais vem se aproximando muito com o passar dos anos e com os avanços das diversas áreas da Ciência. Como já descrito anteriormente, muitos compostos bioativos de plantas têm potencial para a manutenção e promoção da saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de algumas doenças. Nesse sentido, os variados tipos de nanopartículas podem influenciar no aumento da solubilidade e estabilidade desses compostos bioativos, melhorando a sua absorção, além de prolongar o tempo de circulação no organismo, protegendo naturalmente os compostos contra a degradação prematura. Além disso, as nanopartículas possuem elevada eficiência de absorção nas células alvo (ou tecidos) através da prevenção da interação prematura com o ambiente biológico, favorecendo a permeação e efeito de retenção em tecidos doentes, além de melhorar a sua absorção celular, resultando na mitigação da toxicidade (GHORANI & TUCKER, 2015; BONIFÁCIO et al., 2014; AJAZUDDIN, 2010).

A nanotecnologia tem sido apontada como uma das áreas de grande potencial para atender os objetivos do milênio pela Organização das Nações Unidas (ONU). O seu caráter interdisciplinar e multidisciplinar faz com que essa ciência seja considerada inovadora, trazendo benefícios aos mais diversos campos de pesquisa (GOMES et al., 2015). Atualmente, espera-se que esta ciência tenha um profundo impacto na economia e na sociedade durante o século 21, comparável à tecnologia da informação ou aos avanços na biologia celular e molecular. Pesquisas científicas em nanotecnologia podem trazer grandes descobertas nas áreas de engenharia, medicina, agricultura, meio ambiente, energia, biotecnologia, tecnologia da informação, dentre muitas outras

possibilidades. A busca por um desenvolvimento que seja sustentável, ou seja, que permita que a geração presente satisfaça as suas necessidades sem comprometer as gerações futuras, é um dos maiores desafios atuais da nanotecnologia (PUROHIT et al., 2017).

### **3.8 Nanopartículas metálicas**

As nanopartículas (NPs) são vistas como os blocos de construção fundamentais da nanotecnologia. Elas são consideradas o ponto de partida para a preparação de vários tipos de materiais e dispositivos nanoestruturados, que serão utilizados para os mais diversos fins. A sua síntese é um processo vital para a eficiência cada vez maior dos estudos que integram a nanociência (VAHABI et al., 2011).

Diferentes tipos de nanopartículas metálicas são produzidos atualmente a partir de diferentes metais e óxidos metálicos, tais como prata (Ag), ouro (Au), óxido de cobre (CuO), óxido de zinco (ZnO) e titânio (Ti) (SARDELLA et al., 2018). Vários estudos realizados recentemente têm demonstrado, por exemplo, que nanopartículas metálicas podem ser usadas de forma efetiva contra uma ampla gama de patógenos (KUMAR et al., 2019; DAS et al., 2019; PARTHIBAN et al., 2019; HAMELIAN et al., 2018).

A existência de uma grande variedade de nanopartículas metálicas está relacionada com sua natureza química (metais, óxidos metálicos, biomoléculas, polímeros), tamanho e forma (esferas, cubos, tubos), estado de dispersão (individualmente dispersas ou aglomeradas), meio de dispersão (líquido, sólido, gasoso, gel, etc.) e revestimento (NAGARAJAN e HATTON, 2008). Depois da síntese, as nanopartículas obtidas devem passar por processos de caracterização. A caracterização é importante para controlar as condições de síntese e organizar as melhores formas de aplicação das mesmas. Os principais métodos estão resumidos abaixo.

#### **3.8.1. Métodos de caracterização de nanopartículas metálicas**

##### **3.8.1.1. Espectroscopia no ultravioleta-visível e Pico SPR**

A Espectroscopia de Absorção UV-vis envolve a absorção da radiação ultravioleta/visível, que compreende a faixa de 190 a 900 nm, causando a promoção de elétrons do estado eletrônico fundamental para o estado excitado. O espectro é obtido

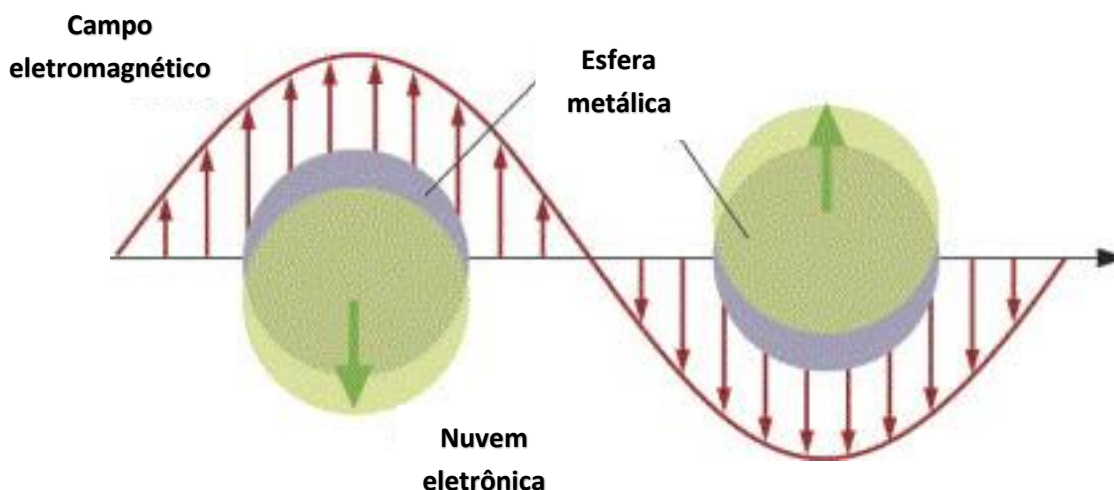
pela irradiação da luz através de uma solução diluída da amostra e o espectro de absorção é dado pela razão da intensidade da radiação, que passa pela amostra e pela referência nesta faixa de comprimentos de onda (PASSOS e SARAIVA, 2019).

Algumas nanopartículas metálicas apresentam bandas de absorção na região do ultravioleta-visível que se devem à oscilação coletiva dos elétrons das nanopartículas em ressonância com as ondas de luz, induzindo a formação de momentos dipolo pelo carregamento da superfície. Uma força de restauração nas nanopartículas tenta compensar, resultando em um comprimento de onda ressonante único, gerando uma banda. Esta é denominada banda de plasmon de superfície (SPR) (PASSOS e SARAIVA, 2019; LIZ-MARZÁN, 2004). Resumidamente, o fenômeno da ressonância de plasmon de superfície pode ser explicado pela oscilação dos elétrons livres em uma superfície metálica. Quando uma nanopartícula é muito menor do que o comprimento de onda da luz, um campo eletromagnético em certa frequência induz uma ressonância, coerente com a oscilação dos elétrons, como ilustra a Figura 11, página 57 (JAIN et al., 2007).

Os espectros de absorção de nanopartículas de metais alcalinos como Ag (prata), Au (ouro) e Cu (cobre) têm sido extensivamente investigados, incluindo o efeito das variações no tamanho e forma das partículas no espectro (DAS et al., 2009). Nem todos os materiais apresentam ressonância de plasmon, porque é necessária a presença de elétrons de condução livres, como ocorre em Ag, Au e Cu (LIZ-MARZÁN, 2004).



**Figura 11.** Esquema da interação de uma nanoesfera metálica com a luz. O campo eletromagnético da luz induz uma oscilação dipolar da condução eletrônica através da partícula.



Fonte: JAIN et al., 2007

O comprimento de onda de oscilação depende de vários fatores, tais como tamanho e forma da partícula, o meio que se encontra (constante dielétrica) e distância interpartículas (interação entre dipolos). Para partículas não esféricas, como bastões, por exemplo, o comprimento de onda de ressonância depende da orientação do campo elétrico. Portanto, duas oscilações são possíveis: a transversal e a longitudinal, gerando duas bandas de absorção no espectro (LIZ-MARZÁN, 2004).

No caso de nanopartículas de prata (AgNPs), quando o campo elétrico de uma onda induz uma polarização dos elétrons para o núcleo iônico mais pesado das AgNPs, a diferença de carga cria uma oscilação dipolar de todos os elétrons na mesma fase. Quando a frequência do campo eletromagnético se encontra ressonante com a corrente de elétrons em movimento, ocorre uma banda de absorção. Essa absorção depende fortemente do tamanho da partícula, do meio dielétrico e dos compostos circundantes. As AgNPs esféricas com aproximadamente 20 nm, por exemplo, exibem uma única banda SPR que ocorre na região do visível a entre 420 e 450 nm. A largura das bandas SPR está relacionada com a distribuição de tamanhos das AgNPs (MARTÍNEZ-CASTANON et al., 2008).

### 3.8.1.2. Potencial Zeta e Espalhamento de luz dinâmico

A caracterização de nanopartículas metálicas (NPMs) é de suma importância para o desenvolvimento de nanoformulações de relevância terapêutica bem definida. Nesse sentido, a determinação do tamanho da partícula e da carga de superfície é fundamental para uma caracterização adequada de NPMs. As medições DLS (espalhamento de luz dinâmico) e ZP (potencial zeta) ganharam popularidade como ferramentas simples, fáceis e reprodutíveis para determinar o tamanho e a carga superficial das partículas (BHATTACHARJEE S., 2016).

Partículas coloidais dispersas em uma solução adquirem uma carga elétrica superficial, devido à ionização de grupos químicos e a adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. Em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados a ela se movem como uma unidade. O potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é denominado Potencial Zeta ( $\zeta$ ) (SKOOG et al., 2009). Quando uma camada de macromoléculas, por exemplo, é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície e altera o potencial zeta. Dessa forma, o potencial zeta é a função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio circundante (GUINGAB et al., 2007).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICK et al., 2003). Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva das partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Quanto maior o potencial zeta, maior a tendência da suspensão à estabilidade, pois as partículas carregadas se repelem entre si, com uma força que supera a tendência natural de agregação. Este é influenciado principalmente pela concentração eletrolítica e pelo pH da suspensão coloidal (RIBEIRO et al., 2011).

A estabilidade das partículas em solução ocorre quando o valor do potencial zeta é  $\zeta \leq -30$  mV ou  $\zeta \geq 30$  mV. Caso ocorra o contrário,  $-30$  mV  $\leq \zeta \leq 30$  mV, a aglomeração irá ocorrer. A velocidade da aglomeração vai aumentando conforme o valor do potencial zeta se aproxima de zero. Assim, coloides com potencial zeta

elevados (positivos ou negativos) são eletricamente estáveis, enquanto que colóides com baixos potenciais zeta tendem a formar agregados (SKOOG et al., 2009). O quadro abaixo ilustra a relação entre o valor do potencial zeta e a estabilidade do colóide em solução.

Potencial Zeta [mV]	Estabilidade do colóide
0 a $\pm 5$	Rápida coagulação ou floculação
$\pm 10$ a $\pm 30$	Instabilidade incipiente
$\pm 30$ a $\pm 40$	Estabilidade moderada
$\pm 40$ a $\pm 60$	Boa estabilidade
Mais de $\pm 61$	Excelente estabilidade

Fonte: SKOOG et al., 2009.

O equipamento utilizado para as medidas de potencial zeta e DLS é o Zeta Sizer Nano.

### 3.9. Nanopartículas de prata (AgNPs)

Os avanços recentes no campo da nanotecnologia têm ocasionado um forte impacto em diversas áreas, e a síntese de nanopartículas de prata também seguiu essa tendência. O desenvolvimento de partículas de prata em escala nanométrica tem proporcionado muitas propriedades interessantes, que variam de aplicações eletrônicas a biomédicas. Os principais aspectos da síntese de nanopartículas de prata concentram-se na capacidade de controlar seu tamanho, forma e dispersão. Além disso, as nanopartículas de prata são atualmente consideradas uma importante classe de nanomateriais, sendo usadas principalmente como catalisadores ou agentes antibacterianos e/ou antifúngicos (UTTAYARAT et al., 2015; RAWEL et al., 2014).

Relatos sobre o potencial antibacteriano e citotóxico de nanopartículas de prata podem ser observados em abundância na literatura atual (ASHRAF et al., 2019; BOCATE et al., 2019; MAJEED et al., 2018; RAJESHKUMAR et al., 2016). Todavia, apesar da sua eficiência já bastante conhecida, o mecanismo de ação das mesmas ainda não está totalmente esclarecido. Este é bastante complexo e ainda possui algumas divergências. De acordo com Neto e colaboradores (2008), as nanopartículas de prata

possuem grande afinidade com grupos que possuem enxofre e fósforo, que são elementos encontrados na composição das membranas celulares. A interação ocorre então com a membrana destes microrganismos, causando danos no processo de respiração celular e, no interior destas células, as nanopartículas de prata interagem com o DNA provocando a sua desnaturação e impedindo a divisão celular. Também podem atacar a superfície da membrana celular e interferir de forma negativa em suas funções de permeabilidade. Pode-se afirmar que a ligação destas partículas na célula depende da área superficial disponível para a interação. Partículas menores possuem uma área muito maior de superfície disponível para interagir com o microrganismo, sendo, por isso, mais eficazes no combate a este, se comparadas à partículas maiores (MORONES et al., 2005).

Wong e colaboradores, em 2010, listaram alguns supostos mecanismos de ação de nanopartículas de prata na eliminação de microrganismos. São eles:

- A) Em escala manométrica, a prata possui uma melhor interação com microrganismos devido a sua elevada área superficial. Devido a isso, estas nanopartículas atingem a superfície celular e penetram mais facilmente no interior desses organismos;
- B) Tanto as nanopartículas de prata quanto os íons de prata podem interagir com proteínas presentes nas membranas celulares, cujas estruturas contêm enxofre e fósforo. Podem, ainda, comprometer as funções do DNA da célula ao interagirem com esses grupos;
- C) As nanopartículas de prata e/ou os íons de prata podem provocar danos na cadeia respiratória, provocando assim a morte celular;
- D) As nanopartículas de prata podem promover uma liberação sustentada de  $\text{Ag}^+$  dentro das células dos microrganismos, podendo formar radicais livres e induzir o estresse oxidativo, reforçando sua atividade antimicrobiana.

O surgimento de microrganismos resistentes tais como fungos, vírus e bactérias, aumentou em um ritmo alarmante nos últimos anos, tornando-se um sério problema de saúde pública. Livres no meio ambiente, muitas vezes são patogênicos, podendo provocar danos em seres humanos, animais e vegetais. Com isso, torna-se cada vez mais necessário a busca de novos agentes para controle efetivo destes microrganismos, de preferência naturais e que não sejam tóxicos ao meio ambiente nem aos seus componentes em geral (GAJBHIYE et al., 2009). Para tanto, a utilização de nanopartículas metálicas (com destaque para as nanopartículas de prata) surge como

uma alternativa viável e eficiente para este fim. Pesquisadores do campo da síntese de nanopartículas estão voltando sua atenção aos sistemas biológicos, pois, muitos organismos procariontes ou eucariontes (incluindo plantas, animais e microrganismos), ou parte deles, são conhecidos por produzirem materiais inorgânicos, intra ou extracelularmente (VENGADESH-PRABHU et al., 2011).

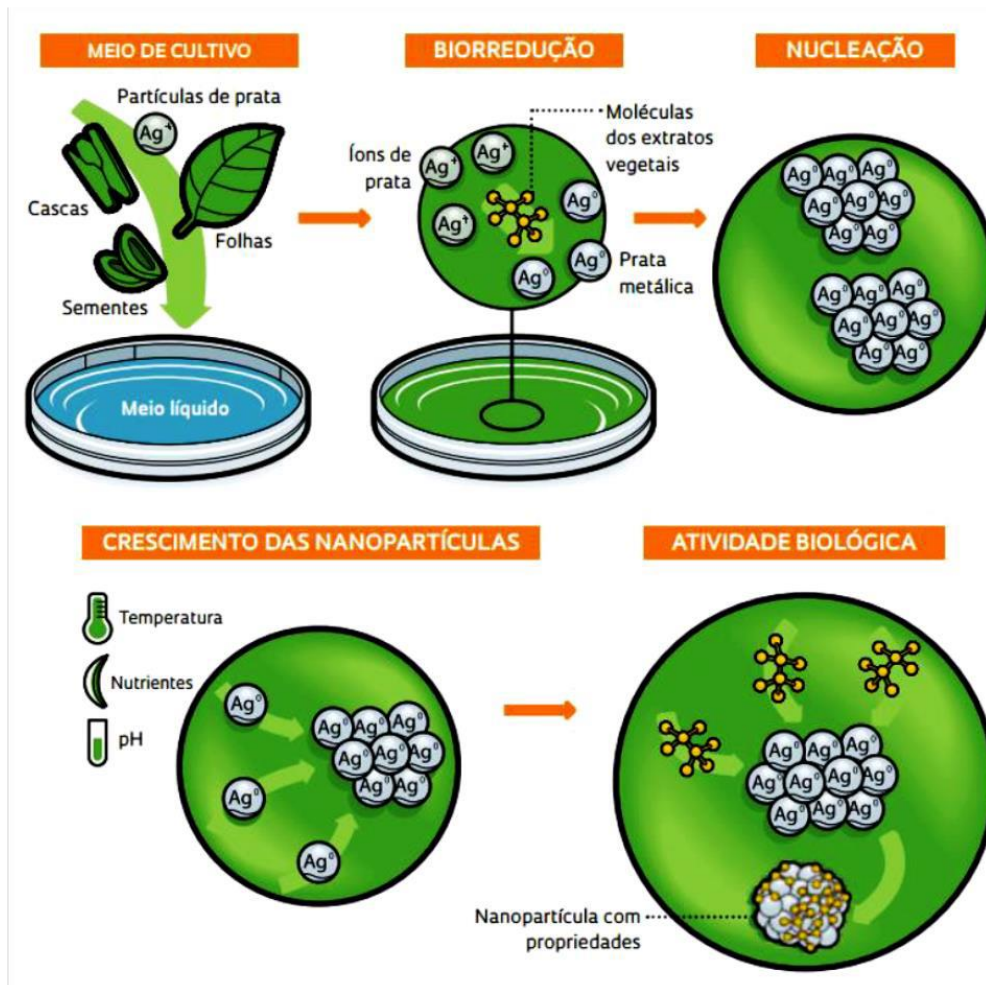
#### **4.0. Nanobiotecnologia verde: biossíntese de nanopartículas metálicas**

A natureza desenvolveu vários processos para a síntese de materiais inorgânicos em escalas nano e micro, contribuindo para o desenvolvimento de uma área de pesquisa relativamente nova e amplamente inexplorada, baseada na biossíntese de nanomateriais. A síntese de nanomateriais utilizando organismos é compatível com os princípios da química verde. Nesse sentido, a chamada “síntese verde” de nanopartículas metálicas faz uso de reagentes não tóxicos, biodegradáveis, de baixo custo e mais seguros (KHAN et al., 2018).

A síntese de nanopartículas metálicas utilizando fontes orgânicas vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas em nanotecnologia realizados atualmente, pois exclui a necessidade de se empregar produtos químicos nocivos nos protocolos de redução e também fornece um método de síntese de favorável ao meio ambiente, sendo ecologicamente correto, além de ser econômico. Nanopartículas metálicas podem ser sintetizadas utilizando várias fontes orgânicas, tais como plantas, bactérias, fungos, leveduras e vírus. A síntese verde de nanopartículas metálicas mediada por plantas é considerada uma das opções preferidas para a síntese de nanopartículas, uma vez que geralmente requer um pH neutro e também ocorre à temperatura ambiente (VELUSAMY et al., 2016).

O esquema de síntese verde de AgNPs pode ser observado na Figura 12 (página 62). Determinados fatores, tais como a natureza e concentração do extrato utilizado, a concentração do sal metálico, pH e temperatura podem afetar a velocidade da reação de síntese, bem como a quantidade e a estabilidade das nanopartículas de prata obtidas (MITTAL et al., 2013).

**Figura 12.** Esquema de síntese de nanopartículas de prata (AgNPs).



Fonte: SILVA, 2014.

O método biossintético empregando extratos vegetais tem se destacado como uma alternativa simples e viável, quando comparado aos procedimentos físicos e químicos utilizados nos últimos anos na síntese de nanopartículas metálicas. A nanotecnologia está se tornando cada vez mais importante nesse sentido, principalmente com relação ao desenvolvimento de formulações de drogas mais novas, seguras e eficazes. Os extratos vegetais são preferidos em relação a outras fontes biológicas devido à sua ampla disponibilidade e ampla gama de metabólitos redutores (OTUNOLA et al., 2017).

É possível afirmar que a biossíntese de nanopartículas a partir de fontes vegetais oferece várias vantagens, tais como custo-benefício, eliminação de alta pressão, energia, temperatura e substâncias químicas tóxicas normalmente utilizadas nos métodos

tradicionais de síntese. Dentre os vários tipos de nanopartículas de metais inorgânicos, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm se destacado como conservantes, agentes antimicrobianos e anticâncer eficazes, além de sensores biomédicos e detectores que apresentam baixa toxicidade para aplicações *in vitro* e *in vivo* (GHEETA et al., 2013). De acordo com Krithiga et al. (2015) as plantas são as melhores opções para a síntese de nanopartículas, pois na maioria das vezes são atóxicas, fornecem agentes de cobertura naturais (estabilização) e reduzem o custo com isolamento de microorganismos e utilização de meios de cultura.

*Materials  
e Métodos*



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Jatropha mollissima* foram coletadas em uma área rural com Caatinga preservada no município de São Raimundo Nonato-PI (S 9° 7'9, 132" / W 42° 44'47, 16"), em fevereiro de 2017. A identificação botânica se deu por comparação das amostras coletadas com uma exsicata da espécie depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF), na Universidade Federal do Vale do São Francisco, sob número de tomo 23193 (Figura 12). Cadastro SisGen: A71AE79.

**Figura 13.** Exsicata da espécie *Jatropha mollissima* depositada no Herbário Vale do São Francisco - HVASF.



Fonte: Autoria própria

## **4.2 Processamento do material botânico**

Cerca de 11,5 kg do material botânico (folhas) coletado foi seco em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 7 dias. Após a secagem e completa estabilização do material (eliminação de água e inativação de enzimas), este foi pulverizado em moinho de facas, obtendo-se o material vegetal seco em pó, com rendimento aproximado de 2 kg.

## **4.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)**

O material vegetal seco e pulverizado foi levado ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME/UNIVASF) e em seguida submetido à maceração exaustiva, utilizando como solvente o etanol 95%, em um recipiente de aço inoxidável. Foram realizadas cinco extrações, substituindo o solvente a cada 72 horas, até o máximo esgotamento da droga. Após este processo, a solução extrativa passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida, a uma temperatura média de 50 °C, obtendo-se, ao final, o extrato etanólico bruto (Jm-EEB).

O rendimento do Jm-EEB foi de aproximadamente 100 g. Do total desse material, 20 g foram reservados para a triagem fitoquímica preliminar e para os testes biológicos. O restante foi submetido ao processo de fracionamento, utilizando a técnica de cromatografia líquida a vácuo (CLV). Foi utilizada sílica gel como fase estacionária e os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (em sistema de polaridade crescente) como fase móvel, visando um pré-fracionamento das substâncias através de suas polaridades. Para tanto, 80 g do extrato etanólico bruto (Jm-EEB), foi adsorvida em uma porção da fase estacionária com auxílio de gral e pistilo. Em seguida, realizou-se o processo de separação das fases sob vácuo, com a utilização de um conjunto apropriado de vidrarias (Figura 14, página 67) (SAITO et al., 2005).

**Figura 14.** Sistema de fracionamento do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) por cromatografia líquida a vácuo.



Fonte: Autoria própria

#### 4.4 Triagem fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica preliminar teve como objetivo a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico bruto (e fases) de *Jatropha mollissima*. As técnicas usadas para este fim são baseadas em reações químicas que exibem características universais para cada uma das diversas classes de metabólitos secundários investigadas. As metodologias utilizadas são realizadas em pequena escala, em tubos de ensaio, e os resultados são observados por meio de reações das amostras com soluções de reagentes específicos para cada classe de metabólito, as quais promovem alterações de cor ou formação de precipitados. Nesse sentido, é utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), que possui como ponto favorável a possibilidade de comparação dos extratos e fases investigadas com padrões de metabólitos secundários disponíveis no mercado. Na cromatografia em

camada delgada analítica, pequenas alíquotas de cada extrato, solubilizados em solventes adequados, foram aplicadas com o auxílio de um capilar de vidro em placas de camada delgada com suporte de alumínio e com sílica gel como fase estacionária. Misturas de solventes em proporções adequadas para cada classe investigada foram usadas como fases móveis. Após a eluição, as placas foram reveladas com reagentes específicos e/ou analisadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm (OLIVEIRA et al., 2010; SIMÕES et al., 2010; BRAZ et al., 2011). A Tabela 3 abaixo apresenta os sistemas de solventes utilizados para cada classe de metabólitos investigada e os seus respectivos reveladores.

**Tabela 3.** Eluentes e reveladores utilizados para a caracterização do perfil fitoquímico cromatográfico do extrato etanólico e fases obtidas a partir das folhas de *J. mollissima*.

Classe química	Eluente	Revelador
1. Alcaloides	Tolueno: AcOEt: Dietilamina (70:20:10)	Dragendorff
2. Antocianinas	AcOEt: Ác. Fórmico: Ác. acético glacial: Água (100:11:11:26)	Anisaldeído sulfúrico
3. Antraquinonas	Éter de petróleo: AcOEt: Ác. fórmico (75:25:1)	Ác. Fosfomolibdico/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> etanólico 10%
4. Compostos fenólicos	AcOEt: Ác. Fórmico: Ác. acético glacial: Água (100:11:11:26)	PEG
5. Cumarinas	Tolueno: Éter etílico (1:1) saturado com ácido acético a 10%	KOH 10%
6. Derivados antracênicos	AcOEt: MeOH: Água (100: 13,5: 10)	KOH 10%
7. Liganas	Clorofórmio: Metanol: Água (70:30:4)	Vanilina sulfúrica
8. Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: AcOEt (93:7)	Vanilina sulfúrica
9. Naftoquinonas	Tolueno: Ác. Fórmico (99:1)	KOH 10%
10. Saponinas	Tolueno: Água: Ác. Acético (4:1:1)	Vanilina sulfúrica
11. Taninos hidrolisáveis	Butanol: Acetona: Tampão fosfato pH 5,0 (40: 50: 10)	Sulfato de ferro amoniacal
12. Triterpenos / esteróis	Tolueno: CHCl <sub>3</sub> : EtOH (40: 40: 10)	Lieberman-Burchard

Fonte: Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais - NEPLAME/UNIVASF

## **4.5 Estudo fitoquímico clássico**

### **4.5.1 Métodos cromatográficos**

Para a cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM) de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm (MERCK). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de sílica a serem utilizadas.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD), foi usada sílica gel 60 PF254 (MERCK). As frações foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) da Silicycle TLC - Aluminum PF<sub>254</sub>, sugerindo dessa forma a pureza da amostra quando observada uma única mancha após revelação em câmara de irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), em placas eluídas em pelo menos três sistemas de solventes distintos. Como fase móvel, foram utilizados isoladamente ou em misturas binárias os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade.

### **4.5.2 Fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl<sub>3</sub> e Jm-AcOEt**

As fases Jm-CHCl<sub>3</sub> (1,0 g) e Jm-AcOEt (1,0 g) foram cromatografadas em coluna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM) como fase estacionária e, como fase móvel, os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, individualmente ou em misturas binárias, seguindo-se um gradiente crescente de polaridade, conforme especificado no Quadro 2. Ao todo, foram coletadas 180 frações da fase Jm-CHCl<sub>3</sub> e 185 frações da fase Jm-AcOEt, de 5 mL cada. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e de acordo com a semelhança entre os fatores de retenção (Rf) e colorações das manchas observadas em câmara de luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, ou após revelação por borrifamento da solução de vanilina sulfúrica 1%, seguido de aquecimento a 105 °C por 5 min, as frações foram reunidas em grupos.

**Quadro 2.** Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl<sub>3</sub> e Jm-AcOEt.

Sistemas de eluição		Jm-CHCl <sub>3</sub>	Jm-AcOEt
<b>1</b>	100 % Hexano	1 a 10	1 a 10
<b>2</b>	90 % Hexano + 10 % Clorofórmio	11 a 21	11 a 21
<b>3</b>	70 % Hexano + 30 % Clorofórmio	22 a 84	22 a 84
<b>4</b>	50 % Hexano + 50 % Clorofórmio	85 a 99	85 a 99
<b>5</b>	30 % Hexano + 70 % Clorofórmio	100 a 115	100 a 120
<b>6</b>	10 % Hexano + 90 % Clorofórmio	116 a 125	121 a 130
<b>7</b>	100 % Clorofórmio	126 a 135	131 a 140
<b>8</b>	90 % Clorofórmio + 2 % Metanol	136 a 145	141 a 150
<b>9</b>	95 % Clorofórmio + 5 % Metanol	146 a 155	151 a 160
<b>10</b>	90 % Clorofórmio + 10 % Metanol	156 a 165	161 a 170
<b>11</b>	80 % Clorofórmio + 20 % Metanol	166 a 175	171 a 176
<b>12</b>	100% Metanol	176 a 180	177 a 185

### 4.5.3 Investigação dos constituintes químicos por técnicas cromatográficas hifenadas

#### 4.5.3.1. Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O extrato etanólico bruto (Jm-EEB) e suas fases (Jm-Hex, Jm-CHCl<sub>3</sub>, Jm-AcOEt e Jm-MeOH) foram analisados através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), com o objetivo de avaliar o perfil químico da espécie *Jatropha mollissima*. As substâncias presentes foram investigadas num aparelho Shimadzu QP-2010 CG-EM. Para as análises, as amostras foram ressuspensas em acetato de etila (Grau HPLC) na concentração de 10 mg/mL e em seguida analisadas num cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu® (QP-2010) acoplado a um auto injetor (AOC 20i). Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas: coluna RESTEK® RTX-5MS (30,0 mm x 0,25 mm x 0,25 mm),

utilizando gás hélio (99,999%) transportado com um fluxo constante de 1,4 mL/min, volume de injeção da amostra de 1,0 µL, modo split com razão 5 (split 1:4 descarte), temperatura do injetor de 260 °C; modo de impacto de elétrons a 70 eV; temperatura da fonte de íon de 250 °C. A temperatura do forno foi programada de 80 °C (isotérmico durante 3 min), com um aumento de 5 °C/min até 285 °C (isotérmico durante 15 min) e 10 °C/min até atingir 320 °C (isotérmica durante 20 min). Uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub> - C<sub>40</sub>H<sub>82</sub>) foi injetada sob as mesmas condições que as amostras em análise, e a identificação dos compostos se deu por comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros apresentados pelo banco de dados do equipamento (Wiley 7 lib e NIST 08 lib). O composto foi considerado como identificado quando apresentou índice de similaridade maior ou igual a 90%.

#### 4.5.3.2 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-MS/MS) e aplicação de networking molecular

As frações clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (Jm-AcOEt) foram selecionadas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-DAD-MS/MS), com posterior aplicação do networking molecular para identificação de compostos fenólicos (flavonoides). As análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS/Ribeirão Preto-SP). Três miligramas das amostras foram dissolvidos em 1,0 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v, 0,1% de ácido acético). Para a remoção de moléculas não-polares, cada solução foi purificada por extração em fase sólida (SPE) usando cartuchos C18, previamente ativados com 5,0 mL de ACN e equilibrados com 5,0 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). As amostras resultantes foram secas sob atmosfera de N<sub>2</sub> e dissolvidas para uma concentração final de 2 mg/mL, filtradas através de um filtro GHP de 0,45 µm e injectadas no HPLC. A análise CLAE-DAD-IT-MS/MS foi realizada utilizando um modelo Proeminence (Shimadzu) contendo duas bombas de alta pressão LC-20AD, um auto-amostrador SIL-20AHT, um forno de coluna CTO-20A e um controlador de sistema CBM-20A acoplado a um espectrômetro de massa QII-ESI-TOF micrOTOF (mass Spectrometer). Os experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizados utilizando uma coluna C18 (Phenomenex-250 mm x 4,6 mm x 5) e gradiente de eluição de acordo com a Tabela 4. Os solventes utilizados foram:

Solvente A = Água e ácido acético (99:1); Solvente B = metanol; Forno de coluna à 35°C, volume de injeção de 20 µL e vazão de 1,0 mL/min.

Os parâmetros de captação do micrOTOF QII-ESI-TOF foram os seguintes: número de scans por segundo 1000 scans/s, offset da placa final 500 V, capilar 3,5 kV, ESI nos modos positivo e negativo, pressão do gás de nebulização 5,0 Bar, gás seco (N<sub>2</sub>) com fluxo de 10,0 L/min e temperatura de 220 °C. A fragmentação de CID foi obtida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e UltraScan para aquisição de MS/MS. As possíveis estruturas putativas foram propostas com base no padrão de fragmentação MS/MS. Os espectros (*m/z* 50-1000) foram registados a cada 2 segundos. Uma solução de 10 mg/mL de NA-TFA (TOF) foi usada para a calibração interna. Em relação às condições de análise do aparelho, foram utilizados os seguintes parâmetros: Placa Terminal: 500 Volts; Capilar: 3500 Volts; Nebulizador: 5,0 Bar; Gás seco: 10 L/ min e temperatura de secagem: 220 °C.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas nos experimentos de LC-MS.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Proporção de A (%)</b>	<b>Proporção de B (%)</b>
0,00	62	38
20,00	62	38
25,00	30	70
30,00	15	85
35,00	00	100

Para as análises de networking molecular, os dados de CLAE-DAD-IT-MS/MS foram convertidos para o formato mzXML utilizando o *software* MSConvert e, em seguida, carregados para o servidor de rede molecular Global Natural Social (GNPS) (gnps.ucsd.edu). (WANG et al., 2016). Os espectros MS/MS foram combinados com o algoritmo MS Cluster para criar espectros MS<sub>2</sub> de consenso (espectros da mesma molécula com massas parentais semelhantes), considerando similaridade de cosseno superior a 0,95. O fluxo de trabalhos *online* disponível no GNPS foi usado para criar a rede molecular.

A rede de espectros comparou todos os possíveis pares de vetores dos espectros de MS/MS, considerando tolerância de massa para picos de fragmentos (0,3 Da), tolerância de massa parental (1,0 Da), número mínimo de picos correspondentes por



alinhamento espectral (5) e um escore de cosseno mínimo de 0,65, com mais de quatro picos correspondentes e pelo menos dois nós entre os 10 maiores escores de cosseno (parâmetro K). Quanto maior o escore de cosseno entre dois espectros, mais semelhantes são os espectros de MS/MS e mais semelhantes são as moléculas. Por fim, os espectros de rede foram pesquisados em bibliotecas espectrais, considerando-se pontuação acima de 0,65 e pelo menos cinco picos correspondentes. A rede molecular foi visualizada no Cytoscape 3.2 (SHANNON et al., 2003) como nós e bordas. Os nós representam as massas dos íons e a espessura da borda corresponde ao escore de cosseno.

Para evitar interpretações errôneas de contaminantes ou ruído de HPLC, as injeções em branco (fase móvel) foram introduzidas na rede de espectros como um grupo de amostras distintas identificadas no Cytoscape e removidas da rede. A rede foi organizada com o *layout* orgânico, as cores do nó foram mapeadas com base nos arquivos de origem do MS/MS e o atributo de espessura da borda foi definido para refletir as pontuações de similaridade de cosseno, com linhas mais espessas indicando maior similaridade.

#### 4.6 Métodos espectrométricos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em espectrômetro Bruker NMR (DRX 500), operando na frequência do hidrogênio a 400 MHz e na do carbono-13 a 100 MHz. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se uma pequena alíquota em solvente deuterado da CIL (Cambridge Isotopes Laboratories) ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes em relação ao TMS: clorofórmio ( $\delta\text{H} = 7,24$ ) e MeOD ( $\delta\text{H} = 4,84$  e  $3,30$ ). Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , em relação ao TMS, foram utilizados: clorofórmio ( $\delta\text{C} = 77,0$ ) e MeOD ( $\delta\text{C} = 49,0$ ). As multiplicidades das bandas de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto), *m* (multiplete).

#### 4.7 Investigação da atividade antibacteriana

As cepas bacterianas de referência utilizadas neste trabalho foram obtidas através de doação pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ - Brasil). Os microrganismos utilizados foram: *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O bioensaio antimicrobiano foi realizado utilizando o extrato etanólico bruto (Jm-EEB) e suas fases (Jm-Hex, Jm-CHCl<sub>3</sub>, Jm-AcOEt e Jm-MeOH). Para determinação da possível atividade antibacteriana dos extratos, foi necessário determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo, como recomendado pelo *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2008). Inicialmente, uma solução mãe de 25000 µg/mL dos extratos foi preparada utilizando uma solução aquosa de DMSO a 20% (v/v). Foram transferidos 100 µL desta diluição para uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de caldo Muller-Hinton. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas, resultando em concentrações de 12500; 6250; 3120; 1560; 780; 390; 195 e 97,5 µg/mL. Os inóculos contendo  $5 \times 10^5$  UFC/mL, que corresponde à turvação 0,5 na escala de McFarland, foram padronizados por espectrofotometria, considerando o intervalo entre valores de absorvância de 0,08 a 0,1. Posteriormente, 10 µL destes inóculos foram adicionados a cada poço. Foram reservados poços nas microplacas para controle de esterilidade do caldo, de crescimento bacteriano e da ação do antimicrobiano de referência (Gentamicina). Para a gentamicina foi usada uma concentração inicial de 1600 µg/mL, a qual foi diluída para concentrações de 800; 400; 200; 100; 50; 25 e 12,5 µg/mL.

As microplacas foram incubadas sob condições de aerobiose durante 24 horas, a 37 °C, quando 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) a 2% foram adicionados em cada poço para a detecção da mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, que reflete o metabolismo bacteriano ativo. A CIM foi definida como a concentração mais baixa do extrato que visualmente inibiu o crescimento bacteriano. Para determinar a CBM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada um dos poços do ensaio anterior e transferidas para placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O surgimento de colônia bacteriana

para uma dada concentração indica que essa não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.8 Investigação da atividade moduladora de resistência a antimicrobianos

Para a investigação da atividade moduladora de resistência a antimicrobianos, foram utilizadas cepas bacterianas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (SA358) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA03), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM, da Universidade Regional do Cariri (URCA/Crato-CE). A fonte bacteriana e o perfil de resistência das espécies estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Origem bacteriana e perfil de resistência.

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA358)	Ferida cirúrgica	Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amo, Clin, Mox, Cip, Lev, Asb, Amc, Eri, Cla, Azi.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA03)	Ponta de cateter	Com, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami.

Ca - Cefadroxil; Cef - Cefalexina; Cf - Cefalotina; Oxa - Oxacilina; Pen - Penicilina; Amp - Ampicilina; Amo - Amoxicilina; Clin - Clindamicina; Mox - Moxifloxacina; Cip - Ciprofloxacina; Lev - Levofloxacina; Asb - Ampicilina + Sulbactam; Amc - Amicacina; Eri - Eritromicina; Cla - Claritromicina; Azi - Azitromicina; Com - Cefepime; Ctz - Ceftazidima; Imi - Imipenem; Ptz - Piperacilina; Mer - Meropenem.

As cepas foram mantidas em condições ideais de armazenamento em meio HIA (infusão de coração inclina; Difco Laboratories Ltda). No dia anterior ao início do experimento, as amostras bacterianas foram cultivadas e incubadas sob condições de aerobiose durante 24 horas a 37 °C, em meio BHI (infusão de cérebro e coração; Difco Laboratories Ltda). Os inóculos contendo  $5 \times 10^5$  UFC/mL, que corresponde à turvação 0,5 na escala de McFarland, foram padronizados por espectrofotometria, considerando o intervalo entre valores de absorbância de 0,08 a 0,1. Para verificar a atividade moduladora das amostras Jm-EEB, Jm-Hex, Jm-CHCl<sub>3</sub>, Jm-AcOEt e Jm-MeOH, foram utilizados três antibióticos considerados padrões no tratamento de infecções promovidas pelas espécies bacterianas testadas: amicacina, ampicilina e norfloxacina. Para os testes, foram preparadas soluções dos antibióticos na concentração inicial de 1024 µg/mL.

