

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Rudinei da Silva Silveira**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE ORAL AGUDA DE *JATROPHA*  
*GOSSYPIIFOLIA* L. (EUPHORBIACEAE)**

Santa Maria, RS  
2017



**Rudinei da Silva Silveira**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
TOXICIDADE ORAL AGUDA DE *JATROPHA GOSSYPIIFOLIA* L.  
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Carine Viana Silva

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silveira, Rudinei da Silva  
Avaliação da composição química, atividade antioxidante e toxicidade oral aguda de *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) / Rudinei da Silva Silveira.- 2017.  
168 p.; 30 cm

Orientadora: Carine Viana Silva  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Atividade antioxidante 2. Compostos fenólicos 3. *Jatropha gossypifolia* L. 4. Terpenóides 5. Toxicidade oral aguda. UHPLC-MS/MS. I. Silva, Carine Viana II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Rudinei da Silva Silveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.  
E-mail: rudissilveira@gmail.com

**Rudinei da Silva Silveira**

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
TOXICIDADE ORAL AGUDA DE *JATROPHA GOSSYPIIFOLIA* L.  
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 05 de janeiro de 2017:**

---

**Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Melânia Palermo Manfron, Dra. (UFSM)**

---

**Ricardo Bizogne Souto, Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2017



## DEDICATÓRIA

*Ao meu pai e à minha mãe,*

*Com todo o meu carinho.*





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à Deus, que nos dá o dom da vida e nos concede maravilhas inexplicáveis todos os dias.

Aos meus pais Carlos Silveira e Dirlei Silveira, que muitas vezes sem nem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minha realização profissional, me incentivando para que tudo fosse alcançado com responsabilidade, honestidade e para que nunca desistisse diante das dificuldades.

Ao meu amigo Fabiano Bohrer pelo apoio e estímulo.

A professora Carine Viana pela orientação, oportunidade, atenção, gentileza e amizade, com que conduziu a realização deste trabalho.

A professora Dr<sup>a</sup> Melânia P. Manfron do laboratório de Farmacognosia da UFSM pela colaboração e amizade.

Às colegas Juliana Brondani, Rachel Lima, Andréia Haas e Camille Guex, do Departamento de Fisiologia Animal da UFSM pela colaboração na realização dos ensaios de toxicidade aguda.

Ao professor Leandro Machado Carvalho, aos colaboradores e a todos os colegas do laboratório de análises químicas (Lachem). Agradeço de forma especial ao Henrique Faccin, a Marcela Schmidt, a Luciana Gobo, a Fernanda Pires, a Thaís Dal Molin, ao Gabriel Reis, a Marcia Barichello e a Géssica Domingos pelas trocas de experiências, amizade e companheirismo.

A minha colega e amiga Sandra Ribeiro, por todo o apoio ao longo desse trabalho. Obrigado pela amizade, troca de conhecimentos, companheirismo, risadas, cafezinho e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Espero não ter esquecido ninguém, contudo saibam que expresso minha gratidão a todos direta ou indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho. Mesmo que seu nome não conste aqui, saiba que sou muito grato também.

O meu muito obrigado.



Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.

(Albert Einstein)



## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE ORAL AGUDA DE *JATROPHA GOSSYPIIFOLIA* L. (EUPHORBIACEAE)

AUTOR: Rudinei Da Silva Silveira  
ORIENTADORA: Carine Viana Silva

A *Jatropha gossypifolia* L. é popularmente conhecida como pião-roxo ou pinhão-roxo, pertencente à família Euphorbiaceae, do gênero *Jatropha*, encontra-se distribuída no Brasil predominantemente na região Amazônica, na Caatinga e Mata Atlântica (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Na medicina popular é utilizada para o tratamento de úlceras pépticas, diabetes, neoplasias, diarreias, como cicatrizante e diurético (MARIZ et al., 2006). Os principais metabólitos secundários identificados na sua constituição química são: ácidos fenólicos, alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, lignanas e taninos. As atividades biológicas evidenciadas na espécie foram: antioxidante, antidiarreico, antimalárico, antimicrobiano, antiviral, sedativo, anticonvulsivante, além de potencial hipotensor e vasorelaxante (MARIZ et al., 2010). O objetivo deste estudo foi caracterizar e quantificar os compostos fenólicos e terpenóides como marcadores analíticos, empregando a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS), bem como, investigar a atividade antioxidante *in vitro* frente aos radicais ânion superóxido, hidroxil e peroxil e avaliar a toxicidade oral aguda do extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia*. Os extratos foram obtidos por infusão e maceração do material vegetal seco (folhas e frutos) nas três diferentes safras, sendo que a infusão não foi utilizada para o teste de toxicidade. Após a maceração, o extrato hidroetanólico obtido foi liofilizado e ressuspendido em água para o fracionamento com solventes na ordem crescente de suas polaridades: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. No extrato hidroetanólico e na infusão foi constatada a presença dos compostos fenólicos majoritários, tais como a catequina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e luteolina. Também no extrato hidroetanólico, identificou-se a presença de três compostos triterpênicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol). A atividade anti-radicalar testada na infusão, extrato hidroetanólico e frações acetato de etila e butanol, demonstrou uma maior atividade antioxidante *in vitro* no extrato hidroetanólico ( $96,6 \pm 3,0$ ) e infusão ( $99,7 \pm 13,9$ ) nas concentrações de 0,1% (m/v) e 1,0% (m/v), respectivamente. O extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia*, testado na toxicidade oral aguda, apresentou DL<sub>50</sub> estimada entre 2000-5000mg/Kg e caracterizou-se como de baixa toxicidade, de acordo com a diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 423., 2001), não conferindo alterações significativas ( $p > 0,05$ , ANOVA) aos parâmetros bioquímicos e hematológicos do grupo teste analisado, em relação ao grupo controle. Assim, o estudo sugere que a presença de catequina, como composto majoritário na infusão, pode estar relacionado ao efeito hipotensor e ainda que as propriedades farmacológicas dos flavonóides e ácidos fenólicos encontrados, possam ser associados ao uso popular dessa planta medicinal.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. *Jatropha gossypifolia* L. Terpenóides. Toxicidade oral aguda. UHPLC-MS/MS.



## ABSTRACT

### EVALUATION OF CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ACUTE ORAL TOXICITY OF *JATROPHA GOSSYPIIFOLIA* L. (EUPHORBIACEAE)

AUTHOR: RUDINEI DA SILVA SILVEIRA  
ADVISER: CARINE VIANA SILVA

The *Jatropha gossypifolia* L. is popularly known as a purple-backed or purple-pine, belonging to the family Euphorbiaceae, of the genus *Jatropha*. It is distributed in Brazil predominantly in the Amazon region, Caatinga and Mata Atlântica (FÉLIX-SILVA et al. 2014). In popular medicine it is used for the treatment of peptic ulcers, diabetes, neoplasias, diarrhea, as cicatrizante and diuretic (MARIZ et al., 2006). The main secondary metabolites identified in its chemical constitution are: phenolic acids, alkaloids, terpenes, steroids, flavonoids, lignans and tannins. The biological activities evidenced in the species were: antioxidant, antidiarrheal, antimalarial, antimicrobial, antiviral, sedative, anticonvulsant, besides hypotensive and vasorelaxant potential (MARIZ et al., 2010). The objective of this study was to characterize and quantify the phenolic compounds and terpenoids as analytical markers, using ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS / MS), as well as to investigate antioxidant activity *in vitro* against superoxide anion, hydroxyl and peroxy radicals and to evaluate the acute oral toxicity of the hydroethanolic extract of the leaves of *J. gossypifolia*. The extracts were obtained by infusion and maceration of the dry plant material (leaves and fruits) in the three different crops, and the infusion was not used for the toxicity test. After the maceration, the obtained hydroethanolic extract was lyophilized and resuspended in water for the fractionation with solvents in the increasing order of their polarities: hexane, chloroform, ethyl acetate and n-butanol. The presence of the major phenolic compounds, such as catechin, *p*-coumaric acid, ferulic acid and luteolin, were found in the hydroethanolic extract and infusion. Also in the hydroethanolic extract, the presence of three triterpene compounds ( $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin and lupeol) was identified. The anti-radical activity tested in the infusion, hydroethanolic extract and ethyl acetate and butanol fractions, showed a higher *in vitro* antioxidant activity in the hydroethanolic extract ( $96.6 \pm 3.0$ ) and infusion ( $99.7 \pm 13.9$ ) in the concentrations of 0.1% w / v and 1.0% w / v, respectively. The hydroethanolic extract from the leaves of *J. gossypifolia*, tested in acute oral toxicity, had an LD<sub>50</sub> of between 2000-5000 mg / kg and was characterized as low toxicity, according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 423., 2001) guideline. No significant changes ( $p > 0.05$ , ANOVA) were observed in the biochemical and hematological parameters of the test group analyzed, in relation to the control group. Thus, the study suggests that the presence of catechin, as the major compound in the infusion, may be related to the hypotensive effect and that the pharmacological properties of the flavonoids and phenolic acids found may be associated with the popular use of this medicinal plant.

**Keywords:** Acute oral toxicity. Antioxidant activity. *Jatropha gossypifolia* L. Phenolic compounds. Terpenoids. UHPLC-MS/ MS.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica de <i>J. gossypiifolia</i> .....	38
Figura 2 – Porte arbustivo de <i>J. gossypiifolia</i> , horto de plantas medicinais da EMBRAPA-Amazônia oriental em Belém-PA, agosto de 2015.....	39
Figura 3 – Folhas, flores e frutos de <i>J. gossypiifolia</i> , horto de plantas medicinais da EMBRAPA-Amazônia oriental em Belém-PA, agosto de 2015 .....	40
Figura 4 – Terpenos isolados na espécie <i>J. gossypiifolia</i> .....	42
Figura 5 – Lignoides isolados na espécie <i>J. gossypiifolia</i> .....	44
Figura 6 – Alcaloides e flavonoides isolados na espécie <i>J. gossypiifolia</i> .....	45
Figura 7 – Peptídeos cíclicos isolados na espécie <i>J. gossypiifolia</i> .....	46
Figura 8 – Reação direta dos antioxidantes (Ant) com os radicais livres (RL).....	58
Figura 9 – Via Biosintética da formação de fenólicos em plantas.....	60
Figura 10 – Estrutura química dos ácidos fenólicos .....	61
Figura 11 – Estrutura básica dos flavonoides.....	61
Figura 12 – Representação esquemática de formação dos principais grupos de terpenos .....	64
Figura 13 – Estrutura molecular do isopreno.....	65
Figura 14 – Estrutura genérica de um triterpeno pentacíclico .....	66
Figura 15 – Estrutura molecular da cortisona, um esteroide triterpênico.....	66
Figura 16 – Estrutura molecular das amirinas e saponinas triterpênicas .....	67
Figura 17 – Formação de radicais superóxido pela transformação da Hipoxantina em Xantina e dessa para ácido úrico, pela ação da enzima xantina oxidase .....	68
Figura 18 – Reação química de formação do formazan a partir da redução do NBT pelo radical superóxido, no sistema hipoxantina-xantina oxidase .	69
Figura 19 – Reação de Fenton .....	70
Figura 20 – Formação do cromógeno por meio da decomposição da deoxirribose pelos radicais hidroxilas formados pela reação de Fenton.....	70
Figura 21 – Termodecomposição do ABAP a 37°C e conseqüente formação de radicais peroxila que atuam na oxidação do reagente DCFH originando o composto fluorescente DCF .....	71
Figura 22 – Placa de análise do método ANCOMROS .....	92
Figura 23 – Procedimento de teste com uma dose inicial de 2000 mg/Kg de peso corporal .....	95
Figura 24 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), da infusão das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (1ª safra) .....	99
Figura 25 – Cromatograma obtido para a análise da infusão das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (1ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM.....	100
Figura 26 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), da infusão das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (2ª safra) .....	100
Figura 27 – Cromatograma obtido para a análise da infusão das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (2ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM.....	101
Figura 28 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (1ª safra) .....	101

Figura 29 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (1ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM ....	102
Figura 30 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (2ª safra).....	102
Figura 31 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (2ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM ....	103
Figura 32 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (3ª safra).....	103
Figura 33 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (3ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM ....	104
Figura 34 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura (m/z 135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE dos frutos de <i>J. gossypiifolia</i> (3ª safra) .....	104
Figura 35 – Cromatograma obtido para a análise do EHE dos frutos de <i>J. gossypiifolia</i> (3ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM ....	105
Figura 36 – Cromatograma obtido para a análise do extato etanólico das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (1ª safra) por UHPLC-APPI-MS/MS em modo MRM .....	107
Figura 37 – Cromatograma obtido para a análise do extato etanólico das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> (2ª safra) por UHPLC-APPI-MS/MS em modo MRM .....	108
Figura 38 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando EHE das folhas de três diferentes coletas da <i>J. gossypiifolia</i> . Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de EHE seco .....	110
Figura 39 – Variação dos compostos terpênicos quantificados por UHPLC-APPI-MS/MS no EHE das folhas de <i>J. gossypiifolia</i> , nas duas diferentes safras. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de EHE seco.....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de ERO radicalares e não-radicalares .....	53
Tabela 2 – Classificação dos compostos terpênicos de acordo com o número de unidades de isopreno .....	65
Tabela 3 – Estrutura química dos compostos fenólicos em estudo.....	80
Tabela 4 – Intervalos de tempos de retenção (TR) e parâmetros do espectrômetro de massas, validados por Faccin e colaboradores (2016), para os compostos fenólicos selecionados.....	85
Tabela 5 – Estrutura química dos compostos triterpênicos em estudo .....	87
Tabela 6 – Intervalos de tempos de retenção (TR) e parâmetros do espectrômetro de massas, validados por Gobbo e colaboradores (2016), para os compostos triterpênicos selecionados.....	89
Tabela 7 – Concentrações dos compostos fenólicos em <i>J. gossypiiifolia</i> determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS usando infusão e extrato hidroetanólico (EHE). Valores são expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de planta seguido pelo desvio padrão em relação a concentração (n=3) .....	106
Tabela 8 – Concentrações de compostos triterpênicos em <i>J. gossypiiifolia</i> determinadas por UHPLC-APPI-MS/MS usando EHE das folhas. Valores são expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de planta seguido pelo desvio padrão em relação a concentração (n=3).....	108
Tabela 9 – Atividade farmacológica dos compostos encontrados.....	113
Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>J. gossypiiifolia</i> obtidos pelos métodos de infusão, maceração e pelas frações obtidas a partir do EHE: Acetato de etila e butanol, frente aos radicais superóxido, hidroxil e peroxil.....	115
Tabela 11 – Parâmetros bioquímicos obtidos de soro de ratos Wistar, tratados com EHE de <i>J. gossypiiifolia</i> (2000 mg/Kg) por via oral.....	117
Tabela 12 – Parâmetros hematológicos (eritrograma) obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com extrato hidroetanólico de <i>J. gossypiiifolia</i> (2000 mg/Kg) por via oral .....	119
Tabela 13 – Parâmetros hematológicos (leucograma) obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com extrato hidroetanólico de <i>J. gossypiiifolia</i> (2000 mg/Kg) por via oral .....	120