Inicialmente, foi realizado o experimento de Concentração Inibitória Mínima (CIM), de forma semelhante ao tópico descrito anteriormente, com diluições seriadas (1:1) dos extratos, a partir da concentração inicial de 1024 µg/mL, resultando nas concentrações finais de 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1 e 0,5 µg/mL. O experimento foi realizado em placas de microcultivo, com 96 poços, sendo os últimos reservados para o controle de esterilidade. Para visualizar se houve ou não crescimento das espécies bacterianas, foi utilizado um indicador cromogênico (Resazurina), o qual age como indicador de oxi-redução, processo que ocorre na respiração celular, em células viáveis. Na presença destas células, o corante resazurina muda sua coloração azul escuro para vermelho vivo, indicando quais concentrações do extrato foram eficazes na inibição do crescimento bacteriano. Os antibióticos padrões (amicacina, ampicilina e norfloxacina) foram utilizados como controle, utilizando a mesma concentração inicial (1024 µg/mL) das amostras em estudo (COUTINHO et al., 2008).

Para atividade modulatória, todas as amostras foram testadas em uma concentração sub-inibitória (1/8 da CIM) com 100 microlitros de uma solução contendo BHI a 10% mais a amostra teste e a suspensão bacteriana. Cem microlitros das soluções teste foram adicionados (na proporção de 1:1) até o penúltimo poço. A concentração dos antibióticos foi de 1024 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, decorrido este tempo, leituras colorimétricas foram feitas, também utilizando resazurina. Os testes foram realizados em triplicata e a significância estatística foi avaliada pelo método ANOVA, através do software *GraphPad Prism* 6.0, onde foi possível observar se houve modulação sinérgica ou antagônica. O sinergismo é caracterizado por uma diminuição da CIM dos antibióticos enquanto que o antagonismo, por sua vez, é definido como o seu aumento.

#### **4.9 Investigação da atividade citotóxica**

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC-Fortaleza/CE), utilizando o método do MTT. A análise pelo método do MTT é comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade, sendo considerado um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983) e permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-

brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As linhagens utilizadas (Tabela 6) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). Estas foram cultivadas em meio RPMI e DMEM (para L929), suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras (Tabela 7) foram diluídas em DMSO para obtenção de concentrações estoque de 20 mg/mL e foram testadas na concentração única de 200 µg/mL, para todos os compostos.

**Tabela 6.** Descrição das linhagens celulares e concentrações utilizadas na investigação da atividade citotóxica.

Código da amostra	Descrição	Concentração utilizada (cél/s/mL)
HCT-116	Cólon humano	0,7x10 <sup>5</sup>
SNB-19	Astrocitoma	0,1x10 <sup>6</sup>
PC3	Próstata	0,1x10 <sup>6</sup>
L929	Fibroblasto (não tumoral)	0,7x10 <sup>5</sup>

**Tabela 7.** Descrição e identificação das amostras utilizadas na investigação da atividade citotóxica.

Código da amostra	Concentração teste (µg/mL)
Jm-EEB	200
Jm-Hex	
Jm-CHCl <sub>3</sub>	
Jm-AcOEt	
Jm-MeOH	

As células foram plaqueadas nas concentrações de 0,7x10<sup>5</sup> células/mL para as linhagens HCT-116 e L929 e 0,1x10<sup>6</sup> células/mL para as linhagens SNB-19 e PC3. As placas foram incubadas com as substâncias durante 72 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao término deste tempo, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3 horas. Decorrido o período de

incubação, as placas foram novamente centrifugadas para a retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 150  $\mu$ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa em 595 nm. Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o *software GraphPad Prism 6.0*. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Após os resultados desta análise inicial, os extratos que apresentaram resultados significativos (acima de 75% de inibição), foram submetidos novamente a testes de citotoxicidade *in vitro* frente às mesmas linhagens de células tumorais, para determinação da  $CI_{50}$  (concentração inibitória em 50%). Os testes foram realizados em triplicata e os dados foram tratados no *software GraphPad Prism 6.0*.

#### **4.10 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* como agente redutor**

##### 4.10.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas de acordo com metodologia descrita por Parthiban et al. (2018), com adaptações. Para obtenção do extrato aquoso de *J. mollissima*, 10 g do pó das folhas foi adicionado a 100 mL de água bidestilada, sendo a mistura, em seguida, submetida à fervura em agitador magnético (modelo 752 A, 230V, Fisatom) por 10 minutos. Decorrido esse tempo, a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado utilizando papel filtro Whatman n° 1. O extrato aquoso foi armazenado a 4 °C até o momento das análises.

O nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) a ser reduzido foi obtido através da empresa Aldrich (EUA). A obtenção de nanopartículas de prata foi estabelecida realizando a dispersão do extrato aquoso de *J. mollissima* em quatro concentrações diferentes de nitrato de prata (5, 10, 25 e 50 mM) preparadas com água bidestilada estéril. Após a obtenção das soluções, 1 mL do extrato aquoso foi adicionado a recipientes com 9 mL de cada solução de nitrato de prata preparada anteriormente, totalizando quatro amostras. As

misturas foram incubadas por 1 hora, na ausência de luz, à temperatura ambiente. A mudança de coloração das soluções, de amarelo-claro (extrato aquoso) para marrom-escuro indicou a formação de nanopartículas de prata.

#### **4.11 Caracterização das nanopartículas de prata (AgNPs)**

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia de Impedância e Materiais Orgânicos (LEIMO), localizado na Universidade Federal do Vale do São Francisco, *campus* Juazeiro-BA.

##### 4.11.1 Absorbância no UV-Visível

A absorbância das amostras foi medida utilizando um espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível Hach DR5000. Os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- ✓ Faixa de Leitura: 190-1100 nm
- ✓ Banda de passagem: 2 nm
- ✓ Precisão de comprimento de onda: +/- 1,0 nm
- ✓ Resolução de comprimento de onda: 0,1 nm

##### 4.11.2 Tamanho das partículas e Potencial Zeta

O tamanho das partículas e o potencial zeta foram medidos usando um espectrofotômetro Zeta Sizer Malvern (Nano ZS90), sendo calculados usando medidas de mobilidade eletroforética.

##### 4.11.3 Análise estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV foram obtidas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Vega 3XM Tescan. O equipamento possui detector de elétrons retroespalhados (BSE) e tem profundidade de foco de 0.5 mm. Para a identificação dos componentes químicos, foi realizada, utilizando o mesmo aparelho, uma análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

#### **4.12 Investigação das atividades antibacteriana e citotóxica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde**

Os métodos de análise utilizados foram os mesmos descritos nos tópicos 4.7 e 4.9, utilizando diluições seriadas das amostras de nanopartículas de prata obtidas em meio aquoso, a partir da concentração inicial de 100% para MIC, CBM e teste inicial de atividade citotóxica. Para a avaliação da  $CI_{50}$  foram utilizadas quatro concentrações mais baixas de nitrato de prata para a preparação das amostras: 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ .



# *Resultados e discussão*

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fracionamento do extrato etanólico bruto obtido a partir das folhas de *Jatropha mollissima*.

Após o processo de fracionamento, obtido através da técnica de cromatografia líquida a vácuo (CLV), o extrato etanólico bruto e suas fases formaram um conjunto de 5 amostras codificadas de acordo com o solvente utilizado na sua extração. Nesse sentido, o extrato etanólico bruto foi inicialmente identificado com o código EEB, indicando que o solvente de extração foi o etanol. A partir do fracionamento, o extrato etanólico bruto deu origem a quatro fases também codificadas de acordo com o solvente de extração, como se segue: fase hexânica (Jm-Hex), fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>), fase acetato de etila (Jm-AcOEt) e fase metanólica (Jm-MeOH). O rendimento das fases obtidas está descrito no Quadro 3:

**Quadro 3** - Rendimento das fases obtidas através do processo de fracionamento por cromatografia líquida à vácuo.

Fase	Rendimento
Jm-Hex (fase hexânica)	8,54 g (10,67%)
Jm-CHCl <sub>3</sub> (fase clorofórmica)	15,45 g (19,31%)
Jm-AcOEt (fase acetato de etila)	15,23 g (19,03%)
Jm-MeOH (fase metanólica)	31,78 g (39,72%)

### 5.2 Triagem fitoquímica preliminar

A análise fitoquímica preliminar realizada teve como objetivo a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico bruto (e suas fases) de *Jatropha mollissima*, comparando o perfil aqui encontrado com dados presentes na literatura. A metodologia seguida neste trabalho permitiu a investigação de doze classes de metabólitos secundários, sugerindo a presença de classes importantes destes metabólitos, com variação na intensidade dependendo da amostra (fraca a forte). Os resultados obtidos com o estudo preliminar realizado encontram-se descritos na Tabela 8.

**Tabela 8:** Descrição das classes de metabólitos secundários investigados nos extratos e fases de *Jatropha mollissima*.

Classe química	Jm-EEB	Jm-Hex	Jm- CHCl <sub>3</sub>	Jm-AcOEt	Jm-MeOH
<b>1</b>	+	+	-	-	-
<b>2</b>	++	++	++	+	+
<b>3</b>	+++	+++	+	-	-
<b>4</b>	+++	+++	+++	+++	+++
<b>5</b>	+++	+	+	-	-
<b>6</b>	+++	-	-	++	-
<b>7</b>	+	-	-	+	+
<b>8</b>	+++	+++	++	-	-
<b>9</b>	-	-	-	-	-
<b>10</b>	+	-	+	-	-
<b>11</b>	+++	-	-	+++	+
<b>12</b>	++	++	+	+	-

**1.** Alcaloides, **2.** Antocianinas, **3.** Antraquinonas, **4.** Compostos fenólicos, **5.** Cumarinas, **6.** Derivados antracênicos, **7.** Lignananas, **8.** Mono, sesqui e diterpenos, **9.** Naftoquinonas, **10.** Saponinas, **11.** Taninos e **12.** Triterpenos/esteróis. **Presença do composto:** (-) ausente (+) fraca (++) moderada (+++) forte. **Jm-Hex** (fase hexânica); **Jm-CHCl<sub>3</sub>** (fase clorofórmica); **Jm-AcOEt** (fase acetato de etila); **Jm-MeOH** (fase metanólica).

Após a análise do extrato etanólico bruto (e fases) de *J. mollissima*, foi possível sugerir a presença de alcaloides, conhecidos por sua ação antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, anti-fúngica, antiviral, antioxidante, entre outras (DEBNATH et al., 2018), de antocianinas, que possuem ação antioxidante (CARDOSO et al., 2011; LOPES et al., 2007), de antraquinonas, com ação anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, entre outras (CHIEN et al., 2015, LOCATELLI, 2011), compostos fenólicos, triterpenos e esteróis, que possuem diversas atividades biológicas importantes, com destaque para atividades antioxidante e citotóxica (KAMPA et al., 2004), cumarinas, com ação antimicrobiana, anticâncer, antioxidante, etc. (BORGES et al., 2005), lignananas, com ação antitumoral, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, etc. (SIMÕES et al., 2010), mono, sesqui e diterpenos, conhecidos por possuírem ação anticâncer, analgésica, anti-inflamatória, neuroprotetora, entre outras (LIMA et al.,

2016), naftoquinonas, com ação antimicrobiana, antiviral, antitumoral, etc. (SILVA et al., 2003), saponinas, com destaque para sua ação anticâncer (KIM et al., 2018; MAN et al., 2010) e taninos, com ação antiulcerogênica (DEMARQUE et al., 2018), antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras (HUANG et al., 2018).

Existem poucos trabalhos na literatura que reportam sobre a composição química da espécie *J. mollissima*. Em estudo recente realizado por Braquehais et al. (2016), foi detectada a presença de cinco classes de metabólitos secundários no extrato bruto das folhas de *J. mollissima* a partir de uma triagem fitoquímica preliminar, a saber: cumarinas, compostos fenólicos (incluindo flavonoides e flavanonas), alcaloides, taninos, triterpenos e esteróis. De forma semelhante, o nosso trabalho também detectou a presença das mesmas classes investigadas no estudo mencionado.

Ribeiro e colaboradores, em 2014, realizaram um estudo fitoquímico preliminar nos extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de *J. mollissima*, buscando detectar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: fenóis, taninos, flavonoides, xantonas, esteroides, alcaloides, cumarinas e saponinas. Nesse estudo, não foi detectada a presença de triterpenos nos extratos das folhas de *J. mollissima*, sendo esta classe detectada apenas no extrato etanólico da raiz. Por outro lado, as classes flavonoides, xantonas, esteroides, alcaloides, cumarinas e saponinas tiveram sua presença sugerida, assim como no nosso trabalho. Este ano, em estudo realizado por Félix-Silva e colaboradores (2018), foi possível detectar a presença de compostos fenólicos (tais como os flavonoides) e saponinas no extrato das folhas de *J. mollissima*. Após as análises de cromatografia em camada delgada analítica, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), confirmou a presença de quatro flavonoides, que foram detectados através de seus índices de retenção e picos característicos no cromatograma, sendo identificados como Isoorientina, Orientina, Vitexina e Isovitexina (Figura 9, pág. 47).

De maneira geral, não foram detectadas diferenças significativas quanto à presença ou ausência das classes de metabólitos secundários, comparando os resultados obtidos nos estudos mencionados anteriormente com os resultados do nosso trabalho, uma vez que as diferenças consistiram basicamente no teor (quantidade) ou na localização (parte da planta) das classes detectadas. De acordo com os estudos presentes na literatura atual, é comum a presença de compostos da classe dos terpenos na composição química das espécies pertencentes ao gênero *Jatropha*. Nesse sentido, os

diterpenos ocupam posição de destaque, com presença abundante e diversas moléculas já isoladas e identificadas, com variadas atividades biológicas importantes relatadas. Para informações em detalhes, rever Tabela 2, página 39.

### 5.3 Estudo fitoquímico clássico

#### 5.3.1 Métodos cromatográficos

##### 5.3.1.1 Fracionamento cromatográfico das fases Jm-CHCl<sub>3</sub> e Jm-AcOEt e isolamento de JM-1 e JM-2.

As fases Jm-CHCl<sub>3</sub> (1,0 g) e Jm-AcOEt (1,0 g) foram cromatografadas em coluna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM) como fase estacionária e, como fase móvel, os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, individualmente ou em misturas binárias, seguindo-se um gradiente crescente de polaridade, conforme especificado no Quadro 2, página 59. Ao todo, foram coletadas 180 frações da fase Jm-CHCl<sub>3</sub> e 185 frações da fase Jm-AcOEt, de 5 mL cada. As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e de acordo com a semelhança entre os fatores de retenção (R<sub>f</sub>) e colorações das manchas observadas em câmara de luz nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, ou após revelação por borrifamento da solução de vanilina sulfúrica 1%, seguido de aquecimento a 105 °C por 5 min, as frações foram reunidas em grupos. Para a fração Jm-CHCl<sub>3</sub> foram obtidos 26 grupos, onde uma dessas frações (fração 100-103, denominada JM-1) apareceu como mancha única na CCDA. Essa fração foi submetida à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para a fração Jm-AcOEt foram obtidos 28 grupos e uma fração (fração 82-83, denominada JM-2) apareceu como mancha única na CCDA. Essa fração também foi submetida à análise por Ressonância Magnética Nuclear.

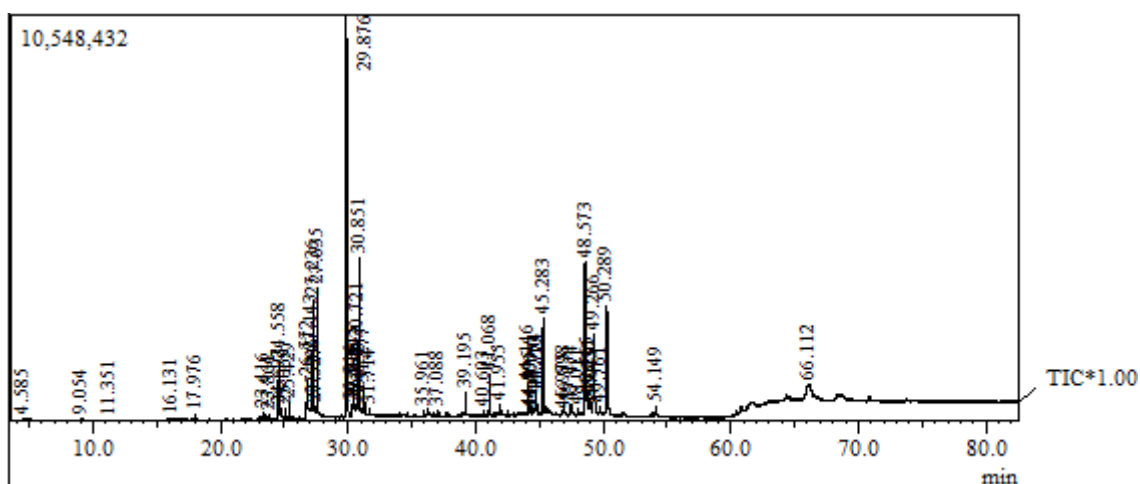
#### 5.3.2 Investigação dos constituintes químicos por técnicas cromatográficas hifenadas

##### 5.3.2.1. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise da composição química do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) e das fases hexânica (Jm-Hex), clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (Jm-AcOEt) e metanólica (Jm-MeOH) obtidas a partir das folhas de *J. mollissima*, foi realizada

utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os ensaios revelaram a presença de 51 picos para Jm-EEB, 24 picos para Jm-Hex, 60 picos para Jm-CHCl<sub>3</sub>, 36 picos para Jm-AcOEt e 16 picos para Jm-MeOH, como pode ser observado nos cromatogramas de íons totais (TIC = “*Total Ion Chromatogram*”) representados nas figuras 15, 17, 19, 21 e 23.

**Figura 15.** Cromatograma de íons totais do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) de *J. mollissima*.



Fonte: Autoria própria

Desses 51 picos, 23 constituintes foram identificados, como mostra abaixo a Tabela 9. A Tabela apresenta a lista dos compostos, o tempo de retenção e a sua quantificação no extrato etanólico bruto. A identificação ocorreu através da comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos bancos de dados presentes no equipamento.

**Tabela 9.** Constituintes químicos do extrato etanólico bruto das folhas de *J. mollissima*.

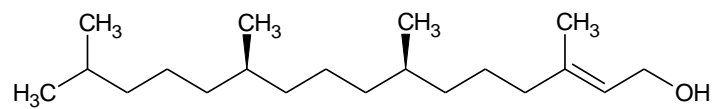
Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR
1	4.585	NI	0.19	-
2	9.055	NI	0.52	-
3	11.350	3-Oxo-4-fenilbutironitrila	0.29	1473
4	16.130	NI	0.39	-
5	17.975	NI	0.22	-
6	23.415	-(-) Loliolide	0.56	-
7	23.865	NI	0.08	-
8	24.560	Neofitadieno	2.59	1836
9	24.695	NI	0.46	-
10	25.070	NI	0.31	-
11	25.430	NI	0.66	-
12	26.770	Ácido 9-hexadecenoico	1.33	1976
13	27.145	Ácido hexadecanoico	2.51	1977
14	27.235	9-hexadecenoato de etila	4.26	1986
15	27.305	NI	0.37	-
16	27.525	NI	0.17	-
17	27.635	Ácido hexadecanóico etil éster (etil palmitato)	4.35	1993
18	29.875	Fitol	18.39	2045
19	30.315	Ácido 9,12 octadecadienoico metil éster	0.53	2183
20	30.445	9,12,15 ácido octadecatrienoico metil éster	1.93	2191
21	30.580	NI	0.49	-
22	30.720	Ácido linoleico	2.76	2193
23	30.850	Ácido linolênico (ômega 3)	6.09	2201
24	30.930	NI	0.24	-
25	31.275	Estearato de etila	0.93	2198
26	31.715	NI	0.16	-
27	35.960	NI	0.07	-
28	37.090	Ácido 1,2 ácido benzenodicarboxílico (ácido ftálico)	0.20	2832
29	39.195	n-pentacosano	0.77	2500
30	40.605	NI	0.15	-
31	41.070	Esqualeno	1.55	2914
32	41.955	n-tricosano	0.33	2300
33	44.145	$\gamma$ -Tocoferol	1.22	3036
34	44.295	NI	0.20	-

35	44.400	NI	0.77	-
36	44.710	NI	0.15	-
37	44.775	NI	0.91	-
38	45.285	Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	4.64	3149
39	46.900	NI	0.70	-
40	46.975	NI	0.02	-
41	47.475	Estigmasterol	0.51	-
42	48.010	NI	0.34	-
43	48.575	$\gamma$ -Sitosterol	12.12	2731
44	48.765	NI	1.25	-
45	48.930	NI	0.93	-
46	49.045	NI	0.36	-
47	49.265	$\beta$ -amirina	6.05	-
48	49.760	NI	0.53	-
49	50.290	Lupeol	9.30	2848
50	54.150	NI	0.68	-
51	66.110	NI	5.72	-

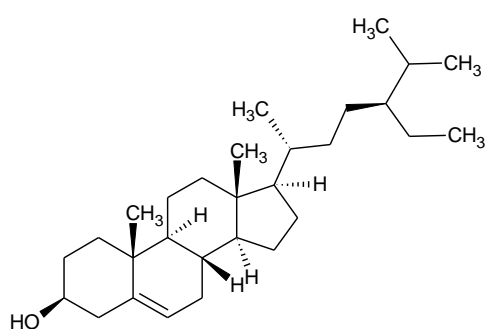
Dos 23 constituintes identificados no EEB, cinco apareceram em maior quantidade: Fitol (18,39%),  $\gamma$ -Sitosterol (12,12%), lupeol (9,30%), ácido linolênico (6,09%) e  $\beta$ -amirina (6,05%). Portanto, estes foram classificados como compostos majoritários. As estruturas químicas destes compostos estão ilustradas na Figura 16.



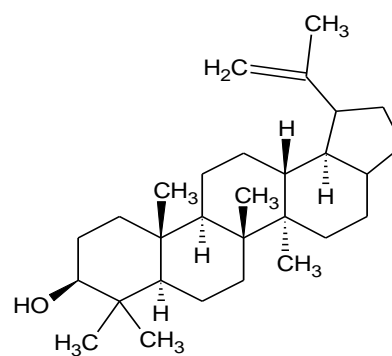
**Figura 16.** Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no extrato etanólico bruto de *J. mollissima*.



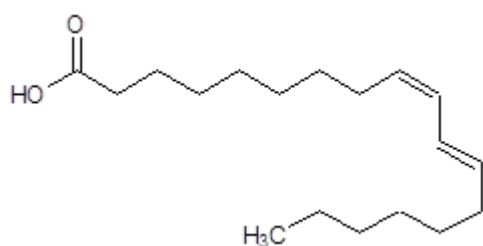
Fitol



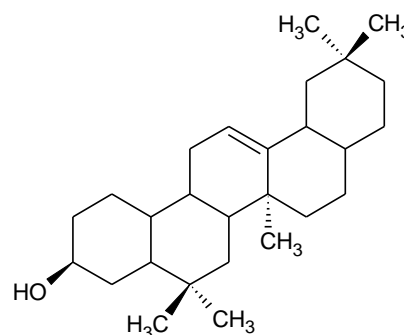
$\gamma$ -Sitosterol



Lupeol

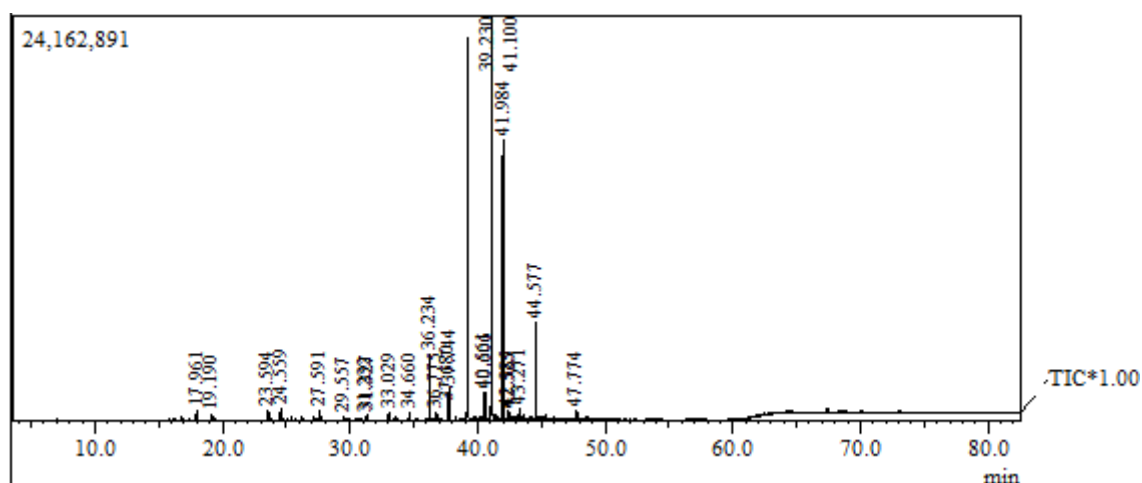


Ácido linolênico



$\beta$ -amirina

Fonte: Autoria própria (Estruturas desenhadas no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

**Figura 17.** Cromatograma de íons totais da fase hexânica (Jm-Hex) de *J. mollissima*.

Fonte: Autoria própria

Dos 24 picos que podemos observar no cromatograma, 12 constituintes foram identificados, como mostra abaixo a Tabela 10. A Tabela apresenta a lista dos compostos, o tempo de retenção e a sua quantificação na fase hexânica. A identificação ocorreu através da comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos bancos de dados presentes no equipamento.

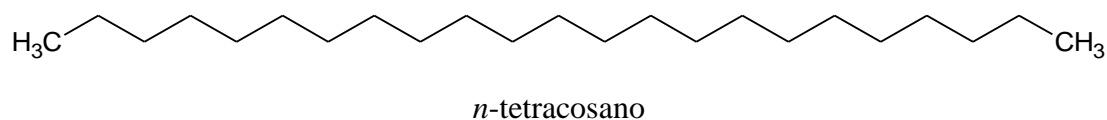
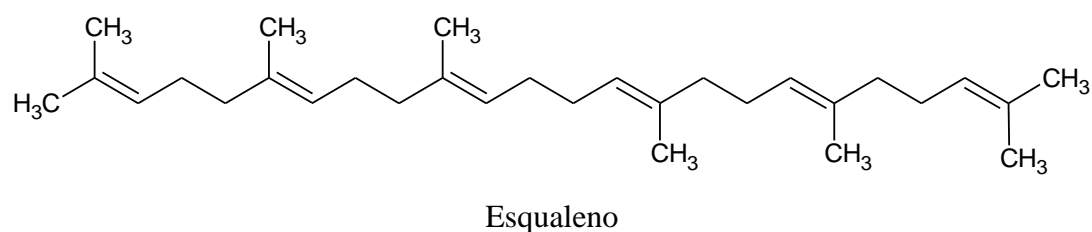
**Tabela 10.** Constituintes químicos da fase hexânica de *J. mollissima*

Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR
1	17.960	Dihydroactinidiolideo	0.64	-
2	19.190	(E)-3-Octadeceno	0.35	-
3	23.595	9-Eicosano, (E)-	0.55	-
4	24.560	NI	0.78	-
5	27.590	1-nonadeceno	0.42	-
6	29.555	n-octadecano	0.15	1800
7	31.230	NI	0.18	-
8	31.325	NI	0.30	-
9	33.030	NI	0.39	2000
10	34.660	n-eicosano	0.46	2000
11	36.235	NI	3.78	-
12	36.775	NI	0.46	-
13	37.680	1-docosanol	0.95	2451
14	37.745	NI	1.92	-

15	39.230	n-tetracosano	27.52	2400
16	40.560	NI	1.76	-
17	40.605	n-heneicosano	1.69	2109
18	41.100	Esqualeno	29.02	2914
19	41.985	NI	19.27	2400
20	42.385	NI	0.74	-
21	42.525	Óxido de etileno	0.45	2955
22	43.270	n-tetratetracontano	0.80	4395
23	44.575	NI	6.74	-
24	47.775	NI	0.74	-

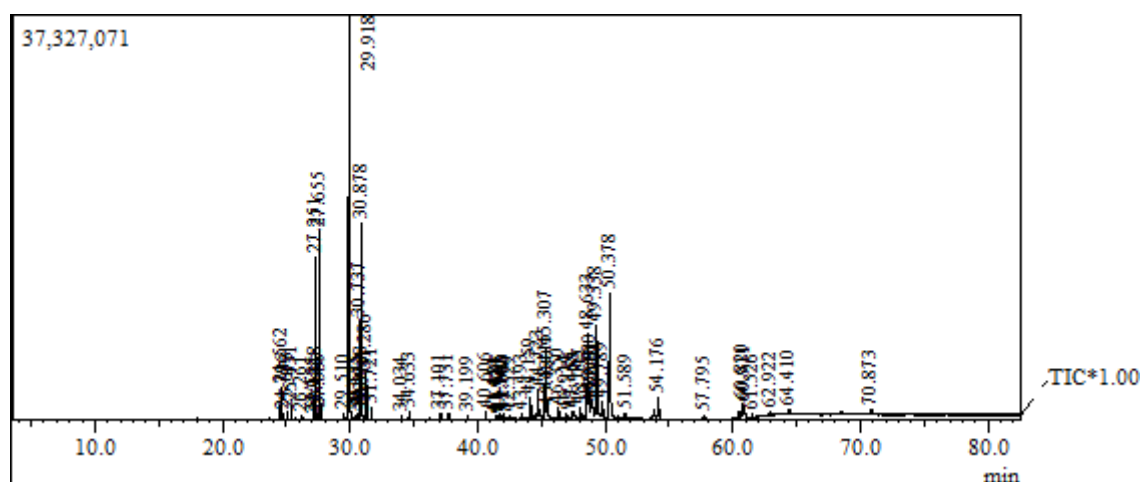
Dos 12 constituintes identificados em Jm-Hex, dois apareceram em maior quantidade: esqualeno (29,02%) e n-tetracosano (27,52%). Portanto, estes foram classificados como compostos majoritários. As estruturas químicas destes compostos estão ilustradas na Figura 18.

**Figura 18.** Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase hexânica de *J. mollissima*.



Fonte: Autoria própria (Estruturas desenhadas no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

**Figura 19.** Cromatograma de íons totais da fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) de *J. mollissima*.



Fonte: Autoria própria

Dos 60 picos que podemos observar no cromatograma, 26 constituintes foram identificados, como mostra abaixo a Tabela 11. A Tabela apresenta a lista dos compostos, o tempo de retenção e a sua quantificação na fase clorofórmica. A identificação ocorreu através da comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos bancos de dados presentes no equipamento.

**Tabela 11.** Constituintes químicos da fase clorofórmica de *J. mollissima*.

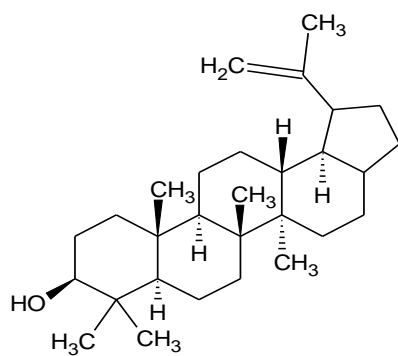
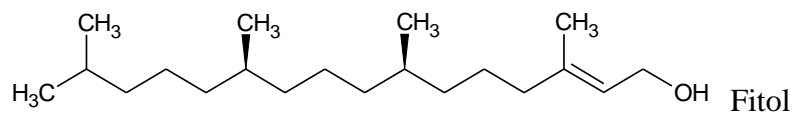
Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR
1	24.560	Neofitadieno	1.26	1836
2	24.725	Hexahidrofarnesil acetona (Fitona)	0.25	1754
3	25.075	NI	0.31	2045
4	25.430	NI	0.49	-
5	26.260	NI	0.14	-
6	27.155	NI	0.10	-
7	27.250	9-hexadecenoato de etila	5.14	1986
8	27.320	1,11,13-Heptadecatrieno, (Z,E)-	0.55	1717
9	27.445	NI	0.17	-
10	27.540	NI	0.27	-
11	27.655	Palmitato de etila	6.79	1978
12	29.510	NI	0.22	-
13	29.920	Fitol	21.02	2045

14	30.435	NI	0.13	-
15	30.575	NI	0.17	-
16	30.735	Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)-	3.63	2183
17	30.880	Ácido linolênico	7.97	2201
18	30.940	Ácido octadecenoico, etil éster	0.43	2185
19	31.015	NI	0.10	-
20	31.285	Estearato de etila	1.58	2198
21	31.720	NI	0.40	2168
22	34.035	NI	0.18	-
23	34.635	Eicosanoato de etila	0.25	2394
24	37.100	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico bis (2-etilhexil) ester	0.22	2832
25	37.730	Docosanoato de etila	0.22	2595
26	39.200	NI	0.12	-
27	40.605	Tetracosanoato de etila	0.26	2796
28	41.115	NI	0.04	-
29	41.180	NI	0.12	-
30	41.785	NI	0.34	-
31	41.965	NI	0.08	-
32	42.080	NI	0.26	-
33	42.530	NI	0.14	-
34	43.495	NI	0.12	-
35	44.160	$\gamma$ -Tocoferol	0.94	3036
36	44.725	1-eicosanol	1.87	-
37	45.305	$\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E)	3.26	3149
38	45.415	NI	0.77	-
39	45.480	NI	0.02	-
40	46.350	NI	0.48	-
41	46.915	Ergost-5-en-3-beta-ol	0.45	2632
42	47.455	NI	0.34	-
43	47.485	Estigmasterol	0.15	-
44	48.045	NI	0.76	-
45	48.635	$\beta$ -Sitosterol	6.76	2731
46	48.780	4,4,6a,6b,8a,11,11, 14b-Octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7, 8,8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14, 14a, 14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona	1.81	2869
47	48.930	NI	1.04	-
48	49.040	NI	0.84	-
49	49.340	$\beta$ -amirina	7.96	-
50	49.790	Lupenona	1.04	-
51	50.380	Lupeol	11.99	-

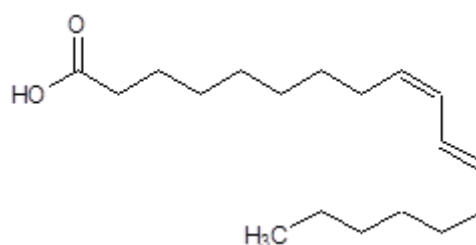
<b>52</b>	51.590	NI	0.41	-
<b>53</b>	54.175	NI	1.90	-
<b>54</b>	57.795	Ácido beonzoico, nonadecil éster	0.33	2850
<b>55</b>	60.820	NI	0.91	-
<b>56</b>	60.910	NI	0.68	-
<b>57</b>	61.525	NI	0.18	-
<b>58</b>	62.920	NI	0.17	-
<b>59</b>	64.410	NI	0.28	-
<b>60</b>	70.875	Solanesol	0.62	-

Dos 26 constituintes identificados em Jm-CHCl<sub>3</sub>, cinco apareceram em maior quantidade: Fitol (21,02%), lupeol (11,9%), ácido linolênico (7,97%), β-amirina (7,96%) e palmitato de etila (6,79%). Portanto, estes foram classificados como compostos majoritários. As estruturas químicas destes compostos estão ilustradas na Figura 20.

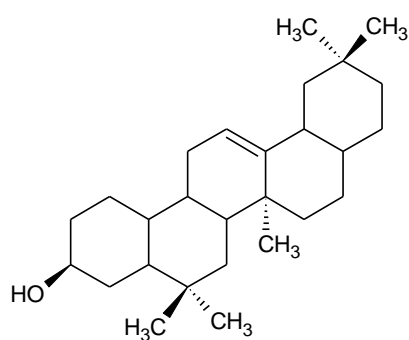
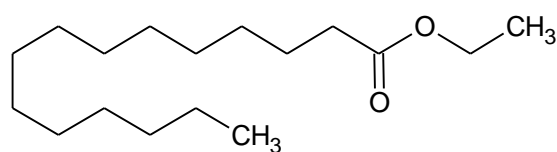
**Figura 20.** Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase clorofórmica de *J. mollissima*.



Lupeol



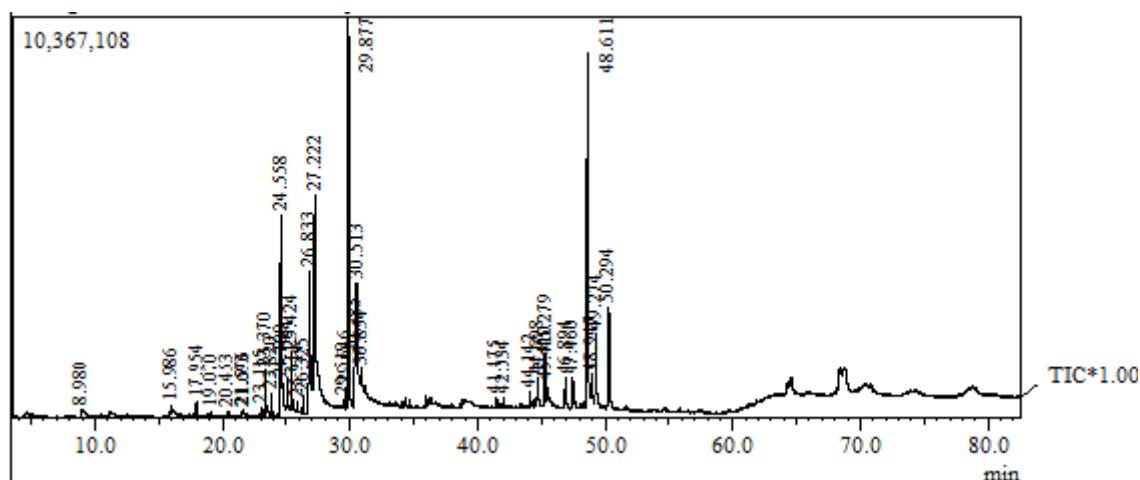
Ácido linolênico

 $\beta$ -amirina

Palmitato de etila

Fonte: Autoria própria (Estruturas desenhadas no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

**Figura 21.** Cromatograma de íons totais da fase acetato de etila (Jm-AcOEt) de *J. mollissima*.



Fonte: Autoria própria

Dos 36 picos que podemos observar no cromatograma, 24 constituintes foram identificados, como mostra a Tabela 12. A Tabela apresenta a lista dos compostos, o tempo de retenção e a sua quantificação na fase acetato de etila. A identificação ocorreu através da comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos bancos de dados presentes no equipamento.

**Tabela 12.** Constituintes químicos da fase acetato de etila de *J. mollissima*.

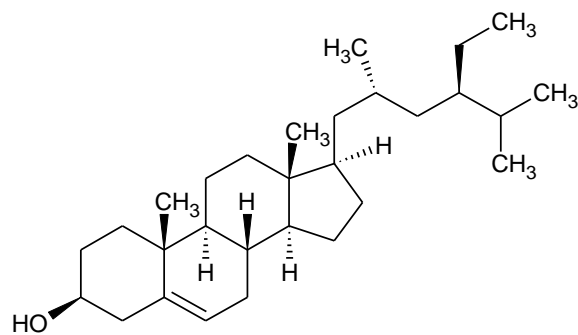
Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR
1	8.980	NI	0.87	-
2	15.985	Ácido pidólico	0.55	1180
3	17.955	NI	0.41	-
4	19.070	NI	0.17	-
5	20.455	NI	0.21	-
6	21.575	3-buten-one,4-(4-hidroxi-2,2,6-trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl-	0.25	1642
7	21.695	NI	0.16	-
8	23.115	Ácido tetradecanoico	0.56	1769
9	23.370	-(-) Loliolide	1.53	-
10	23.815	NI	0.77	-
11	24.455	Neofitadieno	7.35	-
12	24.700	2-hexadeceno,3,7,11,15-	0.78	1802



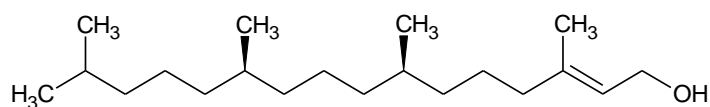
tetrametil-, [R-[R*,R*-(E)]]				
13	25.065	NI	1.02	1836
14	25.425	NI	1.92	-
15	25.915	Metil palmitoleato	0.21	1886
16	26.325	NI	0.40	1878
17	26.835	Ácido cis-9-hexadecenoico	9.92	1876
18	27.220	Ácido palmítico	9.73	1668
19	29.520	Ácido 9,12-octadecadienoico, metil éster	0.24	2093
20	29.645	Ácido linolênico, metil éster	0.49	2101
21	29.875	Fitol	13.28	2045
22	30.385	Ácido linoleico	2.29	2183
23	30.515	Ácido $\alpha$ -linolênico	6.72	2191
24	30.855	NI	0.65	-
25	41.475	NI	0.43	-
26	42.035	2-octacosanol	0.32	3047
27	44.140	$\gamma$ -Tocoferol	0.42	3036
28	44.700	Tetracosil trifluoroacetato	0.56	2607
29	45.280	$\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E)	1.83	3149
30	45.410	NI	1.00	-
31	46.895	Ergost-5-enol	1.57	-
32	47.455	Estigmasterol	1.19	2739
33	48.610	$\beta$ -Sitosterol	20.24	2731
34	48.945	Fucosterol	1.23	2780
35	49.275	$\beta$ -amirina	4.04	-
36	50.295	Lupeol	6.71	2848

Dos 24 constituintes identificados em Jm-AcOEt, quatro apareceram em maior quantidade:  $\beta$ -sitosterol (20,24%), Fitol (13,28%), ácido cis-9-hexadecenoico (9,92%), ácido palmítico (9,76%) e ácido  $\alpha$ -linolênico (6,72%). Portanto, estes foram classificados como compostos majoritários. As estruturas químicas destes compostos estão ilustradas na Figura 22.

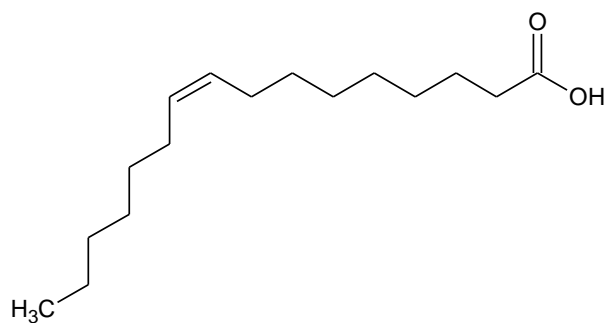
**Figura 22.** Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase acetato de etila de *J. mollissima*.



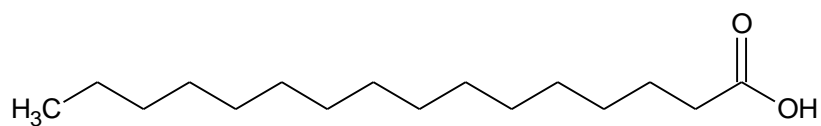
$\beta$ -sitosterol



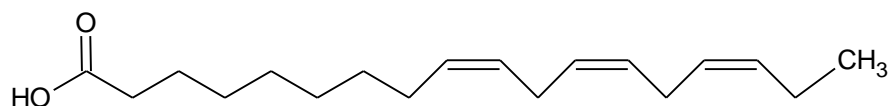
Fitol



do cis-9-hexadecenoico



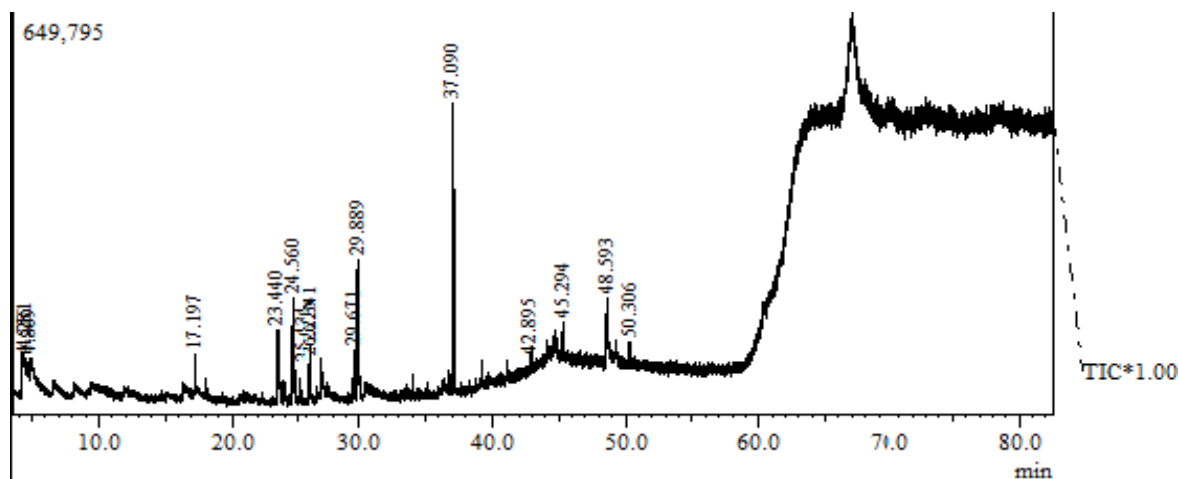
Ácido palmítico



Ácido  $\alpha$ -linolênico

Fonte: Autoria própria (Estruturas desenhadas no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

**Figura 23.** Cromatograma de íons totais da fase metanólica (Jm-MeOH) de *J. mollissima*.



Fonte: Autoria própria

Dos 16 picos que podemos observar no cromatograma, 5 constituintes foram identificados, como mostra a Tabela 13. A Tabela apresenta a lista dos compostos, o tempo de retenção e a sua quantificação na fase metanólica. A identificação ocorreu através da comparação dos espectros de massas dos compostos com os espectros dos bancos de dados presentes no equipamento.

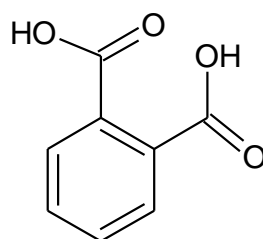
**Tabela 13.** Constituintes químicos da fase metanólica de *J. mollissima*.

Pico	TR (min)	Composto	(%)	IR
1	4.280	NI	8.38	-
2	4.555	NI	4.62	-
3	4.870	NI	8.02	-
4	17.195	NI	3.04	-
5	23.440	NI	5.03	-
6	24.560	Neoftadieno	9.16	1836
7	25.435	NI	2.35	-
8	26.275	NI	3.95	-
9	26.340	NI	3.34	-
10	29.670	Ácido 11,14,17-eicosatrienoico, metil éster	3.30	2300
11	29.890	Fitol	16.28	2045

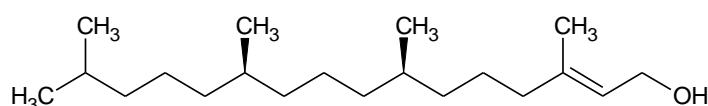
12	37.090	Ácido ftálico	21.24	2704
13	42.895	NI	0.22	-
14	45.295	$\alpha$ -Tocoferil acetato	1.72	3308
15	48.595	NI	4.81	-
16	50.305	NI	4.53	-

Do total de constituintes identificados em Jm-MeOH, dois apareceram em maior quantidade: ácido ftálico (21,24%) e fitol (16,28%). Portanto, estes foram classificados como compostos majoritários. As estruturas químicas destes compostos estão ilustradas na Figura 24.

**Figura 24.** Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na fase metanólica de *J. mollissima*.



Ácido ftálico



Fitol

Fonte: Autoria própria (Estruturas desenhadas no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

Analisando os resultados obtidos através de CG-EM, foi possível identificar compostos de diversas classes de metabólitos primários e secundários, tais como: triterpenos ( $\beta$ -sitosterol,  $\gamma$ -Sitosterol, lupeol, lupenona,  $\beta$ -amirina, estigmasterol), diterpenos (fitol), ácidos graxos (ácido linolênico, palmitato de etila, ácido hexadecanoico, ácido 9-hexadecenoico), um ácido dicarboxílico aromático (ácido

ftálico), tocoferóis ( $\gamma$  e  $\alpha$  tocoferóis), entre outros. Diversos estudos na literatura relatam importantes atividades biológicas atribuídas a estes metabólitos (ADNAN et al., 2017; DAS et al., 2017; KURANO et al., 2018).

Em 2017, na Índia, o lupeol foi estudado quanto às suas propriedades anti-leishmania e imunomodulatória *in vitro* e *in vivo*. Este triterpeno foi isolado a partir da planta *Sterculia villosa* (Malvaceae) e, para avaliação destas atividades, testes de viabilidade celular e avaliação *in vivo* de camundongos infectados com *Leishmania donovani* foram realizados. Os autores observaram que o lupeol apresentou atividade antileishmanial significativa, com valores de IC<sub>50</sub> de 65±0,41 µg/mL e 15±0,45 µg/mL contra formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. O lupeol causou dano máximo na membrana citoplasmática da célula promastigota de *L. donovani* em sua dose de IC<sub>50</sub>. Observou-se também que o lupeol induziu a geração de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. donovani*, seguido de regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e regulação negativa de citocinas anti-inflamatórias. Descobriu-se também que o lupeol reduziu a carga de parasitas hepáticos e esplênicos através da regulação positiva da resposta pró-inflamatória em camundongos BALB/c infectados por *L. donovani*. A forte afinidade de ligação do lupeol foi observada para quatro alvos de drogas potenciais, tais como a pteridina redutase 1, a adenina fosforribosiltransferase, a proteína biossintética dos lipofosfoglicanos e a glicoproteína 63 de *L. donovani* (DAS et al., 2017).

O fitol, por sua vez, foi avaliado em um estudo publicado em 2018 na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* (ISSN: 0753-3322) quanto à sua capacidade anti-angiogênica. Para as análises, foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano A549. Os resultados mostraram que o fitol exibiu potente atividade antiproliferativa contra as células A549 dose e tempo-dependente, com um valor IC<sub>50</sub> de 70,81 ± 0,32 µM e 60,7 ± 0,47 µM às 24 e 48h, respectivamente. O fitol não apresentou efeito tóxico adverso em células pulmonares humanas normais (linhagem L-132). Análises do potencial da membrana mitocondrial, do ciclo celular, espectroscopia de infravermelho e *Western blotting* demonstraram que o mecanismo molecular do fitol foi a indução de apoptose nestas células. Aspectos como a despolarização da membrana mitocondrial, aumento da quantidade de células na fase sub-G0, variação da banda no DNA e expressão de diversas proteínas foram observados. Nesse sentido, os autores concluíram que os resultados obtidos demonstram claramente o modo de ação pelo qual

o fitol induz a morte celular em células de adenocarcinoma de pulmão A549, que é o de apoptose (SAKTHIVEL et al., 2018).

Ainda este ano, foi publicado um artigo de revisão também na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* (ISSN: 0753-3322) que relata todos os benefícios do triterpeno lupenona para a saúde humana, com destaque para seu potencial antidiabético. Outras importantes atividades também são relatadas para este composto, tais como: anti-inflamatória, anti-viral, anticâncer e anti-chagásica (XU et al., 2018). Dessa maneira, podemos concluir que *J. mollissima* é uma espécie interessante do ponto de vista químico, tornando-se necessária a realização de testes biológicos para avaliar o potencial individual desses constituintes.

#### 5.3.2.2 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-DAD-MS/MS) e aplicação de Networking Molecular

As fases clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (Jm-AcOEt) de *J. mollissima* foram selecionadas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um analisador de massas do tipo QTO-ESI-TOF, com o objetivo de se obter a identificação de compostos fenólicos que fazem parte de sua constituição química. Além disso, foi aplicada uma rede molecular (networking molecular), que auxiliou na identificação e classificação dos constituintes presentes nos extratos analisados.

Recentemente, novas técnicas envolvendo a bioinformática e o trabalho em redes moleculares vêm sendo desenvolvidas, proporcionando a caracterização química de extratos biológicos complexos e auxiliando na busca por compostos naturais bioativos, inclusive potenciais compostos bioativos inéditos. Nesse sentido, as redes moleculares não apenas desreplcam moléculas conhecidas a partir de misturas complexas, mas também identificam análogos relacionados. Essa ferramenta pode ser utilizada em diferentes tipos de amostras biológicas, em genomas, proteínas e também em fármacos (DE OLIVEIRA et al., 2016; ALLARD et al., 2016; YANG et al., 2013).

As redes moleculares podem identificar uma ampla variedade de produtos naturais desconhecidos com potencial medicinal, mesmo a partir de organismos que já foram amplamente caracterizados. Essas redes podem ser entendidas como sendo uma abordagem organizacional de dados de espectrometria de massa em tandem (MS/MS), onde moléculas serão fragmentadas por MS/MS na fase gasosa e, dessa maneira, duas moléculas relacionadas provavelmente exibirão espectros com fragmentos de íons

similares. A rede molecular organiza os dados de MS/MS como uma rede espectral relacionada, mapeando assim tudo que foi detectado. O uso de solventes com características físico-químicas distintas influencia as interações intermoleculares soluto-solvente e solvente-solvente, afetando a capacidade extrativa e permitindo, dessa forma, a detecção de uma gama mais ampla de compostos (QUINN et al., 2017; PILON et al., 2016). Esse trabalho foi realizado pela primeira vez no gênero *Jatropha* e na espécie *J. mollissima*, com o objetivo de identificar e conhecer seus constituintes químicos, colaborando também com os estudos sobre a taxonomia do gênero.

Após análise e aquisição dos dados, os espectros MS/MS foram referenciados em relação às bases de dados, levando em consideração dados reportados na literatura. Detecções moleculares putativas foram justificadas com base na fragmentação medida por  $m/z$ , UV máx e MS/MS. A fim de melhorar a análise de dados devido ao grande número de espectros de MS e MS/MS resultantes, o networking molecular foi aplicado. O método auxiliou na identificação *in situ* por agrupamento dos espectros MS/MS utilizando similaridade de cosseno (OLIVEIRA et al., 2016; WANG et al., 2016).

A abordagem integrada levou à detecção de 21 metabólitos, onde 10 foram classificados como flavonoides (Tabela 14, página 104), alguns já descritos anteriormente no gênero *Jatropha* (FÉLIX-SILVA et al., 2018; GOMES et al., 2016). Na Figura 25 (pág. 106), é possível observar a representação da aplicação das redes moleculares com base no modo positivo de ionização por eletrospray de CLAE-DAD-IT-MS/MS após a remoção do branco. O texto presente no "nó" indica a massa do íon pai, a cartela de cores dos "nós" reflete o extrato de origem do constituinte e a largura da borda mostra a semelhança do cosseno entre eles (quanto maior o grau de semelhança, maior a largura da borda).

Os flavonoides são compostos polifenólicos naturais que estão presentes em muitas plantas e exibem uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, tais como atividade antioxidante, potencial anti-inflamatório (CHEN et al., 2019), atividades antiproliferativa, fotoprotetora, despigmentadora e antienvhecimento (NAGULA e WAIRKAT, 2019), atividades antimicrobiana, antiviral, cardioprotetora e antidiabética (WANG et al., 2018), entre outras.

Entre os flavonoides identificados, foi possível detectar a presença de Luteolina-6-C-glicosídeo. Este flavonoide apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+Na]^+$  de  $m/z = 471$  Daltons. Em 2018, o flavonoide luteolina-6-C-glicosídeo foi detectado na

espécie *Jatropha mollissima*, após análises por CLAE-DAD (FÉLIX-SILVA et al., 2018).

**Tabela 14** - Dados obtidos a partir das análises por CLAE-DAD-IT-MS/MS (modo ESI positivo) das fases clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (Jm-AcOEt) de *J. mollissima*.

N° e UV (nm)	Rt (min)	Cosseno	Identificação	[M+H] <sup>+</sup>	Fragmentação
(1) 264; 345	7,3	0,95	Luteolina-6-C-glicosídeo	471.06	[471] 245; 247; 351; 381; 456
(2) 260; 352	7,1	0,91	Luteolina-7-glicosídeo	449.08	[449] 137; 329; 353; 383; 413; 431
(3) 268; 336	11,6	0,98	Apigenina-7-O-neohesperidosídeo	579.14	[579] 271; 433
(4) 270; 356	10,2	0,95	Quercetina-3-O-rutinosídeo	611.13	[611] 147; 169; 259; 272; 285; 288; 303
(5) 270; 340	6,6	0,95	Vitexina-2"-O-rhamnosídeo	579.13	[579] 313; 433
(6) 271; 334	8,2	0,98	Corimbosídeo	565.13	[565] 121; 295; 325; 379; 397;
(7) 268; 336	9,2	0,98	Apigetrina	433.09	[433] 119; 203; 256; 271; 313; 337; 397
(8) 264; 350	9,6	0,95	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	595.14	[595] 287; 449
(9) 264; 336	10,0	0,95	Vitexina	433.10	[433] 415; 397; 367; 337; 313; 219; 197; 177; 158
(10) 272,323	6,7	0,91	8-[4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-yl]oxioxan-2-yl]-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)chromen-4-ona	595.13	[595] 146; 225; 316; 373; 401; 486; 664; 733

Fonte: Autoria própria

O flavonoide Luteolina-7-glicosídeo também foi identificado nas análises realizadas. O composto apresentou íon molecular em modo positivo [M+H]<sup>+</sup> de  $m/z = 449$  Daltons e em modo negativo [M-H]<sup>-</sup>  $m/z = 447$  Daltons. A Luteolina-7-glicosídeo é um flavonoide natural que possui potencial antioxidante e propriedade inibitória da enzima fosfodiesterase (PDE) (RUMP et al., 1994), além de atividade hepatoprotetora (QIUSHENG et al., 2004).



O flavonoide Apigenina-7-*O*-neohesperidosídeo, por sua vez, apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 579$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 577$  Daltons. Este flavonoide foi descoberto em 1979 e descrito pela primeira vez por Hatori e Mattsuda (1952). Segundo relatos na literatura, Apigenina-7-*O*-neohesperidosídeo possui atividades biológicas significativas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos, hepatoprotetores e anticancerígenos (REFAAT et al., 2015).

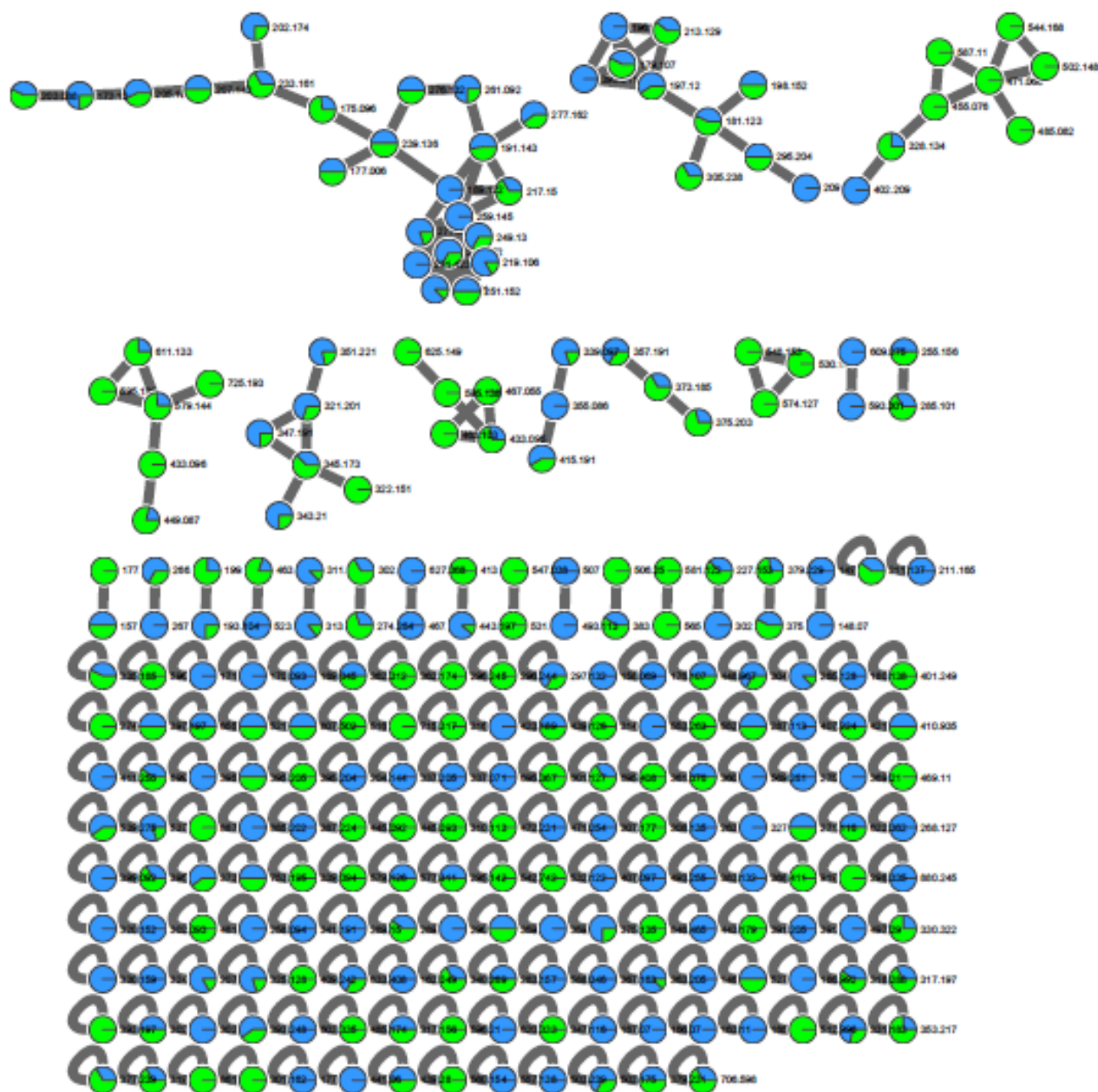
O flavonoide quercetina-3-*O*-rutinosídeo apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 611$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 609$  Daltons. De acordo com estudos encontrados na literatura, Quercetina-3-*O*-rutinosídeo possui importantes atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e hipolipidêmicos (BANSAL et al., 2012).

Vitexina-2''-*O*-ramnosídeo, outro flavonoide detectado nas análises, apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 579$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 577$  Daltons. Relatos na literatura demonstram que este flavonoide possui importantes atividades biológicas, tais como atividades antioxidante e antiproliferativa e que também pode ser utilizado no tratamento de cardiopatias (NINFALÉ et al., 2007; REN et al., 2003).

O flavonoide Corimbosídeo, por sua vez, apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 565$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 563$  Daltons. Este flavonoide foi descoberto em 1979 e descrito pela primeira vez por Besson et al. (1979). Não há relatos na literatura acerca de seu potencial biológico e/ou farmacológico.

O flavonoide Apigetrina também foi identificado nas análises realizadas. O composto apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 433$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 431$  Daltons. Há relatos na literatura de que este flavonóide possui importantes atividades biológicas, como regulação do estresse oxidativo e indução de apoptose (SUN et al., 2018), atividade anti-inflamatória (GUO et al., 2019) e efeito neuroprotetor (LIM et al., 2016).

**Figura 25** - Aplicação de networking molecular baseado no modo positivo de ionização por electrospray de CLAE-DAD-IT-MS/MS nas fases clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (Jm-AcOEt) de *J. mollissima*.



Cor do nó

● Fase acetato de etila (Jm-AcOEt)

● Fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>)

Fonte: Autoria própria

Outro flavonoide identificado nas análises, o flavonoide glicosídeo Kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 595$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 593$  Daltons. Há relatos na literatura de que o Kaempferol-3-*O*-rutinosídeo possui importantes atividades biológicas, incluindo efeito antinociceptivo (NASCIMENTO et al., 2018), atividade antiproliferativa (RAMOS, 2007) e efeito hepatoprotetor (WANG et al., 2015).

O flavonoide Vitexina apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 433$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 431$  Daltons. Recentemente, a vitexina recebeu maior atenção (HE et al., 2016) devido à sua ampla gama de efeitos farmacológicos, incluindo potencial anti-câncer (YANG et al., 2013), atividades anti-inflamatória (ROSA et al., 2016), anti-hipertensiva (JE et al., 2014) e antioxidante (ASHOKKUMAR et al., 2018), potencial anti-AVC (JIANG et al., 2018), entre outros. Em 2016, o flavonoide vitexina foi detectado na espécie *Jatropha mollissima*, após análises por CLAE-DAD (GOMES et al., 2016). Em 2018, este flavonoide foi identificado novamente em *J. mollissima*, também após análises por CLAE-DAD (FÉLIX-SILVA et al., 2018).

O flavonoide 8-[4,5-di-hidroxi-6- (hidroximetil) -3- [3,4,5-tri-hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-yl]oxioxan-2-yl]-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil) chromen-4-ona foi também identificado nas análises. O composto apresentou íon molecular em modo positivo  $[M+H]^+$  de  $m/z = 595$  Daltons e em modo negativo  $[M-H]^-$   $m/z = 593$  Daltons. Não há relatos na literatura sobre esse flavonoide.

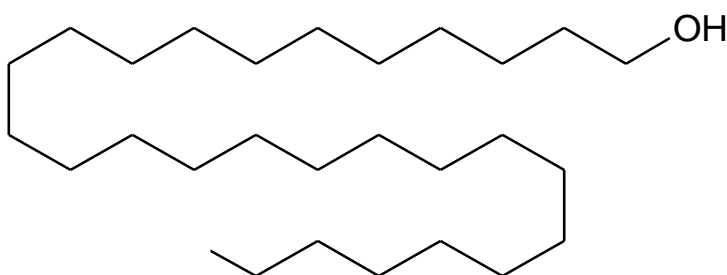
É importante salientar que a análise por CLAE-DAD-MS/MS com aplicação de networking molecular foi o primeiro estudo desta natureza realizado com a espécie *Jatropha mollissima*. Dos dez flavonoides identificados, oito estão sendo descritos pela primeira vez na espécie, exceto os flavonoides Luteolina-6-*C*-glicosídeo e Vitexina, que já foram previamente identificados nesta planta (FÉLIX-SILVA et al., 2018; GOMES et al., 2016). Os resultados obtidos mostram que os extratos de *J. mollissima* apresentam uma constituição química muito relevante, com a presença de compostos fenólicos muito interessantes biologicamente, demonstrando, assim, que esta espécie apresenta um grande potencial biológico a ser explorado.

#### 5.4 Métodos espectrométricos - isolamento e caracterização estrutural de JM-1 e JM-2

O composto codificado como JM-1 foi obtido a partir da fase clorofórmica, na forma de um precipitado amarelo claro oriundo da fração 100-103 (9 mg), solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) revelou a presença de 22 sinais correspondentes à amostra (Figura 27) dentre os quais, o sinal em  $\delta\text{C}$  62,1, que corresponde à carbono ligado à hidroxila (OH). A análise do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz), possibilitou a identificação de um carbono metílico em  $\delta\text{C}$  13,10, que correlacionou com o hidrogênio  $\delta\text{H}$  0,76. Houve também uma correlação entre o sinal  $\delta\text{C}$  13,10 com  $\delta\text{H}$  1,18, caracterizando carbonos metilênicos de cadeia longa. O carbono em  $\delta\text{C}$  62,1 também se correlacionou com o sinal de hidrogênio em  $\delta\text{H}$  3,5, sugerindo a presença de um carbono metilênico oxigenado. É possível observar também o sinal em  $\delta\text{C}$  166,8, correspondente à carbono carbonílico ( $\text{C} = \text{O}$ ) e os sinais em  $\delta\text{C}$  127,8, 129,9 e 131,4, que estão relacionados à região de aromáticos.

Por meio das análises dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $^1\text{H}$  e comparação com valores referenciados na literatura (RIOS, 2009), foi possível concluir que JM-1 é uma mistura de duas substâncias, onde a primeira foi identificada como sendo o álcool de cadeia longa 1-triacontanol (Figura 26). Com relação a segunda substância, não foi possível concluir a elucidação de sua estrutura nem fazer sua identificação.

**Figura 26** - Estrutura química do triacontanol



Fonte: Autoria própria (Estrutura desenhada no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

O triacontanol é um álcool primário de cadeia longa de 30 carbonos e, de acordo com relatos na literatura, este composto está relacionado principalmente ao crescimento das plantas e à respostas aos diversos tipos de tensões abióticas, especialmente salinidade e seca,

prevenindo o estresse oxidativo, a inibição de genes relacionados ao estresse e a regulação de genes envolvidos na modulação de várias funções fisiológicas e bioquímicas. Além dessas funções importantes, o triacontanol tem sido usado como protetor contra a toxicidade de metais pesados e para aumentar o processo de remoção biológica de poluentes de águas residuais (NAEEM et al., 2012; TAŞTAN et al., 2012). Em *J. mollissima*, este composto foi isolado em 2009, a partir de suas raízes (RIOS, 2009). A maioria dos estudos encontrados na literatura apontam os benefícios do triacontanol no crescimento e aumento da biomassa dos vegetais, além de respostas à estresses abióticos (KHANDAKER et al., 2013; NAEEM et al., 2012; TAŞTAN et al., 2012; GRZEGORCZYK et al., 2006) sendo raras as pesquisas relacionando o triacontanol à saúde humana. Porém, há relatos de que este composto tem potencial para inibir certos tipos de câncer, tais como câncer de fígado, pulmão e cólon (FAN et al., 2010).

Em 2018, em um estudo realizado por Lu e colaboradores, na China, o triacontanol foi utilizado para obtenção de um complexo utilizando uma técnica denominada peguilação. Essa técnica, que promove uma ligação covalente entre o polietilenoglicol (PEG) e uma outra molécula, têm sido cada vez mais empregada no sistema de liberação de fármacos e na modificação química de compostos com baixa solubilidade aquosa, visando melhorar sua biodisponibilidade no organismo. Nesse estudo, o principal objetivo foi obter o complexo PEG-triacontanol, para avaliar a melhora de solubilidade e atividade farmacocinética do triacontanol *in vivo*. Para tanto, o complexo PEG-triacontanol foi administrado, em ratos, pela via intravenosa na concentração de 3 mg/kg, e pela via oral na concentração de 120 mg/kg. Após esse procedimento, aproximadamente 200 µL de amostras de sangue foram coletadas via veia jugular a 0; 0,083; 0,167; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 8; 12; 24 e 48h após administração intravenosa ou a 0; 0,083; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 12 e 24h após a administração oral. Posteriormente, o plasma foi separado por centrifugação e os parâmetros farmacocinéticos foram quantificados através de um método específico utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS). O método desenvolvido mostrou ser eficiente para determinar o teor de triacontanol total (livre) e triacontanol peguilado, demonstrando que o segundo teve sua biodisponibilidade significativamente melhorada. Esse estudo fornece subsídios para trabalhos futuros com substâncias bioativas, tais como o triacontanol, aumentando o seu tempo de duração no organismo e, conseqüentemente, otimizando a bioatividade da molécula (LU et al., 2018).

Figura 27 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

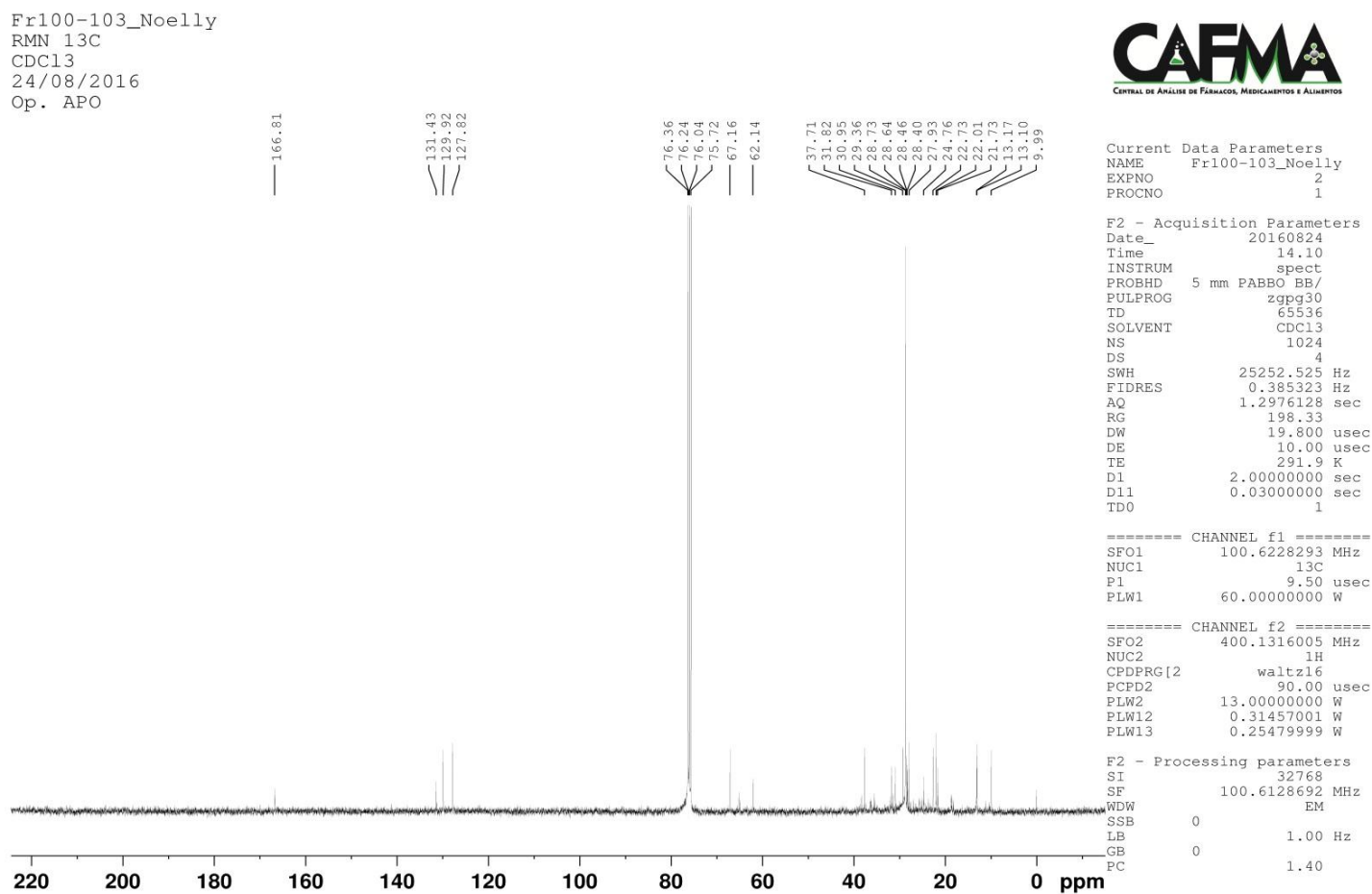


Figura 28 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

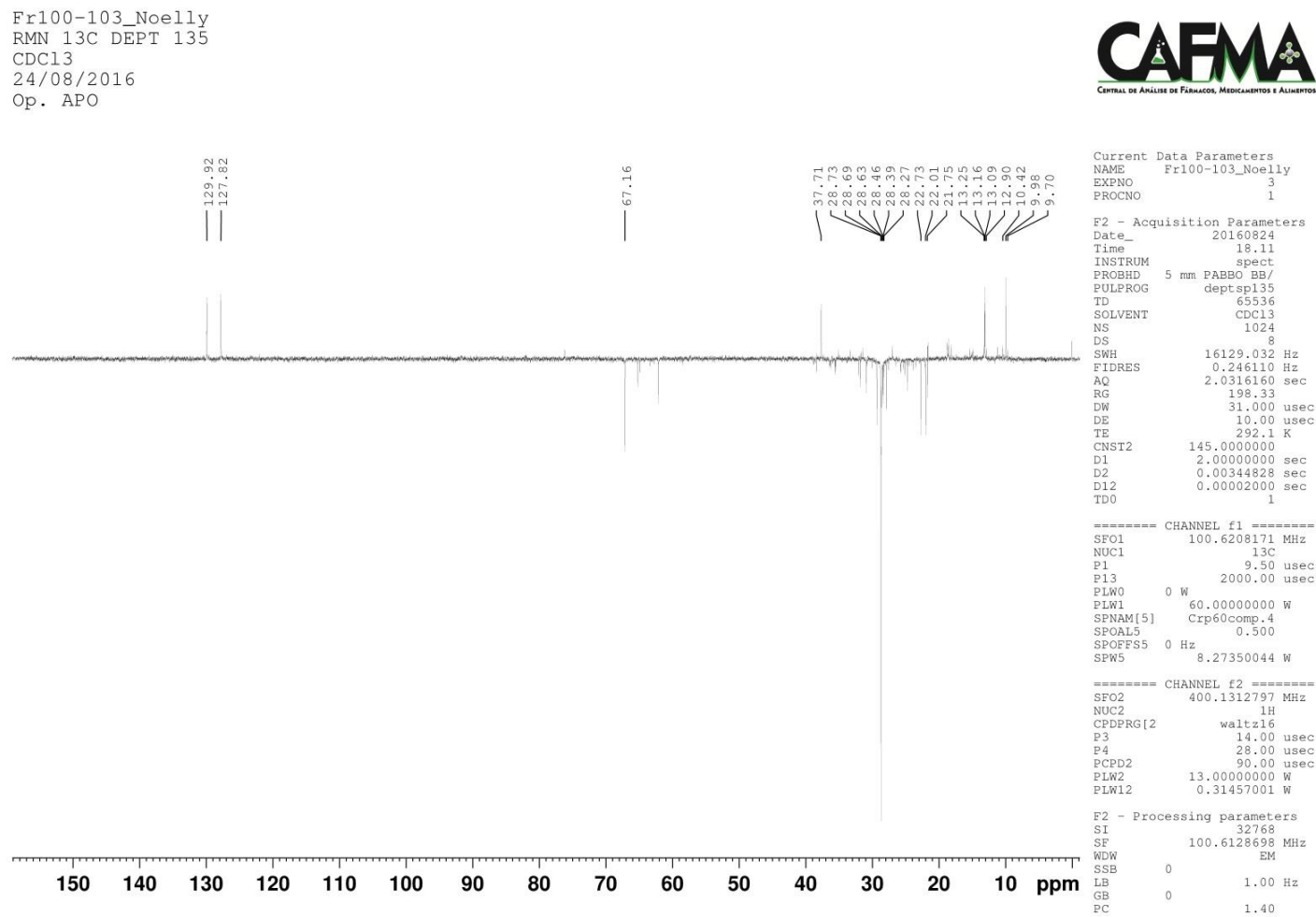
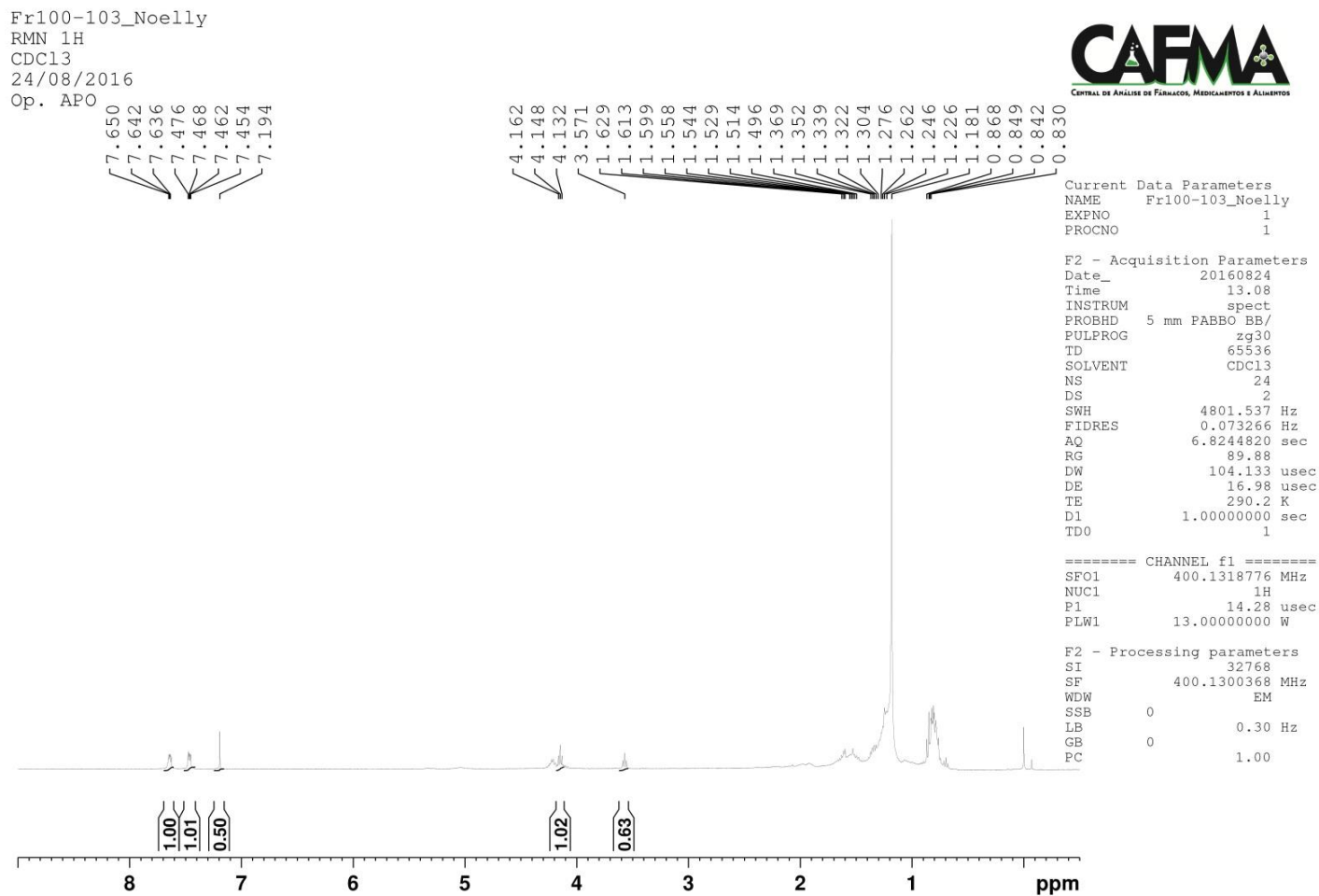


Figura 29 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).