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Formação de um cátion radical.....	51
Equação 2 – Formação de um ânion radical .....	51
Equação 3 – Fissão homolítica de uma reação covalente.....	51
Equação 4 – Formação do radical superóxido.....	52
Equação 5 – Formação do íon peróxido .....	52
Equação 6 – Formação de água.....	52
Equação 7 – Reação de peróxido de hidrogênio com metais de transição .....	54
Equação 8 – Homólise da água por exposição à radiação ionizante.....	54
Equação 9 – Dismutação do radical superóxido .....	54
Equação 10 – Formação do ácido conjugado, radical hidroperóxido, do radical Superóxido.....	54
Equação 11 – Redução do Fe (III) a Fe (II) e produção de radicais hidroxil .....	55
Equação 12 – Reação de Haber-Weiss.....	55
Equação 13 – Produção de radicais superóxido por fagócitos com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase .....	56
Equação 14 – Oxidação dos grupos S–H por radicais superóxido .....	56
Equação 15 – Dismutação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase .....	58
Equação 16 – Redução do peróxido de hidrogênio a água .....	58
Equação 17 – Regeneração da enzima GSH .....	58
Equação 18 – Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante frente ao radical superóxido .....	58
Equação 19 – Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante frente ao radical superóxido .....	90
Equação 20 – Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante frente ao radical hidroxila .....	91
Equação 21 – Fórmula para o cálculo da atividade antioxidante frente ao radical peroxila .....	93



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	Dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
ALT	Alanina aminotransferase
ANCOMROS	Atividade antioxidante medida pela determinação de espécies reativas de oxigênio, do inglês, <i>Antioxidant competence measured by ROS determination</i> .
ANOVA	Análise de variância
APO	Atividade pro-oxidante
APPI	Fonte de fotoionização à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric pressure photoionization</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês, MCHC-Mean corpuscular hemoglobin concentration
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DCF°	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína oxidado
DCFH <sub>2</sub>	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína desacetilado
DCFH <sub>2</sub> -DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DL <sub>50</sub>	Dose letal média
DMAPP	Dimetil-alil-difosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHE	Extrato hidroetanólico
EMEA	Agência europeia de medicina, do inglês, European medicines agency
ERO	Espécies reativas de oxigênio, do inglês, ROS - <i>Reactive oxygen species</i> .
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês, <i>electrospray ionization source</i>
ESR	Ressonância do Spin Eletrônico, do inglês, <i>Electron Spin Resonance</i>
GAE	Equivalentes de ácido gálico, do inglês, <i>galic acid equivalent</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazina etanosulfônico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coa
HO°	Radical hidroxila
HO <sub>2</sub> °	Radical hidroperoxila
IPP	Isopentenil-difosfato
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>
MDA	Malondialdeído
MEP	2C-metil-eritritol-4P
MIR	Mircetina
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>multiple</i>

	<i>reaction monitoring</i>
MT	Medicina tradicional
MVA	Ácido mevalônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT	Azul nitro de tetrazólio, do inglês, <i>nitro-blue tetrazolium</i>
nd	Não determinado
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, do inglês, <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Ácido p-cumárico
PTFE	Politetrafluoretileno, do inglês, <i>polytetrafluoroethylene</i>
QUE	Quercetina
RES	Resveratrol
RO <sup>•</sup>	Radical alcóxila
ROO <sup>•</sup>	Radical peróxila
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
SOD	Superóxido dismutase
T&MC	Produtos tradicionais e medicinais complementares
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TPC	Compostos fenólicos totais, do inglês, <i>Total phenolic compounds</i>
TR	Tempo de retenção
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, do inglês, <i>Ultra high performance liquid chromatography coupled mass spectrometry</i>
UV	Radiação ultravioleta
VAC	Ácido vanílico
VCM	Volume corpuscular médio
XOD	Xantina oxidase



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
2.1	EUPHORBIACEAE .....	33
2.2	JATROPHA L.....	34
2.3	JATROPHA GOSSYPIIFOLIA L. ....	36
2.3.1	<b>Aspectos botânicos</b> .....	36
2.3.2	<b>Aspectos químicos</b> .....	40
2.3.3	<b>Etnofarmacologia</b> .....	47
2.3.4	<b>Atividades farmacológicas</b> .....	47
2.4	<b>RADICAIS LIVRES</b> .....	51
2.4.1	<b>Oxigênio e seus derivados</b> .....	52
2.4.2	<b>Principais espécies reativas derivadas de O<sub>2</sub> (ERO)</b> .....	54
2.4.2.1	<i>Radical Hidroxil (HO<sup>•</sup>)</i> .....	55
2.4.2.2	<i>Radicais Peroxil (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e alcóxil (RO<sup>•</sup>)</i> .....	56
2.5	<b>DEFESAS ANTIOXIDANTES</b> .....	57
2.5.1	<b>Compostos fenólicos</b> .....	59
2.5.2	<b>Compostos terpênicos</b> .....	63
2.6	<b>MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	67
2.6.1	<b>Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD</b> .....	68
2.6.2	<b>Radical Hidroxil - Método Deoxirribose</b> .....	69
2.6.3	<b>Radical Peroxil - Método ANCOMROS</b> .....	70
2.7	<b>TOXICOLOGIA</b> .....	71
2.7.1	<b>Ensaio de Toxicidade aguda</b> .....	74
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>77</b>
3.1	<b>EQUIPAMENTOS</b> .....	77
3.2	<b>AMOSTRAGEM</b> .....	77
3.3	<b>PREPARO DOS EXTRATOS</b> .....	78
3.4	<b>CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR UHPLC-ESI-MS/MS</b> .....	79
3.4.1	<b>Preparo da amostra</b> .....	79
3.4.2	<b>Padrões, reagentes e soluções</b> .....	80
3.4.3	<b>Condições de análise por UHPLC-ESI-MS/MS</b> .....	83
3.5	<b>CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR UHPLC-APPI-MS/MS</b> .....	86
3.5.1	<b>Preparo da amostra</b> .....	86
3.5.2	<b>Padrões, reagentes e soluções</b> .....	86
3.5.3	<b>Condições de análise por UHPLC-APPI-MS/MS</b> .....	88
3.6	<b>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i></b> .....	90
3.6.1	<b>Frente ao radical Ânion Superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) - Sistema Hipoxantina-Xantina Oxidase (HPX/XOD)</b> .....	90
3.6.2	<b>Frente ao radical Hidroxil (HO<sup>•</sup>) - Método deoxirribose</b> .....	91
3.6.3	<b>Frente ao radical Peroxil (ROO<sup>•</sup>) - Método ANCOROS</b> .....	91
3.7	<b>TOXICOLOGIA</b> .....	93
3.7.1	<b>Animais</b> .....	93
3.7.2	<b>Teste de toxicidade oral aguda</b> .....	94

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	97
4.1	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS DE <i>JATROPHA GOSSYPIIFOLIA</i> L.....	98
4.2	ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	98
4.3	ANÁLISE DOS COMPOSTOS TRITERPÊNICOS .....	107
4.4	VARIAÇÃO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	109
4.5	DEFINIÇÃO DOS MARCADORES ANALÍTICOS DA ESPÉCIE.....	111
4.6	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NA ESPÉCIE.....	112
4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	114
4.8	TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA .....	116
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	123
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125
	<b>ANEXO</b> .....	137
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> ..	137
	<b>ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO</b> .....	139

## 1 INTRODUÇÃO

A medicina tradicional (MT) é uma parte importante e subestimada dos serviços de saúde. Em alguns países, incluindo o Brasil, a medicina tradicional ou a medicina não convencional pode ser chamado de medicina complementar. A MT tem uma longa história de uso na manutenção da saúde, prevenção e tratamento de doenças, especialmente as crônicas e uma Estratégia de Medicina Tradicional: 2014-2023 com políticas e regulamentos para promover a utilização segura e eficaz de produtos tradicionais e medicinais complementares (T&MC) têm aumentado em todo o mundo (WHO, 2013).

Plantas são usadas em todo o mundo, estão em ascensão e os dados disponíveis sugerem que o mercado de produtos T&MC é substancial. No entanto, a diversidade de categorias regulamentares para estes produtos faz com que se torne difícil avaliar a dimensão do mercado, com qualquer grau de precisão. Para exemplificar, os gastos anuais sobre MT na República da Coreia foram de US\$ 7,4 bilhões em 2009 e nos Estados Unidos de US\$ 14,8 bilhões em 2008 (WHO, 2013).

O Brasil é considerado como um dos países com maiores perspectivas para a exploração econômica da biodiversidade do planeta. É o país com maior número de espécies vegetais do mundo, contando com um número estimado entre 15% a 20% do total. A maioria das plantas existentes é encontrada nos países tropicais, e estima-se que aproximadamente 25% das espécies ocorram originalmente no Brasil (RODRIGUES, 2016). Estas têm atraído a atenção das indústrias farmacêuticas e, por isso, vêm sendo avaliadas a partir de estudos etnofarmacológicos, pré-clínicos e clínicos que pesquisam sua composição química, ação farmacológica e sua indicação terapêutica na busca do desenvolvimento de novos fármacos (LORENZI; MATOS, 2008).

Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. No Brasil, para o registro e licenciamento de fitomedicamentos, a obtenção de extratos padronizados a partir de um perfil cromatográfico com marcadores químicos é uma etapa fundamental e obrigatória para qualquer nova espécie a ser empregada para fins terapêuticos (BRASIL, 2010).

De acordo com a Agência Europeia de Medicina (EMEA, do inglês, *European Medicines Agency*), marcadores analíticos são os constituintes ou grupos de constituintes químicos que servem somente para propósitos analíticos, enquanto que os marcadores bioativos contribuem para a atividade terapêutica de uma determinada espécie. Os polifenóis e terpenos podem ser considerados marcadores analíticos de caráter bioativo e com grande potencial terapêutico no tratamento de doenças, apresentando atividade antioxidante e anticonvulsivante, respectivamente. Em estudos com plantas medicinais que podem se tornar possíveis fármacos, a correta identificação dos marcadores terapêuticos bioativos é de grande relevância clínica (LI et al., 2008).

Muitos dos efeitos benéficos do uso de plantas medicinais estão relacionado à presença de metabólitos secundários (flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides, terpenos, ácidos fenólicos) que desempenham um importante papel no crescimento, reprodução, proteção contra patógenos e predadores, contribuem para a coloração e características sensoriais de frutas e vegetais e recebem especial atenção por apresentar funções antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana entre outras (PIETTA, 2000; MIGLIATO et al., 2007).

Dentre as diferentes classes de compostos presentes em extratos de plantas pode-se destacar os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides) e terpenos que são conhecidos por sua pronunciada ação removedora de radicais livres.

O metabolismo oxidativo é de suma importância para a sobrevivência celular e o efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas espécies reativas desempenham funções relevantes no organismo e encontram-se em equilíbrio com os mecanismos de defesa antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007; ALVES et al., 2010). No entanto, o excesso na produção dessas espécies reativas ocasiona o estresse oxidativo que pode vir a apresentar efeitos deletérios ao organismo tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndria e membranas, provocando alterações nas funções celulares que podem estar associadas a doenças crônicas e degenerativas. O excesso de radicais livres é combatido através de uma defesa antioxidante de origem endógena ou através de compostos adquiridos da dieta (ANTOLOVICH et al., 2002; ALVES et al., 2010).

Os fitoterápicos são utilizados amplamente pela população acreditando-se que por ser um produto natural não causam efeitos tóxicos ou adversos. Entretanto,

os estudos toxicológicos mostram que as plantas quando utilizadas de forma exacerbada podem ser nocivas ao organismo humano. Para melhorar o entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação do risco/benefício do seu uso por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos que visam colaborar para a promoção do uso racional de tais produtos (LAPA et al., 2004; FARIAS et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008).

A toxicidade de uma substância é a capacidade que esta tem em causar algum desequilíbrio ao organismo com o qual entra em contato, ou seja, refere-se ao potencial desta em produzir efeito tóxico. A importância de analisar tal propriedade reside no fato de que toda e qualquer substância química pode vir a ser tóxica dependendo de fatores relacionados à exposição, tais como: dose, frequência e duração da exposição, condições fisiológicas e patológicas do organismo exposto (BARROS; DAVINO, 2003).

De um modo geral, os ensaios de avaliação toxicológica compreendem a execução de protocolos experimentais padronizados em espécies vegetais ou animais (fase pré-clínica) e até mesmo na espécie humana (fase clínica). Na fase pré-clínica, o organismo escolhido para ser avaliado em um modelo experimental pode ser tratado com altas doses do produto em curto espaço de tempo (avaliação da toxicidade aguda) ou exposto por tempo prolongado a doses relativamente menores (toxicidade crônica), sempre no intuito de antever eventuais efeitos tóxicos das substâncias químicas presentes. Quanto maior for o número de parâmetros orgânicos monitorados e mais específicos forem estes indicadores, tão melhor será a avaliação toxicológica no que diz respeito ao fornecimento de dados que contribuam para o delineamento de estudos clínicos visando estabelecer uma margem terapêutica segura para uso do produto pelo paciente (LARINI, 1993; BRITO, 1994; BARROS et al., 2003; LAPA et al., 2004; BRASIL, 2004).

A avaliação dos efeitos tóxicos não pretende combater a fitoterapia enquanto modalidade de tratamento de enfermidades, mas sim objetiva fomentar seu desenvolvimento racional ao contribuir para uma utilização segura de fitoterápicos, através do gerenciamento de informações sobre eventuais danos à saúde associados ao uso desses produtos (MARIZ, 2007).

Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), o uso da Fitoterapia nos serviços de saúde passou a ter uma demanda importante dos profissionais de saúde, dos usuários, dos pesquisadores e dos gestores. Como resposta a esta

demanda o Ministério da Saúde, através da Portaria 971/2006, criou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. Posteriormente, também foram criados a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Em 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), contendo 71 plantas, entre elas a *Jatropha gossypifolia* L. Contudo, nenhuma outra informação a respeito desta planta foi fornecida, sendo que estudos sistemáticos sobre seus extratos padronizados e sua possível bioatividade ainda são incipientes (FIGUEREDO, 2008).

A *J. gossypifolia* é popularmente conhecida no Brasil por vários nomes, tais como, pião-roxo ou pinhão-roxo. Pertence à família Euphorbiaceae; gênero *Jatropha*; subgênero *Jatropha*; secção *Jatropha* e subsecção *Adenophorae*. Apresenta-se como uma árvore de folhas alternas grandes, flores roxas, frutos pequenos e capsulares. Várias partes da planta têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como: úlceras pépticas, diabetes, neoplasias, diarreias e ainda como cicatrizante e diurético (MARIZ et al., 2006). Diversas substâncias já foram identificadas como, ácidos fenólicos, alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, lignanas e taninos, entre diversos outros constituintes. Estes compostos conferem a *J. gossypifolia* atividades antioxidante, antidiarreico, antimalárico, antimicrobiano, antiviral, moluscicida, sedativo, anticonvulsivante, além de potencial hipotensor e vasorelaxante. O principal constituinte ativo do pião-roxo é o diterpeno chamado jatrofona (MARIZ et al., 2010).

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização e quantificação dos compostos fenólicos e terpênicos como marcadores analíticos, investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações baseados na geração dos radicais livres e sua correlação com a concentração dos marcadores orgânicos encontrados. Bem como avaliar a toxicidade oral aguda no extrato hidroetanólico (EHE) (folhas) de *J. gossypifolia*.

Sendo, os objetivos específicos:

- I. Caracterizar e quantificar os compostos fenólicos na infusão (folhas) e no EHE (folhas e frutos) e, terpênicos no EHE (folhas) como marcadores analíticos, empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS);

- II. Determinar quais compostos fenólicos e terpenos aparecem repetidamente e majoritariamente nos diferentes extratos e correlacionar com variações sazonais.
- III. Investigar a atividade antioxidante dos extratos (infusão, EHE) e frações acetato de etila e butanol por métodos *in vitro* baseados na geração dos radicais ânion superóxido, hidroxila e peroxila e sua correlação com a concentração dos marcadores orgânicos encontrados;
- IV. Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia* em ratos Wistar, segundo o Guia OECD 423.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As plantas medicinais são utilizadas para a manutenção e recuperação da saúde, desde as formas mais simples de tratamento na medicina popular até a fabricação industrial de medicamentos. Podem ser caracterizadas por: plantas cujas propriedades terapêuticas e os seus constituintes foram estabelecidas cientificamente, e plantas que são consideradas medicinais, mas que ainda não foram submetidas a investigação detalhada. Na busca de novos medicamentos de origem vegetal estão envolvidos conhecimentos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (LORENZI; MATOS, 2008).

Planta medicinal é qualquer planta que apresente em um ou mais dos seus órgãos substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que possam ser precursoras para a síntese de novos fármacos (WHO, 1977 apud OKIGBO et al., 2009, p. 86).

O termo “herbal drug” (medicamentos à base de plantas) é aplicado quando uma parte ou partes da planta são utilizadas para a preparação de medicamentos, nomeadamente, folhas, flores, sementes, raízes, cascas, caules. Estas podem ser submetidas à extração, fracionamento, purificação, concentração ou outros processos físicos ou biológicos para a sua utilização direta (estado bruto) ou como intermediária de produtos à base de plantas (formulações farmacêuticas) (OKIGBO et al., 2009; RATES, 2001).

As plantas medicinais representam as maiores fontes de substâncias biologicamente ativas, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos, como as saponinas, taninos, óleos essenciais, flavonoides, terpenos, alcaloides e outros compostos complexos com propriedades curativas e têm sido utilizadas como origem de agentes terapêuticos por meio: a) do isolamento de compostos bioativos para o uso direto como fármaco, a exemplo da digoxina, taxol e morfina; b) da produção de compostos bioativos com diferentes estruturas que permitam a semi-síntese de compostos de entidades patenteáveis de maior atividade (eficácia) ou de menor toxicidade; c) da utilização como ferramentas farmacológicas e d) da aplicação da planta ou algumas de suas partes como medicamento (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

Os fitoterápicos são utilizados em todo o mundo e encontram-se em ascensão nas nações ocidentais. Nos Estados Unidos, a comercialização de ervas medicinais

aumentou cerca de 20% de 2000 a 2010 e junto com países europeus, especialmente a Alemanha, e Asiáticos, atende aos principais mercados produtores e consumidores desses medicamentos (JORDAN et al., 2010).

No Brasil foi promulgada no ano de 2006 a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, com o objetivo de garantir à segurança, eficácia e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, a qual é parte integrante das políticas públicas de saúde, meio ambiente e desenvolvimento econômico e social, sendo considerada um componente essencial na promoção da qualidade de vida dos brasileiros. Entre os princípios considerados na elaboração desta política, destacam-se a melhoria da atenção à saúde, uso sustentável da biodiversidade brasileira e fortalecimento da agricultura familiar. Suas diretrizes foram detalhadas por ações do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), conforme Portaria Interministerial nº 2.960/2008 e tem como medida fortalecer o desenvolvimento industrial e tecnológico nesta área, garantir melhor acesso aos medicamentos pelos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), procurar valorizar o conhecimento popular e incentivar a terapia fitoterápica (BRASIL, 2006).

Segundo Portaria nº 886/2010 fica instituída a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que 12 das 71 espécies vegetais da RENISUS (Relação nacional de plantas e espécies vegetais de interesse ao SUS) já se encontram na RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) e são disponibilizadas pelo SUS, como por exemplo a babosa, unha de gato, cáscara sagrada entre outras (BRASIL, 2006).

Entre 2013 e 2015 a busca por produtos medicinais no SUS mais que dobrou, crescendo 161%. Em 2013, cerca de 6 mil pessoas procuraram alguma farmácia de atenção básica para receber produtos vegetais, sendo que em 2016 essa procura passou para quase 16 mil, ano que o PNPMF completou 10 anos garantindo o uso sustentável da biodiversidade brasileira e disponibilizando-os em cerca de 3.250 farmácias do SUS de 930 municípios brasileiros (BRASIL, 2016).

Ainda no Brasil, cerca de 80% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais, porém a carência de informações adequadas sobre aspectos como eficácia e segurança desses produtos ainda dificulta o seu uso (OUEDRAOGO et al., 2012). Especificamente no estado do Rio Grande do Sul (RS), segundo o relatório anual do Centro de Informações Toxicológicas (CIT), 281 casos de

intoxicação por plantas ocorreram no ano de 2014. O que confirma a necessidade de estudos toxicológicos na área (CIT-RS, 2014).

Sendo as plantas medicinais fonte de compostos bioativos para a produção de novos fármacos, é necessária a investigação e pesquisa para identificação dos constituintes ativos bem como o seu isolamento, atividades farmacológicas e potenciais toxicológicos (ROBINSON et al., 2011; BALUNAS et al., 2005).

## 2.1 EUPHORBIACEAE

Euphorbiaceae é uma das maiores famílias das Angiospermas, composta por mais de 300 gêneros e mais de 8.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical, especialmente nos continentes americano e africano. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies (SOUZA et al., 2008).

As espécies pertencentes a esta família são muito diversificadas, incluindo árvores, arbustos e ervas monóicas ou dióicas. Geralmente são latexcentes com folhas alternas ou opostas, estípulas livres, caducas ou persistentes. Possuem inflorescências terminais ou axilares, com flores solitárias ou em glomérulos. As flores são unissexuais, actinomorfas, com sépalas e pétalas de cores diferentes, gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpelar e placentação axial. O fruto é geralmente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos. Os membros desta família mostram uma grande diversidade em sua anatomia de nó, pecíolo, limbo foliar, venação, tipos de estômatos, órgãos florais, frutos e sementes. Esta divergência provavelmente está associada à diversidade de habitats encontrados na família (THAKUR et al., 2012).

As plantas da família Euphorbiaceae podem ser medicinais ou aromáticas, sendo bem estudados quanto à sua composição química, possuindo os diterpenos como seus principais quimiomarcadores e ainda apresentam na sua composição compostos com atividade biológica, tais como alcaloides, flavonoides, fenóis, que podem ser encontrados nas folhas, caules, flores, casca, fruto ou semente (MWINE et al., 2011).

Embora a maioria das plantas possa ser classificada como venenosa, ainda hoje são usadas na medicina popular, devido às suas propriedades terapêuticas com dosagem e eficácia por vezes desconhecida, o que pode causar efeitos adversos, sendo atualmente alvo de estudo para o desenvolvimento de novos

fitoterápicos com aplicações para uso humano, animal ou pesticida (OKIGBO et al., 2009; MWINE et al., 2011).

Os gêneros mais expressivos da família são *Euphorbia* L, com 1500 espécies, *Croton* (700), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (250), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Tragia* (150), *Jatropha* (150) e *Manihot* (150) (SOUZA; LORENZI, 2008).

Apresentam espécies de grande importância econômica como o *Ricinus communis* L. (mamona ou rícino) que é fonte de biocombustível, *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) importante espécie agrícola de cultura industrial, utilizada por populações de baixa renda em que as folhas e raízes constituem um alimento básico primário, *Hevea brasiliensis* Willd (seringueira) que é a principal fonte de borracha natural e várias espécies de *Jatropha* utilizadas em preparações medicinais (AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2010).

## 2.2 JATROPHA L.

O gênero *Jatropha* possui crescimento rápido, fácil propagação e adaptação, apresentando uma vasta distribuição, sendo constituído por cerca de 175 espécies e pertence à família das *Euphorbiaceae*, subfamília *Crotonoideae* e tribo *Jatropheae*. Este gênero apresenta uma distribuição disjunta, encontrando-se majoritariamente nas Américas (Norte e Sul), de onde a maior parte é nativa. Existem entre 50 a 70 espécies na África, sendo endêmica em Madagascar, poucas na Índia e cerca de 50 espécies na Arábia. Também é possível encontrar duas espécies no território Australiano (SUJATHA et al., 2013; BAHADUR et al., 2013).

Baseando-se nas características da espécie *Jatropha curcas*, é considerado que as outras espécies evoluíram desta ou de uma outra forma ancestral, com algumas mudanças no seu hábito de crescimento e especialização na estrutura vegetativa (estruturas florais). Estas plantas foram provavelmente distribuídas por navegadores portugueses através das ilhas de Cabo Verde e pela Guiné-Bissau para os outros países (HELLER, 1996).

Devido a esta distribuição, é um gênero morfologicamente diverso, composto por plantas herbáceas perenes, suculentas, facultativas anuais e geófitas. Os arbustos possuem inflorescência terminal cimosas, monóica, flores pentâmeras, pistiladas e estaminadas do tipo prato e produtoras de néctar e frutos do tipo

esquizocárpicos, secos, com três cocas globosas de deiscência explosiva e, conseqüentemente, dispersão primária por autocoria (NEVES et al., 2010).

Possuem crescimento articulado com morfologia descontínua, podendo chegar de 8 a 10 metros de altura em condições favoráveis. Seu caule contém grande quantidade de látex e o florescimento ocorre normalmente nas estações de verão e outono, permanecendo durante o ano todo quando as plantas estão submetidas permanentemente a regiões úmidas. As sementes de coloração preta amadurecem em torno de três a quatro meses depois do florescimento, sendo conhecidas pela produção de grande quantidade de óleo presente em seu albúmen, em torno de 60,8% (SILVA, 2008; KUMAR et al., 2008).

As plantas do gênero possuem uma região geográfica específica para o seu desenvolvimento e sua diversidade morfológica permite que várias espécies sejam cultivadas como plantas ornamentais, sendo empregadas como cercas-vivas em várias partes do mundo (SUJATHA et al., 2013; SABANDAR et al., 2013).

O gênero *Jatropha* destacou-se nas últimas décadas, particularmente, pelo óleo proveniente das suas sementes, que é considerado uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel. A espécie *J. curcas* é a mais estudada do gênero porque suas sementes são ricas em óleo o que levou nos últimos anos, ao aparecimento de vastas áreas de plantações da mesma em alguns países da Ásia, África e América do Sul (DEVAPPA et al., 2010a; OLIVEIRA et al., 2009).

O nome do gênero deriva do Grego, *iatrós* que significa “doutor” e *trophé* “comida ou nutrição”, que está relacionado com as suas propriedades medicinais, sendo as três espécies mais importantes *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. multifida*. É conhecido pelo efeito purgativo do óleo proveniente das suas sementes que é usado para sintomas digestivos, diarreia, disenteria, vômitos, náusea e dor de estômago. Também as folhas de algumas espécies apresentam semelhante efeito. Outras finalidades estão relacionadas com a cura de doenças de pele com o óleo da semente, látex e folha. A casca do caule ou raiz são trituradas e aplicadas sobre a pele para tratar eczemas, coceiras, carbúnculos, bolhas na boca, feridas e inchaços (DEVAPPA et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

As raízes das espécies *J. gossypifolia* e *J. multifida*, são usadas no tratamento de lepra e gonorreia, respectivamente e o látex de *J. curcas* e *J. molíssima* é usado como antidoto do veneno de cobra, concentrado para o uso externo e diluído com água para uso interno. O extratos aquosos e alcoólicos do

caule e da casca da espécie *J. macarantha* são usados como estimulante sexual masculino (DEVAPPA et al., 2010a; SABANDAR et al., 2013).

A utilização de plantas do gênero *Jatropha* na etnomedicina desencadeou a pesquisa de moléculas bioativas, sendo possível o isolamento de alguns dos seus constituintes químicos, entre os quais, alcaloides, peptídeos cíclicos, terpenos (mono-, di- e tri-), flavonoides, lignanas, cumarinas e ácidos graxos. Destes compostos, os que mais se destacaram foram os diterpenos, que são muito abundantes neste gênero e apresentam uma elevada bioatividade e toxicidade, sendo por isso potenciais matérias-primas para a síntese de novos compostos (DEVAPPA et al., 2010a; DEVAPPA et al., 2010).

A presença de diversos compostos com diferentes atividades biológicas no gênero, permite a utilização dos resíduos resultantes da extração do óleo das sementes como fertilizantes, apesar destes serem tóxicos devido a presença de ésteres de forbol, sendo necessária a extração dos mesmos. No entanto, é fundamental a realização de mais ensaios para verificar esta potencial aplicação, pois os ésteres de forbol degradam-se no solo dependendo da temperatura e umidade. (SABANDAR et al., 2013; DEVAPPA et al., 2010a).

Nas últimas décadas, vários estudos foram efetuados em algumas espécies deste gênero, por análise da atividade anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-malária, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, inibição de acetilcolinesterase, moluscicida e inseticida do óleo, extratos e dos constituintes químicos isolados (SABANDAR et al., 2013).

Contudo, a presença de compostos tóxicos requer uma maior análise tanto para o tratamento tradicional, como para a aplicação em indústrias de diferentes áreas, como agroindústria, indústria farmacêutica ou de biodiesel (DEVAPPA et al., 2010a; DEVAPPA et al., 2010).