**Figura 30** - Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz).

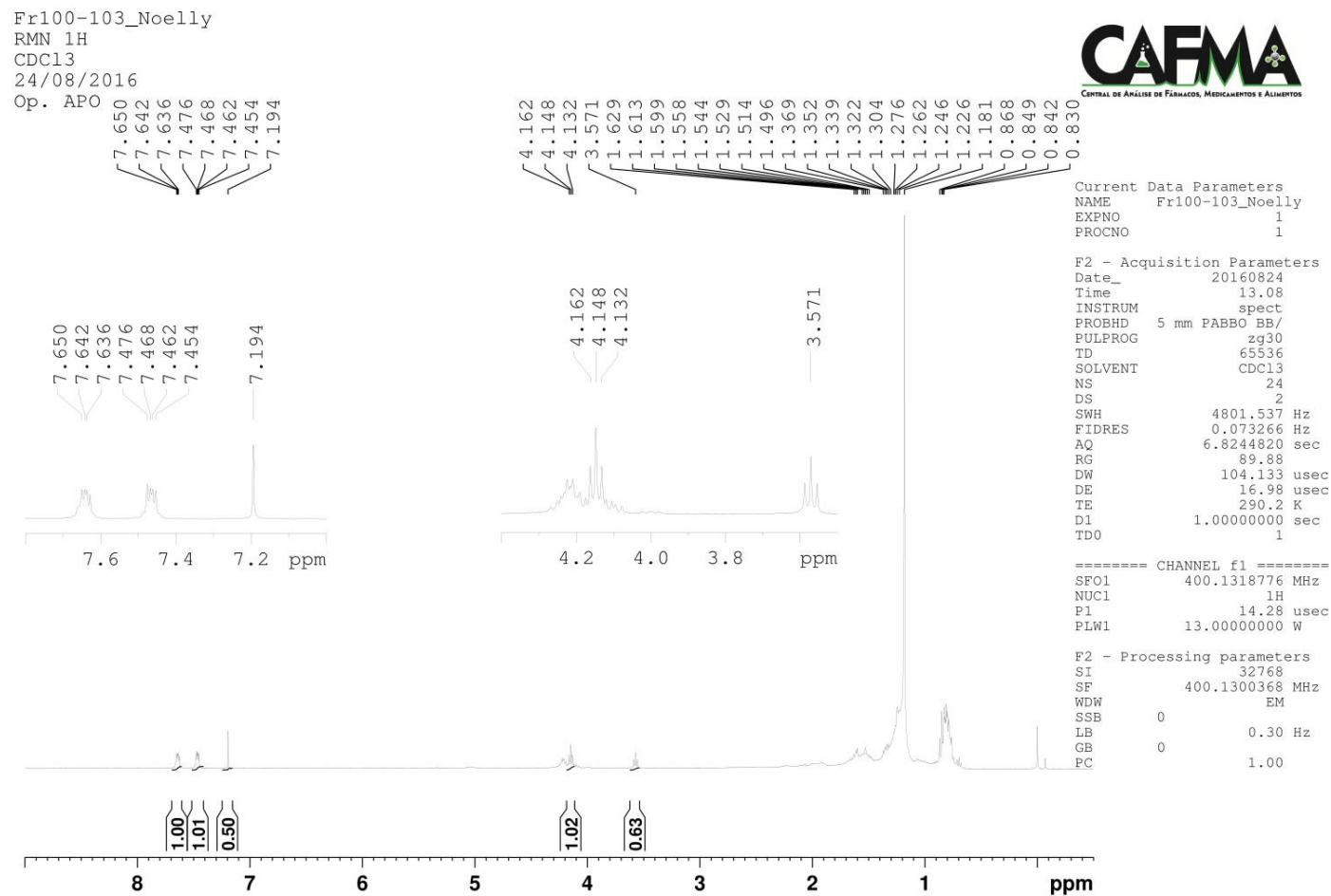


Figura 31 - Espectro de correlação  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  - HSQC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
 CDC13  
 24/08/2016  
 op. APO

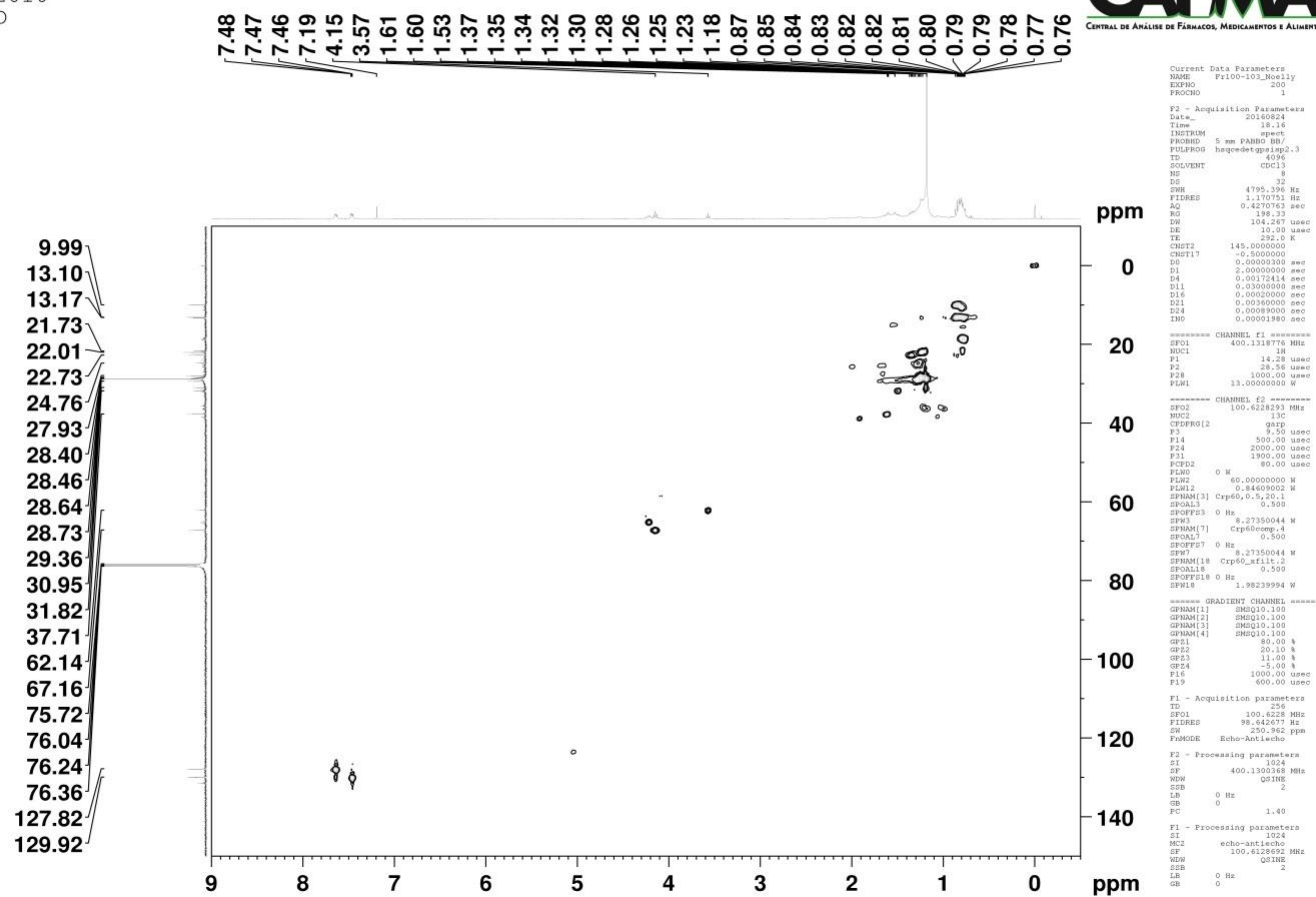
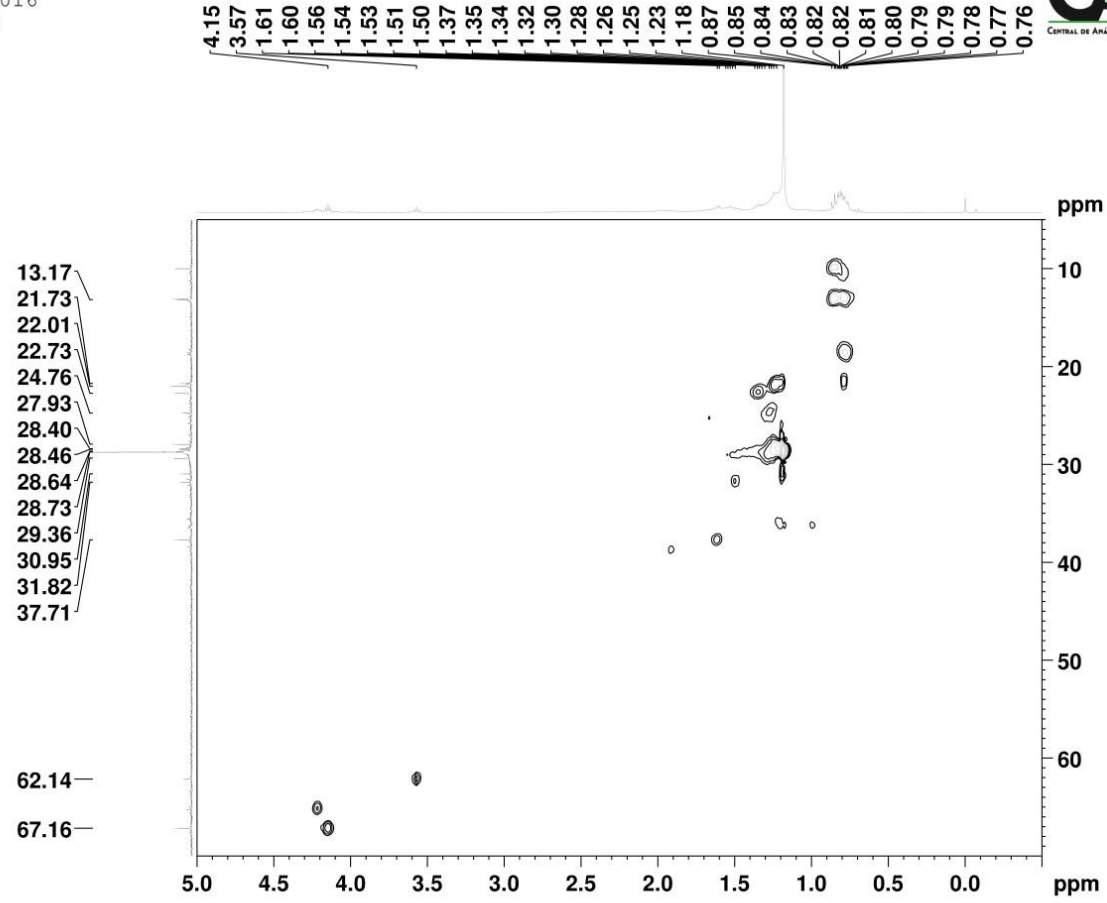


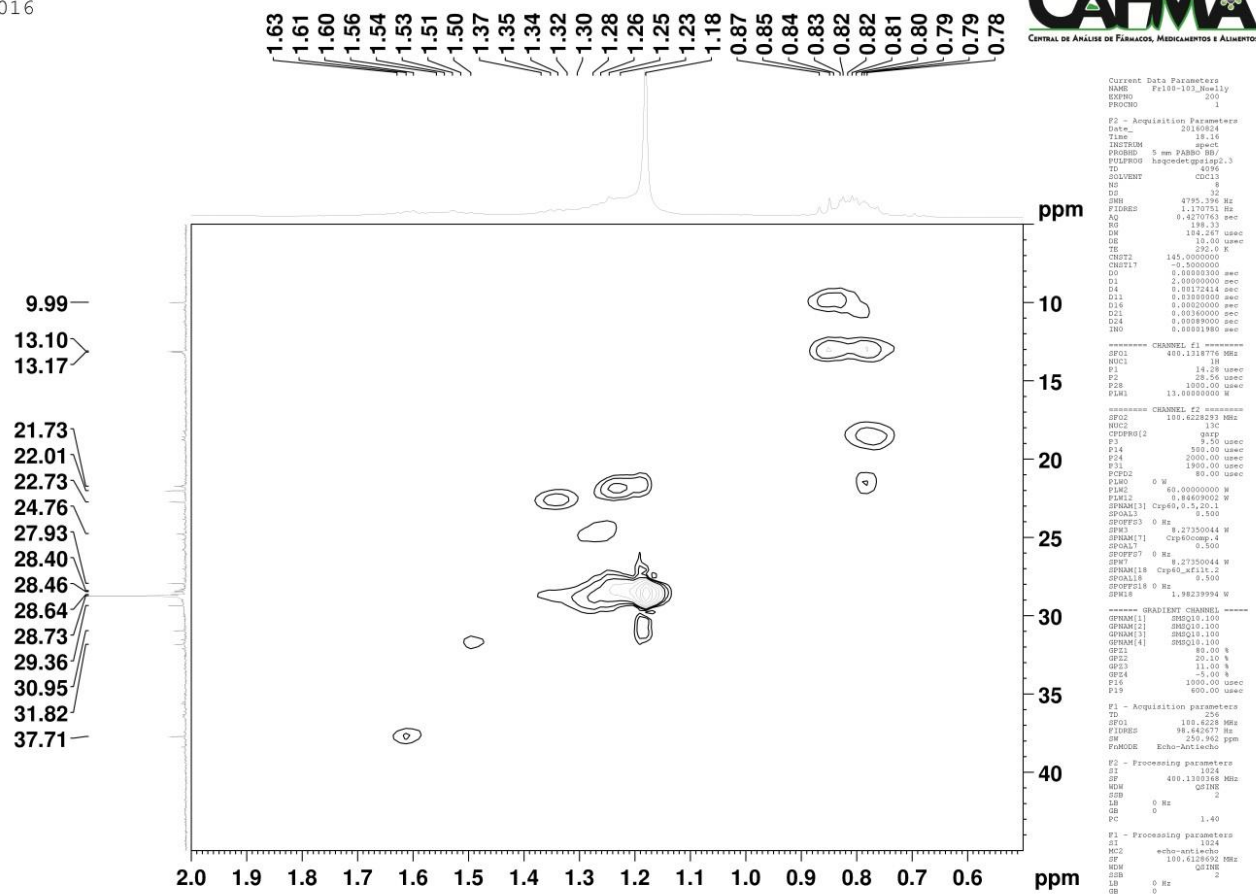
Figura 32 - Expansão 1 do espectro de correlação <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C - HSQC de JM-1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
CDC13  
24/08/2016  
op. APO



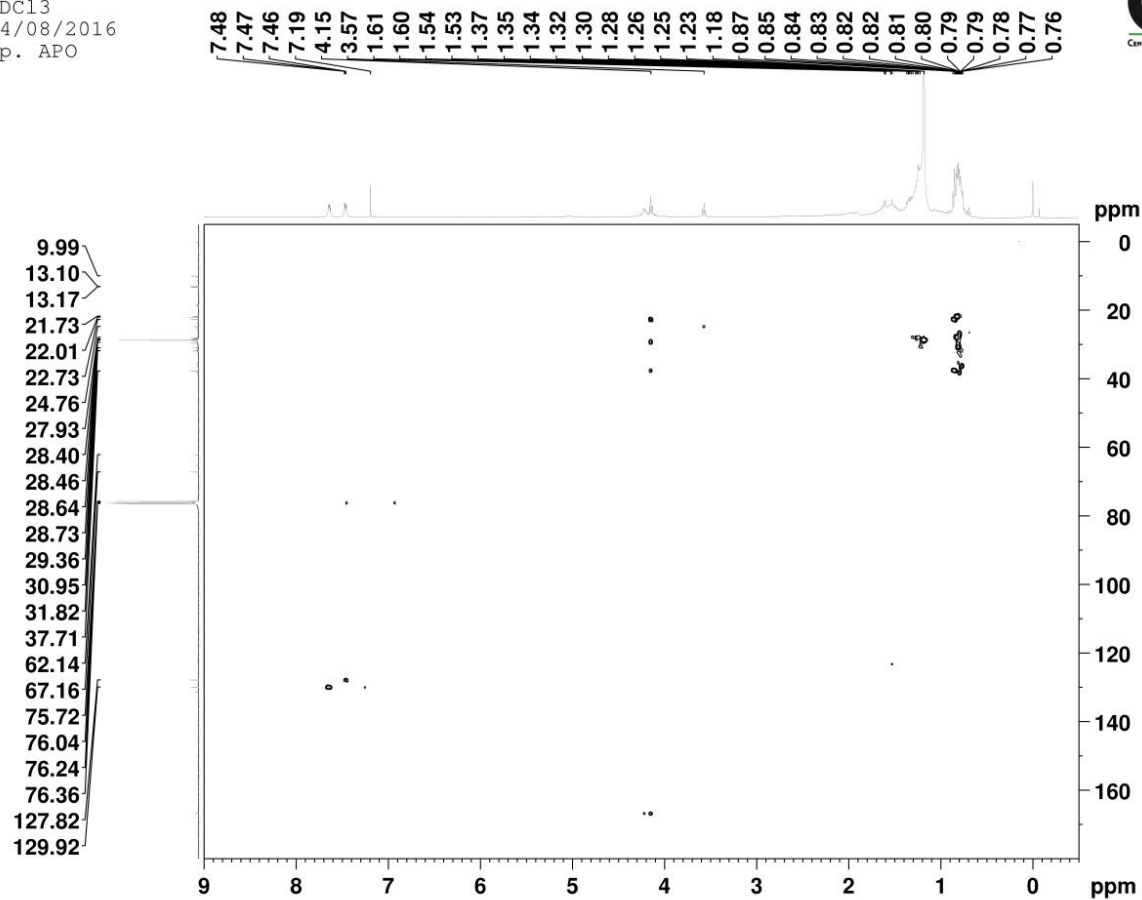
**Figura 33** - Expansão 2 do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HSQC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
 $\text{CDCl}_3$   
 24/08/2016  
 op. APO



**Figura 34** - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
HMBC 1H, 13C  
CDCl3  
24/08/2016  
Op. APO



**CAFMA**  
CENTRAL DE ANÁLISE DE FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

Current Data Parameters  
NAME Fr100-103\_Noelly  
EXPNO 300  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20160824  
Time 19.44  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm FABBO BB/  
PULPROG hmbcgp1podaqf  
TD 2048  
SOLVENT cdcl3  
NS 16  
DS 16  
SWH 4795.396 Hz  
FIDRES 2.341502 Hz  
AQ 0.2135381 sec  
RG 198.33  
DW 104.267 usec  
DE 10.00 usec  
TE 299.1 K  
CNST2 145.000000  
CNST13 10.000000  
DO 0.0000300 sec  
D1 1.5000000 sec  
D2 0.0034828 sec  
D6 0.0500000 sec  
D16 0.0002000 sec  
IN0 0.00001980 sec

----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 400.1318776 MHz  
NUC1 1H  
P1 14.28 usec  
P2 28.56 usec  
PLW1 13.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----  
SFO2 100.6228293 MHz  
NUC2 13C  
P3 9.50 usec  
PLW2 60.00000000 W

----- GRADIENT CHANNEL -----  
GFNAM[1] SMSQ10.100  
GFNAM[2] SMSQ10.100  
GFNAM[3] SMSQ10.100  
GPZ1 50.00 %  
GPZ2 30.00 %  
GPZ3 40.10 %  
F16 1000.00 usec

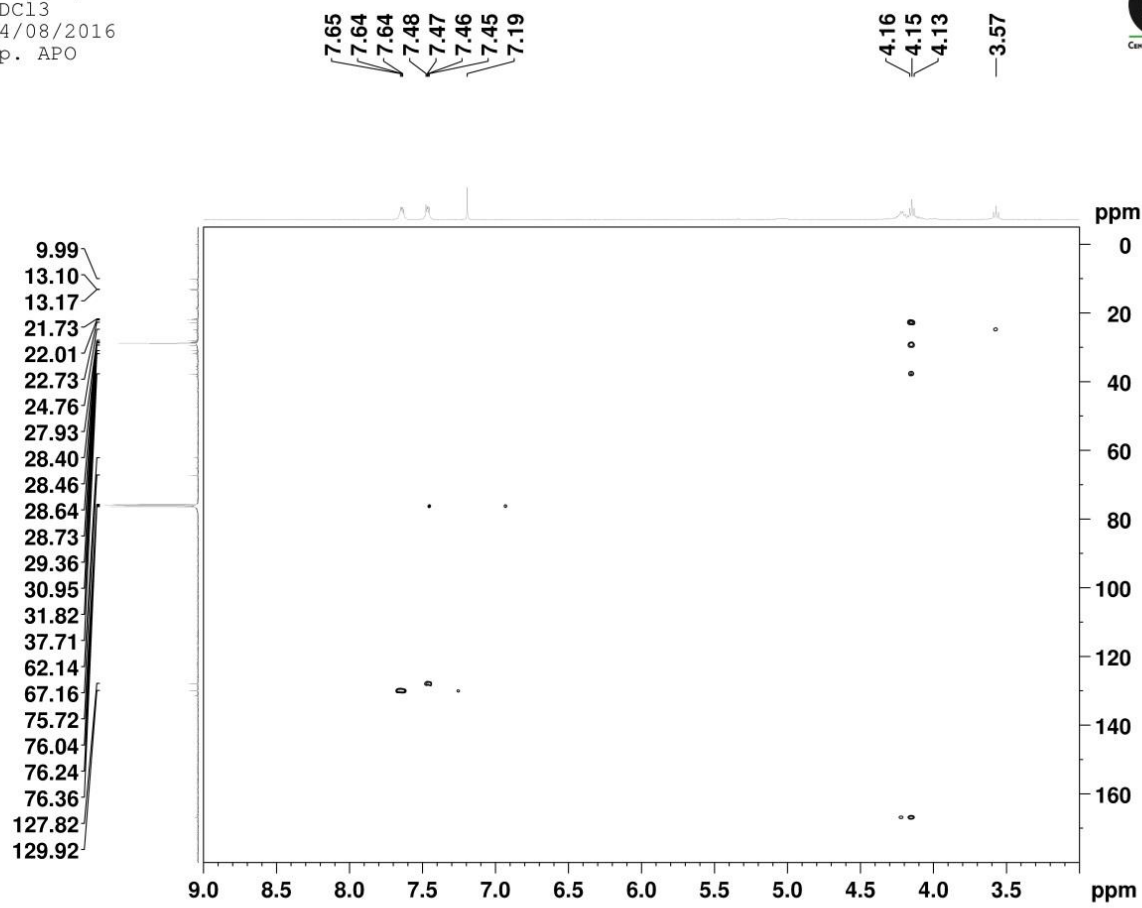
F1 - Acquisition parameters  
TD 256  
SFO1 100.6228 MHz  
FIDRES 98.642677 Hz  
SW 250.962 ppm  
FMODE QF

F2 - Processing parameters  
SI 2048  
SF 400.1300368 MHz  
WOW SINE  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0  
PC 1.40

F1 - Processing parameters  
SI 1024  
MC2 QF  
SF 100.6128692 MHz  
WOW SINE  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0

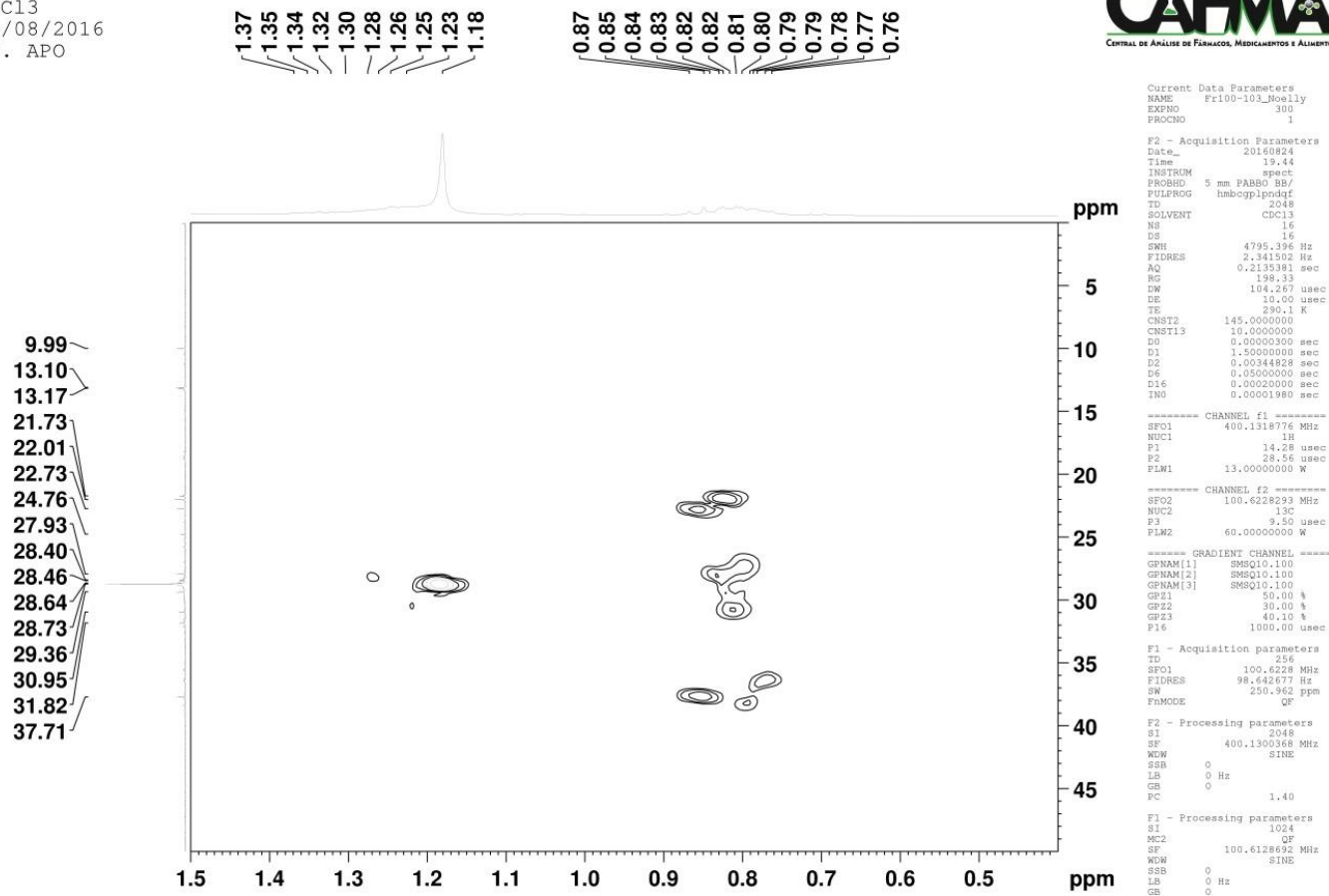
**Figura 35** - Expansão 1 do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
HMBC  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   
 $\text{CDCl}_3$   
24/08/2016  
Op. APO



**Figura 36** - Expansão 2 do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC de JM-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Fr100-103\_Noelly  
HMBC 1H, 13C  
CDCl3  
24/08/2016  
Op. APO



O composto codificado como JM-2, por sua vez, foi obtido a partir da fase acetato de etila, na forma de um precipitado esbranquiçado oriundo da fração 82-83 (10 mg), solúvel em clorofórmio. A partir da análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT (Figura 38, pág. 122 e figura 39, pág. 123) foi possível observar os deslocamentos químicos referentes aos átomos de carbono olefínico em  $\delta\text{C}$  140,70 e 121,70, os quais são atribuídos aos carbonos C-5 e C-6. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 40, pág 124), foi possível observar o multiplete na faixa de  $\delta\text{H}$  3,4 - 3,5 ppm, que é característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, o qual é atribuído ao átomo de hidrogênio H3 dos esteroides. Além disso, o espectro também apresentou sinais na faixa de 0,6 e 1,99 ppm que são referentes a átomos de hidrogênios metílicos ( $\text{CH}_3$ ), metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e metínicos ( $\text{CH}$ ) de esteroides.

Por meio das análises dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de  $^1\text{H}$  e DEPT e comparação com valores referenciados na literatura (LOMENICK et al., 2015), foi possível identificar JM-2 como sendo o fitoesterol  $\beta$ -sitosterol (Figura 37). A comparação dos valores espectrais obtidos e os dados da literatura estão listados na Tabela 14.

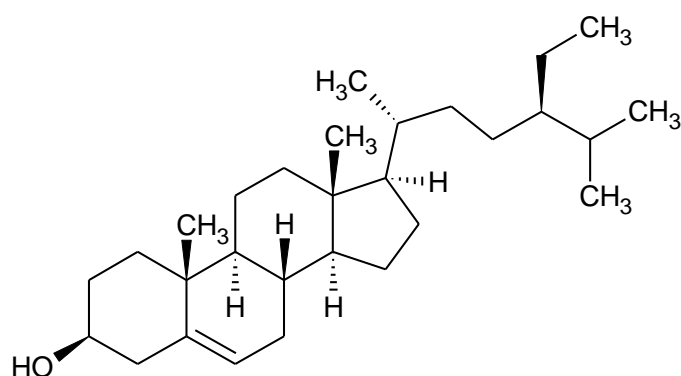
**Tabela 15.** Comparação com os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do fitoesterol  $\beta$ -sitosterol encontrados na literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	$\delta\text{C}$	
	JM-2	$\beta$ -sitosterol (literatura)
<b>C</b>		
5	140,7	140,6
10	36,4	36,8
13	42,2	42,3
<b>CH</b>		
3	71,7	72,7
6	121,7	121,9
8	31,8	31,9
9	50,0	50,1
14	56,7	56,8
17	55,9	56,0
20	36,1	36,1
24	45,7	45,8
25	29,0	29,1
<b>CH<sub>2</sub></b>		
1	37,1	37,1
2	31,5	31,8



4	42,2	42,3
7	31,8	31,9
11	21,0	21,1
12	39,7	39,8
15	24,2	24,3
16	29,0	29,1
22	33,8	33,9
23	25,9	26,0
28	22,9	23,0
<b>CH<sub>3</sub></b>		
18	11,9	11,9
19	19,4	19,3
21	18,7	18,8
26	19,8	19,8
27	19,3	19,1
29	11,9	12,3

**Figura 37** - Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol.



Fonte: Autoria própria (Estrutura desenhada no *software* C+H NMR Viewer: ChemSketch)

O  $\beta$ -sitosterol é um tipo de fitoesterol, sendo considerado um dos mais abundantes dentro do grupo de esteróis produzidos pelas plantas. Constituem uma parte significativa da dieta humana e promovem vários benefícios para a saúde (LOMENICK et al., 2015). Há relatos na literatura de que este composto possui atividade antitumoral (AWAD et al., 2007), reduz os níveis de colesterol no sangue (DESAI et al., 2016), possui efeito antiasmático (MAHAJAN e MEHTA, 2011), atividade anti-inflamatória (YIN et al., 2018; VALERIO e AWAD, 2011), bacteriostática (BURČOVÁ et al. 2018), entre outras.

Em estudo recente realizado por Shin e colaboradores (2018), foram investigados os efeitos anticâncer do  $\beta$ -sitosterol em três linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico humano (AGS, SNU-216 SNU-601). Para a realização das análises *in vitro* foi utilizado o ensaio MTT, onde foi possível observar a viabilidade celular e, para as análises *in vivo*, foi utilizada a técnica do xenoinxerto. Para o estudo do xenoinxerto, linhagens de células cancerígenas ( $2 \times 10^6$  células/100 $\mu$ l) foram misturadas, em meio RPMI, com o reagente Matrigel (mesma dosagem). A mistura de células tumorais/Matrigel foi injetada subcutaneamente nos flancos esquerdos dos camundongos (machos, com cerca de cinco semanas de idade). Após uma semana, os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos: Controle, grupo de indução (inoculação da linhagem cancerígena) e grupo  $\beta$ -sitosterol (inoculação da linhagem cancerígena com  $\beta$ -sitosterol a 100 mg/kg). A administração das substâncias teste foi feita por injeção intraperitoneal (i.p.) com  $\beta$ -sitosterol numa dosagem de 100 mg/kg durante 11 semanas. O peso corporal dos animais foi avaliado a cada semana e o volume do tumor foi medido usando calibradores digitais e calculado usando a fórmula:  $(\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}^2)$ .

Os resultados do ensaio do MTT apontaram uma atividade citotóxica significativa do  $\beta$ -sitosterol frente às três linhagens de adenocarcinoma gástrico, sendo que a AGS foi a mais sensível, sendo a escolhida para os testes posteriores. O valor da  $CI_{50}$  (onde metade do efeito máximo foi obtido) do  $\beta$ -sitosterol em células AGS foi de aproximadamente 105,5  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  após 72 horas de tratamento, sendo que a viabilidade celular foi medida nos intervalos de tempo 6, 24 e 72h após o tratamento. Nesse sentido, os autores concluíram que a viabilidade celular foi significativamente diminuída de maneira dependente do tempo. Para determinação do mecanismo de ação, foi realizado o teste de citometria de fluxo, além da análise de parâmetros celulares, tais como os níveis proteicos. Observou-se que a expressão da fosfatase, do homólogo da tensina (PTEN) e da proteína quinase foram estimulados. Além disso, observou-se também que o  $\beta$ -sitosterol suprimiu a proliferação das células cancerígenas AGS, sem toxicidade, nos modelos de xenoinxerto em camundongos. Com base nisso, os autores concluíram que o  $\beta$ -sitosterol exerce efeitos anticancerígenos significativos em células AGS *in vitro* e *in vivo*, e o mecanismo de ação proposto foi que a atividade se deu através da mediação de proteínas quinase, tensina e Hsp90 (SHIN et al., 2018).

Diante do exposto, podemos concluir que o  $\beta$ -sitosterol é uma substância importante e com um grande potencial biológico, devendo ser considerada no que concerne aos estudos químicos e farmacológicos de plantas.