## 2.3 JATROPHA GOSSYPIIFOLIA L.

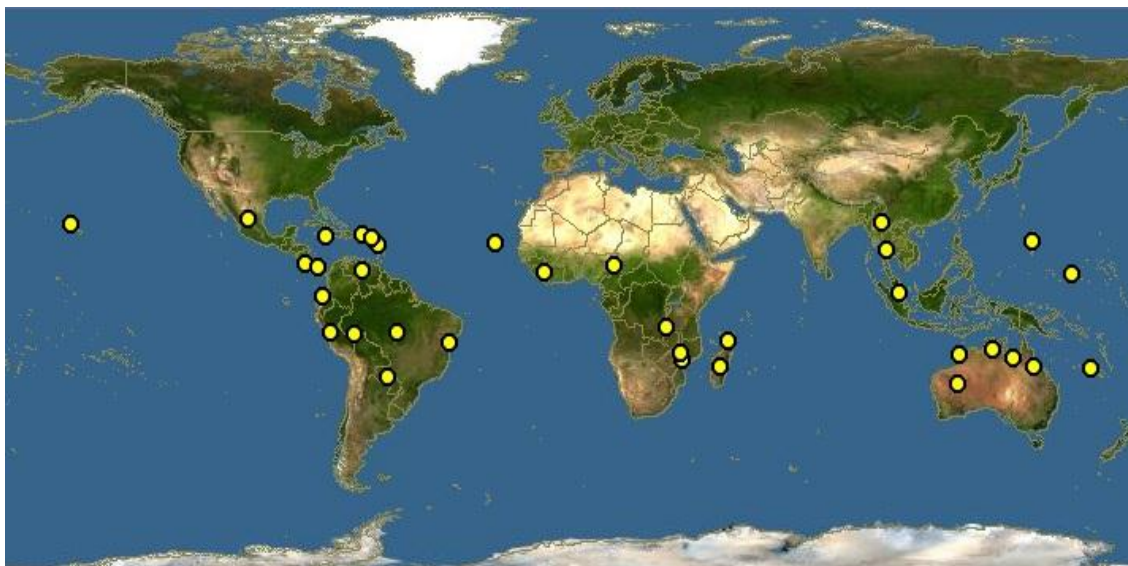
### 2.3.1 Aspectos botânicos

A espécie *Jatropha gossypifolia* L., conhecida popularmente como pinhão roxo, é uma das principais plantas medicinais do gênero *Jatropha*, secção *Jatropha*, família das *Euforbiáceas*. O seu nome “*gossypifolia*” é uma combinação do Latim

“*gossypium*”, que significando algodão, com “*folium*”, que sugere que as folhas são semelhantes às do algodoeiro. Supõe-se que esta espécie seja nativa da América tropical e da região das Caraíbas, mas não se sabe o local exato da sua origem. São seus sinônimos: *Adenoropium gossypifolium* (L.) Pohl., *Jatropha elegans* (Pohl) Klotzsch (SCHMELZER et al., 2008; RANDALL et al., 2009).

Esta planta apresenta uma fácil adaptação, cresce naturalmente em quase todos os tipos de solo (areia bem drenada, solos arenosos e argilosos, pedregosos), em regiões com uma estação seca pronunciada, em pastagens e arbustos, próximo de zonas costeiras e lugares desérticos. Também é possível encontrá-la em terrenos baldios, na beira de estradas, campos agrícolas mal cuidados, e áreas de transbordo dos rios (KUMAR; SINGH, 2012).

A sua rápida propagação, através de sementes e partes vegetativas permitiu que a sua distribuição fosse muito além da original. Atualmente encontra-se naturalizada na maior parte dos países tropicais e encontra-se distribuída no Brasil predominantemente na região Amazônica, na Caatinga e Mata Atlântica (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Também pode ser encontrada em toda África tropical exceto nas regiões secas do sul (mas inclui a África do Sul), América do Norte (majoritariamente na Flórida e México) e Sul, Ásia, e a Austrália, sendo introduzida como planta medicinal e ornamental (Figura 1). Foi registrada como uma espécie invasora em algumas áreas, devido à sua rusticidade, resistência a longos períodos de seca, não ser atacada por pragas e doenças, bem como a sua adaptabilidade a condições de solo e climas muito diferentes (SCHMELZER et al., 2008; RANDALL et al., 2009).

Figura 1 – Distribuição geográfica de *J. gossypiifolia*

Fonte: Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Jatropha+gossypiifolia>. Acesso em: 7 mar. 2016.

Na África Ocidental esta espécie é ainda plantada em torno das aldeias para a proteção das casas contra o fogo, pois estas têm pouca tendência a inflamar, bem como para manter as cobras afastadas e como limitação da área. O óleo das suas sementes é utilizado como lamparina e combustível (SCHMELZER et al., 2008).

Botanicamente a *J. gossypiifolia* é um arbusto perene (Figura 2) muito ramificado de 0.5 a 3 m de altura e 1 a 3 cm de diâmetro basal e dependendo do clima pode ser sempre verde ou caducifólio. Este apresenta uma raiz principal curta, que não é normalmente muito enraizada, laterais robustas e muitas raízes terciárias finas. É constituída apenas por um caule lenhoso, ereto, cilíndrico, sólido e ramificado. O pequeno número de ramos presente é robusto, verde e semi-lenhos (SABANDAR et al., 2013).



Figura 2 – Porte arbustivo de *J. gossypiifolia*, horto de plantas medicinais da EMBRAPA-Amazônia oriental em Belém-PA, agosto de 2015



Fonte: Foto do autor.

No interior dos caules e ramos existe um látex (seiva) espesso, branco ou amarelo, que é possível ver-se quando estes são cortados. O caule, os ramos e as folhas apresentam pelos glandulares na sua superfície. As suas folhas são alternadas (Figura 3), opostas, caulinares ou ramais, podendo ter três ou cinco lóbulos. O seu comprimento e largura pode variar entre 3 a 13 por 3 a 19 cm, apresentam uma cor avermelhada ou arroxeadada quando jovens e verdes quando totalmente desenvolvidas. As flores são pequenas (Figura 3), vermelhas ou roxas, nascem a diversos níveis da haste da planta e elevam-se à mesma altura, formando sucessivamente vários ramos que saem em posição oposta, corimbo cimeira terminal. As pétalas podem também ser de tonalidade rosa avermelhada ou roxa e com 0,5 cm de comprimento e 0,3 cm de largura. Os frutos são oblongos (Figura 3), cápsulas de três lóbulos, verdes quando jovens e castanhos-amarelados na maturidade. No seu interior encontram-se três sementes de tonalidades cinza, castanha ou cinza-vermelho de 0,6 cm de comprimento, 0,3 centímetros de largura e 0,2 cm de espessura (KUMAR et al., 2012).

Figura 3 – Folhas, flores e frutos de *J. gossypiifolia*, horto de plantas medicinais da EMBRAPA-Amazônia oriental em Belém-PA, agosto de 2015



Fonte: Foto do autor.

A floração, foliação e frutificação da planta inicia-se na época das chuvas, mas pode continuar durante todo o ano caso a umidade do solo permaneça alta. Esta pode produzir sementes por autofecundação ou polinização cruzada, e muitos insetos, entre os quais as abelhas, visitam as suas flores para recolher o néctar (SCHMELZER et al., 2008).

### 2.3.2 Aspectos químicos

As plantas sintetizam uma ampla e diversificada variedade de compostos orgânicos. Alguns destes compostos estão presentes em todas as plantas e executam funções metabólicas, associadas à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento das mesmas. Estes representam os metabolitos primários, entre os quais, lipídios acilados, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos (DEWICK, 2002; CROTEAU et al., 2000; CROZIER et al., 2006).

Existem outros compostos fitoquímicos, estruturalmente diferentes, muitos dos quais se encontram apenas numa espécie ou gênero, ou estão distintamente distribuídos em grupos taxonomicamente relacionados, designados metabolitos secundários. A síntese dos mesmos pode ser ativada unicamente durante a fase de crescimento e desenvolvimento, em épocas sazonais específicas, sob condições de

disponibilidade de nutrientes ou estresse, entre outros fatores. A sua função está relacionada com a proteção das plantas contra predadores, como insetos, fungos e bactérias, repelência, em função da sua natureza tóxica, atração de polinizadores e animais de dispersão de sementes, protetores contra radiação ultravioleta (UV) e para a comunicação das plantas com outros organismos (MAZID et al., 2011; VERPOORTE et al., 2002; CROZIER et al., 2006).

Alguns dos principais metabólitos secundários detectados na espécie *J. gossypifolia* são ácidos graxos, açúcares, alcalóides, aminoácidos, esteróides, cumarinas, lignanas, flavonóides, proteínas, saponinas, taninos e terpenos. Estes compostos são alvo de pesquisas de extrema relevância, dado que têm importantes aplicações comerciais como corantes, fibras, colas, ceras, óleos, agentes aromatizantes, perfumes, bem como fontes de potenciais fármacos naturais, antibióticos, inseticidas e herbicidas (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

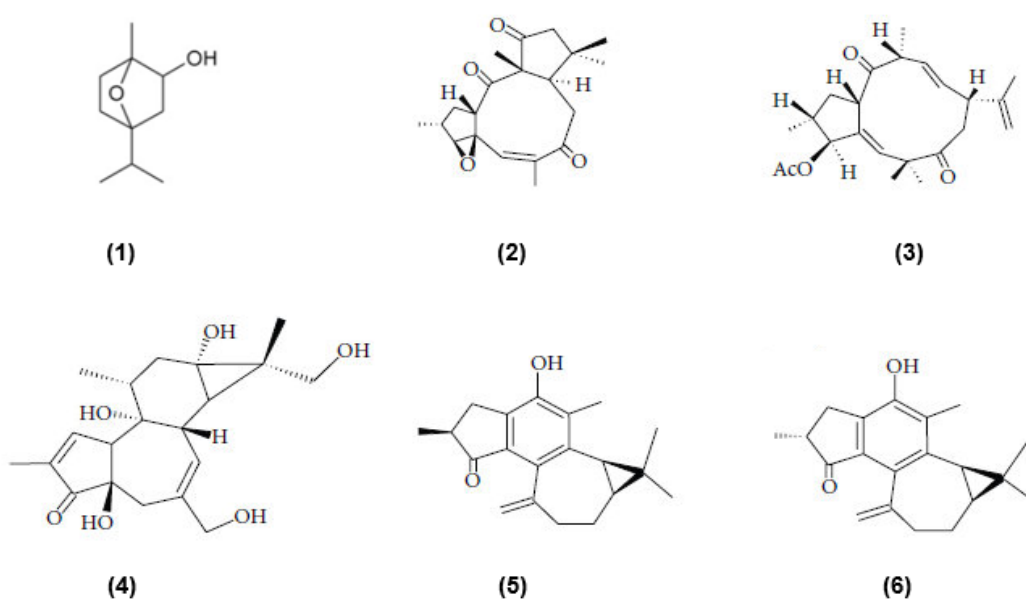
A extração dos constituintes químicos de *J. gossypifolia* tem sido realizada por diferentes métodos e com os mais diversos solventes, de acordo com a finalidade do estudo. O principal solvente extrator empregado é o etanol, entretanto, outros trabalhos utilizam misturas de solventes, tais como: acetato de etila e água destilada; água, etanol e acetato de etila; clorofórmio e metanol; etanol e acetona; éter de petróleo e clorofórmio e ainda hexano e etanol (MARIZ, 2007).

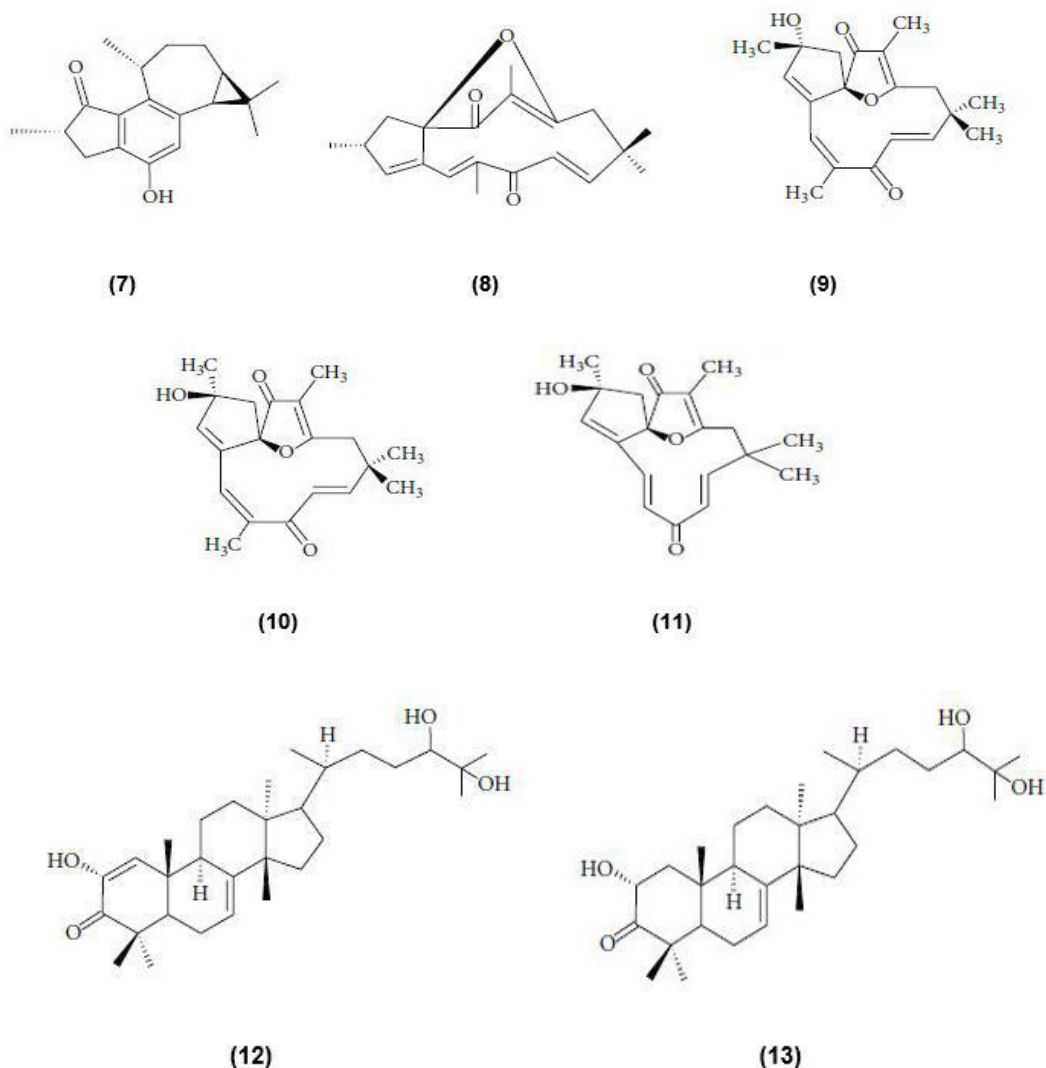
Contudo, os principais compostos bioativos desta espécie não estão totalmente elucidados, uma vez que são insuficientes as pesquisas que efetuam o isolamento, determinam a atividade biológica e utilizam água como solvente de extração dos constituintes de *J. gossypifolia*, porém quando esta planta é usada para fins medicinais é normalmente na forma de infusão ou decocção. Pouco se sabe sobre a constituição deste tipo de extrato, o que se traduz em um limitado número de compostos polares identificados, como flavonoides, taninos e glicídios. Normalmente utilizam solventes ou misturas de solventes com características não polares, que contribui para a caracterização de compostos não polares, como os lignoides e terpenos. Este último encontra-se majoritariamente no gênero *Jatropha*, sendo possível isolar mono, di e triterpenos nesta espécie (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Os compostos, à seguir, foram isolados a partir do extrato de diferentes partes da planta em diclorometano: metanol (1:1, v/v) por cromatografia em coluna de sílica em gel.

Relativamente ao rizoma foi isolado o monoterpene 1,4-epoxi-p-mentano-2-ol **(1)**. Foram isolados diterpenos de diversas partes de *J. gossypifolia*, entre estes, o citlaltiriona **(2)**, que despertou interesse para a semi-síntese de agentes anticancerígenos, e jatrafenona **(3)**, que apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* com a penicilina como referência. Outro diterpeno, 12-deoxi-16-hidroxi-forbol (DHPB) **(4)**, foi isolado a partir do extrato semente por cromatografia em contracorrente e possui atividade como promotor de tumores. A partir do extrato das raízes, foi possível isolar Jatrolona (Jatropholone) A e B **(5 e 6)**, faladona (Falodone) **(7)**, jatrafono (jatrophone) **(8)**, e os seus derivados naturais, 2 $\alpha$ -hidroxijatrafono **(9)**, 2 $\beta$ -hidroxijatrafono **(10)** e 2 $\beta$ -hidroxi-5,6-isojatrafono **(11)**, que apresentam atividade citotóxica, antiproliferativa de células leucêmicas e tumorais e atividade antibacteriana *in vitro*. A partir do extrato etanólico das folhas por procedimentos de partição sucessivos, cromatografia de sílica em gel e cromatografia em camada delgada (CCD), foram isolados os triterpenos (2 $\alpha$ , 13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 20S)-2,24,25-trihidroxilano-7-en-3-one **(12)** e (13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 20S)-2,24,25-trihidroxilano-1,7-dien-3-one **(13)** (Figura 4) (FÉLIX-SILVA et al., 2014; DEVAPPA et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

Figura 4 – Terpenos isolados na espécie *J. gossypifolia*

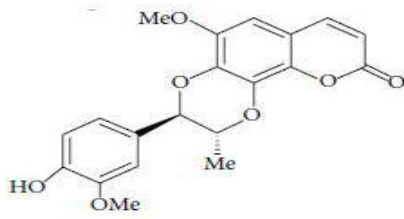




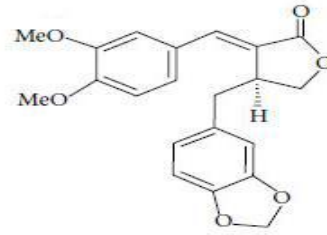
Legenda: **1**) 1,4-Epoxi-p-mentano-2-ol, **2**) Citlaltiriona, **3**) Jatrofenona, **4**) 12-deoxi-16-hidroxi-forbol (DHPB), **5**) Jatrofolona (jatropholone) A, **6**) Jatrofolona (jatropholone) B, **7**) Faladona (falodone), **8**) Jatrofeno (jatrophone), **9**) 2 $\alpha$ -Hidroxi-jatrofeno, **10**) 2 $\beta$ -Hidroxi-jatrofeno, **11**) 2 $\beta$ -Hidroxi-5,6-isojatrofeno, **12**) (2 $\alpha$ , 13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 20S)-2,24,25-Trihidroxilanost-7-en-3-one, **13**) (13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 20S)-2,24,25-Trihidroxilanosta-1,7-dien-3-one.

Fonte: (FÉLIX-SILVA et al., 2014; DEVAPPA et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

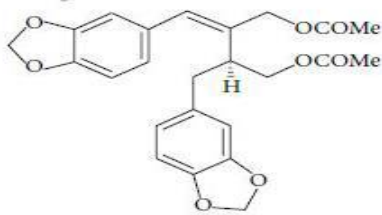
Outra classe encontrada e muito importante foi a dos lignoides, uma vez que apresentam muitas estruturas isoladas e identificadas, tais como, lignanas e as coumarino-lignanas (lignanas não convencionais). Entre os quais, Propacina (**14**), gossipifana (**15**), gossipilina (**16**), jatrodieno (**17**), gossipidieno (**18**), cleomiscosina A (**19**), isogadaina (**20**) e prasantalina (prasanthaline) (**21**), gadaina (**22**) e jatrofana (jatrophan) (**23**) (Figura 5) (FÉLIX-SILVA et al., 2014; SABANDAR et al., 2013).

Figura 5 – Lignoides isolados na espécie *J. gossypiifolia*

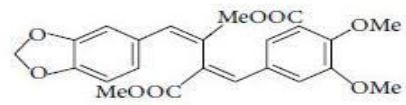
(14)



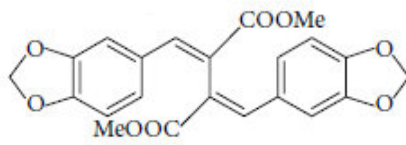
(15)



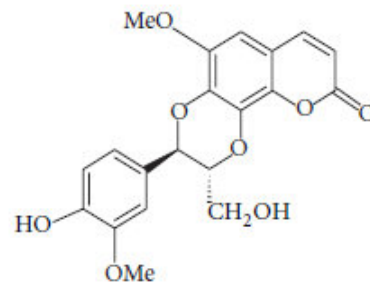
(16)



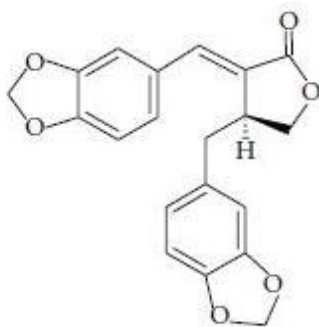
(17)



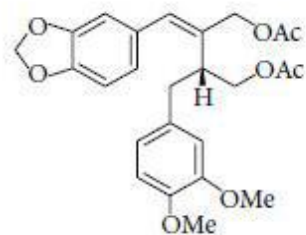
(18)



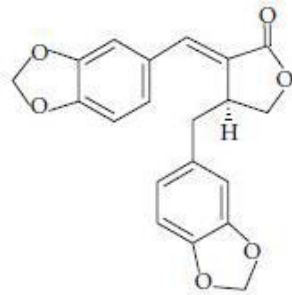
(19)



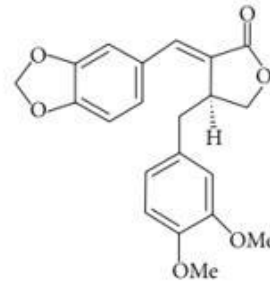
(20)



(21)



(22)



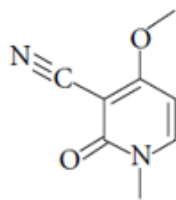
(23)

Legenda: **14)** Propacina, **15)** Gossipifana, **16)** Gossipilina, **17)** Jatrodieno, **18)** Jatrodieno, **19)** Cleomiscosina A, **20)** Isogadaina, **21)** Prasantalina (Prasanthaline), **22)** Gadaina, **23)** Jatrofana (Jatrophan).

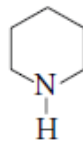
Fonte: (FÉLIX-SILVA et al., 2014; SABANDAR et al., 2013).

Também foram detectados e isolados alcaloides, como ricinina (**24**), piperidina (**25**) e jatrofina (**26**). De diferentes extratos etanólicos das folhas, foi realizada a identificação dos flavonoides apigenina (**27**), vitexina (**28**) e isovitexina (**29**), a quem são atribuídos a atividade antioxidante (Figura 6) (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

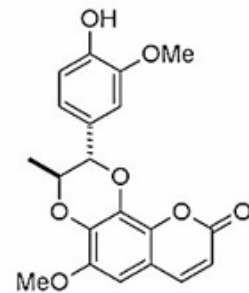
Figura 6 – Alcaloides e flavonoides isolados na espécie *J. gossypiifolia*



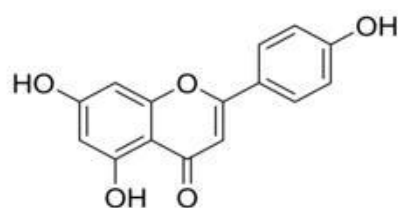
(24)



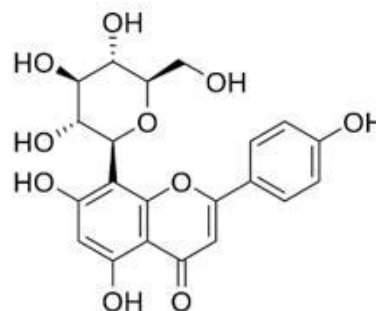
(25)



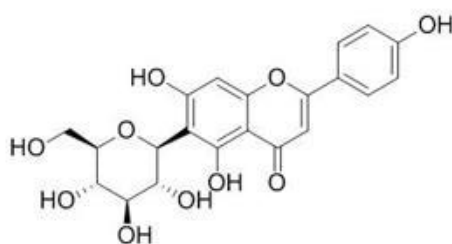
(26)



(27)



(28)

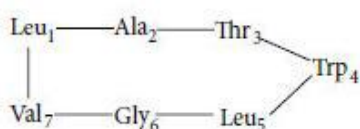


(29)

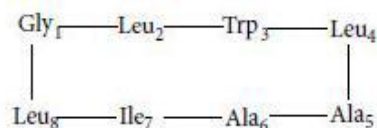
Legenda: **24)** Ricinina, **25)** Piperidina, **26)** Jatrofina, **27)** Apigenina, **28)** Vitexina, **29)** Isovitexina.  
 Fonte: (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

No emprego do látex foram isoladas proteínas, peptídeos cíclicos, como ciclogossina A e B (30 e 31) (Figura 7). No extrato éter de petróleo das sementes foram identificados ácidos graxos, tais como, ácido caprílico, ácido láurico, ácido lignocérico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido ricinoleico, ácido palmitoleico, ácido 12-hidróxi-cis-octadeca-9-enóico (FÉLIX-SILVA et al., 2014; SABANDAR et al., 2013; SCHMELZER et al., 2008).

Figura 7 – Peptídeos cíclicos isolados na espécie *J. gossypifolia*



(30)



(31)

Legenda: **30)** Ciclogossina A, **31)** Ciclogossina B.  
 Fonte: (FÉLIX-SILVA et al., 2014; SABANDAR et al., 2013).



### 2.3.3 Etnofarmacologia

A utilização de plantas na terapêutica, enquanto elemento cultural de um povo é importante fonte preliminar de informação na pesquisa com vistas ao desenvolvimento e promoção do uso racional de fitoterápicos (MARIZ, 2007).

As espécies do gênero *Jatropha* vêm sendo utilizadas popularmente, ao longo dos anos, no tratamento de diversos males e algumas das propriedades medicinais de *J. gossypifolia* são comuns a outras espécies do gênero e são atribuídas a toda planta ou a partes específicas da mesma, como folhas, caules, raízes e sementes. São preparadas através de infusão, decocção e maceração, podendo ser utilizadas de formas distintas como oral, tópica, ou banhos (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Os usos populares da planta de *J. gossypifolia* podem ser como anti-hemorrágica, antipirético, diurético, anticonvulsivantes, antisséptico, hepatoprotetor, e no tratamento da diabetes e anemias. Esta planta também é utilizada no tratamento de disfonias, eczemas, abscessos, lepra, artrite, otite, alopecia, regulador do fluxo menstrual, obstruções do trato gastrointestinal e reumatismos (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Outros usos dessa espécie vegetal, além dos terapêuticos, são citados na literatura, como a utilização ornamental da planta devido à coloração arroxeada das folhas. Também são comuns os relatos de que preparados de *J. gossypifolia* seriam úteis em rituais religiosos contra os maus espíritos ou para a população em geral com finalidades místicas diversas, como a crença de que seria uma das plantas que protegem caçadores e cães de caça de venenos animais. Ainda destaca-se o cultivo desta planta em sequência para a construção de cercas vivas contra incêndios e relâmpagos e a fixação de dunas. Outros benefícios para o ser humano seriam o uso, por algumas populações, como inseticida, o emprego do óleo da semente tanto na preparação de tintas e sabões quanto como lubrificante e combustível para motores tipo Diesel e ainda, na iluminação (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2004).

### 2.3.4 Atividades farmacológicas

A despeito do reconhecido potencial tóxico de diversas espécies de *Jatropha*, vários autores têm demonstrado ações terapêuticas de substâncias químicas

extraídas desta planta. Como a jatrofona, principal constituinte químico de *J. gossypifolia*, um diterpeno extraído que possui atividade relaxante de musculatura lisa e cardíaca e capacidade de inibir a ligação do glutamato ao seu receptor sugerindo ação antinociceptiva (CALIXTO; SANTANA, 1987; SILVA et al., 1995).

Há propriedades terapêuticas relatadas para a *J. gossypifolia*, como moderado efeito sedativo e anticonvulsivante; efeito analgésico, relaxante da musculatura lisa vascular e não vascular e como agente hipotensor (ABREU et al., 2003).

O efeito hipotensor do extrato etanólico (EE) de *J. gossypifolia* foi demonstrado por Abreu e colaboradores (2003) com a redução significativa da pressão arterial sistólica em ratos normotensos e não anestesiados. Tiveram percentuais de inibição de 10,9 % e 13,3 % para os grupos tratados, respectivamente, com doses de 125 mg/kg (v.o.) e 250 mg/kg (v.o.) do extrato. Esse efeito foi atribuído a uma ação vasorelaxante dependente da dose, demonstrado experimentalmente, pelo extrato em produzir relaxamento em preparação isolada de anéis de artéria mesentérica (sem endotélio), pré-contraídas com norepinefrina ou cloreto de cálcio, quanto pela propriedade de inibir, de forma não-competitiva e dose dependente, a contração vascular induzida pelos referidos agonistas. Os experimentos realizados permitem supor que o mecanismo de ação esteja relacionado com antagonismo não-competitivo em receptores  $\alpha_1$  ou em outros mecanismos pós- receptores e ainda com a inibição do influxo de cálcio através da membrana celular.