Figura 38 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

Noelly 82-83  
 RMN 1H  
 $\text{CDCl}_3$   
 17/07/2016  
 Op. ALAN

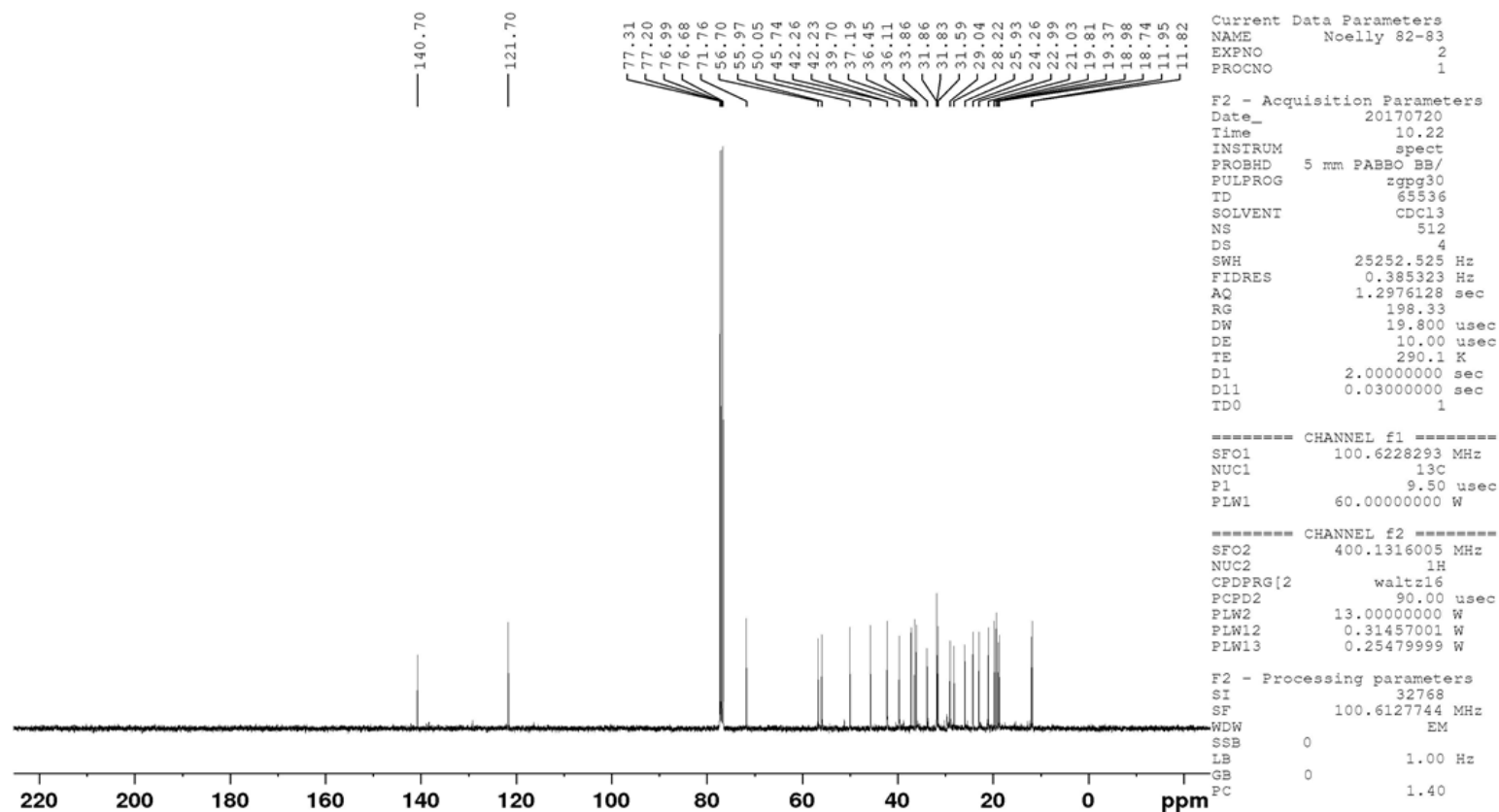


Figura 39 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

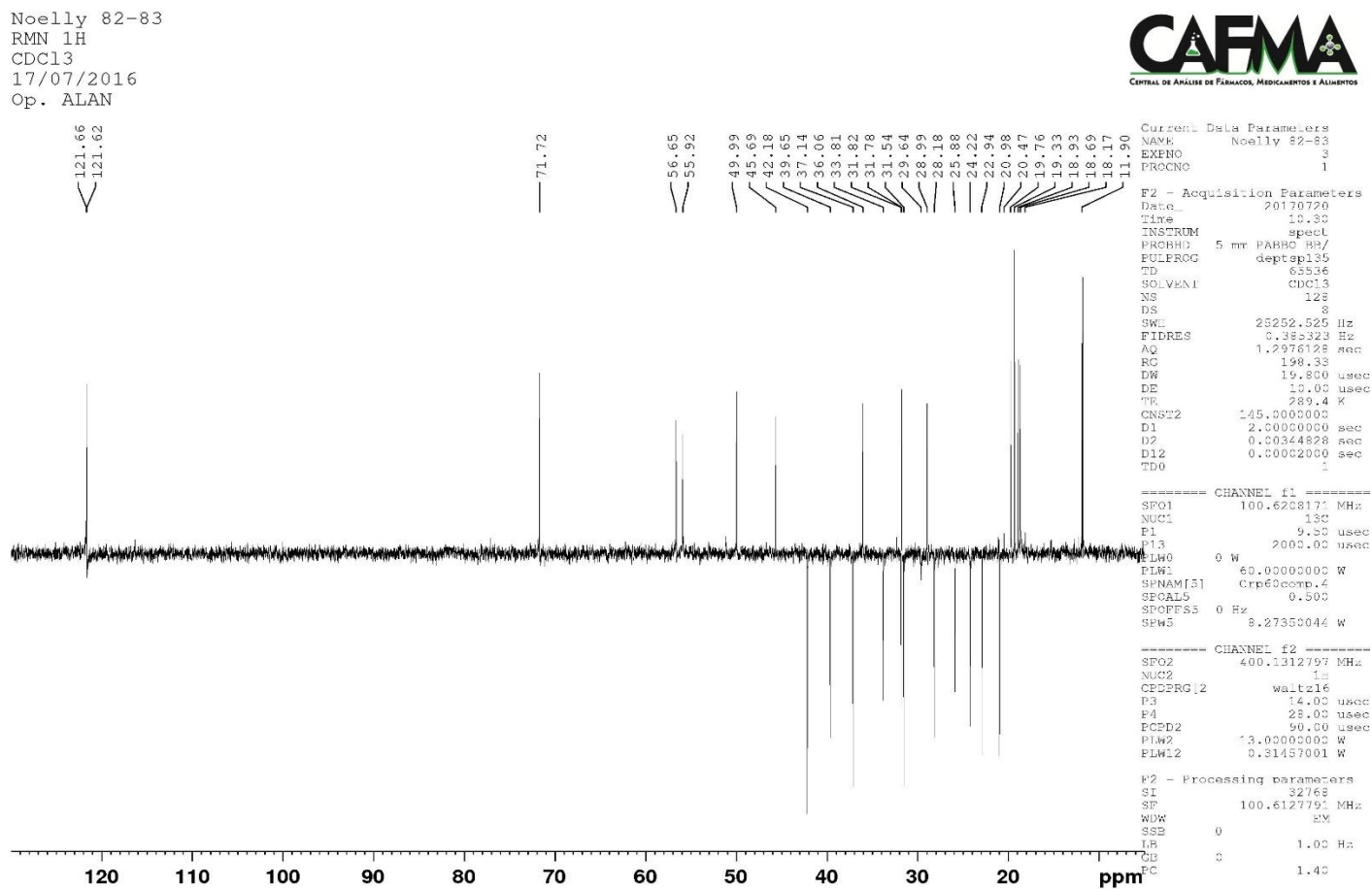
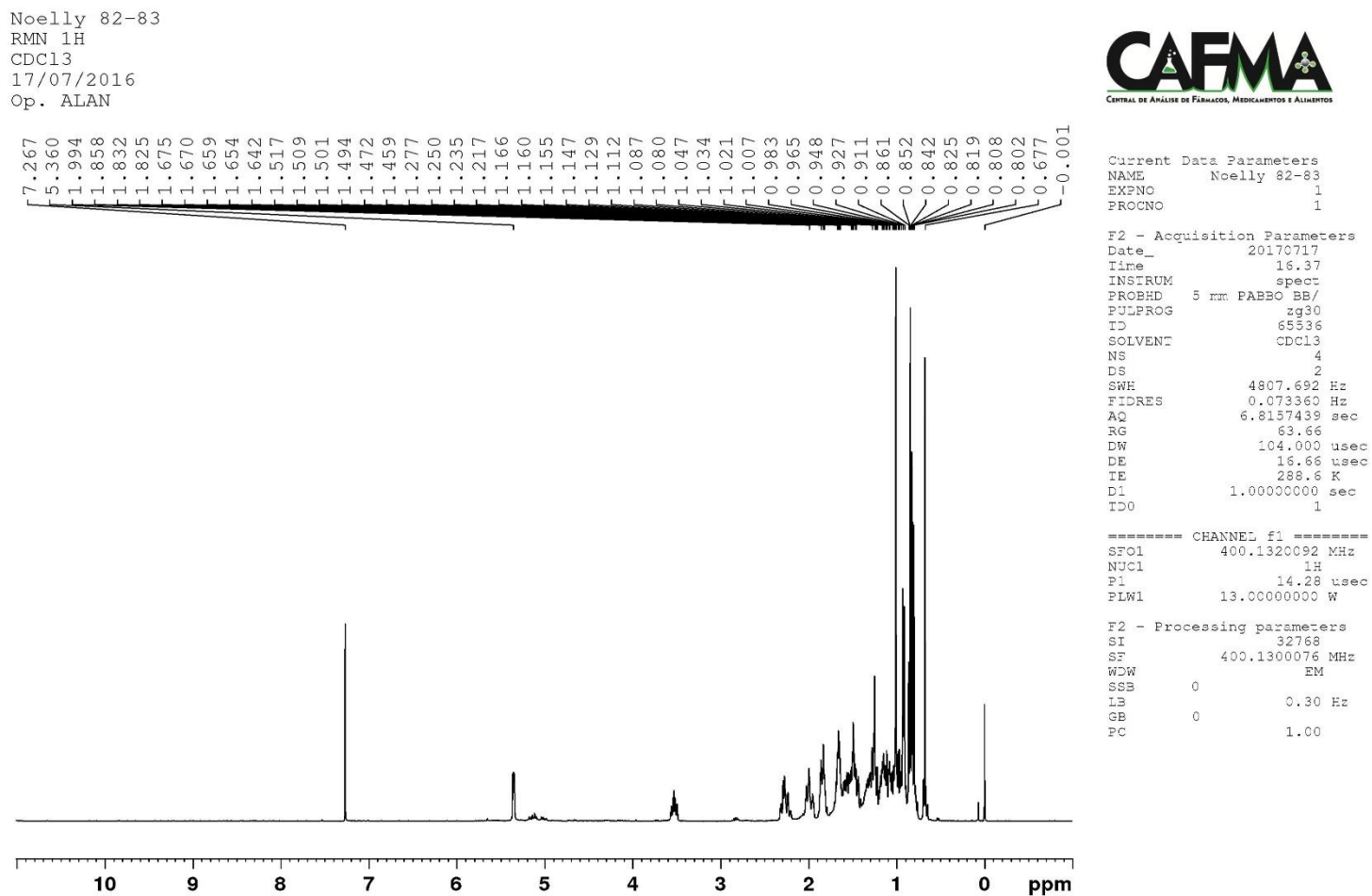
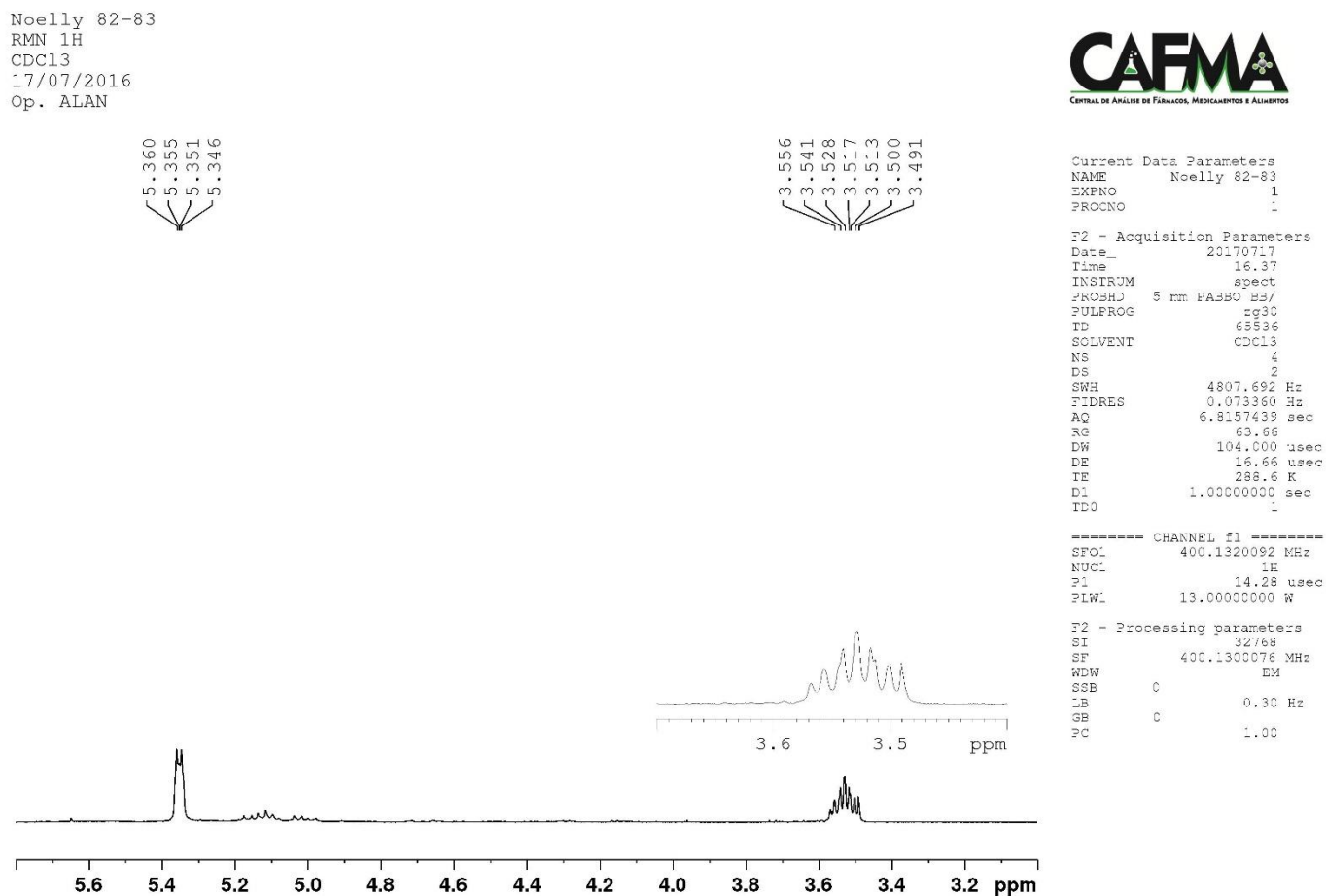


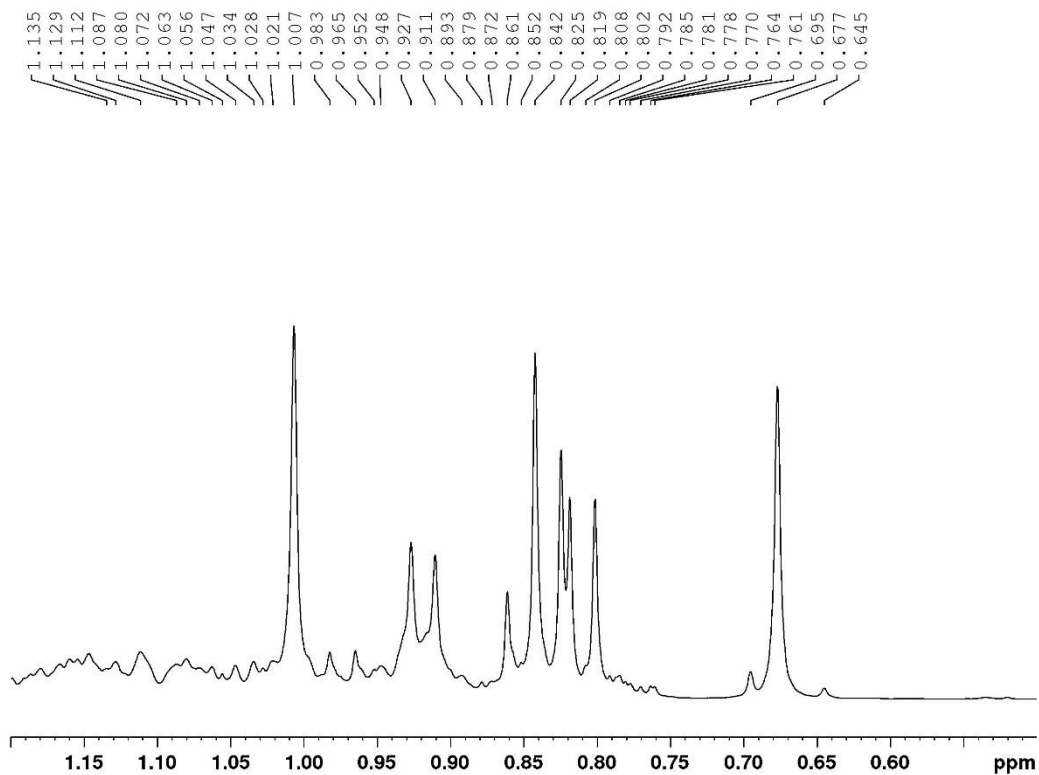
Figura 40 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

**Figura 41** - Expansão 1 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz).



**Figura 42** - Expansão 2 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz).

Noelly 82-83  
 RMN 1H  
 CDCl3  
 17/07/2016  
 Op. ALAN



Current Data Parameters  
 NAME Noelly 82-83  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20170717  
 Time 16.37  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBO BB/  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 4  
 DS 2  
 SWH 4807.692 Hz  
 FIDRES 0.073360 Hz  
 AQ 6.8157439 sec  
 RG 63.66  
 DW 104.000 usec  
 DE 16.66 usec  
 TE 288.6 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TDO 1

----- CHANNEL f1 -----  
 SF01 400.1320092 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 14.28 usec  
 PLW1 13.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1300076 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Figura 43 - Espectro de correlação <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C - HSQC de JM-2 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz e 100 MHz).

Noelly 82-83  
 RMN 1H  
 CDCl<sub>3</sub>  
 17/07/2016  
 Op. ALAN

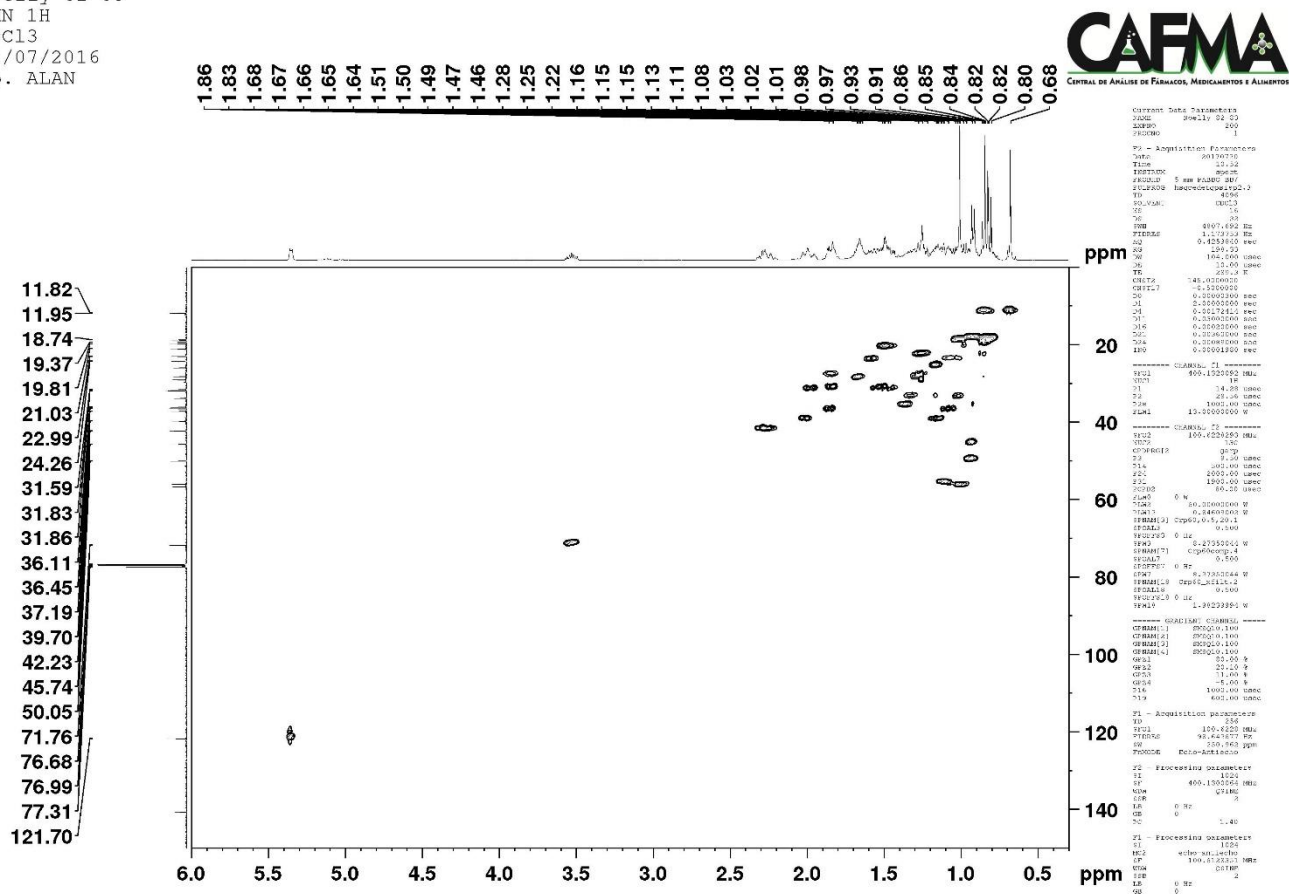




Figura 44 - Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  - HMBC de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz e 100 MHz).

Noelly 82-83  
 RMN 1H  
 $\text{CDCl}_3$   
 17/07/2016  
 Op. ALAN

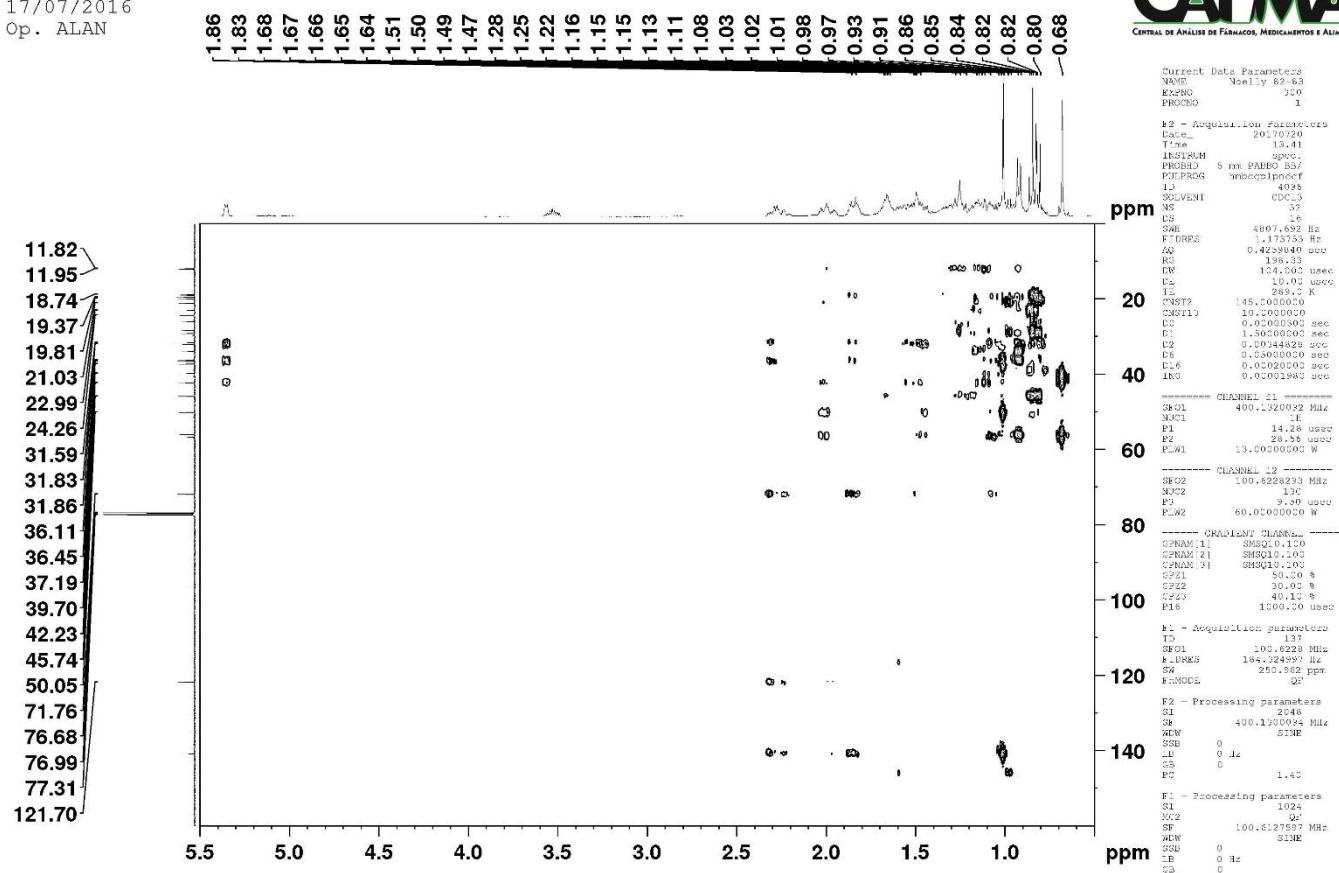
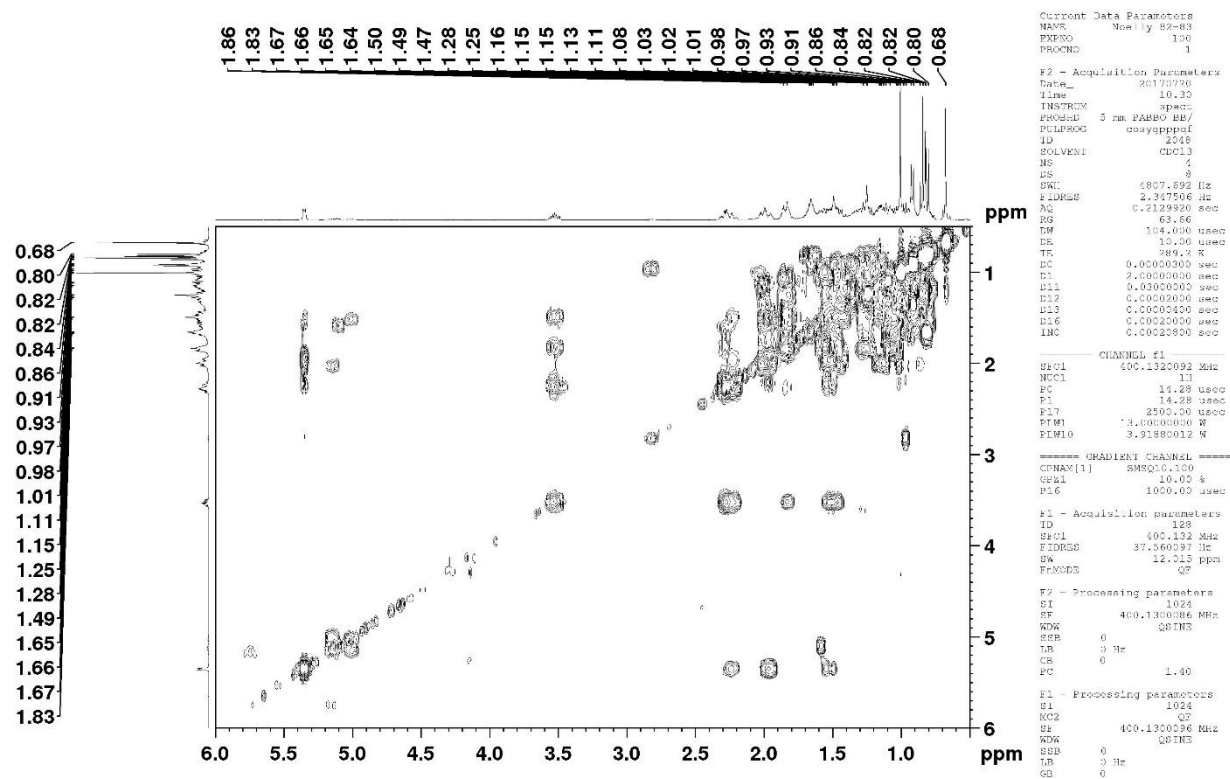


Figura 45 - Espectro de correlação  $^1\text{H}$  COSY de JM-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Noelly 82-83  
 RMN 1H  
 $\text{CDCl}_3$   
 17/07/2016  
 Op. ALAN



## 5.5 Investigação da atividade antibacteriana

Atualmente, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com relação à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o objetivo de descobrir novos compostos bioativos com atividade comparada à dos fármacos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade e maior eficácia contra a resistência de microrganismos patogênicos, além de possuírem um menor impacto ambiental. Na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, diferentes métodos podem ser utilizados, sendo os mais conhecidos o método de difusão em ágar, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição em caldo (DE BONA et al., 2014).

De acordo com Duarte (2006) e Cowan (1999), não existe um consenso comum com relação ao melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e nem sobre o nível de inibição considerado aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, devido aos poucos estudos comparativos relatando as características, pontos positivos e negativos de cada método. Há uma necessidade de uniformização dos testes *in vitro*, para que a pesquisa se torne mais eficiente e a interpretação dos dados mais facilitada e confiável. Nesse sentido, no presente trabalho, utilizou-se o parâmetro proposto por Aligianis et al. (2001) que classifica os extratos vegetais com base nos resultados de CIM. É considerado como forte inibição: CIM até 500 µg/mL, inibição moderada: CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca inibição: CIM para resultados acima de 1500 µg/mL.

Os resultados da avaliação do efeito antibacteriano do extrato e fases de *Jatropha mollissima* são apresentados na Tabela 16 (pág. 133) e são expressos como concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). De acordo com a classificação seguida, foi possível observar que dentre os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM), pôde-se considerar como forte a ação do extrato Jm-EEB frente à cepa *Serratia marcescens*, apresentando o valor de CIM de 195 µg/mL. Foi observada também uma forte atividade inibitória da fase Jm-AcOEt contra as cepas *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri* com valores de CIM de 390, 390 e 195 µg/mL respectivamente. Ainda, as fases Jm-Hex e Jm-CHCl<sub>3</sub> obtiveram um resultado moderado contra as cepas *Serratia marcescens* (as duas fases) e *Enterococcus faecalis* (fase Jm-CHCl<sub>3</sub>), com valores de 780 µg/mL.

Com relação à concentração bactericida mínima (CBM), todos os extratos se apresentaram fracamente ativos, com valores de CBM maiores ou iguais a 12500 µg/mL para

todas as amostras testadas. Entretanto, como afirma Biyiti et al. (2004), por meio da relação entre os valores de CIM e CBM, pode-se ter uma melhor avaliação do efeito antibacteriano de compostos bioativos. De acordo com este autor, uma substância é considerada bactericida quando a razão CIM/CBM é  $\leq 2$  e bacteriostática se a razão CIM/CBM  $> 2$ . Sendo assim, baseado nestes valores, foi possível classificar o extrato etanólico bruto e a fase hexânica como tendo efeito bacteriostático contra *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*, a fase clorofórmica como tendo efeito bacteriostático contra *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, a fase acetato de etila como tendo efeito bacteriostático contra *Serratia marcescens* e a fase metanólica foi classificada como não efetiva para todas as cepas bacterianas testadas. Foi possível observar que nenhum dos extratos testados apresentou potencial bactericida frente às cepas bacterianas testadas.

Em 2016, o extrato etanólico bruto das folhas de *J. mollissima* foi testado quanto ao seu potencial antimicrobiano frente à cinco linhagens bacterianas, dentre estas, quatro cepas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Hafnia alvei* ATCC 51873, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) e uma cepa Gram-positiva (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Diferentemente do nosso trabalho, onde foi utilizado o método da microdiluição em caldo, nesse estudo foi empregado o método de difusão em ágar, com o objetivo de avaliar o tamanho dos halos de inibição e mensurar, dessa forma, o potencial antimicrobiano de *J. mollissima*. Foi utilizada a concentração de 250 mg/mL do extrato para os testes e, como resultado, o maior halo de inibição foi constatado contra a espécie *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, com um diâmetro de 7,03 mm. Nesse sentido, os autores concluíram que o extrato etanólico bruto de *J. mollissima* apresentou atividade moderada frente à esta cepa bacteriana, com seu efeito sendo atribuído à provável presença de metabólitos secundários das classes: cumarinas, compostos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides e esteroides (BRAQUEHAIS et al., 2016).

Em estudo realizado por Camelo (2015), foi avaliado o potencial antimicrobiano do látex de *J. mollissima* frente à quatro cepas bacterianas, sendo duas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e duas Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, com concentrações que variaram de 8192  $\mu\text{g/mL}$  a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Semelhante ao nosso trabalho com o extrato das folhas, o látex de *J. mollissima* não apresentou atividade bactericida frente às espécies testadas, reduzindo, no entanto, o crescimento das culturas. Através da técnica denominada *Spread Plate* (técnica do espalhamento em placa), os autores observaram que houve redução no desenvolvimento das espécies *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus*

*aureus*, demonstrando o efeito bacteriostático do látex de *J. mollissima*. O gênero *Jatropha* é considerado promissor no que diz respeito ao seu potencial antimicrobiano, com estudos relatando essa atividade para diversas espécies, tais como *J. curcas* (SAOSOONG e RUANGVIRIYACHAI, 2016), *J. dioica* (SILVA-BELMARES et al., 2013), *J. multifida* (ANANI et al., 2016) e *J. isabellei* (FRÖLICH et al., 2013).

No nosso estudo, pôde-se perceber que *J. mollissima* agiu como um inibidor moderado frente as espécies *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* e *Shigella flexneri*. Isso provavelmente se deve ao fato de seu extrato e fases apresentarem em sua constituição compostos fenólicos e terpenos (como foi sugerido na triagem fitoquímica preliminar e confirmado nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência). Essas substâncias apresentam potencial antimicrobiano, como já relatado na literatura. Por meio das análises cromatográficas de CG-EM foi possível observar que o extrato e as fases analisadas apresentam em suas composições diferentes compostos da classe dos terpenos (Tabelas 9-13, págs. 85-98). Através da observação do perfil fitoquímico preliminar, também foi possível perceber que o extrato etanólico bruto e suas fases possuem em sua composição esses mesmos constituintes. Nosso trabalho se assemelha a um estudo realizado por Rahman et al. (2014) com a espécie *Jatropha curcas*, na qual foram encontrados metabólitos tais como ácido 10-octadecenoico metil éster, ácido octadecanoico, ácido 9,12-octadecadienoico metil éster e ácido *n*-hexadecenoico com potencial antimicrobiano.

Os terpenos têm despertado grande interesse devido às diversas atividades biológicas já relatadas na literatura atribuídas à estes compostos, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (COLOMA et al., 2011). Nesse sentido, estes metabólitos podem estar associados à atividade antimicrobiana apresentada por *J. mollissima*, pois, de acordo com estudos, estes apresentam capacidade de inibir o crescimento microbiano. O mecanismo de ação responsável pela sua atividade não está totalmente esclarecido, mas provavelmente é devido a ruptura da membrana plasmática por seus compostos lipofílicos (COWAN, 1999).

Diante disso, pode-se perceber que a espécie *J. mollissima* é interessante do ponto de vista químico e biológico, o que incentiva a continuação das pesquisas com esta espécie, tendo em vista que os estudos acerca da mesma ainda são poucos ou incipientes.

**Tabela 16.** Atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto e fases, obtidos a partir das folhas de *J. mollissima*.

Extrato	Jm-EEB		Jm-Hex		Jm-CHCl <sub>3</sub>		Jm-AcOEt		Jm-MeOH		Gentamicina	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Enterococcus faecalis</i>	12500	-	12500	-	780	-	390	-	12500	-	400	400
<i>Escherichia coli</i>	3125	12500	3125	12500	12500	12500	12500	12500	-	-	*	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6250	-	-	-	6250	-	-	-	-	-	50	50
<i>Salmonella enterica</i>	12500	-	-	-	6250	-	12500	12500	-	-	50	50
<i>Serratia marcescens</i>	195	12500	780	12500	780	12500	390	12500	12500	-	*	25
<i>Shigella flexneri</i>	3125	-	6250	-	3125	-	195	-	12500	12500	*	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	12500	-	6250	-	6250	-	12500	-	-	-	25	25

Todos os valores foram expressos como µg.mL; (\*) ausência de crescimento em todas as concentrações testadas.; (-) Não houve atividade sobre a cepa bacteriana testada. **Jm-EEB** (extrato etanólico bruto); **Jm-Hex** (fase hexânica); **Jm-CHCl<sub>3</sub>** (fase clorofórmica); **Jm-AcOEt** (fase acetato de etila); **Jm-MeOH** (fase metanólica).

## 5.6 Investigação da atividade moduladora da resistência a antimicrobianos

Tendo em vista o crescente problema da resistência microbiana aos fármacos atualmente disponíveis ocasionada principalmente pelo uso inadequado de antibióticos, há uma crescente preocupação por parte dos profissionais de saúde com relação à busca por novos produtos que combatam esses microrganismos de forma eficiente, minimizando os efeitos colaterais e os gastos econômicos. Nesse sentido, as plantas são consideradas uma das alternativas mais relevantes para tentar controlar a resistência bacteriana, pela variedade de substâncias bioativas oriundas de seu metabolismo secundário (SOUZA et al., 2014).

O uso de extratos vegetais como agentes antimicrobianos minimizam a possibilidade dos microrganismos adquirirem resistência à sua ação, pois são misturas complexas, fazendo com que a adaptabilidade microbiana seja dificultada. Estes compostos naturais, quando associados a determinados antibióticos, podem promover uma atividade direta frente à diversas espécies bacterianas, diminuindo ou aumentando a atividade de um antibiótico específico. A potencialização da atividade antibiótica ou a reversão da resistência aos antibióticos permite a classificação destes compostos como moduladores de atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2009).

Os resultados dos testes de avaliação do potencial modulador de *J. mollissima* estão expressos na Figura 44 (págs. 136-138). Através do teste de microdiluição em caldo feito inicialmente, foi possível definir a CIM dos extratos de *J. mollissima*, que foi  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  para as duas linhagens bacterianas multirresistentes estudadas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e a CIM dos antibióticos, que foi  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  para Amicacina e Ampicilina e  $\geq 512 \mu\text{g/mL}$  para Norfloxacin, frente às mesmas linhagens bacterianas. Os altos valores de CIM obtidos para as amostras testadas e até mesmo para os próprios antibióticos, pode ser atribuída aos mecanismos de resistência que estas duas linhagens bacterianas possuem. A resistência antibiótica ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico (LOUREIRO et al., 2016).

As bactérias podem apresentar diferentes genes de resistência e transmití-los através de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons e integrons, entre diferentes espécies e gêneros bacterianos, patogênicos ou não, bem como a transmissão subsequente dessas bactérias entre vários hospedeiros e reservatórios ambientais, colaborando com a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos.

Existem quatro mecanismos principais de resistência à antimicrobianos: produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos, redução da permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo hiperexpressos (bombas de efluxo) e alteração do sítio alvo (de ligação) do antibiótico por bloqueio ou proteção (LOUREIRO et al., 2016). Em *Pseudomonas aeruginosa*, os principais mecanismos de resistência encontrados são: produção de enzimas beta-lactamases (enzima que cliva a ligação amida do anel beta-lactâmico dos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos, rompendo esse anel), bombas de efluxo (capacidade de bombear antibióticos para fora das células) e perda de porinas (sua ausência em *P. aeruginosa* confere resistência intrínseca a um grande número de antibióticos) (SANTOS et al., 2015). Em *Staphylococcus aureus*, os principais mecanismos de resistência encontrados são: produção de enzimas beta-lactamases, redução da permeabilidade da membrana externa, ocorrência de proteína ligadora de penicilina, entre outros. Vale salientar que mais de um mecanismo pode estar presente na mesma bactéria (SOUZA et al., 2005).

Após a obtenção do resultado da CIM como foi relatado anteriormente, foi realizado o teste de modulação da resistência à antimicrobianos, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as substâncias testadas e os antibióticos. Após ensaio em triplicata utilizando o reagente resazurina, foi realizada uma comparação entre a CIM dos extratos e a CIM de cada antibiótico, para avaliação de interações entre os produtos. Observando os gráficos da Figura 46, nota-se que não houve redução da CIM dos antibióticos para nenhuma das amostras testadas (não houve interação sinérgica). As amostras testadas, de maneira geral, não interferiram no efeito dos antibióticos, com exceção da Norfloxacin.