Um experimento utilizando tiras de útero de ratos, foi realizado para testar a contração da musculatura lisa uterina evocada por cálcio, as quais foram incubadas com extrato hidroetanólico (EHE) e frações clorofórmica (FC) e aquosa (FA) de partes aéreas de *J. gossypifolia*. O EHE reduziu as contrações máximas em 27,3% e 80,3% com doses de 0,5 e 1,0 mg / ml, respectivamente. A FC inibiu a responsividade do músculo uterino ao cálcio, fazendo com que a resposta contrátil máxima fosse reduzida em 27,4% e 45,1% com doses de 0,25 mg/ml e 0,5 mg/ml, respectivamente. Por outro lado, este parâmetro foi apenas ligeiramente reduzido na presença da FA. Estes dados corroboram com estudos anteriores que demonstram a inibição da contração induzida por cálcio ou norepinefrina, promovendo o relaxamento dos anéis aórticos de ratos previamente tratados. Tal fato, pode ser atribuído, principalmente a presença de diterpenos e triterpenos, entre eles a jatrofona e seus derivados  $2\alpha$ -hidroxijatrofona e  $2\beta$ -hidroxijatrofona que agem por

mecanismos distintos, comprometendo os receptores de acetilcolina os quais dificultam a despolarização da célula, ativando os canais de potássio associada com o bloqueio dos canais de cálcio e inibindo as vias mediadas pela proteína C-quinase (PKC). Outros metabólitos secundários são responsáveis pelo efeito relaxante sobre o músculo liso do útero, comprometendo o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependente de voltagem. O teste considerou que o EHE e a FC causaram uma concentração dependente e efeito inibidor não competitivo na contração induzida por cálcio em preparações de músculo uterino isolado de ratos, contribuindo para validar a planta como espasmolítica e tocolítica, porém mais estudos são necessários para identificar os compostos bioativos (PAES et al., 2012).

Silva e colaboradores (2011) em estudo com as partes aéreas de *J. gossypifolia* investigaram a atividade antiespasmódica, através da ação da planta na velocidade do trânsito intestinal e atividade contrátil induzida por acetilcolina (Ach) e cálcio no jejuno isolado de ratos. Doses orais de extrato hidroetanólico (EHE) da planta (500, 1000 e 2000 mg/Kg) causaram redução na velocidade do trânsito do intestino delgado, com inibição da motilidade 37,6 a 52,7 e 57,1% quando comparado ao grupo controle, efeito este semelhante à droga padrão atropina (1mg/Kg) de 39,5%. Para investigar a redução da velocidade do trânsito intestinal causado pelo EHE, foi avaliada a contração do jejuno isolado de rato induzida pela Ach e cálcio com redução da resposta máxima de contração para a Ach, usando EHE (0,5; 1 e 2 mg/ml) em 12,6, 29,9 e 49,3%, sugerindo a presença de um ou mais compostos antiespasmódicos, que suprimiram as respostas para a Ach através de ambos mecanismos competitivo e não competitivo, manifestando uma possível atividade anticolinérgica muscarínica. Para examinar o comportamento dos princípios ativos presentes no EHE, as frações aquosa (FA) e clorofórmica (FC) também foram estudadas em preparações de jejuno isolado de rato com contrações induzidas por Ach. A FA reduziu a contração máxima através de um fator de 3 em relação ao controle, indicando antagonismo competitivo dos receptores muscarínicos, com atividade anticolinérgica. A FC 0,1 e 0,5 mg/ml reduziu a resposta máxima para Ach em 14,7 e 37,5, respectivamente, sugerindo uma possível atividade anticolinérgica muscarínica e a presença de outro componente antiespasmódico. A fim de elucidar o possível mecanismo do efeito antiespasmódico da FC, investigou-se a interferência da FC com os canais para cálcio operado por voltagem, tratando previamente o jejuno com solução despolarizada de tyroide's e

após contraído com concentrações crescentes de cloreto de cálcio. Na presença da FC 0,05 e 1mg/ml, a resposta máxima foi reduzida, de maneira dependente da concentração até 28,7% e 52,9%, comparado ao controle, respectivamente, indicando que o efeito antiespasmódico, é possivelmente mediado por substâncias que podem alterar a mobilização de cálcio para dentro das células e que são responsáveis pelo efeito não competitivo obtido no teste com a Ach. Estas propriedades, podem explicar o uso do gênero *Jatropha* como agente antidiarreico na medicina tradicional, seguido de mais estudos para melhor entender os mecanismos envolvidos e a identificação dos compostos ativos responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados.

A *J. gossypifolia*, está incluída na lista nacional de plantas medicinais de interesse ao sistema público de saúde Brasileiro (*RENISUS*), sendo utilizada popularmente, como antiinflamatório. Félix-Silva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antiinflamatória local (via tópica) e sistêmica (via oral) pelo método de edema de pata em ratos induzido pela carragenina, bem como a caracterização fitoquímica para o extrato aquoso das folhas desta espécie. O *screening* revelou a presença de alcaloides, gomas, fenóis, resinas, saponinas, compostos de enxofre e flavonoides-C-glicosídeos, como sendo, provavelmente, o principal composto no extrato. A avaliação sistêmica e local, após administração do extrato, mostrou-se eficaz, provocando a inibição do edema em 16,98%, 55,29%, 51,47%, 0%, 37,79% e 54,10% para os animais tratados com doses de 50 mg/Kg (v.o), 100 mg/Kg (v.o), 200 mg/Kg (v.o), 1% (v.t), 2% (v.t) e 3% (v.t), respectivamente. Em ambas as vias testadas, o pico de inibição do edema ocorreu, em torno da 3ª hora após a injeção de carragenina, o que corresponde ao período em que há, principalmente, a produção de prostaglandinas, sugerindo um efeito inibitório sobre a ação da cicloxigenase. A menor atividade antiedematogênica tópica, pode estar relacionada com uma baixa absorção ou permeabilidade dos constituintes do extrato incorporados aos lipogéis, quando usados na superfície plantar dos animais, porém foi por esta via que ocorreu a melhor ação inibitória do extrato ( $\approx$  50%), na dose de 5%, quando comparado ao padrão anti-inflamatório indometacina. Os resultados obtidos com o este experimento, revelaram o potencial antiinflamatório do extrato aquoso das folhas de *J. gossypifolia*, que pode servir de fonte para novos fármacos a base de plantas anti-inflamatórias, agindo por um mecanismo ainda desconhecido, mas que parcialmente pode ser indicada uma ação sobre mediadores eicosanóides,

considerando o mecanismo inflamatório da carragenina. Isto justifica parte dos seus principais usos populares na medicina tradicional, ressaltando também a importância de sua inclusão no *RENISUS*.

## 2.4 RADICAIS LIVRES

Radicais livres podem ser basicamente definidos como quaisquer espécies capazes de existir independentemente de conter um ou mais elétrons desemparelhados (equações 1 e 2) sendo constantemente produzidos durante o funcionamento celular normal em organismos aeróbios e, quando em baixas concentrações, são benéficos para as células, estando integrados em diversos processos fisiológicos de sinalização e regulação. São moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas e sua presença é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (PETISCA, 2008; HALLIWELL, 2011).

Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. A presença de um ou mais elétrons desemparelhados geralmente faz com que radicais livres sejam fracamente atraídos a um campo magnético (isto é, são paramagnéticos), o que faz com que algumas vezes sejam altamente reativos, ainda que a reatividade química dos radicais varie bastante. Radicais são formados pela perda de um único elétron de uma espécie não radicalar (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):



ou



Radicaís também podem ser formados por fissão homolítica, quando uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com uma parte da molécula quebrada, como mostra a equação 3:



Rigorosamente falando, a molécula de oxigênio diatômica pode ser também definida como um radical livre, já que ela possui dois elétrons desemparelhados. Uma das reações mais importantes do oxigênio é a sua redução à água, uma reação cujo potencial formal é de +0,85 V vs. EPH em pH 7. Embora esta reação seja termodinamicamente favorável, as reduções de oxigênio envolvendo a troca de 4 elétrons são muito raras. A redução de oxigênio procede normalmente via etapas de 1 ou 2 elétrons e podem apenas ocorrer desde que uma primeira reação de 1 elétron tenha ocorrido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O oxigênio reage fracamente com outros radicais porque a transferência de elétron ao oxigênio é restringida pelo princípio de Pauli. Uma vez que 2 elétrons desemparelhados estejam localizados em dois diferentes orbitais  $\sigma$  e tenham spins paralelos, o oxigênio estará limitado a aceitar um elétron de cada vez (alguns catalisadores são capazes de quebrar esta restrição de spin). Estes fatores determinam a reatividade química e bioquímica do oxigênio. Isso é algo crucial na biologia porque o consumo de oxigênio é regulado por sua reatividade cinética. Com isso, o oxigênio pode coexistir dentro da célula com vários agentes redutores, sem, no entanto, reagir rapidamente com eles, o que previne as reações de oxigênio randômicas que destruiriam um grande número de componentes celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

#### 2.4.1 Oxigênio e seus derivados

O oxigênio também pode existir em mais formas reativas, isto é, duas formas de oxigênio singlete, o radical superóxido e o íon peróxido. O radical superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ , é formado quando um único elétron é adicionado a uma molécula de  $O_2$  (equação 4), e o íon peróxido,  $O_2^{2-}$ , é formado pela adição de 2 elétrons ao  $O_2$  (equação 5). O  $O_2^{2-}$  não é um radical e é facilmente reduzido a duas moléculas de óxido,  $2O^{2-}$ . A adição de 4 elétrons leva a formação de água (equação 6) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



O radical superóxido pertence às ERO. Este termo compreende não apenas radicais de oxigênio, mas também alguns derivados de oxigênio não-radicalares, como  $H_2O_2$ , HOCl e  $O_3$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A tabela 1 mostra as assim chamadas ERO.

Tabela 1 – Exemplos de ERO radicalares e não-radicalares

Radicais	Não radicais
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$
Hidroxila, $HO^{\cdot}$	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxila, $ROO^{\cdot}$	Ozônio, $O_3$
Alcoxila, $RO^{\cdot}$	Peróxidos orgânicos, ROOH
Hidroperoxila, $HO_2^{\cdot}$	

Fonte: Adaptado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Vários modelos têm sido usados e desenvolvidos na pesquisa de ERO. Métodos envolvendo a medida de DNA e/ou danos a proteínas expostas a radicais livres, ensaios para a determinação de peróxido de hidrogênio, radical superóxido e oxigênio singlete, ressonância de spin eletrônico (ESR), *spin trapping*, radiólise de pulso, método de degradação de desoxirribose, entre outros, têm sido empregados com o objetivo de clarificar o papel das ERO no estresse oxidativo e em outras doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na prática, a única técnica que consegue observar radicais livres diretamente é ESR. A ESR é uma técnica espectroscópica que detecta elétrons desemparelhados e, assim, é específica para radicais livres.

A maioria dos radicais livres, em sistemas biológicos possui elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio, sendo derivados de ERO e distribuindo-se entre os grupos de radicais hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), mas os derivados de nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio, ERN) também existem e possuem um importante papel no estresse oxidativo, que é definido como uma condição de alta atividade pró-oxidante devido aos radicais livres. Os radicais livres mais reativos e danosos são o radical hidroxila  $HO^{\cdot}$ , e o ânion peroxinitrato,  $ONOO^-$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

## 2.4.2 Principais espécies reativas derivadas de O<sub>2</sub> (ERO)

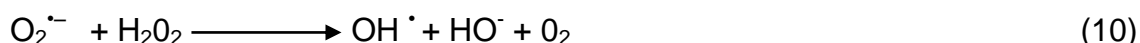
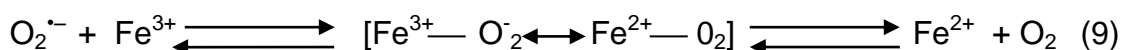
### 2.4.2.1 Radical Ânion Superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

O radical superóxido é gerado continuamente por diversos processos celulares (na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como a xantina oxidase e NADPH oxidase) ou pela redução monoelétrica de oxigênio. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (equação 7). Ele também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO<sup>•</sup>), é mais reativo (equação 8) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).



O superóxido é menos reativo que o radical hidroxila e não reage com a maioria das moléculas biológicas sendo que, dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação pelo radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é a cisteína. Sua reatividade com não-radicais é influenciado pelo solvente e pelo pH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

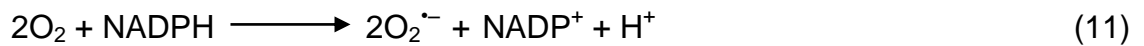
Em certos processos químicos importantes no contexto biológico, a participação do ânion radical superóxido é fundamental. O principal deles é o auxílio na produção de radicais hidroxila (<sup>•</sup>OH), através da redução de quelatos de Fe (III) (equação 9), formando Fe(II). Assim, o <sup>•</sup>OH pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (VASCONCELOS et al., 2007). (Equação 10).



Além disso, o radical superóxido possui a habilidade de liberar Fe (II) das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente (VASCONCELOS et al., 2007).



Apesar dos efeitos danosos, o radical  $O_2^{\cdot-}$ , tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo estaria desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Para combater corpos estranhos, o radical  $O_2^{\cdot-}$  ocorre de forma espontânea e é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório e na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron de  $O_2$  com gasto de uma molécula de NADPH (equação 11). Além disso, também pode ser produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e ciclooxigenases (FERREIRA et al., 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).



O radical formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferrosulfurosas das bactérias, porém gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos (VASCONCELOS et al., 2007).

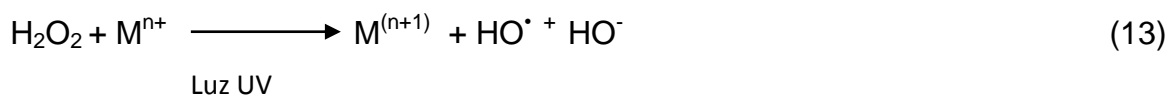
O ânion radical superóxido ainda funciona como sinalizador molecular através da sua capacidade de oxidar grupos  $-SH$  em ligações dissulfeto (equação 12), podendo ativar e desativar enzimas que contenham metionina (VALKO et al., 2007)



#### 2.4.2.1 Radical Hidroxil ( $HO^{\cdot}$ )

O radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ), teoricamente, é o mais reativo das ERO, com um curto tempo de meia-vida, de aproximadamente  $10^{-9}$  s. Ele pode oxidar qualquer molécula biológica. Assim, quando produzido, *in vivo*, dificilmente pode ser sequestrado e uma vez formado, o organismo não dispõe de mecanismo de defesa para combatê-lo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

As principais vias de formação do radical HO<sup>•</sup> são pela reação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com metais de transição (equação 13) e pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (equação 14) (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).



A incidência de radiação no ultravioleta, raios gama e raios X podem produzir radicais hidroxil nas células da pele. O ataque intensivo e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos (VALKO et al., 2007).