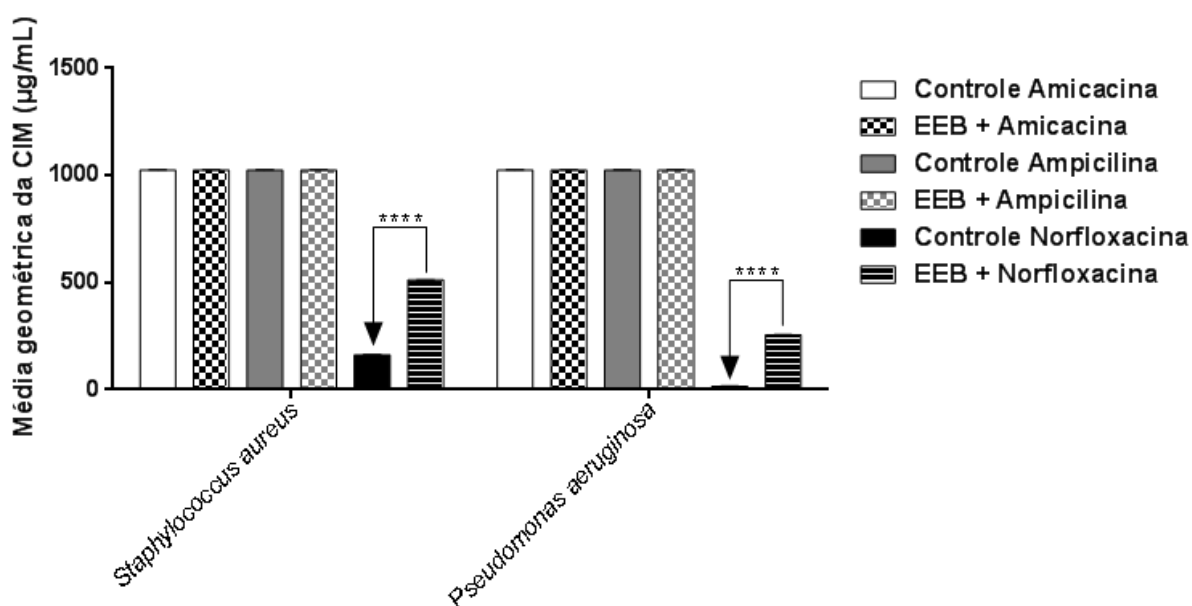
Foi possível observar interação antagônica (aumento da CIM do antibiótico) entre o antibiótico Norfloxacin e todas as amostras testadas. O extrato etanólico bruto aumentou a CIM do antibiótico de 16 µg/mL para 256 µg/mL frente à espécie *Pseudomonas aeruginosa* e de 161 µg/mL para 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. A fase hexânica, por sua vez, aumentou a CIM do antibiótico de 16 µg/mL para 512 µg/mL frente à espécie *Pseudomonas aeruginosa* e de 161 µg/mL para 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. As fases clorofórmica e metanólica, assim como o extrato etanólico bruto, aumentaram a CIM do antibiótico de 16 µg/mL para 256 µg/mL frente à espécie *Pseudomonas aeruginosa* e de 161 µg/mL para 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Por fim, a fase acetato de etila aumentou a CIM do antibiótico



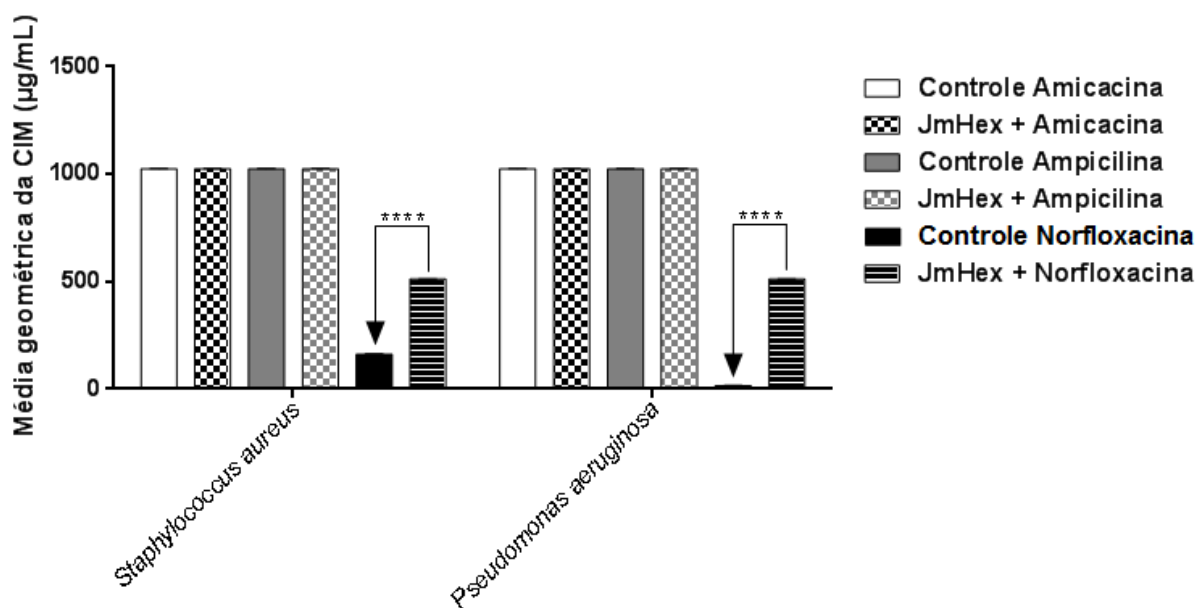
de 16  $\mu\text{g/mL}$  para 645  $\mu\text{g/mL}$  frente à espécie *Pseudomonas aeruginosa* e de 161  $\mu\text{g/mL}$  para 512  $\mu\text{g/mL}$  para *Staphylococcus aureus*.

**Figura 46 (A-E)** - Avaliação do potencial modulador do extrato etanólico bruto e suas fases, obtidos a partir das folhas de *J. mollissima*, sobre o efeito antibacteriano de antibióticos contra espécies multirresistentes.

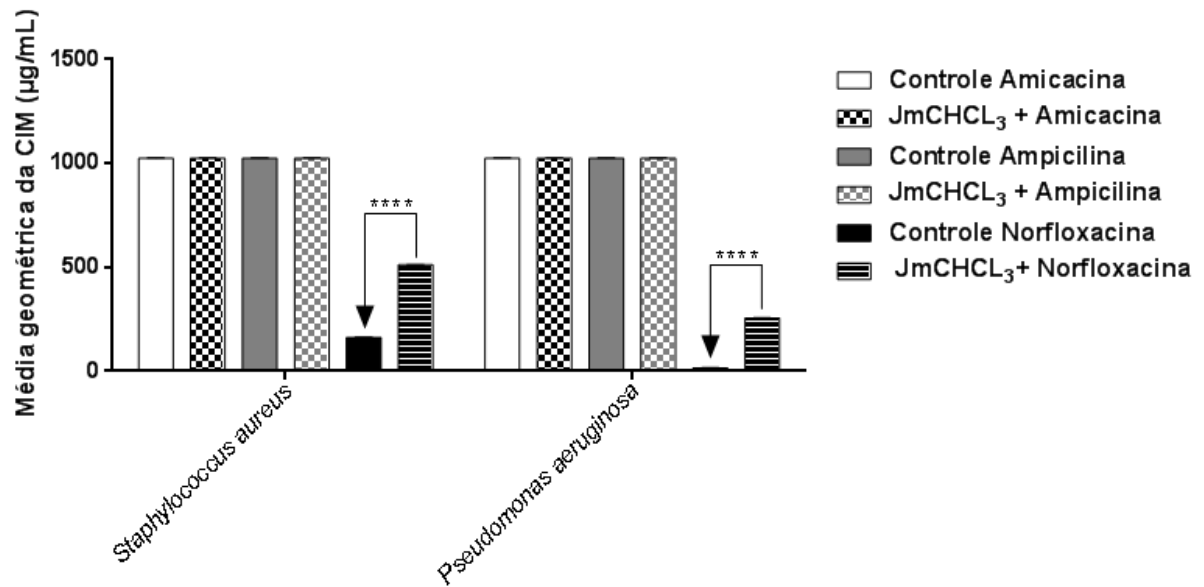
**A) Extrato etanólico bruto (Jm-EEB)**



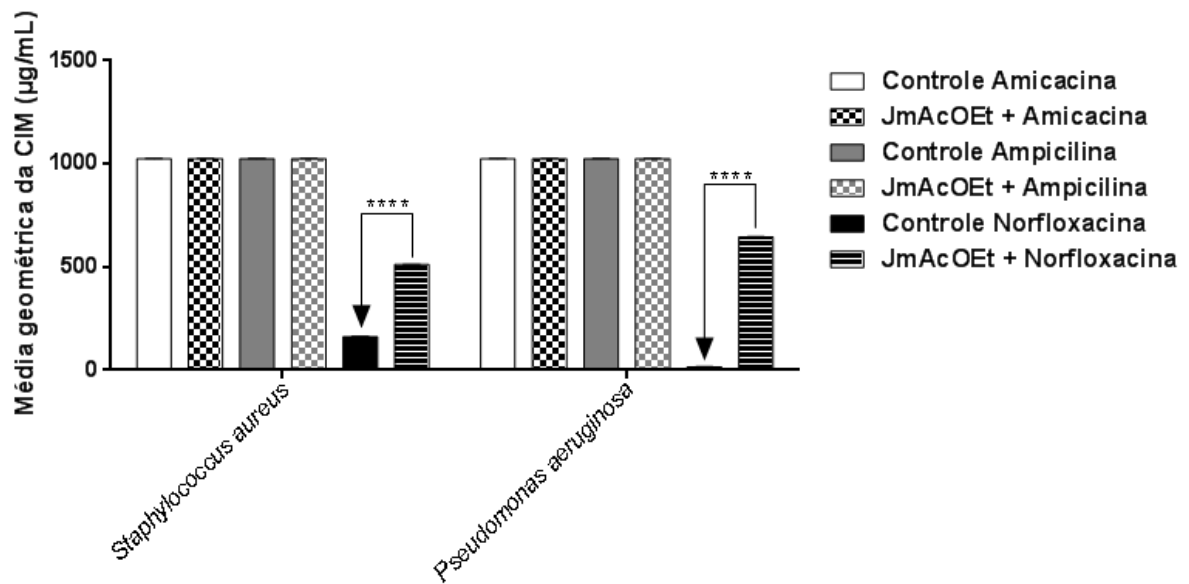
**B) Fase hexânica (Jm-Hex)**



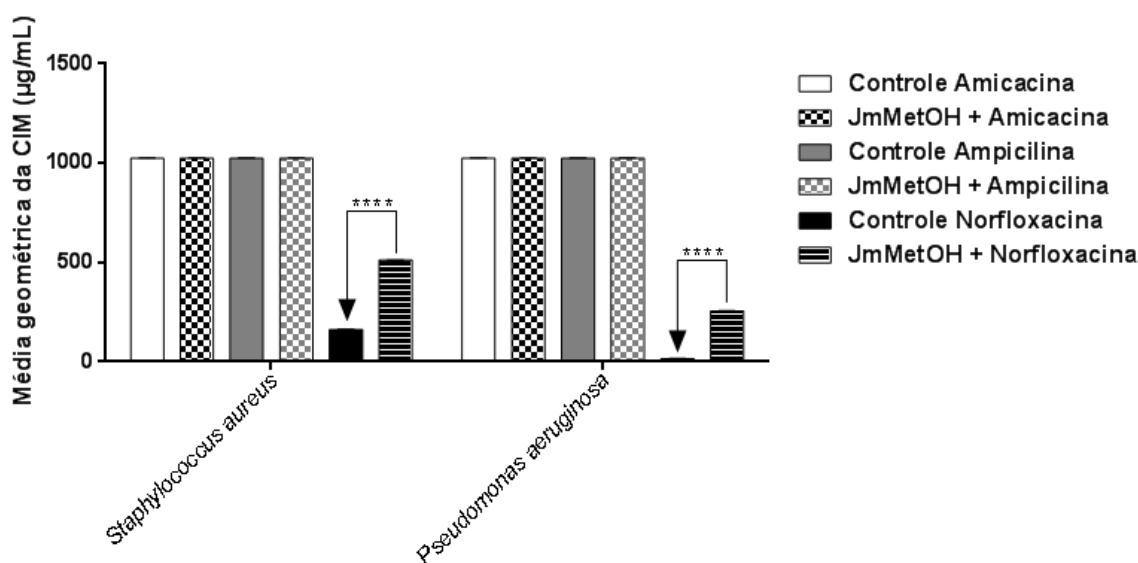
### C) Fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>)



### D) Fase acetato de etila (Jm-AcOEt)



### E) Fase metanólica (Jm-MeOH)



O antagonismo é descrito por Saraiva (2012) como sendo o resultado da associação de uma determinada droga a um extrato vegetal, onde o extrato dificulta ou inibe a ação do fármaco. De acordo com Granowitz e Brown (2008), as interações antagônicas provenientes do uso combinado entre antibióticos e produtos naturais podem ser atribuídas à ocorrência de quelação mútua. As reações de quelação são observadas mais frequentemente com o antibiótico tetraciclina e antibióticos da classe das fluoroquinolonas, tais como a norfloxacin (MAHAN et al., 2012), onde a diminuição do efeito (antagonismo) pode ocorrer principalmente devido a competição pelo mesmo receptor (HOEFLER e WANNMACHER, 2010).

O efeito antagônico também merece destaque nos estudos científicos, tendo em vista que, na medicina popular, as pessoas podem fazer uso de alguma parte da planta de forma empírica concomitante à antibioticoterapia, prejudicando, dessa forma, a eficácia do medicamento (COUTINHO et al., 2013). Trabalhos na literatura relatam que compostos fenólicos (como os flavonoides) possuem propriedades quelantes (VERAS et al., 2011; BEHLING et al., 2004), o que possivelmente explica o antagonismo entre os extratos de *J. mollissima* e o antibiótico Norfloxacin. A triagem fitoquímica preliminar sugeriu a presença de compostos fenólicos na constituição química da planta e os dados de CLAE-DAD-IT-MS/MS confirmaram a presença desses constituintes. Até o presente momento, não consta na literatura nenhum trabalho que verse sobre a atividade

modulatória de espécies do gênero *Jatropha*, sendo este também o primeiro estudo dessa natureza a ser realizado com a espécie *J. mollissima*.

### 5.7 Investigação da atividade citotóxica

Com a chegada do século XX, ocorreu um avanço significativo na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia, especialmente vegetais e microorganismos, que têm possibilitado a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica. Cerca de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais, que estão disponíveis em abundância e oferecem ótimas possibilidades de se encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT é comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade e grandes centros de referência utilizam esse método, como o programa de *screening* do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 substâncias a cada ano (SHEKAN et al., 1990). É um método eficiente por possuir características importantes como a rapidez, sensibilidade e custo relativamente baixo. A técnica foi descrita primeiramente por Mosman (1983) e permite analisar a viabilidade e o estado metabólico das células em estudo. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a capacidade citotóxica de determinada substância, mas para definir o mecanismo de ação são necessários testes mais específicos, como citometria de fluxo ou testes de morfologia (BERRIDGE et al., 1996).

Nesse sentido, foi realizado, inicialmente, um estudo preliminar (*screening*) para avaliar a capacidade citotóxica do extrato etanólico bruto e das fases obtidas a partir das folhas de *J. mollissima*, frente à três linhagens de células tumorais. Foi utilizada nos testes uma concentração única de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com escolha da concentração baseada na literatura. Os resultados obtidos com o *screening* das amostras testadas estão representados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Atividade citotóxica *in vitro* (concentração única) de extratos de *Jatropha mollissima* contra linhagens de células tumorais.

Linhagem	Percentual de inibição (%)				
	Jm-Hex	Jm-MeOH	Jm-AcOEt	Jm-CHCl <sub>3</sub>	Jm-EEB
SNB-19	60,66±4,34	60,07±1,66	96,74±3,32	38,15±0,18	97,19±1,57
PC-3	98,63±0,98	100±0,61	100±1,10	90,33±0,73	100±0,24
HCT-116	76,15±8,80	88,05±2,09	100±0,61	66,91±0,84	100±0,8

**Jm-EEB** (extrato etanólico bruto); **Jm-Hex** (fase hexânica); **Jm-CHCl<sub>3</sub>** (fase clorofórmica); **Jm-AcOEt** (fase acetato de etila); **Jm-MeOH** (fase metanólica).

Os dados da Tabela 17 demonstram que todas as substâncias testadas foram eficazes e exibiram atividade citotóxica altamente significativa, com destaque para a linhagem PC-3 (câncer de próstata), onde todas as amostras apresentaram taxa de inibição acima de 90%. Com relação à linhagem SNB-19 (astrocitoma), o extrato etanólico bruto (Jm-EEB) e a fase acetato de etila (Jm-AcOEt) apresentaram os melhores resultados, com taxa de inibição também acima de 90%, enquanto que, frente a esta mesma linhagem, as fases hexânica (Jm-Hex) e metanólica (Jm-MeOH) apresentaram atividade moderada, com taxa de inibição de 60%. A exceção foi a fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>), que apresentou uma baixa atividade citotóxica (taxa de inibição abaixo de 40%) contra a linhagem de células de astrocitoma.

Com relação à linhagem HCT-116 (câncer de cólon), apenas a fase clorofórmica (Jm-CHCl<sub>3</sub>) apresentou uma atividade citotóxica moderada (taxa de inibição entre 50% e 60%), ao passo que todos os outros extratos apresentaram uma boa taxa de inibição (acima de 75%), com destaque para a fase acetato de etila (Jm-AcOEt) e extrato etanólico bruto (Jm-EEB), que demonstraram uma taxa de inibição de 100%.

Após a verificação dos resultados obtidos na análise preliminar, onde foi possível concluir que todas as amostras testadas possuem potencial citotóxico, estas tiveram a sua atividade citotóxica avaliada novamente, frente às mesmas linhagens, desta vez para determinação da CI<sub>50</sub>, que é a concentração necessária para que seja alcançado metade do efeito máximo (taxa de inibição de 50%). Os experimentos foram realizados utilizando seis concentrações de cada extrato: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os dados detalhados de  $\text{CI}_{50}$  das amostras testadas estão representados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Atividade citotóxica *in vitro* ( $\text{CI}_{50}$ ) de extratos de *Jatropha mollissima* contra linhagens de células tumorais.

Linhagem	$\text{CI}_{50}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (intervalo) <sup>a</sup>					
	Jm-Hex	Jm-MeOH	Jm-AcOEt	Jm-CHCl <sub>3</sub>	Jm-EEB	Dox <sup>b</sup>
SNB-19	164,7	165,4	71,44		80,91	1,20
	151,5-	150,3	- 66,76	- >200	74,26	- 1,03-1,39
	179,09	182,2	76,44		88,15	
PC-3	87,33	92,18	25,19	87,66	41,36	0,44
	78,84	- 83,36	- 21,92	- 77,12	- 32,55	- 0,34-0,54
	96,75	101,9	28,94	99,64	52,56	
HCT-116	128,3	137,7	72,75	166,0	80,71	0,11
	102,4	- 130,4	- 66,44	- 154,3	- 73,79	- 0,08-0,14
	160,7	145,4	79,66	178,5	88,27	
L929 <sup>c</sup>	59,8±1,7	53,7±4,9	47,2±2,4	60,5±0,6	46,9±2	—

<sup>a</sup>Valores de concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, realizados em triplicata em três linhagens tumorais. <sup>b</sup>Doxorrubicina foi usada como controle positivo. <sup>c</sup>Valores expressos como percentual de inibição de crescimento celular  $\pm$  desvio padrão, na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . **Jm-EEB** (extrato etanólico bruto); **Jm-Hex** (fase hexânica); **Jm-CHCl<sub>3</sub>** (fase clorofórmica); **Jm-AcOEt** (fase acetato de etila); **Jm-MeOH** (fase metanólica).

Observando os resultados na Tabela 18, é possível verificar novamente a atividade citotóxica dos extratos frente às três linhagens tumorais utilizadas no estudo, os quais apresentaram potencial citotóxico variando de 25,19 a 166  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A fração acetato de etila (Jm-AcOEt) apresentou a menor  $\text{CI}_{50}$  (25,19  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguida do extrato etanólico bruto (Jm-EEB) com  $\text{CI}_{50}$  de 41,36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à linhagem de câncer de próstata (PC-3). Para a linhagem de câncer de cólon (HCT-116), a citotoxicidade variou de 72,75 a 166  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , onde a fração Jm-AcOEt apresentou a melhor atividade frente esta linhagem (72,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Uma linhagem não tumoral (L929 - Fibroblasto) foi utilizada, ainda, para verificação da seletividade das amostras. O valor de  $\text{IC}_{50}$  abaixo de 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentado pela fase Jm-AcOEt frente à linhagem de células tumorais PC3, bem como a citotoxicidade da mesma apresentada frente à todas as linhagens de células tumorais testadas no *screening*, caracterizam esta fase como sendo promissora para a pesquisa de novos agentes anticâncer, com destaque

para o câncer de próstata, encorajando a continuidade dos estudos para que sejam traçados os possíveis mecanismos de ação.

O câncer de próstata é uma grande ameaça à saúde humana e é um dos que mais atinge os homens em todo o mundo (cerca de 1,1 milhões de casos), sendo considerado o câncer que tem a maior taxa de mortalidade, ficando atrás apenas do câncer de pulmão. A taxa varia muito de acordo com a localidade, sendo observado o maior número de casos de morte na América do Norte e o menor número na Ásia. O tratamento geralmente é feito utilizando medicamentos antiandrógenos, mas muitos pacientes são mais propensos a desenvolver tumores independentes do tratamento, sendo estes tumores geralmente mais agressivos, mais resistentes aos agentes quimioterápicos usados e causam, ainda, mais metástases do que outros tipos de tumor. Nesse sentido, a descoberta de novos agentes terapêuticos é muito importante, objetivando melhorar os resultados dos tratamentos já existentes para o câncer de próstata. Os produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais são uma ótima fonte para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos e oferecem subsídios seguros para a fabricação de medicamentos sintéticos (HASSANIPOUR et al., 2018; NASCIMENTO-GONÇALVES et al., 2018; WANG et al., 2018).

O gênero *Jatropha* é promissor nesse sentido, e várias de suas espécies já foram estudadas com relação ao seu potencial citotóxico e/ou antiproliferativo. Em 2015, o óleo essencial das raízes de *J. ribifolia*, obtido por hidrodestilação, foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico, frente à nove linhagens celulares cancerígenas: U-251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário - linhagem resistente a medicamentos), 786-0 (rim), NCI-460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon), K562 (leucemia) e PC-3 (próstata). Através da técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), foram obtidas 5 frações (F1-F5) a partir do óleo essencial bruto. Essas frações foram testadas e a  $CI_{50}$  determinada, utilizando as concentrações de 0.25, 2.5, 25 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , realizando todos os testes em triplicata. Para as análises, foi utilizado o ensaio de Sulforrodamina B (SRB), corante usado para determinar a densidade celular via determinação de proteínas celulares. Como resultado, os autores observaram que o óleo essencial bruto promoveu um efeito inibitório dose-dependente em todas as linhagens testadas, considerando o intervalo de concentração mencionado anteriormente. As frações (F1-F5), por sua vez, tiveram um efeito mais pronunciado, com valores de  $CI_{50}$  mais baixos do que os do óleo essencial bruto. A linhagem de células cancerígenas PC-3 (próstata), assim como no nosso trabalho, foi a mais sensível,

com valores significativos de  $CI_{50}$  para as frações F1, F2 e F4 ( $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os autores atribuíram a atividade citotóxica significativa à presença de terpenos na constituição química do óleo essencial, com possível sinergismo entre esses compostos (SILVA et al., 2015).

Lei e colaboradores, em 2013, realizaram na China um estudo com o extrato das folhas da espécie *J. curcas*. Os experimentos, *in vitro*, foram realizados utilizando duas linhagens celulares cancerígenas: A431 (carcinoma epidermoide humano) e A375 (melanoma), para determinar o efeito antiproliferativo. As taxas de inibição de crescimento celular em A375 e A431 foram de 80% ( $41,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 73,7% ( $43,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), respectivamente, utilizando a concentração de  $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$  do extrato. Obteve-se, ainda, um composto isolado da classe dos flavonoides, identificado como isoschaftosideo, que mostrou efeito antiproliferativo moderado contra a linhagem A375. Os autores concluíram que o extrato das folhas de *J. curcas* possui um forte efeito citotóxico, atribuindo essa atividade à quantidade de compostos fenólicos em sua constituição química. O composto isolado também foi testado quanto à sua capacidade antiproliferativa frente às mesmas linhagens, obtendo, porém, um efeito menos pronunciado do que o do extrato como um todo. Os autores acreditam que tal fato pode ser um indicativo de importantes atividades citotóxicas de outros compostos dentro do extrato, bem como efeitos sinérgicos entre eles (LEI et al., 2013).

A fração metanólica de *J. curcas*, em 2009, foi estudada quanto à sua capacidade antiproliferativa e anti-metastática *in vitro* e *in vivo*, utilizando a linhagem B16F10 (melanoma) em ratos. Nos testes *in vivo*, importantes parâmetros foram analisados, tais como: teor de hidroxiprolina, teor de hexosamina e níveis de ácido urônico, ácido siálico sérico e  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase, que são marcadores de proliferação neoplásica. Foi feita nos animais uma administração simultânea da fração metanólica, nas doses 100 e 200 mg/kg. Os autores observaram que houve inibição na formação de colônias metastáticas do melanoma em pulmões em 47,54% (para a dose de 100 mg/kg) e 69,52% (para a dose de 200 mg/kg). Os teores de hidroxiprolina, hexosamina, dos ácidos e da  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase que estavam altamente elevados nos animais utilizados como controle, foram reduzidos significativamente pela administração simultânea da fração metanólica de *J. curcas* nas concentrações testadas. A análise histopatológica dos tecidos pulmonares também se correlacionou com os resultados obtidos pelos pesquisadores. O ensaio citotóxico *in vitro* da fração metanólica de *J. curcas* em células de melanoma B16F10 foi realizado utilizando o método MTT, onde a



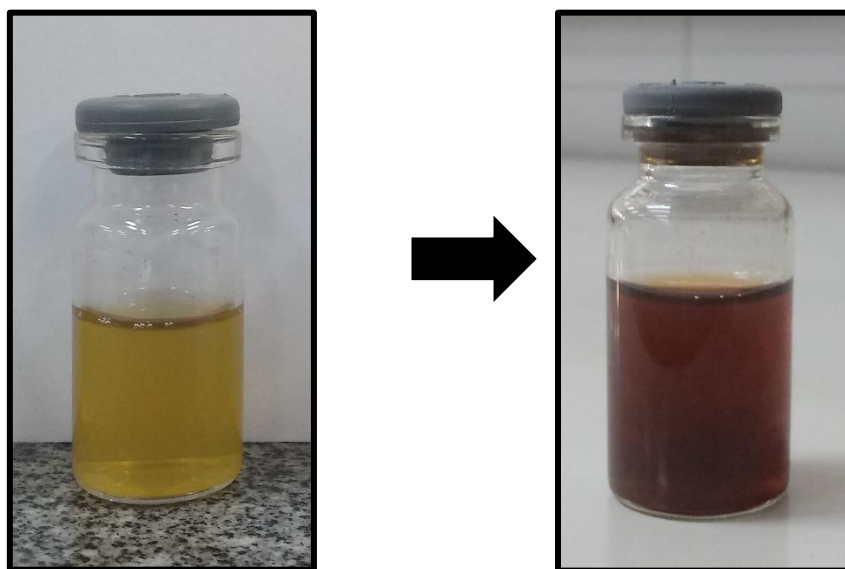
melhor IC<sub>50</sub> encontrada foi de 24,8 µg/ml. Assim, os autores concluíram que a fração metanólica de *J. curcas* é eficaz na inibição da metástase de células de melanoma B16F10 e também possuem atividade anti-metastática e antiprolifativa, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos em sua constituição química, pois a triagem fitoquímica indicou a presença de flavonoides no extrato, já conhecidos por sua capacidade antiroliferativa (BALAJI et al., 2009).

Diante do exposto, é possível observar o potencial citotóxico do gênero *Jatropha*, o que torna ainda mais necessário estudos mais aprofundados, incluindo estudos com moléculas isoladas, para elucidar possíveis mecanismos de ação de extratos e frações. Este foi o primeiro estudo dessa natureza realizado com a espécie *J. mollissima*.

### **5.8 Síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando o extrato aquoso das folhas de *J. mollissima* como agente redutor**

A síntese verde das nanopartículas de prata foi realizada em única etapa, à temperatura ambiente, seguindo o planejamento experimental proposto por Parthiban et al. (2018), com algumas adaptações, por não haver relatos na literatura abordando o extrato aquoso de *Jatropha mollissima* como agente redutor. Após 1 hora de incubação das misturas, na ausência de luz e em temperatura ambiente, foi possível observar visualmente uma mudança na coloração das soluções. A coloração amarelo-claro inicial (extrato aquoso) se transformou em marrom-escuro, indicando a formação de nanopartículas de prata (Figura 47). A mudança de coloração é a primeira evidência de formação das nanopartículas de prata, que se confirma através de análises por espectroscopia no UV-Visível.

**Figura 47.** Reação de biossíntese de nanopartículas de prata com mudança de coloração.



Fonte: Autoria própria

## 5.9. Caracterização das amostras de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde

### 5.9.1 Análise do pico SPR por absorbância no UV-Visível

As reações de biossíntese de nanopartículas de prata foram acompanhadas através de varredura por espectrofotometria no UV-Vis, no intervalo de comprimento de onda entre 190 e 1100 nm. No presente trabalho os picos SPR variaram de 420 a 428 nm. Os resultados das análises por espectrofotometria UV-Vis são apresentados na Figura 48 (A-D).

É possível observar que as amostras obtidas apresentaram picos de absorbância inferiores a 450 nm, caracterizando a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs). As AgNPs apresentam pico de absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda no intervalo entre 420-500 nm devido à sua ressonância plasmônica de superfície. O pico que aparece na análise por UV-Vis (denominado pico SPR, do inglês “*surface plasmon resonance*”) é resultado da oscilação dos elétrons de superfície em resposta a uma exposição à radiação eletromagnética em determinado comprimento de onda

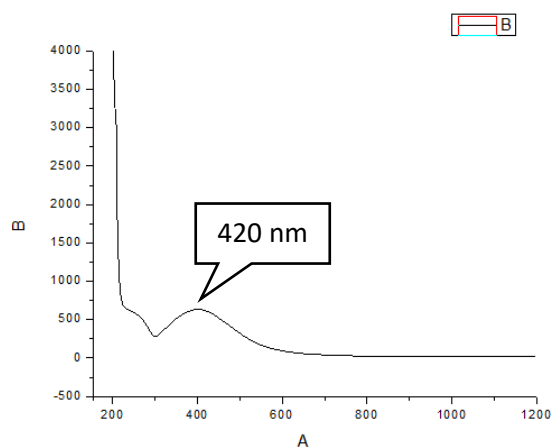
(TITUS et al., 2019). Este pico tem relação com a variação de cor característica que varia de marrom avermelhado a marrom escuro (ALBERNAZ, 2014).

A espectroscopia no UV-vis é uma técnica muito útil e confiável para a caracterização primária de nanopartículas de prata, sendo usada para monitorar a síntese e estabilidade das mesmas. A espectroscopia no UV-vis é uma técnica rápida, fácil, simples, sensível e seletiva para diferentes tipos de nanopartículas, necessitando apenas de um curto período de tempo para a medição. Além disso, calibrações prévias no equipamento não são necessárias para a caracterização de partículas de suspensões coloidais (ZHANG et al., 2016).

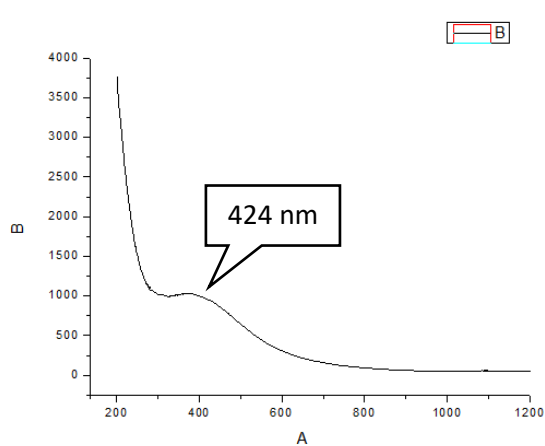
Os diferentes picos SPR podem também sugerir a morfologia de nanopartículas metálicas, tais como: forma de bastão (pico SPR 370-380 nm), esférica (pico SPR 408-430 nm), cubo (pico SPR 450-600 nm) e triangular (pico SPR 670-740 nm) (ALBERNAZ, 2014).

**Figura 48.** Curvas de formação representativas das medidas de absorvância no UV-Vis de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde.

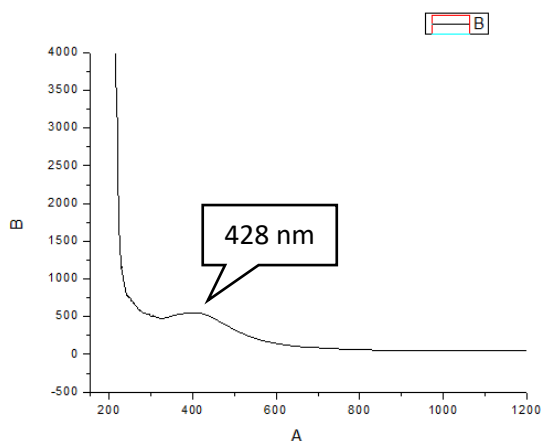
A) Amostra 1 (5 mM)



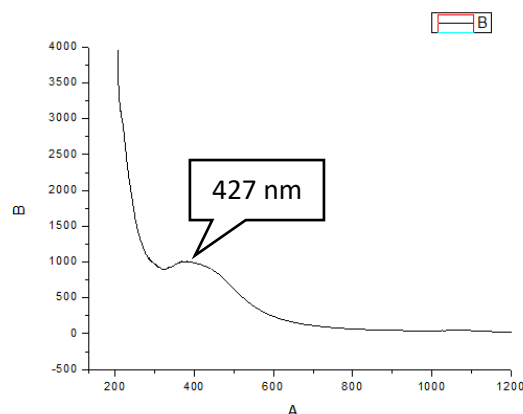
B) Amostra 2 (10 mM)



C) Amostra 3 (25 mM)



D) Amostra 4 (50 mM)



### 5.9.2 Determinação do tamanho das partículas (DLS) e Potencial Zeta (PZ)

Espalhamento de luz dinâmico (DLS - do inglês *dynamic light scattering*) e potencial zeta (PZ) surgiram como técnicas simples, executáveis em ambientes de laboratório comuns, para investigar, respectivamente, tamanho e carga de superfície de nanopartículas metálicas. Os instrumentos integrados, compactos e acessíveis oferecem interfaces digitais de fácil utilização, juntamente com a possibilidade de uma análise de dados abrangente. Além disso, as técnicas não são invasivas, exigem preparação mínima da amostra e nenhuma calibração pré-experimental. Os instrumentos modernos atuais são capazes de orientar os usuários sobre a qualidade dos dados gerados e possuem capacidade de exportar os dados rastreados como arquivos compatíveis com vários softwares de plotagem (BHATTACHARJEE S., 2016).

No presente trabalho foram realizadas inicialmente medidas utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação da diferença entre o tamanho das partículas obtidas nos experimentos, bem como sua dispersão na solução coloidal. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 19. É possível observar que as amostras apresentaram uma distribuição bimodal (com exceção da amostra 4), visto que as populações de AgNPs apresentaram dois picos, sendo um de maior e outro de menor intensidade, como pode ser observado na Figura 49 (A-D).

O índice de polidispersividade (PdI) obtido para as nanopartículas de prata biossintetizadas variou de 0,382 a 0,500. Esse valor é um indicativo de monodispersividade moderada das nanopartículas obtidas. De acordo com Bonato e

Silva (2014), as nanopartículas de prata formadas por rotas de síntese verde geralmente possuem um PDI moderado, variando de 0,3 a 0,5 (BONATTO e SILVA, 2014).

Estudos têm demonstrado que o tamanho, a morfologia, a estabilidade e as propriedades (químicas e físicas) das nanopartículas metálicas são fortemente influenciadas pelas condições experimentais, pela cinética de interação dos íons metálicos com os agentes redutores e/ou pelos processos de adsorção de agentes estabilizadores com as nanopartículas metálicas (KHODASHENAS e GHORBANI, 2015).

A técnica de DLS é usada principalmente para determinar o tamanho das partículas e avaliar as distribuições de tamanho em soluções aquosas ou fisiológicas. O método utilizado na DLS é um método não destrutivo e é usado para obter o diâmetro médio de nanopartículas dispersas em líquidos. Tem a vantagem especial de sondar uma grande quantidade de partículas simultaneamente (ZHANG et al., 2016). A técnica também fornece detalhes sobre o estado de agregação de nanopartículas. Uma solução agregada, por exemplo, terá diâmetros hidrodinâmicos maiores, enquanto que uma solução não agregada terá um diâmetro menor. Os diâmetros hidrodinâmicos dependem do tamanho e do formato das nanopartículas (TITUS et al., 2019).

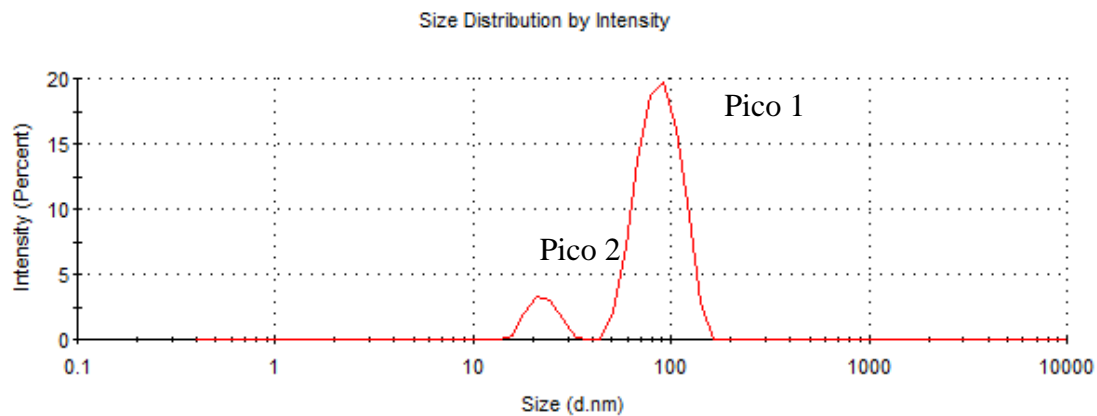
**Tabela 19.** Dados obtidos por análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

<b>Amostra</b>	<b>Tamanho hidrodinâmico médio Dz (nm)</b>	<b>PDI</b>
<b>1 (5 mM)</b>	85,56	0,382
<b>2 (10 mM)</b>	87,72	0,303
<b>3 (25 mM)</b>	89,05	0,310
<b>4 (50 mM)</b>	205,50	0,500

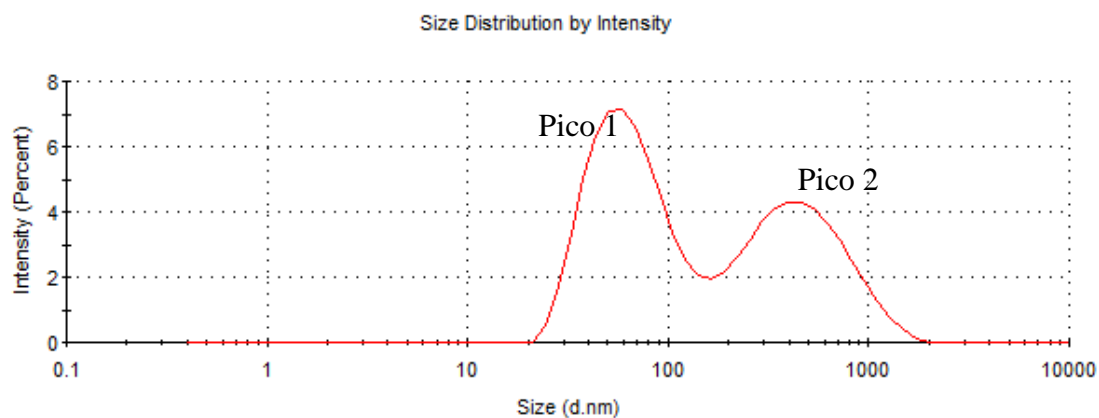
PdI: índice de polidispersividade.

**Figura 49 (A-D).** Representação da distribuição das nanopartículas de prata obtidas por síntese verde em meio aquoso.

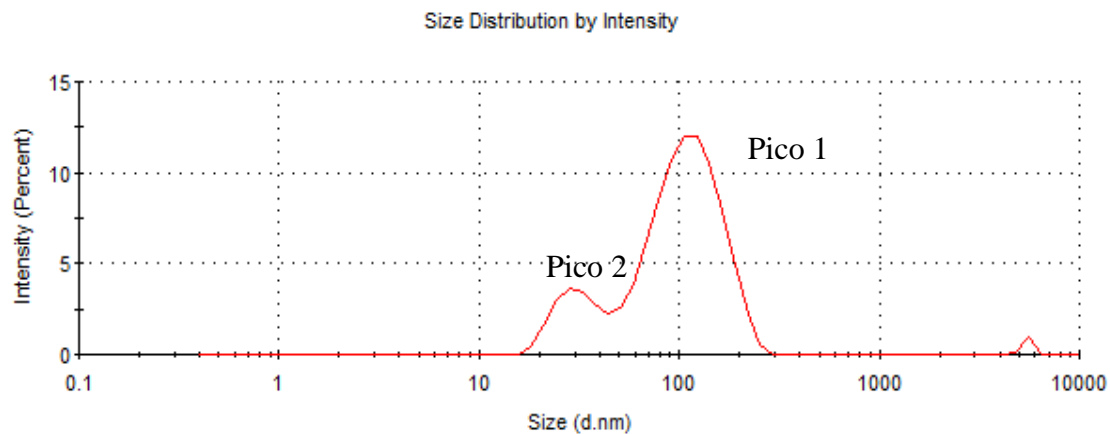
**A) Amostra 1 - 5 mM**



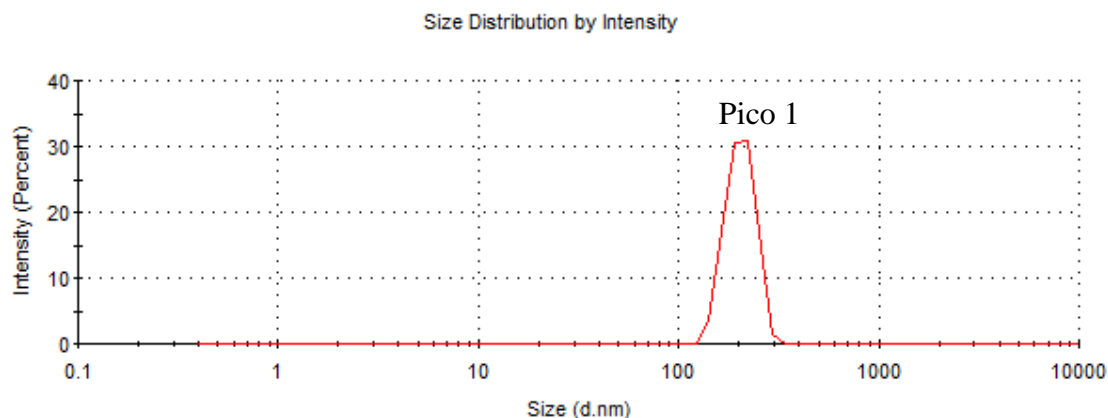
**B) Amostra 2 - 10 mM**



**C) Amostra 3 - 25 mM**



#### D) Amostra 4 - 50 mM



O potencial zeta, por sua vez, foi determinado por meio da medida da direção e da velocidade do movimento das partículas em um campo elétrico. A determinação do valor de potencial zeta para sistemas coloidais e nanopartículas metálicas tem grande importância, pois este pode ser relacionado à estabilidade das mesmas. Como mostrado na Tabela 20, todas as suspensões obtidas apresentaram potencial zeta carregados negativamente em meio aquoso, fato este que pode ser atribuído à composição do extrato utilizado como agente redutor.

Segundo Titus et al. (2019) quanto maior o potencial zeta, maior a tendência da suspensão à estabilidade, pois as partículas carregadas se repelem entre si, com uma força que supera a tendência natural de agregação. Este é influenciado principalmente pela concentração eletrolítica e pelo pH da suspensão coloidal. Partículas com um potencial zeta negativo se ligam às superfícies carregadas positivamente e vice-versa (TITUS et al., 2019).

**Tabela 20.** Potencial Zeta das nanopartículas obtidas por síntese verde utilizando o extrato aquoso de *J. mollissima* como agente de redução.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
1 (5 mM)	-28,7
2 (10 mM)	-22,9
3 (25 mM)	-13,3
4 (50 mM)	-12,3

Na literatura existem poucos trabalhos que abordam a síntese verde e a caracterização de nanopartículas de prata no gênero *Jatropha*. Dos trabalhos encontrados nas bases de dados, a grande maioria utilizou a espécie *Jatropha curcas* como objeto de estudo.

Um estudo realizado em 2013 por Demissie e Lele relata uma biossíntese rápida de nanopartículas de prata utilizando o extrato aquoso de sementes de *Jatropha curcas*. O tamanho das partículas e as análises morfológicas foram realizadas utilizando as técnicas de potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As propriedades físico-químicas foram monitoradas por espectroscopia UV-Vis, Infravermelho (FTIR) e difração de raios X (XRD). A formação das nanopartículas de prata foi determinada usando espectrofotômetro UV-Vis com pico de absorvância detectado em 421 nm. A análise de potencial zeta indicou que as nanopartículas eram carregadas negativamente, com tamanho variando de 2 nm a 50 nm. As análises por MEV e MET apontaram a morfologia das nanopartículas, que se apresentaram uniformemente esféricas. O estudo físico-químico usando XRD indicaram estabilidade térmica significativa e natureza cristalina das nanopartículas. Os autores concluíram que esta biossíntese de nanopartículas de prata é simples, ecológica e mais barata do que outras técnicas mecânicas e químicas (DEMISSIE e LELE, 2013).

Um estudo realizado na Índia por Bar e colaboradores relata um processo para a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando o extrato aquoso das sementes de *J. curcas*. Foram utilizadas diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  ( $10^{-3}$  M;  $2 \times 10^{-3}$  M;  $4 \times 10^{-3}$  M;  $6 \times 10^{-3}$  M;  $8 \times 10^{-3}$  M e  $10^{-2}$  M). A caracterização das nanopartículas foi realizada utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios X (XRD), espectroscopia no infravermelho (FTIR) e UV-vis. As análises por TEM e XRD mostrou que as partículas obtidas possuíam natureza cristalina com geometria predominantemente esférica e tamanho médio entre 15-50 nm. A análise por FTIR indicou a presença de grupos funcionais relativos à ácidos graxos presentes no extrato. Com relação à análise por UV-Vis, os autores observaram picos de absorção plasmônica de superfície nos comprimentos de onda de 425 e 452 nm. Os autores concluíram que o tamanho das partículas pode ser controlado variando a concentração de  $\text{AgNO}_3$  e que as nanopartículas de prata preparadas permanecem intactas por quase dois meses se forem protegidas da luz (BAR et al., 2009).

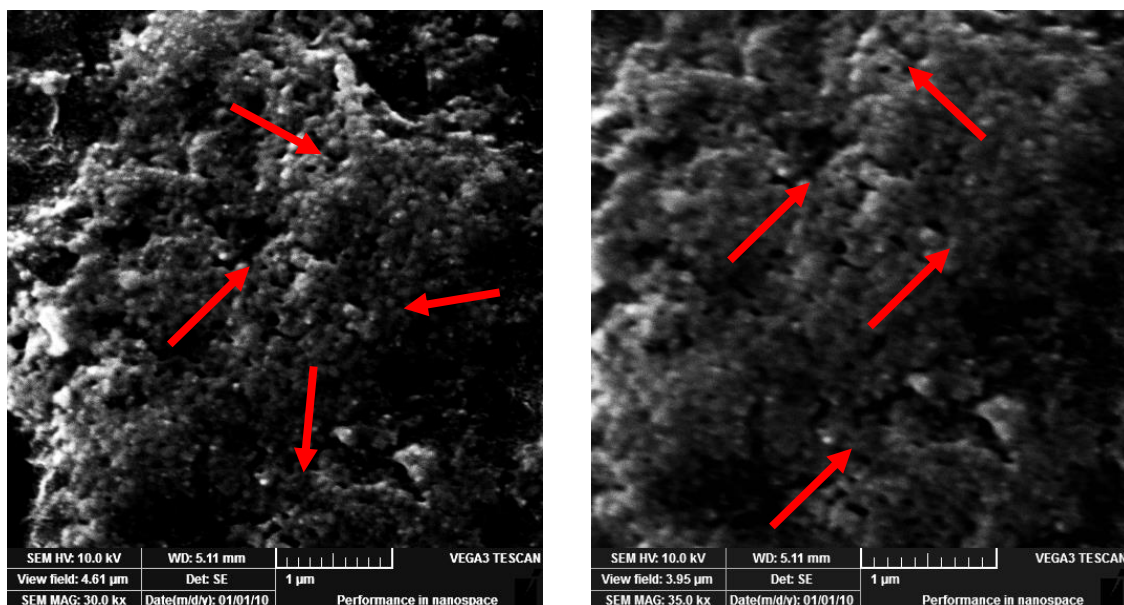


### 5.9.3 Análise estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de componentes químicos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para pesquisas referentes a nanomateriais, faz parte dos processos de caracterização observar a morfologia e composição das amostras. Atualmente, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é muito usada na busca do entendimento destes nanomateriais, devido às recentes melhorias significativas em MEV para geração de imagens, difração e análise elementar. A análise por MEV não requer nenhuma preparação especial da amostra e também não requer qualquer esmagamento mecânico que possa causar a destruição da amostra, permitindo assim que a informação morfológica e a informação de superfície sejam retidas (SUGA et al., 2014).

A morfologia das nanopartículas de prata obtidas no presente trabalho foi avaliada por MEV. Analisando a Figura 50, é possível observar que as nanopartículas apresentaram em sua maioria morfologia esférica, com moderada dispersão e com regiões de agregação. Os resultados de morfologia obtidos por microscopia são corroborados pela análise de UV-Vis, pois, conforme teoria de Mie, apenas uma única banda plasmônica é esperada no espectro de absorção de nanopartículas esféricas, com pico SPR variando de 350 a 550 nm (RAMOS, 2017).

**Figura 50.** Imagens de MEV de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde.

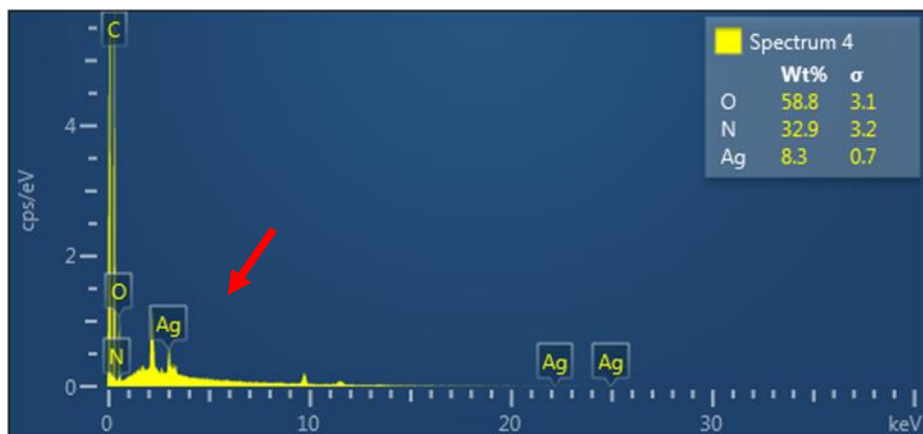


A espectroscopia de energia dispersiva (EDS), por sua vez, é um método analítico para determinação elementar, também de grande importância para o processo de caracterização. Geralmente, ela é combinada com análises de microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão, para fornecer dados sobre a distribuição dos elementos químicos das nanopartículas de prata (AgNPs). Além disso, para amostras complexas, é uma ferramenta muito útil para identificar a existência destas nanopartículas (LIU et al., 2012).

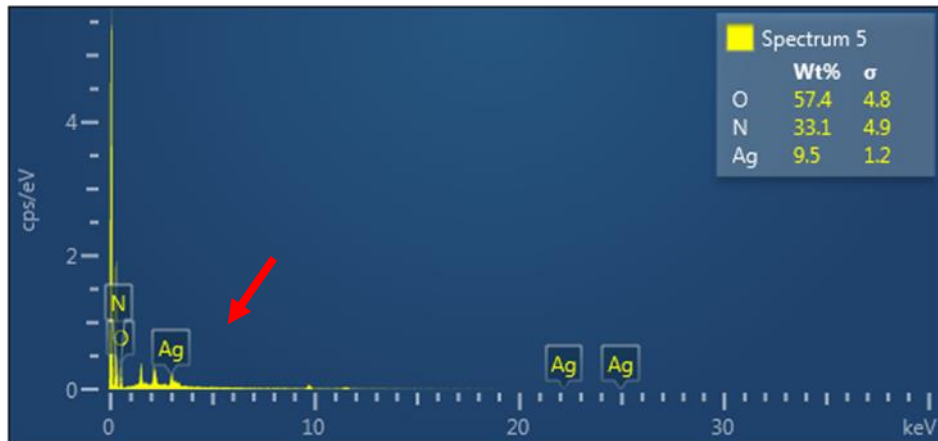
No presente trabalho, as análises por espectroscopia de energia dispersiva revelaram sinais característicos na região da prata, confirmando, portanto, a formação de nanopartículas de prata. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 51 (A-D). As nanopartículas de prata metálica geralmente mostram um pico típico de absorção óptica em aproximadamente 3 keV devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (BAR et al., 2009a)

**Figura 51 (A-D).** Espectros de EDS para identificação de componentes químicos presentes nas amostras de nanopartículas de prata.

A) Amostra 1 (5 mM)



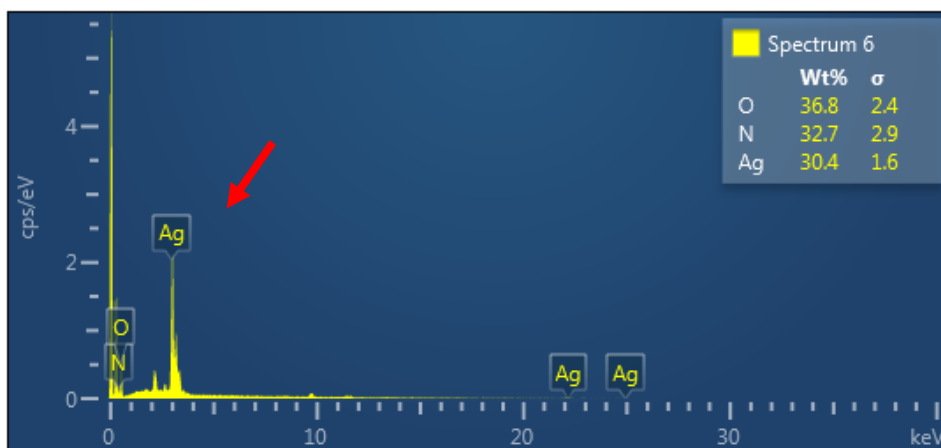
B) Amostra 2 (10 mM)



C) Amostra 3 (25 mM)



D) Amostra 4 (50 mM)



## 5.10. Atividades antibacteriana e citotóxica das nanopartículas (AgNPs) de prata obtidas por síntese verde

### 5.10.1 Determinação das concentrações inibitória (CIM) e bactericida mínima (CBM)

As concentrações utilizadas nesta análise foram obtidas através de diluições seriadas a partir da concentração inicial de 100% das nanopartículas de prata em meio aquoso, resultando nas concentrações finais de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% e 0,78%. Como controle foi utilizada a última coluna da microplaca, onde os primeiros seis poços foram utilizados como controle bacteriano (sem adição de AgNPs) e os últimos seis poços como controle do caldo (sem adição de AgNPs e inóculo bacteriano). A CIM foi determinada como a menor concentração das AgNPs capaz de causar inibição do crescimento microbiano. A inibição (ou não) das espécies bacterianas foi avaliada visualmente, utilizando o reagente colorimétrico cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) a 2%. Em seguida, a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada pela transferência de uma pequena alíquota (10 µL) do conteúdo dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível no teste de CIM para a superfície de placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton estéril. Após incubação das amostras durante 24 h e posterior análise das placas, definiu-se a concentração bactericida mínima como a menor concentração capaz de causar a morte do inóculo.

**Tabela 21.** Atividade antibacteriana de AgNPs obtidas por síntese verde.

Amostra	1 (5mM)		2 (10mM)		3 (25mM)		4 (50mM)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Enterococcus faecalis</i>	*	3,12	*	3,12	*	3,12	*	3,12
<i>Escherichia coli</i>	*	1,56	*	1,56	*	1,56	*	1,56
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	1,56	*	1,56	*	1,56	*	1,56
<i>Salmonella enterica</i>	*	1,56	*	1,56	*	1,56	*	1,56
<i>Serratia marcescens</i>	*	1,56	*	1,56	*	1,56	*	1,56
<i>Shigella flexneri</i>	*	1,56	*	1,56	*	1,56	*	1,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	3,12	*	3,12	*	6,25	*	6,25

Todos os valores foram expressos como porcentagem. (\*) ausência de crescimento em todas as concentrações testadas.

Os resultados ilustrados na Tabela 21 demonstram que todas as concentrações de AgNPs foram capazes de inibir visualmente o crescimento das cepas bacterianas testadas. Analisando as microplacas, não foi possível detectar mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, fato esse que indica ausência (ou taxa muito baixa) de metabolismo bacteriano ativo.

O enorme potencial da nanotecnologia tem sido reconhecido nos últimos anos devido à eficácia dos nanomateriais contra as várias espécies de microorganismos patogênicos. Um método para combater a resistência bacteriana às drogas disponíveis é justamente a aplicação de nanopartículas metálicas, para tentar diminuir as infecções e combater essa resistência. Acredita-se que os materiais em nanoescala sejam agentes antimicrobianos únicos, com uma alta relação área-volume, sendo capazes de combater mecanismos de resistência em múltiplos microrganismos. Dentre as nanopartículas metálicas, as de prata foram estabelecidas como diferentes das outras nanopartículas, pelo fato de possuírem uma eficácia antimicrobiana significativa contra bactérias, vírus e outros microrganismos. As nanopartículas de prata e os compostos à base de prata são extremamente tóxicos para esses microrganismos, apresentando fortes efeitos biocidas em várias espécies bacterianas (RAJESHKUMAR et al., 2019; TRAN et al., 2013; RAI et al., 2012).

Existem diversos relatos na literatura acerca do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde, porém, no gênero *Jatropha*, há poucos estudos, sendo o nosso o primeiro trabalho realizado com a espécie *Jatropha mollissima*.

Chauhan e colaboradores, em 2016, realizaram um estudo com a espécie *J. curcas*, utilizando o extrato aquoso das folhas para a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) e posterior avaliação do seu potencial antibacteriano contra patógenos alimentares. A análise das nanopartículas por UV-Vis indicou que o pico de ressonância plasmônica de superfície ocorreu a 430 nm. Análises por FTIR indicaram a presença de aminas alifáticas e aminoácidos no extrato utilizado. Análises por microscopia de transmissão demonstraram que as nanopartículas eram predominantemente esféricas, sem áreas de aglomeração. As análises por DLS indicaram que o tamanho hidrodinâmico das partículas era de 43 nm, com potencial zeta de -23,4. A análise por difração de raios X (XRD) confirmou a presença de prata (Ag) como o principal elemento constituinte das amostras. Com relação à avaliação da atividade antibacteriana, os resultados dos testes de difusão em disco e MIC/CBM indicaram que

*Escherichia coli* (ZOI: 23 mm, CBM: 0,010 mg/ml) foi o organismo mais sensível, enquanto *Staphylococcus aureus* (ZOI: 14,66 mm, CBM: 0,041 mg/ml) e *Salmonella enterica* (ZOI: 16,66 mm, CBM: 0,041 mg/ml) foram os menos sensíveis. Os autores concluíram que as nanopartículas de prata produzidas utilizando o extrato aquoso de *J. curcas* possuem potencial antibacteriano significativo (CHAUAN et al., 2016).

Em um estudo conduzido por Bose et al. (2013), nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas utilizando o extrato aquoso das sementes de *J. curcas* como agente redutor. A análise das AgNPs por UV-Vis indicou que o pico de ressonância plasmônica de superfície ocorreu em 424 e 438 nm. Os resultados da caracterização por FTIR demonstraram que proteínas e fenóis presentes no extrato atuaram como agentes redutores, dispersantes e estabilizantes. Análises por DLS mostraram que as AgNPs obtidas apresentaram um diâmetro médio de 74 nm. Com relação à avaliação do potencial antibacteriano, os resultados mostraram que as AgNPs possuem excelente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por fim, os autores concluíram que os resultados obtidos são promissores e que as pesquisas nessa área abre um caminho de novas possibilidades para a aplicação de nanopartículas de prata no campo médico (BOSE et al., 2013).

#### 5.10.2 Investigação da atividade citotóxica de nanopartículas de prata obtidas a partir de síntese verde

O uso de nanopartículas de prata como um método seguro e eficiente no tratamento do câncer ainda é uma tarefa complexa. No entanto, estudos que visam compreender a eficiência antitumoral da prata estão progredindo intensamente. A reprodutibilidade e a estabilidade dessas nanoestruturas de prata são objetivos-chave para pesquisadores dedicados ao desenvolvimento dessa área, a chamada “nanomedicina”. Há fortes evidências de que as nanopartículas de prata se inserem dentro das células-alvo e as reprogramam, desencadeando principalmente o fenômeno da apoptose (VLASCEANU et al., 2016).

A síntese verde de nanopartículas de prata surge como uma alternativa interessante para este fim, pois o agente redutor da prata, que geralmente é alguma substância química, é substituído por biomoléculas do organismo vivo utilizado (planta), diminuindo, dessa forma, o uso de substâncias químicas tóxicas e caras. Dentre as diversas vantagens da síntese verde, podemos citar sua relação custo-benefício, boa

reprodutibilidade e menor quantidade de energia necessária em comparação a outros métodos (VLASCEANU et al., 2016; TRAN et al., 2013).

No presente trabalho, foi realizado, inicialmente, um estudo preliminar (*screening*) para avaliar a capacidade citotóxica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde frente à três linhagens de células tumorais. Foram utilizadas no teste concentrações obtidas por diluições seriadas a partir de 100% da solução obtida inicialmente, totalizando quatro concentrações: 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Os resultados obtidos com o *screening* das amostras testadas estão representados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Atividade citotóxica *in vitro* de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde contra linhagens de células tumorais.

Amostra		SNB-19	SD	PC3	SD	HCT-116	SD
Nº	Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1 (5 mM)	50%	94,92	0,35	97,99	0,49	99,09	0,68
	25%	84,17	0,37	94,25	1,47	94,84	0,85
	12,5%	79,80	0,00	63,35	3,43	92,40	0,23
	6,25%	25,46	5,58	38,12	9,31	34,09	0,00
2 (10 mM)	50%	96,16	0,30	98,55	0,49	99,83	0,17
	25%	96,54	0,52	92,06	0,56	96,09	0,17
	12,5%	91,27	3,87	95,01	4,51	98,81	0,17
	6,25%	56,23	0,00	70,00	0,69	91,83	0,79
3 (25 mM)	50%	99,16	0,15	99,93	0,29	100	0,06
	25%	95,16	0,60	98,96	0,10	100	1,08
	12,5%	90,37	1,26	96,81	1,37	98,13	0,11
	6,25%	81,74	1,12	94,46	0,59	97,66	0,34
4 (50 mM)	50%	98,32	0,45	99,52	0,10	100	0,06
	25%	97,17	0,20	99,65	0,10	100	0,07
	12,5%	97,05	0,15	99,45	0,00	100	0,06
	6,25%	82,01	2,23	93,49	3,53	98,58	0,17

Valores expressos como percentual de inibição de crescimento celular  $\pm$  desvio padrão.

Os dados da Tabela 22 demonstram que todas as substâncias testadas foram eficazes e exibiram atividade citotóxica altamente significativa, acima de 75% de inibição, com destaque para a linhagem HCT-116 (câncer de cólon), onde todas as amostras apresentaram taxa de inibição acima de 90%. Com relação à linhagem SNB-19 (astrocitoma), as amostras 3 e 4 apresentaram os melhores resultados, com taxa de inibição entre 82 e 99%, enquanto que, frente a esta mesma linhagem, as amostras 1 e 2

apresentaram atividades de baixa a moderada, com taxas de inibição entre 25,46% (diluição de 6,25% de AgNPs para a amostra 1) e 56,23% (diluição de 6,25% de AgNPs para a amostra 2).

Com relação à linhagem PC3 (câncer de próstata), apenas a amostra 1 (diluição de 6,25% de AgNPs) apresentou uma atividade citotóxica considerada baixa (taxa de inibição de 38,12%), ao passo que todas as outras amostras apresentaram uma boa taxa de inibição (acima de 75%), com destaque para a amostra 4, onde todas as concentrações utilizadas demonstraram uma taxa de inibição acima de 90%.

Após a verificação dos resultados obtidos na análise preliminar, onde foi possível concluir que todas as amostras testadas possuem potencial citotóxico, estas tiveram a sua atividade citotóxica avaliada novamente, frente às mesmas linhagens, desta vez para determinação da  $CI_{50}$ , que é a concentração necessária para que seja alcançado metade do efeito máximo (taxa de inibição de 50%). Os valores foram expressos como percentual de inibição de crescimento celular, nas concentrações de 50  $\mu$ M (amostra 1), 100  $\mu$ M (amostra 2), 150  $\mu$ M (amostra 3) e 200  $\mu$ M (amostra 4). Os dados detalhados de  $CI_{50}$  das amostras testadas estão representados na Tabela 23.

**Tabela 23.** Atividade citotóxica *in vitro* ( $CI_{50}$ ) de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde contra linhagens de células tumorais.

Linhagem	$CI_{50}$ $\mu$ M (intervalo) <sup>a</sup>				
	1 (50 $\mu$ M)	2 (100 $\mu$ M)	3 (150 $\mu$ M)	4 (200 $\mu$ M)	Dox <sup>b</sup>
SNB-19	7,76	8,66	10,18	8,07	1,20
	5,62 – 10,72	7,97 – 9,42	8,08 – 12,82	5,78 – 11,26	1,03-1,39
PC3	11,37	14,16	6,43	2,93	0,44
	4,51 – 28,71	8,20 – 24,48	4,87 – 8,49	2,14 – 4,01	0,34-0,54
HCT-116	21,55	26,88	5,41	4,349	0,11
	20,62 – 22,52	23,26 – 31,05	4,67 – 6,27	4,23 – 4,47	0,08-0,14

<sup>a</sup>Valores de concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes. <sup>b</sup>Doxorrubicina usada como controle positivo. Valores expressos como percentual de inibição de crescimento celular  $\pm$  desvio padrão.

Observando os dados da Tabela 23, é possível observar que as amostras apresentaram potencial citotóxico variando de moderado a alto para as linhagens tumorais testadas. As amostras 1 e 2 apresentaram melhor atividade para a linhagem de astrocitoma (SNB-19) com  $CI_{50}$  de 7,76 e 8,66  $\mu$ M, respectivamente. A amostra 3,



mostrou-se mais citotóxica para a linhagem de câncer de cólon (HCT-116 - 5,41  $\mu\text{M}$ ). A melhor atividade foi observada na amostra 4, onde a taxa de  $\text{CI}_{50}$  foi de apenas 2,93  $\mu\text{M}$  para a linhagem de câncer de próstata (PC-3). Existem diversos relatos na literatura acerca do potencial citotóxico de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde, porém, no gênero *Jatropha*, não há nenhum estudo, sendo também este o primeiro trabalho realizado com o gênero e com a espécie *Jatropha mollissima*.

Este ano, em estudo realizado na Coreia, Ahan e colaboradores investigaram o potencial citotóxico de nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por síntese verde a partir de extratos de espécies vegetais. Dentre trinta extratos utilizados inicialmente para a biossíntese, sete (*Cratoxylum formosum*, *Phoebe lanceolata*, *Scurrula parasitica*, *Ceratostigma minus*, *Mucuna birdwoodiana*, *Myrsine africana* e *Lindera strychnifolia*) promoveram uma síntese bem-sucedida de AgNPs e foram selecionados para as etapas seguintes. A análise das nanopartículas por UV-Vis indicou que o pico de ressonância plasmônica de superfície ocorreu a 450 nm. Análises por microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que as AgNPs biossintetizadas por esses sete extratos se apresentaram em sua maioria na forma esférica e o potencial zeta (de -26 a -35) indicou uma alta estabilidade coloidal. Com relação à atividade citotóxica, os autores observaram que todas as sete amostras de AgNPs biossintetizadas apresentaram bons resultados frente à células humanas de câncer de pulmão (A549), atribuindo esta atividade à constituição química dos extratos vegetais utilizados (AHAN et al., 2019).

Em 2017, Rajkuberan e colaboradores realizaram um estudo com a espécie *Euphorbia antiquorum* L. (Euphorbiaceae), utilizando o extrato aquoso do seu látex para a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) e posterior avaliação do seu potencial citotóxico. A análise das nanopartículas por UV-Vis indicou que o pico de ressonância plasmônica de superfície ocorreu a 438 nm. Análises por FTIR indicaram a presença de compostos fenólicos no extrato utilizado. Análises por microscopia de transmissão demonstraram que as nanopartículas eram esféricas, dispersas e tamanho variando de 10 a 50 nm. A análise espectroscópica de raios X por energia dispersiva (EDX) confirmou a presença de prata (Ag) como o principal elemento constituinte das amostras. Com relação à avaliação da atividade citotóxica, as AgNPs apresentaram um bom resultado contra células de carcinoma cervical humano (HeLa) ( $\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{g/mL}$ ). Os autores concluíram que as AgNPs podem ser consideradas nanobiomateriais ambientalmente benignos e não tóxicos para aplicações biomédicas e que os compostos fenólicos são os constituintes ativos na redução e estabilização das AgNPs

(RAJKUBERAN et al., 2017). Esse dado corrobora o nosso trabalho, pois estudos fitoquímicos realizados com *J. mollissima* indicaram a forte presença de compostos fenólicos em sua constituição química.

Nesse sentido, levando em consideração tudo que já foi exposto anteriormente, pode-se concluir que os extratos vegetais são um recurso natural muito valioso para a síntese verde de AgNPs. Os extratos contêm diversos metabólitos secundários bioativos que podem atuar como excelentes agentes redutores e estabilizadores, aumentando ainda mais a atividade biológica das nanopartículas de prata resultantes dos processos de síntese verde.

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

A espécie *Jatropha mollissima* apresentou uma grande diversidade de compostos em sua constituição química e o fracionamento cromatográfico do seu extrato bruto e de suas fases possibilitou o isolamento de duas substâncias, identificadas como triacontanol e  $\beta$ -sitosterol. As análises por CG-EM revelaram a presença de diversos constituintes, sendo a classe dos terpenos a mais representativa. Foram identificados compostos importantes, tais como lupeol, fitol, ácido palmítico, ácido linolênico e  $\alpha$ -tocoferol, todos com atividades biológicas significativas relatadas na literatura. As análises por CLAE-DAD-MS/MS e networking molecular possibilitaram a identificação de dez flavonoides, sendo que, dentre esses, oito estão sendo descritos pela primeira vez em *J. mollissima*.

Com relação ao seu potencial antimicrobiano, *J. mollissima* foi capaz de promover uma inibição moderada de espécies bacterianas de importância clínica, sendo *Serratia marcescens* a espécie mais sensível. Nos testes de atividade modulatória com antibióticos, ficou evidenciado que *J. mollissima* estabeleceu uma relação antagônica com o antibiótico Norfloxacin, que faz parte da classe das fluoroquinolonas. Com relação à atividade citotóxica, *J. mollissima* apresentou um forte potencial antiproliferativo, principalmente contra linhagens celulares de câncer de próstata ( $CI_{50} < 30\mu\text{g/mL}$ ). A síntese verde de nanopartículas de prata utilizando o extrato aquoso de *J. mollissima* foi bem sucedida, onde estas apresentaram morfologia predominantemente esférica, dispersão moderada e tamanho médio de 80 nm. A avaliação de suas atividades biológicas apontou que estas nanopartículas possuem potencial antibacteriano e citotóxico significativos, com altas taxas de inibição para todas as amostras testadas. Os resultados significativos obtidos são provavelmente devido à presença de compostos fenólicos na constituição química da planta.

Estes são resultados inéditos para a espécie, o que incentiva ainda mais os estudos com esta planta, a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação. Diante do exposto, pode-se considerar que *J. mollissima* apresentou uma constituição química bastante rica do ponto de vista químico e biológico, com a presença de compostos muito interessantes biologicamente, demonstrando, assim, que essa espécie possui um grande potencial a ser explorado. Além disso, destaca-se a contribuição deste trabalho para a fitoquímica da espécie e do gênero, que é reconhecidamente promissor pela literatura atual.

# *Referências*

## 8. REFERÊNCIAS

- Adnan S. N. A., Ibrahim N., Yaacob W. A. 2017. Transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in response to stigmasterol and lupeol. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. Vol. 8, pp. 48-54.
- Aiyelaagbe O. O., Adesogan K., Ekundayo O. and Gloer J. B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. **Phytochemistry**, Vol. 68, pp. 2420-2425.
- Ajazuddin S. S. 2010. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, Vol. 81, pp. 680-689.
- Albernaz, V. L. 2014. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em Nanociência e Nanotecnologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. 122 f.
- Albuquerque U. P., Nunes A. T., Almeida A. L. S., Almeida C. M. A. D., Neto E. M. F. L., Vieira F. J., Silva F. S., Soldati G. T., Nascimento L. G. S., Santos L. L., Ramos M. A., Cruz M. P., Alencar N. L., Medeiros P. M., Araújo T. A. S. e Nascimento V. T. 2010. **Caatinga: Biodiversidade e Qualidade de vida**. Bauru, SP: Nupeea, 120 p.
- Albuquerque U. P., Andrade L. H. C., Silva A. C. O. 2005. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasílica**, Vol. 19 (1), pp. 27-38.
- Allard P. M., Péresse T., Bisson J., Gindro K., Marcourt L., Pham V., Roussi F., Litaudon M., Wolfender J. L. 2016. Integration of Molecular Networking and in-silico ms/ms fragmentation for natural products dereplication. **Anal Chem**. Vol. 88 (6), pp. 3317-3323.
- Althoff T. D., Menezes R. S. C., Pinto A. S., Pareyn F. G. C., Carvalho A. L., et al. 2018. Adaptation of the century model to simulate C and N dynamics of Caatinga dry forest before and after deforestation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. Vol. 254 (15), pp. 26-34.
- Anani K., Adjrah Y., Améyapoh Y., Karou S. D., Agbonon A., Souza C. and Gbeassor M. 2016. Antimicrobial, antiinflammatory and antioxidant activities of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae). **Pharmacognosy Res**. Vol. 8 (2), pp. 142-146.
- Ashraf A., Zafar S., Zahid K., Shah M. S., Al-Ghanin K., Al-Misned F., Mahboob S. 2019. Synthesis, characterization, and antibacterial potential of silver nanoparticles

synthesized from *Coriandrum sativum* L. **Journal of Infection and Public Health**, Vol. 12 (2), pp. 275-281.

Ashokkumar R., Jamuna S., Sadullah M. S. S., Devaraj S. N. 2018. Vitexin protects isoproterenol induced post myocardial injury by modulating hipposignaling and ER stress responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 496 (2), pp. 731-737.

Awad A. B., Chinnam M., Fink C. S., Bradford P. G. 2007.  $\beta$ -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**, Vol. 14 (11), pp. 747-754.

Bansal P., Paul P., Kunwar A., Jayakumar S., Nayak P. G., Priyadarsini K. I., Unnikrishnan M. K. 2012. Radioprotection by quercetin-3-O-rutinoside, a flavonoid glycoside – A cellular and mechanistic approach. **Journal of Functional Foods**, Vol. 4 (4), pp. 924-932.

Bar H., Bhui D. K., Sahoo D. P., Sarkar P., Santanu P., Misra A. 2009 (b). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. Vol. 348 (1-3), pp. 212-216.

Barbosa L. T. C. e Vega M. R. G. 2017. Diterpenos do Gênero *Xylopi*a. **Rev. Virtual Quím.** Vol 9 (4), pp. 1712-1733.

Behling E. B., Sendão M. C., Francescato H. D. C., Antunes L. M. G., Bianchi M. L. P. 2004. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentary Nutrition**, Vol. 15, pp. 285-292.

Benabdelaziz I.; Gómez-Ruiz S., Benkhaled M., Carralero S., Schenker P., Salm A., Gertsch J., Hab H. 2018. New cycloartane-type ester triterpenes from *Euphorbia pterococca* and biological evaluation. **Fitoterapia**, Vol. 127, pp. 271-278.

Berridge M. V.; Tan A. S.; McCoy K. D.; Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assay that use tetrazolium salts. **Biochemica**. Vol. 4, pp. 14-19.

Besson E., Dombris A., Raynaud J., Chopin J. 1979. Corymboside, nouvelle di-c-glycosylflavone des racines de *Carlina corymbosa*. **Phytochemistry**, Vol.18, pp. 1899-1900.

Bhattacharjee S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Vol. 235, pp. 337-351.

Biyiti L. F., Meko'o D. J. L., Tamzic V., Amvam Zollo P. H. 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. **Pharmacologie et Médecine Traditionnelle en Afrique**, Vol. 13, pp. 11-20.

Bocate K. P., Reis G. F., Souza P. C., Junior A. G. O., Durán N., Nakazato G., Furlaneto M. C., Almeida R. S., Panagio L. A. 2019. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 291, pp. 79-86.

Bonatto C. C.; Silva L. P. 2014. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, Vol. 58, pp. 46-54.

Bonifácio B. V., Silva P. B., Ramos M. A. S., Negri K. M. S., Bauab T. M., Chorilli M. 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, Vol. 9, pp. 1-15.

Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L., Uriarte E. 2005. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, Vol. 12, pp. 887-916.

Braquehais I. D., Vasconcelos F. R., Ribeiro A. R. C., Silva A. R. A; Franca M. G. A., Lima D. R., De Paiva C. F., Guedes M. I. F. and Magalhães F. E. A. 2016. Toxicological, antibacterial, and phytochemical preliminary study of the ethanolic extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão-bravo, Euphorbiaceae) leaves, collected in Tauá, Ceará, Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Vol.18, (2), pp. 582-587.

Bose A., Keharia H., Deshpande M. P. 2013. Eco-Friendly Phyto-Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Jatropha* Seedcake Extract. **Chinese Physics Letters**, Vol. 30 (12), DOI: 10.1088/0256-307X/30/12/128103.

Braz R. et al. 2011. Quality control and TLC profile data selected plant species commonly found in the Brazilian Market. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 22 (5), p. 1111-1118.

Burčová Z., Kreps F., Greifová M., Jablonský M., Ház A., Schmidt S., Šurina I. 2018. Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts. **Journal of Biotechnology**. Vol. 282, pp. 18-24.

Cabral, E. C. 2010. Utilização da técnica de *fingerprinting* por Espectrometria de Massas para a análise de extratos de produtos naturais. 145f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo-SP.



Camelo S. B. 2015. Avaliação da atividade antimicrobiana do látex de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Sapium glandulosum* (L.) Morong. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba/UFPB, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 32 p.

Cardoso L. M., Leita J. P. V., Peluzio M. C. G. 2011. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, Vol. 40 (1), pp. 116-138.

Carrión J. F., Gastauera M., Mota N. M., and Meira-Neto J. A. A. 2017. Facilitation as a driver of plant assemblages in Caatinga. **Journal of Arid Environments**. Vol. 142, pp. 50-58.

Cartaxo S. L. 2009. Diversidade e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga em Aiuaba-CE, Brasil. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA). 105f.