Para se estabilizar, o radical HO<sup>•</sup> promove, principalmente, a abstração de hidrogênio e/ou a adição a insaturações de moléculas próximas. No DNA, este radical pode modificar tanto as bases nitrogenadas (púricas e pirimídicas) quanto a desoxirribose sendo que quando ocorre o ataque no açúcar, quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. Além disso, o HO<sup>•</sup> pode reagir com aminoácidos e proteínas gerando clivagens de ligações, o que pode ter como conseqüência a perda da atividade enzimática (inativação de várias proteínas) dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares também são susceptíveis ao ataque do radical hidroxil, dando início a peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

#### 2.4.2.2 Radicais Peroxil (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e alcoxil (RO<sup>•</sup>)

Os radicais peroxil e alcoxil são bons agentes oxidantes, tendo valores de E<sup>o</sup> altamente positivos. O radical peroxil mais simples é o radical hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), forma protonada do radical superóxido. Esses radicais (RO<sub>2</sub><sup>•</sup> e RO<sup>•</sup>) podem abstrair um átomo de hidrogênio de outras moléculas, uma reação importante na peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A decomposição de peróxidos pelo aquecimento ou pela catálise de metais de transição pode gerar tanto o radical peroxila como o alcoxila. No organismo esses

radicais são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica. Os radicais peroxil e alcoxil aromáticos tendem a ser menos reativos que os alifáticos, uma vez que os elétrons se deslocam no anel benzênico (VASCONCELOS et al., 2007).

## 2.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Atualmente existe um grande interesse no estudo da atividade antioxidante devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo humano (RIZEA et al., 2010).

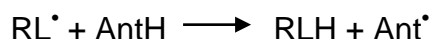
Antioxidante é qualquer substância que tem a capacidade de reduzir eficazmente um composto pró-oxidante (que induz danos oxidativos), inibindo ou retardando a oxidação, com formação de produtos mais estáveis e com um nível de toxicidade baixo ou nulo, mesmo quando presente numa pequena concentração comparativamente a do substrato oxidável (VALENTÃO, 2002; BORA et al., 2005; APAK et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008).

Para que haja um funcionamento normal do organismo torna-se essencial a existência de um equilíbrio entre a produção e a eliminação dos radicais, ou seja, a capacidade de defesa antioxidante. Se uma célula tender para a perda desse equilíbrio, no sentido da formação de radicais livres em excesso, o organismo entra em estresse oxidativo, o que pode levar a diversas consequências negativas para o funcionamento celular e o despertar de variadas patologias (FERREIRA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008; DUDONNÉ et al., 2009).

Os mecanismos de defesa contra radicais livres induzidos pelo estresse oxidativo envolvem: mecanismos preventivos mecanismos de reparo, defesas físicas e as defesas antioxidantes. Existem três tipos de compostos, os quais podem diretamente suprimir a formação de radicais livres, que são: os antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), os “varredores” de radicais livres e os quelantes (RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes promovem a supressão da formação de radicais livres, através de reação direta com estes (Figura 8) para formar novos radicais inativos ou quelar metais de transição, cataliticamente ativos para formar complexos inativos (VALKO et al., 2007).

Figura 8 – Reação direta dos antioxidantes (Ant) com os radicais livres (RL)



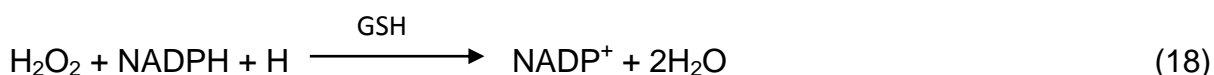
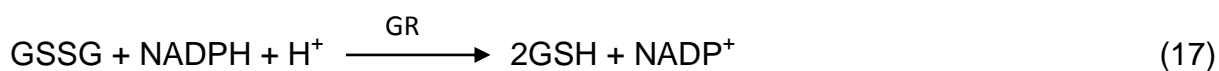
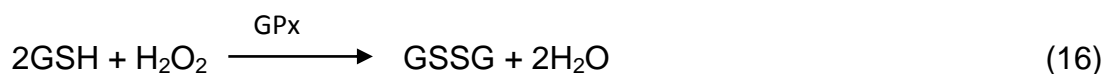
Fonte: Adaptado (VALKO et al., 2007).

Antioxidantes enzimáticos são constituídos por sistemas enzimáticos capazes de bloquear o início da oxidação graças à existência de metais com múltiplas valências no seu centro ativo, que impedem que elas próprias se tornem espécies radicalares. Dentro das enzimas antioxidantes, o primeiro sistema é composto pela superóxido dismutase (SOD), o segundo pela catalase (CAT) e o terceiro é formado pela glutathiona (GSH) em conjunto com duas enzimas: glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (DUDONNÉ et al., 2009).

A SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , na presença de próton  $\text{H}^+$ . A CAT, uma hemeoproteína citoplasmática, catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (equação 15).



A GPx catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  pela conversão da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG) e logo em seguida a GSH é regenerada (equações 16-18) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).



Os antioxidantes não enzimáticos incluem, entre outros, compostos como a glutathiona (GSH), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipoico, os carotenoides e os compostos fenólicos. Estes compostos interagem com as espécies radicalares sendo consumidos durante a reação (MOREIRA;

MANCINI-FILHO, 2004; ANGELO; JORGE, 2007; FERREIRA; ABREU, 2007; AFONSO, 2010).

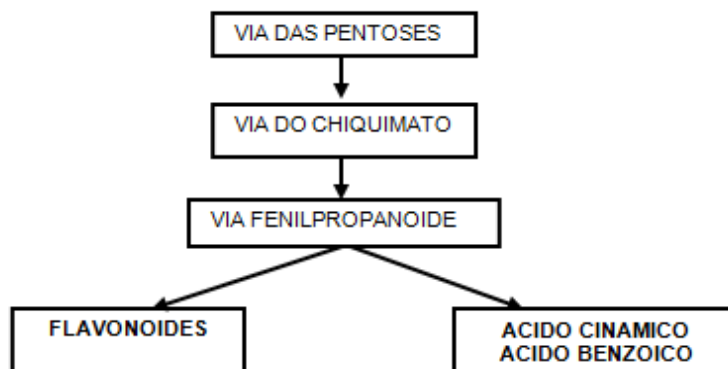
A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH), é um importante antioxidante não enzimático que desempenha várias funções no organismo, como por exemplo, no metabolismo, transporte, catálise, manutenção de proteínas, etc. Como composto redox, a glutathiona atua como um “varredor” de radicais livres e como um doador de elétrons no ciclo redox da glutathiona peroxidase e da glutathiona redutase que catalisa a redução de peróxidos. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO et al., 2005; VALKO et al., 2007).

O ácido ascórbico e GSH são os mais importantes antioxidantes solúveis em meio aquoso encontrados nos organismos vivos. A atividade antioxidante da glutathiona é especialmente importante no cérebro, que contém níveis relativamente baixos de SOD, catalase e glutathiona peroxidase. Neste caso, a alteração do metabolismo de GSH pode contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (VALKO et al., 2007).

### **2.5.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário das plantas e são essenciais para o seu crescimento, pigmentação e reprodução, atuando igualmente como agentes antipatogênicos e de resposta a condições de estresse como, por exemplo, a existência de ferimentos ou a exposição intensa à radiação ultravioleta e agem como mecanismo de defesa para tornar os tecidos vegetais indesejáveis a potenciais predadores. São derivados de duas rotas sintéticas principais: via do chiquimato e via acetato (Figura 9) (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 9 – Via Biosintética da formação de fenólicos em plantas



Fonte: Adaptado (ANGELO; JORGE, 2007).

São membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgicas, antivirais, antiinflamatórias, vasodilatadoras e antioxidantes (DUDONNÉ et al., 2009).

O termo “fenólico” ou “polifenólico” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros) (FERREIRA; ABREU, 2007).

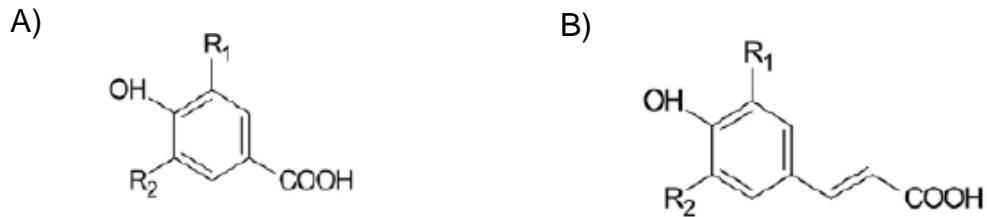
Os ácidos fenólicos existem em todas as plantas e alimentos vegetais. Eles são, em sua maioria, derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico. Porém, apenas uma pequena fração deles está na forma de ácido livre. A fração majoritária destes está ligada a ésteres, éteres, acetais ou proteínas, ligninas, flavonoides, glicoses e terpenos. Isso torna a determinação dos ácidos fenólicos complexa. Já os flavonoides ocorrem geralmente como derivados glicosilados em plantas (DUDONNÉ et al., 2009).

Além de vários vegetais, os compostos fenólicos são encontrados em sementes, frutos secos, grãos e especiarias, bem como nas bebidas, como vinho, chá, e cevada (PIETTA, 2000).

Os ácidos fenólicos são compostos que apresentam um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila. Estes podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo são os derivados do ácido hidroxibenzóico, que apresentam sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples

encontrados na natureza. Sua fórmula geral e denominação são representadas na Figura 10-A. O segundo grupo são os derivados do ácido hidroxicinâmico, que apresentam nove átomos de carbono, conforme mostra a Figura 10-B (C6-C3) (ANGELO; JORGE, 2007; APAK et al., 2007).

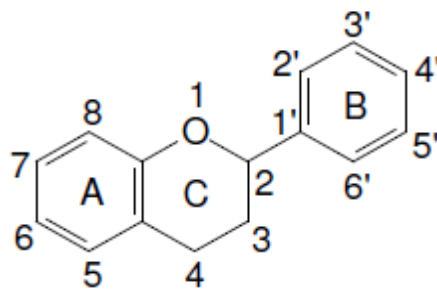
Figura 10 – Estrutura química dos ácidos fenólicos



Legenda: A) ácido hidroxibenzóico, B) ácido hidroxicinâmico.  
Fonte: Adaptado (ANGELO; JORGE, 2007).

A estrutura básica dos flavonoides é um esqueleto de 15 átomos de carbono composto do tipo C6-C3-C6, dispostos em dois anéis aromáticos, que são denominados A e B, conectados por uma ponte de três carbonos, que contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 11) (PIETTA, 2000).

Figura 11 – Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: (PIETTA, 2000).

Os flavonoides são classificados em grupos pelo nível de oxidação e no padrão de substituição no anel C, resultando em importantes classes como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis ou catequinas, isoflavonas e antocianidinas. Enquanto os compostos individuais, dentro de um mesmo grupo, são diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

Os flavonoides são, geralmente, hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente localizada na posição 3. Os glicosídeos mais comuns são L-ramnose, D-glicose, glucorhamnose, galactose, ou arabinose (APAK et al., 2007).

Apesar de serem agliconas, na natureza, os flavonoides encontram-se geralmente na forma glicosilada, graças à sua conjugação com açúcares. Possuem atividades fisiológicas e farmacológicas diversificadas, como estrogênica, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, antiinflamatória e a bem conhecida atividade antioxidante (APAK et al., 2007; DAS; ROSAZZA, 2006; FERREIRA; ABREU, 2007).

Alguns flavonoides têm demonstrado efeito benéfico em relação ao diabetes mellitus, agindo em várias vias, como na captação e regulação bioquímica da glicose e em sua tolerância, perfil lipídico, biossíntese do glicogênio e liberação de insulina. Sua atividade antioxidante está relacionada às características de sua molécula, agindo como anti-radicaís hidroxila, ânion superóxido e evitando a peroxidação lipídica (VOLPATO et al., 2008; CUNHA et al., 2010).

Os compostos fenólicos são classificados como potentes inibidores de danos oxidativos. Esta sua ação parece relacionar-se com a existência de um ou mais grupos hidroxílicos ligados aos seus anéis aromáticos. Assim, os compostos com maior número de grupos hidroxílicos e de ligações duplas são, normalmente, aqueles que apresentam um potencial antioxidante mais elevado. No entanto, essa mesma eficácia decresce com a presença dos açúcares aos quais estão ligados, visto que os glicosídios são muito menos bioativos, em comparação com as agliconas correspondentes (LANDETE, 2012; SALAH et al., 1995).

Os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos podem ser explicados por sua prevenção a peroxidação lipídica através da estabilização de radicais livres de iniciação lipídica tais como, superóxido, hidroxil e peroxil. Outro efeito, muito importante, é a quelação de íons metálicos, por exemplo, a complexação com íons ferro, suprimindo a reação de Fenton (APAK et al., 2007).

Muitos autores tem tentado elucidar a relação estrutura-atividade dos compostos fenólicos quanto ao poder antioxidante. No entanto, isso é uma tarefa difícil, já que o potencial antioxidante pode ser determinado por vários fatores, dos



quais a lipofilicidade, a quelação de ferro, e a limpeza de radicais livres são os mais importantes (PIETTA, 2000; SIMÕES et al., 2004).

Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos possuem propriedades antienvhecimento, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e inibitórias da proliferação celular, a maioria delas atribuídas às suas capacidades redutoras intrínsecas, podendo também oferecer uma proteção indireta por ativação de sistemas de defesa endógenos e por modelação de processos de sinalização celular, sendo cada vez mais considerados como eficazes agentes de proteção (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

### **2.5.2 Compostos terpênicos**

Os compostos terpênicos pertencem à classe dos metabólitos secundários em plantas, os quais não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Porém a ausência desses metabólitos afeta a sobrevivência, fecundidade ou estética do organismo a longo prazo. (MARIOT; BARBIERI, 2007; MUFFLER et al., 2011; EMERY et al., 2010).