Chauhan N., Tyagi A. K., Kumar P., Malim A. 2016. Antibacterial potential of *Jatropha curcas* synthesized silver nanoparticles against food borne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, Vol. 7, pp. 1-13.

Chen G., Fan M., Wu J., Li N., Guo M. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from *Lotus plumule*. **Food Chemistry**, Vol. 277, pp. 706-712.

Chiaradia M. C.; Collins C. H.; Jardim I. C. S. F. 2008. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, Vol. 31 (3), pp. 623-636.

Chien S., Wu Y., Chen Z., Yang W. 2015. Naturally occurring anthraquinones: Chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Vol. 2015, pp. 1-13.

Coloma A. G.; Balboa C. L.; Reina O. S. M.; Fraga B. M. 2011. Triterpene-based plant defenses. **Phytochem Ver**. Vol. 10, pp. 245-260.

Costa-Lotufo L. V., Montenegro R. C., Alves A. P. N. N., Madeira S. V. F., Pessoa C., Moraes M. E. A., Moraes M. O. 2010. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quím.**, Vol. 2 (1), pp. 47-58.

Coutinho H. D. M., Silva I., Freitas M. A., Gondim C. N. F. L., Andrade J. C. 2013. Análise físico-química e avaliação antimicrobiana do fruto cambuí (*Myrcia multiflora*). **Rev. Biol. Farm.** Vol. 9 (1), pp. 96-103.

Coutinho H. D. M., Costa J. G. M., Lima O. E., Falcão-Silva V. S., Junior-Siqueira J. P. 2009. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharm Biol.** Vol. 47 (11), pp. 1056-1059.

Coutinho H. D. M., Costa J. G., Lima E. O., Falcão-Silva V. S., Siqueira-Junior J. P. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy.** Vol. 54 (4), pp. 328-330.

Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Oxford, Vol. 12, pp. 564-582.

Das A., Jawed J. J.; Das M. C., Sandhu P., De U. C., Dinda D., Akhter Y., Bhattacharjee S. 2017. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents.** Vol. 50 (4), pp. 512-522.

Das P., Ghosal K., Janda N. K., Mukherjee A., Basak P. 2019. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using belladonna mother tincture and its efficacy as a potential antibacterial and anti-inflammatory agent. **Materials Chemistry and Physics**, Vol. 228, pp. 310-317.

Das R., Nath S. S., Chakdar D., Gope G., Bhattacharjee S. 2009. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Characterization. Disponível em: [www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2318](http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2318). Acesso em: 27/03/2019.

Davey M. Secondary metabolism in plant cell cultures. 2017. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences** (Second Edition). Vol. 2, pp. 462-467.

Debnath B., Singh W. S., Das M., Goswami S., Singh M. K., Maiti D., Manna K. 2018. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materialstoday Chemistry**, Vol. 9, pp. 56-72.

De Bona E. A. M., Pinto F. G. S., Fruet T. K., Jorge T. C. M., Moura A. C., 2014. **Arq. Inst. Biol.**, Vol. 81 (3), pp. 218-225.

Demarque D. P., Callejon D. R., Oliveira G. G., Silva D. B., Carollo C. A., Lopes N. P. 2018. The role of tannins as antiulcer agents: a fluorescence-imaging based study. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** Vol. 28 (4), pp. 425-432.

Demissie A. G., Lele S. S. 2013. Phytosynthesis and characterization of silver nanoparticles using callus of *Jatropha curcas*: a biotechnological approach. **International Journal of Nanoscience**. Vol. 12 (2), pp 1-7.

Desai A. J., Dong M., Miller L. J. 2016. Beneficial effects of  $\beta$ -sitosterol on type 1 cholecystokinin receptor dysfunction induced by elevated membrane cholesterol. **Clinical Nutrition**, Vol. 35 (6), pp. 1374-1379.

De Oliveira G. G., Carnevale N. F., Demarque D. P., Sousa J. A. P. J., Sampaio P. F. R. C., Melo S. J., Almeida J. R. G. S., Lopes J. L. C., Lopes N. P. 2016. Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by untargeted tandem mass spectrometry based molecular networking. **Planta Medica**, Vol. 83 (7), pp. 636-646.

Duarte M. C. T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Vol. 7, pp.1-16.

Fan X., Zhang R., Cheng H. 2010. Use of Triaccontanol in preparation of medicaments for treatment of cancers, US. Patent 07863337. Disponível em: <https://www.patexia.com/us-patents/07863337/claims>. Acesso em 30/07/2018.

Farooq U., Khan A., Naz S., Rauf A., Khan H., Khan A., Ullah I., Bukhari S. M. 2018. Sedative and antinociceptive activities of two new sesquiterpenes isolated from *Ricinus communis*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Vol. 16 (3), pp. 225-230.

Félix-Silva J., Gomes J. A. S., Fernandes J. M., Moura A. K. C., Menezes Y. A. S., Santos E. G. G., et al. 2018. Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 213, pp. 12-20.

Félix-Silva, J., Giordani, R. B., Silva Jr, A. A., Zucolotto, S. M., Fernandes-Pedrosa, M. F., 2014. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** pp. 1-32.

Frölich J. K., Froeder A. L. F., Janovik M, Venturini T. P., Pereira R. P., Boligon A. A., Brum T. F., Alves S. H., Rocha J. B. T., Athayde M. L. 2013. Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg. **Natural Product Research**, Vol. 27 (12), pp. 1049-1059.

Gajbhiye M., Kesharwani J.; Ingle A.; Gade A., Rai M. 2009. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in

combination with fluconazole. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Vol. 5, pp. 382-386.

Geetha A. R., George E., Srinivasan A., Shaik J. 2013. Optimization of green synthesis of silver nanoparticles from leaf extracts of *Pimenta dioica* (Allspice). **Scientific World Journal**, article ID 362890, pp.1-5.

Ghorani B., Tucker N. 2015. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, Vol. 51, pp. 227-240.

Granowitz E. V.; Brown R. B. 2008. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, Vol. 24, pp. 421-442.

Grzegorzcyk I., Bilichowski I., Mikiciuk-Olasik E. and Wysokinska H. 2006. The effect of triacontanol on shoot multiplication and production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L.," **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Vol. 75 (1), pp. 11-15.

Gomes J. A. S., Félix-Silva J., Fernandes J. M., Amaral J. G., Lopes N. P., Egito E. S. T., Silva-Júnior A. A., Zucolotto S. M., Fernandes-Pedrosa M. F. 2016. Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. decreases local effects induced by bothropic venom. **BioMed Research International**, Vol. 2016, Article ID 6101742, pp. 1-13.

Gomes T. A., Costa S. P. M., Medeiros G. C. R., Silva C. R., Lyra M. A. M., Silva K. E. R., Albuquerque M. M., Silva R. M. F., Neto P. J. R. 2015. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II: Efavirenz. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Vol. 36 (2), pp. 239-249.

González N. F. C. 2012. Food security and biofuels: a case study of *Jatropha curcas* in Bolivia. **Int J Therm Environ Eng.**, Vol. 4, pp. 109-116.

Guerra A. C. V. A., Soares L. A. L., Ferreira M. R. A., Araújo A. A., Rocha H. A. O., Medeiros J. S., Cavalcante R. S., Junior R. F. A. 2017. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 92, pp. 696-706.

Guingab J. D., Lauly B., Smith B. W., Omenetto N., Winefordner J. D. 2007. Stability of silver colloids as substrate for surface enhanced Raman Spectroscopy detection of dipicolinic acid. **Talanta**, Vol. 74, pp. 271-274.

Guo H., Li M., Xu L. 2019. Apigenin treatment attenuates LPS-induced acute otitis media through suppressing inflammation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 109, pp. 1978-1987.

Hadi V., Hotard M., Ling T., Salinas I. G., Palacios G., Connelly M. and Rivas F. 2013. Evaluation of *Jatropha isabellei* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents. **Eur. J. Med. Chem.** Vol. 65, pp. 376-380.

Hamelian M., Hemmati S., Varmira K., Veisi H. 2018. Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using *Pistacia atlantica* extract. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Vol. 93, pp. 21-30.

Hattori S. and Matsuda H. 1952. Rhoifolin, a new flavone glycoside, isolated from the leaves of *Rhus succedanea*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vol. 37 (1), pp. 85-89.

Hassanipour S., Fathalipour M., Salehiniya H. 2018. The incidence of prostate cancer in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Prostate International**, Vol. 6 (2), pp. 41-45.

He M., Min J., Kong W., He X., Li J., Peng B. 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, Vol. 115, pp. 74-85.

Huang Q., Liu X., Zhao G., Hu T., Wang Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition**, Vol. 4 (2), pp. 137-150.

Hoefler R. e Wannmacher L. 2010. **Interações de Medicamentos**. In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília (DF), pp. 1-14.

Jain P. K., El-Sayed I. H., El-Sayed, M. A. 2007. Au nanoparticles target cancer. **Nano Today**. Vol. 2 (1), pp.18-29.

Je H. G., Hong S. M., Je H. D., Sohn U. D., Choi Y. S., Seo S. Y., Min Y. S., Chung S. J., Shin Y. K., Lee T. J., Park E. S., Jeong J. H. 2014. The inhibitory effect of vitexin on the agonist-induced regulation of vascular contractility. **Die Pharmazie**, Vol. 69 (3), pp. 224-228.

Jia Q., Köllner T. G., Gershenzon J., Chen F. 2018. MTPSLs: New Terpene synthases in nonseed plants. **Trends in Plant Science**, Vol. 23 (2), pp. 121-128.

Jiang J., Dai J., Cui H. 2018. Vitexin reverses the autophagy dysfunction to attenuate MCAO-induced cerebral ischemic stroke via mTOR/Ulk1 pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 99, pp. 583-590.

Joshi R. R.; Gupta K. R.; Patil S. S. 2012. Hyphenated Technique - A Boon to Analytical World. **Int J Pharm Sci Res.** Vol. 3 (11), pp. 4184-4191.

Kamel D. A., Farag H. A., Amin N. K., Zatout A. A., Ali R. M. 2018. Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. **Industrial Crops and Products**, Vol. 111, pp. 407-413.

Kampa M., Alexaki V., Notas G., Nifli A., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, Vol. 6 (2), pp. 63-74.

Khan M. Z. H., Tareq F. K., Hossen M. A., Rokki M. N. A. M. 2018. **Journal of Engineering Science and Technology**, Vol. 13 (1), pp. 158-166.

Khandaker M. M., Faruk G., Rahman M. M., Sofian-Azirun N., Boyce A. N. 2013. The Influence of 1-Triacontanol on the growth, flowering, and quality of potted bougainvillea plants (*Bougainvillea glabra* var. "Elizabeth Angus") under natural conditions. **The Scientific World Journal**, Vol. 2013, pp.1-12.

Khodashenas B.; Ghorbani H. R. 2015. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Arabian Journal of Chemistry**. In Press, DOI 10.1016/j.arabjc.2014.12.014.

Kim T. D., Thanh H. N., Thuy D. N., Duc L. V., Thi T. V., Manh H. V., Boonsiri P., Thanh T. B. 2018. Anticancer effects of saponin and saponin-phospholipid complex of *Panax notoginseng* grown in Vietnam. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol. 6 (9), pp. 795-800.

Krithiga N., Rajalakshmi A., Jayachitra A. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of *Clitoria ternatea* and *Solanum nigrum* and study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. **Journal of Nanoscience**, article ID 928204, pp. 1-9.

Krstić G., Jadranin M., Todorović N. N., Pešić M., Stanković T., Aljančić I. S., Tešević V. V. 2018. Jatropane diterpenoids with multidrug-resistance modulating activity from the latex of *Euphorbia nicaeensis*. **Phytochemistry**, Vol. 148, pp. 104-112.

Kurano M., Hasegawa K., Kunimi M., Hara M., Yatomi Y., Teramoto T., Tsukamoto K. 2018. Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. Vol. 1863 (2), pp. 191-198.

- Lanças F. M. 2009. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, Vol. 5 (1), pp. 27-46.
- Lastra C. A. M. e Henao C. A. A. 2009. Taxonomic study of Euphorbiaceae from Quindío (Colombia). **Rev. Asoc. Col. Cienc. Biol. (Col.)**, Vol. 21, pp. 156-173.
- Laviola B. G., Rodrigues E. V., Teodoro P. E., Peixoto L. A. and Bhering L. L. 2017. Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol. 76, pp. 894-904.
- Leal C. K. A. e Agra M. F. 2005. Estudo Farmacobotânico Comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, Vol. 24 (1), pp. 5-13.
- Lei L., Tang L., Chen F., Xiao S., Ding L. 2013. Antiproliferative activity of leaf extract and a flavonoid glycoside from *Jatropha curcas*. **Lat. Am. J. Pharm.** Vol. 32 (6), pp. 936-939.
- Li J., Li H., Wang W., Song W., Wang Y., Xuan L. 2018. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia helioscopia* and their lipid-lowering activities. **Fitoterapia**, Vol. 128, pp. 102-111.
- Li J., Wang W., Canção W. Xuan L. 2018. (19 $\alpha$ H)-lupane and (9 $\beta$ H)-lanostane triterpenes from *Euphorbia helioscopia* trigger apoptosis of tumor cell. **Fitoterapia**, Vol. 125, pp. 24-32.
- Lim H. S., Kim O. S., Kim B. Y., Jeong S. J. 2016. Apigenin from *Scutellaria baicalensis* Georgi inhibits neuroinflammation in BV-2 microglia and exerts neuroprotective effect in HT22 hippocampal cells. **J. Med. Food**, Vol. 19, pp. 1032-1040.
- Lima P. S. S., Lucchese A., Araújo-Filho H. G., Menezes P. P., Araújo A. A. S., Quintans-Junior L. J., Quintans J. S. S. 2016. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers** Vol. 151, pp. 965-987.
- Liu F., Yang X., Liang Y., Dong B., Su G., Tuerhong M., Jin J., Xu J., Guo Y. 2018. Daphnane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activities and interactions with iNOS from the leaves of *Trigonostemon thyrsoideus*. **Phytochemistry**, Vol. 147, pp. 57-67.
- Liu Y., Zhao W., Feng X., Zhang Z., Zong K., Sun Z., Zheng Y., Fu Y. 2018. Novel tetrahydrofuran derivatives from *Trigonostemon howii* with their potential anti-HIV-1 activities. **Bioorganic Chemistry**, Vol. 79, pp. 111-114.

- Liu J. Q., Yang Y. F., Xia J. J., Li X.Y., Li Z. R., Zhou L. and Qiu M. H. 2015. Cytotoxic diterpenoids from *Jatropha curcas* cv. *nigroviensrugosus* CY yang roots. **Phytochemistry**, Vol. 117, pp. 462-468.
- Liu W. W., Zhang Y., Yuan C., Yu C., Ding J., Li X., Hao X., Wang Q. and Li S. 2014. Japodagriconones A and B, novel diterpenoids from *Jatropha podagrica*. **Fitoterapia**, Vol. 98, pp. 156-159.
- Liu J. Q., Yang Y. F., Wang C. F., Li Y. and Qiu M. H. 2012. Three new diterpenes from *Jatropha curcas*. **Tetrahedron**, Vol. 68, pp. 972-976.
- Liu J., Yu S., Yin T., Chao J. 2012. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 33, pp. 95-106.
- Liz-Marzán L. M. 2004. Nanometals: formation and color. **Materials Today**, Vol. 7 (2), pp. 26-31.
- Locatelli M. 2011. Anthraquinones: analytical techniques as a novel tool to investigate on the triggering of biological targets. **Curr Drug Targets**. Vol. 12 (3), pp. 366-80.
- Lomenick B., Shi H., Huang J., Chen C. 2015. Identification and characterization of  $\beta$ -sitosterol target proteins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 25 (21), pp. 4976-4979.
- Lopes T. J., Xavier M. F., Quadri M. G. N., Quadri M. B. 2007. Anthocyanins: A brief review of structural characteristics and stability. **Rev. Bras. Agrobiologia**, Vol. 13 (3), pp. 291-297.
- Loureiro R. J., Roque F., Rodrigues A. T., Herdeiro M. T., Ramalheira A. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Vol. 34 (1), pp. 77-84.
- Lu X., Fang M., Dai Y., Yang Y., Fan A., Xu J., Qin Z., Lu Y., Zhao D., Chen X., Li N. 2018. Quantification of triacntanol and its PEGylated prodrug in rat plasma by GC-MS/MS: Application to a pre-clinical pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, Vol. 1089, pp. 8-15.
- Luo P., Yin Z., Sun Z., Chen H., Li C., Zhou H., Gu Q., Xu J. 2018. Cembrane-type diterpenoids from *Macaranga pustulata*. **Fitoterapia**, Vol. 129, pp. 162-166.
- Lyra D. H., Sampaio L. S., Pereira D. A., Silva A. P. Silva, Amaral C. L. F. 2011. Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha mollissima*



(Euphorbiaceae): species with potential for biofuel production. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 10 (3), pp. 368-374.

Magalhães F. E. A., Batista F. L. A., Serpa O. F., Moura L. F. W. G., Lima M. C. L., Silva A. R. A., Guedes M. I. F., Santos S. A. A. R., Oliveira B. A., Nogueira A. B., Barbosa T. M., Holanda D. K. R., Damasceno M. B. M. V., Junior J. M. A. M., Barroso L. K. V., Campos A. R. 2018. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 97, pp. 1575-1585.

Mahajan S. G. and Mehta A. 2011. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by  $\beta$ -sitosterol in a guinea pig model of asthma. **European Journal of Pharmacology**. Vol. 65 (1), pp. 458-464.

Mahan L., K., Escott-Stump S., Raymond J. L. 2012. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier, 1227 p.

Mai Z., Ni G., Liu Y., Zhang Z., Li L., Chen N., Yu D. 2018. Helioscopianoids A-Q, bioactive jatrophane diterpenoid esters from *Euphorbia helioscopia*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, pp. 1-13.

Majeed S., Danish M., Zahrudin A. H. B., Dash G. K. 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from fungal species and its antibacterial and anticancer effect. **Karbala International Journal of Modern Science**, Vol. 4 (1), pp. 86-89.

Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**. Vol. 81 (7), pp. 703-714.

Martínez-Castanon G. A., Nino-Martínez N., Martínez-Gutierrez F., Martínez-Mendoza J. R., Ruiz F. 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticle Research**, Vol.10 (8), pp. 1343-1348.

Mbeunkeu A. B. D Azebaze A. G. B., Tala M. F., Teinkela J. E. M., Noundou X. S., Krause R. W. M., Vardamides J. C., Laatsch H. 2018. Three new pentacyclic triterpenoids from twigs of *Manniophyton fulvum* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry Letters**, Vol. 27, pp. 1-8.

Melo-Batista A. A. e Oliveira C. R. M. 2014. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade do semiárido baiano: saberes tradicionais e a conservação ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, Vol. 10 (18), pp. 74-88.

Melo J. G., Araújo T. A. S., Castro V. T. N. A., Cabral D. L. V., Rodrigues M. D., Nascimento S. C., Amorim E. L. C. e Albuquerque U. P. 2010. Antiproliferative

activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, Vol. 15, pp. 8534-8542.

Mittal A. K., Chisti Y., Banerjee U. C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, Vol. 31 (2), pp. 346-356.

[MMA] Ministério do Meio Ambiente, 2014. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: 25 de Outubro de 2017.

Moniruzzaman M., Yaakob Z., Khatun R. Biotechnology for *Jatropha* improvement: A worthy exploration. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016. Vol (54): pp. 1262-1277.

Morones J., Elechiguerra J., Camacho A., Holt K., Kouri J., Ramirez J. T., Yacaman M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, Vol. 16, pp. 234-235.

Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Vol. 65, pp. 55-63.

Muangman S., Thippornwong M. and Tohtong R. 2005. Anti-metastatic Effects of Curcucione B, a Diterpene from *Jatropha curcas*. **In vivo**, Vol. 19, pp. 265-268.

Nagula R. L. and Wairkat S. 2019. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**. Vol. 296, pp. 190-201.

Nascimento J. E. T., Morais S. M., Lisboa D. S., Sousa M. O., Santos S. A. A. R., Magalhães F. E. A., Campos A. R. 2018. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 107, pp. 1030-1036.

Nascimento-Gonçalves E., Faustino-Rocha A. I., Seixas F., Ginja M., Colaço B., Ferreira R., Fardilha M., Oliveira P. A. 2018. Modelling human prostate cancer: Rat models. **Life Sciences**. Vol. 203 (15), pp. 210-224.

Naeem M., M. Masroor A. Khan & Moinuddin. 2012. Triacontanol: a potent plant growth regulator in agriculture, **Journal of Plant Interactions**, Vol. 7 (2), pp. 129-142.

Nagarajan R., Hatton T. A. 2008. **Nanoparticles: synthesis, stabilization, passivation and functionalization**. ACS Symposium Series, American Chemical Society. 464 p.

Neto E. A. B., Ribeiro C.; Zucolotto V. 2008. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Comunicado técnico 99. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, 1ª ed., pp. 1-4.

Ninfali P., Bacchiocca M., Antonelli A., Biagiotti E., Di Gioacchino A. M., Piccoli G., Stocchi V., Brandi G. 2007. Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). **Phytomedicine**, Vol. 14, pp. 216-221.

Oliveira D. G. 2013. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, Vol. 9 (4), pp. 1-7.

Oliveira F., Ritto J. L. A., Akisue G., Bacchi E. M. 2010. Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos. São Paulo, Ed. Atheneu, 1 ed.

Oliveira-Tintino C. D. M., Pessoa R. T., Fernandes M. N. M., Alcântara I. S., Silva B. A. F., Oliveira M. R. C., Martins A. O. B. P. B., Silva M. S., et al. 2018. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St. Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound  $\beta$ -caryophyllene in *in vivo* models. **Phytomedicine**, Vol. 41 (1), pp. 82-95.

Openshaw, K., 2000. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Vol. 19 (1), pp. 1-15.

Papalia T., Barreca D., Panuccio M. R. 2017. Assessment of antioxidant and cytoprotective potential of *Jatropha* (*Jatropha curcas*) grown in southern Italy. **Int. J. Mol. Sci.** Vol. 18, pp. 660-615.

Patel K. N., Patel J. K., Rajput G. C., Patel H. A. 2010. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, Vol. 1 (1), pp. 2-13.

Passos M. L. C.; Saraiva L. M. F. S. 2019. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems and detection strategies. **Measurement**, Vol. 135, pp. 896-904.

Pereira S. A., Mendonça M. S., Barbalho C. R. S. 2014. Prospective evaluation of genus *Jatropha* (Euphorbiaceae) with focus on Biotechnology. **Revista GEINTEC**, Vol. 4 (5), pp. 1424-1434.

Phartiban E., Manivannan N., Ramanibai R., Mathivanan N. 2019. Green synthesis of silver-nanoparticles from *Annona reticulata* leaves aqueous extract and its mosquito larvicidal and anti-microbial activity on human pathogens. **Biotechnology Reports**, Vol. 21, pp. 1-9.

Otunola G. A., Afolayan A. J., Ajayi E. O., Odeyemi S. W. 2017. **Pharmacognosy Magazine**, Vol. 13 (2), pp. S201-S208.

Özbilgin S., Acikara O. B., Akkol E. K., Sutar I., Keleş H., Saltan G. 2018. *In vivo* wound-healing activity of *Euphorbia characias* subsp. *wulfenii*: Isolation and quantification of quercetin glycosides as bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol 224, pp. 400-408.

Qiu M., Jin J., Zhou L., Zhou W., Liu Y., Tan Q., Cao D., Zhao Z. 2018. Diterpenoids from *Croton crassifolius* include a novel skeleton possibly generated via an intramolecular [2+2]-photocycloaddition reaction. **Phytochemistry**, Vol. 145, pp. 103-110.

Qiusheng Z., Xiling S., Xubo., Meng S., Changhai W. 2004. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. **Pharmazie**, Vol. 59 (4), pp. 286-289.

Queiroz M. F.; Fernandes P. D.; Neto J. D.; Arriel N. H. C.; Marinho F. J. L. e Leita, S. F. 2013. Crescimento e fenologia de espécies de *Jatropha* durante a estação chuvosa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Vol. 17 (4), pp. 405-411.

Rai M. K., Deshmukh S. D., Ingle A. P., Gade A. K. 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 112, pp. 841-852.

Rahman M. M., Ahmad S. H., Mohamed M. T. M. and Ab Rahman M. Z. 2014. Antimicrobial Compounds from Leaf Extracts of *Jatropha curcas*, *Psidium guajava*, and *Andrographis paniculata*. **Sci. World J.**, pp. 1-9.

Rajeshkumar, S., Bharath, L. V., Geetha, R. 2019. Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action. Chapter 7: **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**, pp. 429-444.

Rajeshkumar S., Malarkodi C., Vanaja M., Annadurai G. 2016. Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens. **Journal of Molecular Structure**, Vol. 1116, pp. 165-173.

Rajkuberan C., Prabukumar S., Sathishkumar G., Wilson A., Ravindran K., Sivaramakrishnan S. 2017. Facile synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia antiquorum* L. latex extract and evaluation of their biomedical perspectives as anticancer agents. **Journal of Saudi Chemical Society**, Vol. 21 (8), pp. 911-919.

Ramos J. C. F. 2017. Síntese verde de nanopartículas de prata mediada por extrato da casca de *Anacardium microcarpum* Ducke: caracterização e atividade biológica. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí. 50 f.

Ramos S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J. Nutr. Biochem.** Vol. 18 (7), pp. 427-442.

Ravindranath N., Venkataiah B., Ramesh C., Jayaprakash P. and Das B. 2003. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. **Chem. Pharm. Bull.** Vol. 51 (7), pp. 870-871.

Rauwel P., Küünal S., Ferdov S., Rauwel E. 2014. A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. **Advances in Materials Science and Engineering**, Vol. 2014, pp. 1-9.

Refaat J., Yehia S. Y., Ramadan M. A., Kamel M. S. 2015. Rhoifolin: a review of sources and biological activities. **International Journal of Pharmacognosy**, Vol. 2 (3), pp. 102-109.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. **Med. Res. Rev.**, Vol. 23, pp. 519-534.

Ribeiro A. C. R., Andrade F. D., Medeiros M. C., Camboim A. S., Pereira Júnior F. A., Athayde A. C. R., Rodrigues O. G., Silva W. W. 2014. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Vol. 34 (11), pp. 1051-1055.

Ribeiro, A. R. C. 2014. Prospecção química, toxicidade do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e seu efeito sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus* no semiárido paraibano. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 32 f.

Ribeiro B. T., Lima J. M., Curi N., Oliveira G. C., Lima P. L. T. 2011. Cargas superficiais da fração argila se solos influenciadas pela vinhaça e fósforo. **Química Nova**, Vol. 34 (1), pp. 5-10.

Ribeiro K., Sousa-Neto E. R., Junior J. A. C., Lima J. R. S, Menezes R. S. C., Duarte-Neto P. J. and Silva G. 2016. Land cover changes and greenhouse gas emissions in two different soil covers in the Brazilian Caatinga. **Science of The Total Environment**. Vol. 571, pp. 1048-1057.

Rocha F. A. G. e Dantas L. I. S. 2009. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, Vol. 4, pp. 3-11.

Rodrigues M. V. N., Rehder V. L. G., Sartoratto A., Junior S. B., Santos A. S. 2006. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, Vol. 7, pp. 1-14.

Rosa S. I., Rios-Santos F., Balogun S. O., Martins D. T. 2016. Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Vol. 23 (1), pp. 9-17.

Rump A. F. E., Schussler M., Acar D., Cordes A., Theisohn M., Rosen R., Klaus W., Fricke U. 1994. Functional and antiischemic effects of luteolin-7-glucoside in isolated rabbit hearts. **Gen. Pharmac.** Vol. 25 (6), pp. 1137-1140.

Saito E., Furlan C., Lopes G. C., Mello J. C. P. 2005. A cromatografia líquida a vácuo na análise qualitativa e quantitativa de flavonoides em *Achyrocline satureioides*. **Revista Fitos**. Vol.1 (1), pp. 57-59.

Sakthivel R., Malar D. S., Devi K. P. 2018. Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 105, pp. 742-752.

Santiago R. N. S., Freire P. T. C. Ayalla A. P., Teixeira A. M. R., Santos H. S., Bandeira P. N., Gonçalves F. G., Oliveira M. T. A., Cruz B. G., Sena Jr, D. M. 2018. Crystal structure, vibrational spectra and quantum chemical parameters of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from the *Croton anisodontus* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Molecular Structure**, Vol. 1171 (5), pp. 815-826.

Santos I. A., Nogueira J. M., Mendonça F. C. 2015. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **RBAC**. Vol 47 (1-2), pp. 5-12.

Saosoong K. and Ruangviriyachai C. 2016. Antimicrobial Activity and Chemical Constituents of the Extract from *Jatropha curcas* Fruit. **Orient J. Chem.** Vol. 32 (2), pp. 163-1169.

Saraiva R. M. C. 2012. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas (Dissertação de mestrado). Belém: Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará. 94 p.

Sátiro L. N. e Roque N. 2008. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Vol 22 (1), pp. 99-118.

Schaffazick S. R., Guterres S. S., Freitas L. L., Pohlmann, A. R. 2003. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**. vol. 26 (5), pp. 726-737.

Secco R. S. 2005. Flora da Reserva Ducke, AM, Brasil: Euphorbiaceae - Parte I Rodriguésia. **Revista do Jardim Botânico do RJ**, Vol. 56 (86), pp. 143-168.

Serrano-Gallardo L. B., Castillo-Maldonado I., Borjón-Ríos C. G., Rivera-Guillén M. A., Morán-Martínez J., Téllez-López M. A., Garcia-Salcedo J. J., Pedroza-Escobar D., Vega-Menchaca M. C. 2017. Antimicrobial activity and toxicity of plants from northern Mexico. **Indian J Tradit Knowl**. Vol. 16 (2), pp. 203-207.

Shin E. J., Choi H., Sung M., Parque H., Chung M., Chung S., Hwang J. 2018. Antitumour effects of beta-sitosterol are mediated by AMPK/PTEN/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 152, pp. 60-70.

Shoji M., Woo S., Masuda A., Win N. N., Ngwe H., Takahashi E., Kido H., Morita H., Ito T., Kuzuhara T. 2017. Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar. **BMC Complement Altern Med**. Vol. 17 (96), pp.1-7.

Silva-Belmares Y., Rivas-Morales C., Viveros-Valdez E., Cruz-Galicia M. G. and Carranza-Rosales P. 2013. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model. **Pak. J. Biol. Sci.**, pp. 1-3.

Silva C. E. L., Minguzzi S., Silva R. C. L., Matos M. F. C., Tofoli D., Carvalho J. E., Ruiz A. L. T. G., Costa W. F., Simionatto E. 2015. Chemical composition and cytotoxic activity of the root essential oil from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc**. Vol. 26 (2), pp. 233-238.

Silva J. M. C., Tabarelli M., Fonseca, M.T. e Lins L.V. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. 2004. Universidade Federal de Pernambuco, Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 382 p.

Silva, Luciano. 2014. Nanopartículas verdes. **Revista Pesquisa Fapesb**, edição 233. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesb.br/2014/09/16/nanoparticulas-verdes/>. Acesso em: 05 de mar. 2019.

Silva M. N., Ferreira V. F., Souza M. C. B. V. 2003. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Quím. Nova**. Vol. 26 (3), pp. 407-416.

Silva O. L. M. 2014. Estudo taxonômico de *Euphorbia* L.(Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 162 p.

Simões C. M. O., Schenkel E. P., Gosmann G., Mello J. C. P., Mentz L. A., Petrovick P. R. (Orgs). 2010. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p.

Sistema Nacional de Informações Florestais – SNIF. 2018. Os Biomas e Suas Florestas - Caatinga – Mapas. Disponível em: <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/os-biomas-e-suas-florestas/253-mapas>. Acesso em: 10/04/2019.

Skoog D. A., Holler F. J. N. T. A., Crouch S. R. 2009. **Princípios da análise instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre, RS. Editora Bookman, 1056 p.

Souza D. O., Tintino S. R., Figueiredo F. G., Borges M. C. M, Braga M. F. B. M. et al. 2014. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Rev Cubana Plant Med**. Vol.19 (1), pp. 121-132.

Souza M. V., Reis C., Pimena F. C. 2005. Revisão sobre aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 34 (1), pp. 27-36.

Suga M., Asahina S., Sakuda Y., Kazumori H., Nishiyama H., Nokuo T. et al. 2014. Progress in Solid State Chemistry. Vol. 42, (1-2), pp. 1-21.

Sun Q., Lu N., Feng L. 2018. Apigetrin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. (1), pp. 164-170.

Sutthivaiyakit S., Mongkolvisut W., Prabpai S. and Kongsaree P. J. 2009. Diterpenes, Sesquiterpenes, and a Sesquiterpene-Coumarin Conjugate from *Jatropha integerrima*. **Nat. Prod.**, Vol. 72, pp. 2024-2027.

Tanjung M., Juliawaty L. D., Hakim E. H., Syah Y. M. 2018. Flavonoid and stilbene derivatives from *Macaranga trichocarpa*. **Fitoterapia**, Vol. 126, pp. 74-77.

Taştan B. E., Duygu E., Dönmez G. 2012. Boron bioremoval by a newly isolated *Chlorella* sp. and its stimulation by growth stimulators. **Water Research**, Vol. 46 (1), pp. 167-175.

Thakre B. and Bhatt J. Antifungal activities of plant extract as seed treatment to controlwilt in mung bean (*Vignaradiata* L. wilezek). **Plant Arch**. Vol. 17(1), pp. 325-328.



Titus D., Samuel E. J. J., Roopan S. M. 2019. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles - Chapter 12. **Micro and Nano Technologies**, pp. 303-319.

Tran Q. H., Nguyen V. Q., Le A. T. 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.** Vol. 4, pp. 1-20.

Trindade M. J. S. e Lameira O. A. 2014. Especies de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil. **Rev. Cub. Plantas Med.** Vol. 19 (4), pp. 292-309.

Utaipan T., Suksamrarn A., Kaemchantuek P., Chokchaisiri R., Stremmel W., Chamulitrat W., Chunglok W. 2018. Diterpenoid trigonoreidon B isolated from *Trigonostemon reidioides* alleviates inflammation in models of LPS-stimulated murine macrophages and inflammatory liver injury in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 101, pp. 961-971.

Uttayarat P., Eamsiri J., Tangthong T., Suwanmala P. 2015. Radiolytic synthesis of colloidal silver nanoparticles for antibacterial wound dressings. **Advances in Materials Science and Engineering**, Vol. 2015, pp. 1-7.

Valerio M. and Awad A. B. 2011.  $\beta$ -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. **International Immunopharmacology**. Vol. 11 (8), pp. 1012-1017.

Vasconcelos G. C. L., Fernandes F. S., Amador A. M., Amador K. A. M., Arriel N. H. C. 2014. Caracterização morfológica de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. **Revista Verde**, Vol. 9 (3), pp. 263-268.

Vengadesh-Prabhu K., Sundaramoorthi C., Devarasu S. 2011. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Streptomyces aureofaciens*. **Journal of Pharmacy Research**, Vol. 4 (3), pp. 820-822.

Veras H. N. H., Santos I. J. M., Santos A. C. B., Fernandes C. N., Matias E. F. F., Leite G. O., Souza H. H. F., Costa J. G. M., Coutinho H. D. M. 2011. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin *in vitro*. **Current topics in nutraceutical research**, Vol. 9 (1/2), pp. 25-30.

Vieira P. B., Silva N. L. F., Silva G. N. S., Silva D. B., Lopes N. P., Gnoatto S. C. B., Silva M. V., Macedo A. J., Bastida J. and Tasca T. 2016. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 26 (9), pp. 2229-2236.

Vlasceanu G. M., Marin S., Tiplea R. E., Bucur I. R., Lemnar M., Marin M. M., Grumezescu A. M., Andronescu E. 2016. **Nanobiomaterials in Cancer Therapy: Applications of Nanobiomaterials**, Vol. 7, pp. 29-56.

Wang A., Tian X., Cui Y., Huo X., Zhang B., Deng S., Feng L., Ma X., Jia J., Wang C. 2018. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia bracteolata* and their inhibitory effects on human carboxylesterase 2. **Phytochemistry**, Vol. 146, pp. 82-90.

Wang S., Su R., Nie S., Sun M., Zhang J., Wu D., Moustaid-Moussa N. 2014. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Vol. 25, pp. 363-376.

Wang X. D., Su G. Y., Zhao C., Qu F. Z., Wang P., Zhao Y. Q. 2018. Anticancer activity and potential mechanisms of 1C, a ginseng saponin derivative, on prostate cancer cells. **Journal of Ginseng Research**. Vol. 42 (2), pp. 133-143.

Wang W., Jiang K., Zhang P., Shen K., S. Qu, Yu X., Tan C. 2018. Highly oxygenated and structurally diverse diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*. **Phytochemistry**, Vol. 145, pp. 93-102.

Wang Y., Tang C., Zhang H. 2015. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from *Carthamus tinctorius* L. on CCl<sub>4</sub> induced oxidative liver injury in mice. **Journal of Food and Drug Analysis**, Vol. 23 (2), pp. 310-317.

Webster G. L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Vol. 81, pp. 33-144.

Wu Z., Lai Y., Zhang Q., Xie S., Zhang M., Hu Z., Li X., Wang J., Luo Z., Xue Y., Zhou Q., Zhu H., Zhang Y. 2018. Phenylacetylene-bearing 3,4-seco-cleistanthane diterpenoids from the roots of *Phyllanthus glaucus*. **Fitoterapia**, Vol. 128, pp. 79-85.

Xu F., Huang X., Wu H., Wang X. 2018. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 103, pp. 198-203.

Yan S., Li Y., Chen X., Liu D., Chen C., Li R. Diterpenes from the stem bark of *Euphorbia neriifolia* and their *in vitro* anti-HIV activity. **Phytochemistry**, Vol. 145, pp. 40-47.

Yang S. H., Liao P. H., Pan Y. F., Chen S. L., Chou S. S., Chou M. Y. 2013. The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. **Phytotherapy Research: PTR**, Vol. 27 (8), pp. 1154-1161.

Yang J. Y., Sanches L. M., Rath C. M., Liu X., Boudreau P. D., Bruns N., Glukhov E., Wodtke A. et al. 2013. Molecular Networking as a dereplication strategy. **J. Nat. Prod.**, Vol. 76 (9), pp. 1686-1699.

Yin Y., Liu X., Liu J., Cai E., Zhu H., Li H., Zhang L., Li P., Zhao Y. 2018. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Vol. 28 (9), pp. 1525-1533.

Yu Z., Wei Y., Tian X., Yan Q., Yan Q., Huo X., Wang C., Sun C., Zhang B., Ma X. 2018. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata* and their anti-tuberculosis effects. **Bioorganic Chemistry**, Vol. 77, pp. 471-477.

Zhang J. S., Zhang Y., Li S., Ahmed A., Tang G. H., and Yin S. 2018. Cytotoxic Macrocyclic Diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Bioorganic Chemistry**, Vol. 80, pp. 511-518.

Zhang X., Liu Z., Shen W., Gurunathan S. 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **Int. J. Mol. Sci.**, Vol. 17, pp. 2-34.

# ANEXOS

**ANEXO 1 – TRABALHOS DERIVADOS A PARTIR DESTA TESE****Artigos submetidos em revistas científicas:**

Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): Chemical and Biological Aspects - a Review.

\*Artigo de revisão submetido à revista *Chemico-Biological Interactions*.

Phytochemical analysis, antibacterial activity and antibiotic modifying action of *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. (Euphorbiaceae).

\* Artigo de pesquisa submetido à revista *Industrial Crops and Products*.

Phytochemical analysis and cytotoxic activity of *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae) against prostate (PC3), astrocytoma (SNB-19) and colon (HCT-116) cancer cells.

\* Artigo de pesquisa submetido à revista *Phytochemistry*.