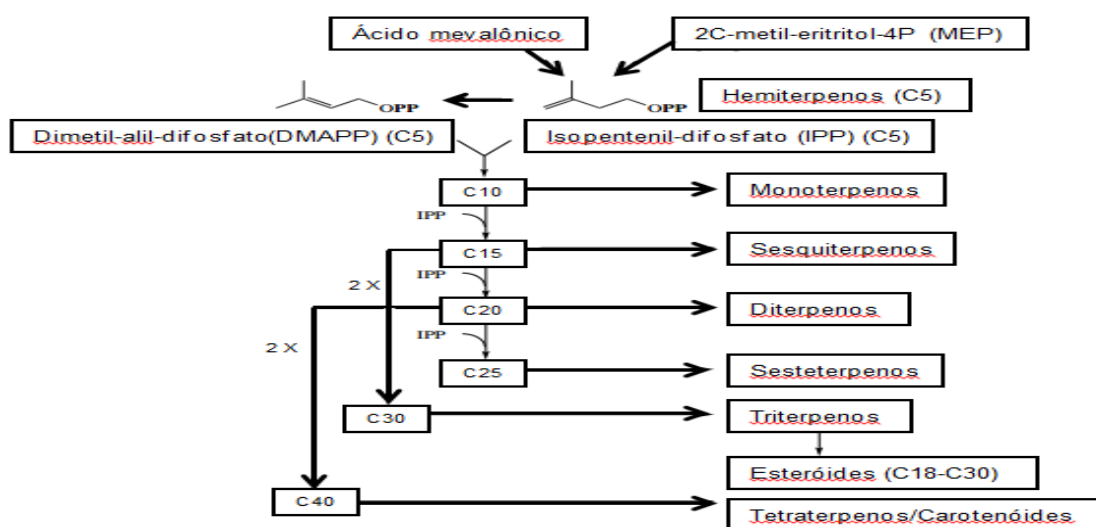
Existem mais de 30.000 terpenos conhecidos, produzidos por vegetais e outros organismos terrestres e marinhos, inclusive animais, fungos e bactérias. Alguns são hidrocarbonetos simples, outros contêm em sua estrutura átomos de oxigênio ou nitrogênio ligado às suas cadeias carbônicas. Muitos monoterpenos e sesquiterpenos, por serem compostos voláteis, compõem óleos essenciais, como por exemplo o mentol extraído da menta (RHOURLI-FRIH et al., 2013; MUFFLER et al., 2011; EMERY et al., 2010).

Os terpenos pertencem a uma classe de hidrocarbonetos e estão distribuídos no reino vegetal especialmente nas plantas que possuem clorofila abundante, constituindo assim a maior e mais diversificada classe de produtos naturais. Podem ocorrer também em animais (esqualeno e lanosterol) onde se manifestam com estrutura mais complexa (EBERHARD, 2006).

Durante algum tempo foram considerados empiricamente constituídos a partir de uma molécula de isopreno ( $C_5H_8$ ). O termo terpenos é frequentemente estendido para os terpenos, que são derivados oxigenados destes hidrocarbonetos (EBERHARD, 2006).

A formação biológica dos terpenos (Figura 12) ocorre pela combinação de duas moléculas de ácido acético gerando o ácido mevalônico ( $C_6H_{12}O_4$ ) e conversão do último para o pirofosfato de isopentenilo, que contém cinco átomos de carbono na forma de isopreno. Outras transformações do composto isopentenil podem produzir uma grande variedade de terpenos e terpenos (EBERHARD, 2006).

Figura 12 – Representação esquemática de formação dos principais grupos de terpenos



Fonte: Adaptado (DEWICK, 2009).

Os isoprenos são produtos de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos. O dimetil-alil-difosfato (DMAPP) e o isopentenil-difosfato (IPP) são considerados isoprenos ativos e participam da formação de terpenos. São sintetizados pela via do ácido mevalônico e pela via do 2C-metil-eritritol-4P (DEWICK, 2009).

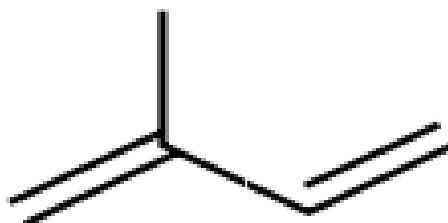
Na via do ácido mevalônico (MVA), a síntese dessa substância se dá pela união de três moléculas de acetil-CoA, sendo que duas são unidas inicialmente formando aceto-acetil-CoA e a terceira em adição aldol-estereoespecífica, formando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Após duas reduções (tio-éster para aldeído e aldeído para álcool) é enfim sintetizado o ácido mevalônico. Este, após descarboxilação e mediante gasto energético de três ATPs, resulta em IPP, que pode ainda ser isomerizado em DMAPP (DEWICK, 2009).

Na via do 2C-metil-eritritol-4P (MEP) ocorre fusão de ácido pirúvico com gliceraldeído-3P, ambos compostos intermediários do ciclo de Krebs. Após a fusão,

ocorre isomerização em 2C-metil-D-eritritol-ciclo-fosfato e depois em 4-hidroxi-3-metil-but-2-enil-PP, composto que origina IPP ou DMAPP (DEWICK, 2009).

Os terpenos apresentam a maioria dos grupos funcionais conhecidos em sua estrutura, de modo que estes não fornecem um meio útil de classificação. No entanto o número e a organização estrutural dos átomos de carbono é uma característica definitiva. Como os terpenos podem ser considerados compostos derivados de unidades de isopreno (mais precisamente isopentano), estes podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (figura 13) e número de átomos de carbono, de acordo com a tabela 2 (EBERHARD, 2006).

Figura 13 – Estrutura molecular do isopreno



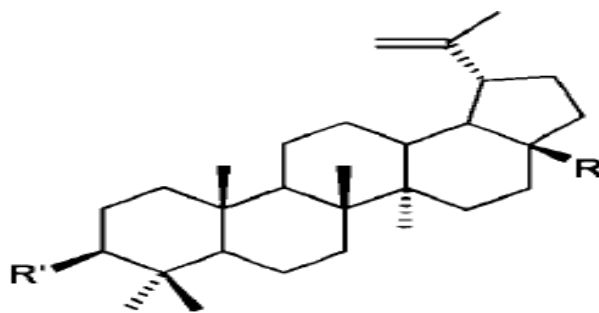
Fonte: (EBERHARD, 2006).

Tabela 2 – Classificação dos compostos terpênicos de acordo com o número de unidades de isopreno

Classificação	Unidades de isopreno	Nº de átomos de C
Hemiterpenos	1	C <sub>5</sub>
Monoterpenos	2	C <sub>10</sub>
Sesquiterpenos	3	C <sub>15</sub>
Diterpenos	4	C <sub>20</sub>
Sesterterpenos	5	C <sub>25</sub>
Triterpenos	6	C <sub>30</sub>
Tetraterpenos	8	C <sub>40</sub>
Politerpenos	N	C <sub>n</sub>

A classe dos triterpenos (figura 14) se encontra abundante na natureza particularmente em resinas. Podem ocorrer como ésteres ou glicosídeos (muitas vezes chamados saponinas - moléculas composta de açúcares ligados à esteróides ou tripterpenos - devido à sua capacidade de fazer espuma em soluções aquosas). Eles são derivados essencialmente de acoplamento de dois precursores de sesquiterpenos e podem ser alifático, tetracíclico ou pentacíclicos (SELL, 2006).

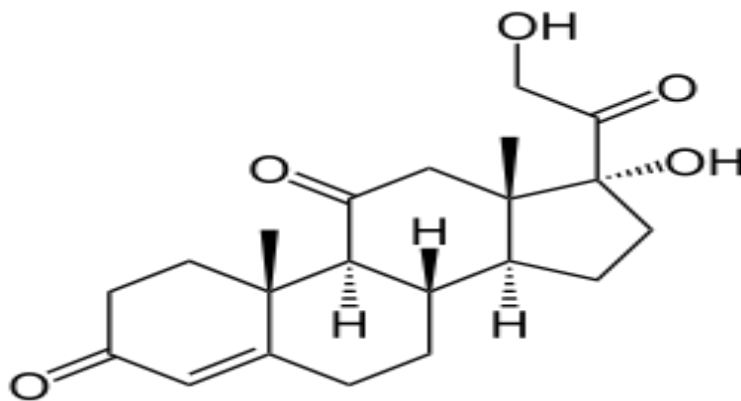
Figura 14 – Estrutura genérica de um triterpeno pentacíclico



Fonte: (SELL, 2006).

Os esteróides são triterpenos modificados, mas são provavelmente mais conhecidos por seu papel como hormônios, por exemplo, testosterona, estrogênio e progesterona. Esteróides, tais como cortisona (figura 15), são mais frequentemente utilizados como agentes anti-inflamatórios, mas possuem outras funções como seu uso em pílulas anticoncepcionais. (SELL, 2006).

Figura 15 – Estrutura molecular da cortisona, um esteroide triterpênico

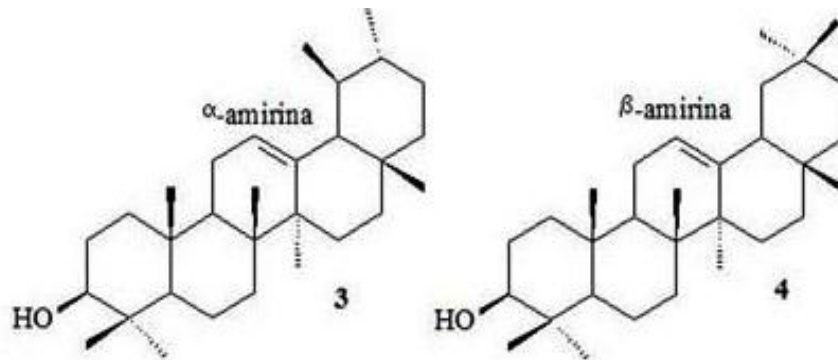


Fonte: (SELL, 2006).

As saponinas, apesar de possuírem uma distribuição mais restrita na natureza quando comparadas aos triterpenos, são de grande importância e interesse devido à sua relação com compostos como hormônios sexuais, cortisona, esteroides diuréticos, a vitamina D e glicosídeos cardíacos. As saponinas esteroides C27 podem servir como precursores químicos para a síntese de compostos anti-inflamatórios e drogas contraceptivas. Já as triterpênicas (Figura 16) podem ser classificadas em três grupos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol) e são formados pela substituição de um grupo metila por um grupo carboxílico na posição 4, 17 ou 20.

Materiais vegetais contêm muitas vezes estas saponinas em quantidades consideráveis, o que é de grande valia, pois possuem propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatórias, expectorante, antitussígeno e anti-hemorroidal (SELL, 2006).

Figura 16 – Estrutura molecular das amirinas e saponinas triterpênicas



Fonte: (SELL, 2006).

## 2.6 MÉTODOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversas metodologias para medição da atividade antioxidante são descritas na literatura, principalmente, para amostras de fluidos biológicos, extratos de alimentos e plantas, e compostos puros. Cada método varia quanto ao tipo de radical gerado, ao indicador de oxidação empregado e ao método de detecção e quantificação usado. Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (VASCONCELOS et al., 2007).

Para se ter uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como, onde e a extensão do dano causado. Assim, o entendimento sobre os efeitos dos compostos antioxidantes somente pode ser aperfeiçoado se metodologias mais específicas forem utilizadas, e se estas forem capazes de definir quais produtos são

formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (ALVES et al., 2010).

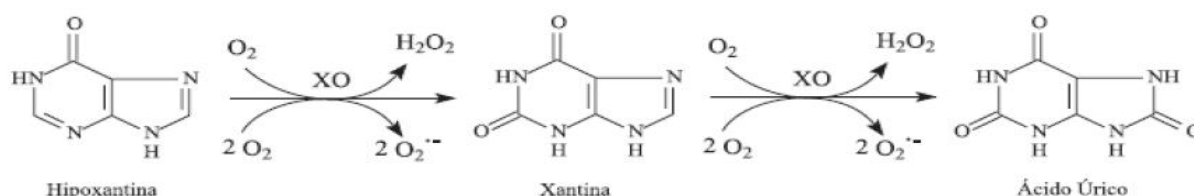
Alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total, em vez da análise de antioxidantes isolados, uma vez que há dificuldade em medir cada antioxidante e, principalmente, devido à interação que existe entre eles (ALVES et al., 2010).

### 2.6.1 Radical Ânion Superóxido – Sistema HPX/XOD

A produção do ânion radical superóxido é essencial para a defesa de organismos vivos, pois esse radical atua na transferência de sinais entre células vivas. No entanto, a superprodução de  $O_2^{\cdot-}$  pode causar estresse oxidativo e estar envolvida na presença de diversas patologias (ALVES et al., 2010).

A enzima Xantina Oxidase (XOD) é responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido (Figura 17), por isso é considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio. A atividade de um grande número de substâncias pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido gerado nesse sistema enzimático (ALVES et al., 2010).

Figura 17 – Formação de radicais superóxido pela transformação da Hipoxantina em Xantina e dessa para ácido úrico, pela ação da enzima xantina oxidase

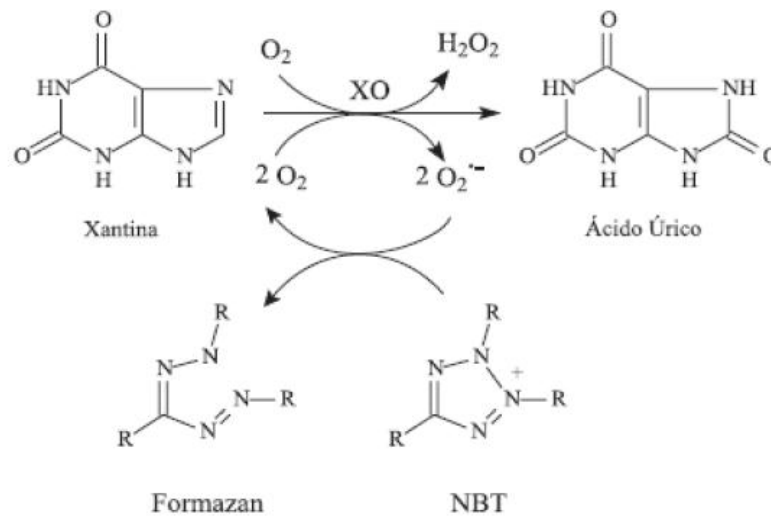


Fonte: Adaptado (ALVES et al., 2010).

O radical superóxido reduz o nitroazul de tetrazólio (NBT, do inglês *nitro-blue tetrazolium*) ao composto formazan, em pH 7,4 e temperatura ambiente (Figura 18). O formazan gerado é medido por espectrofotometria, no comprimento de onda de 560 nm, já que há uma mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma

coloração púrpura do formazan. O poder antioxidante dos compostos fenólicos é avaliado pela inibição da produção do formazan, uma vez que os compostos reagem com  $O_2^{\bullet-}$  presente no meio antes do radical reduzir o NBT. Uma menor formação de formazan corresponde a uma maior ação antirradicalar (ALVES et al., 2010).

Figura 18 – Reação química de formação do formazan a partir da redução do NBT pelo radical superóxido, no sistema hipoxantina-xantina oxidase



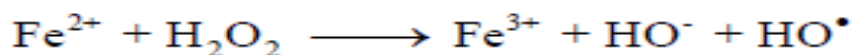
Fonte: Adaptado (ALVES, 2010).

## 2.6.2 Radical Hidroxil - Método Deoxirribose

O radical hidroxil caracteriza-se como um dos mais deletérios radicais livres e quando o DNA (ou RNA) está exposto a sua presença pode vir a gerar uma série de produtos devido a alta reatividade, pela meia-vida muito curta e por ser difícil o sequestro *in vivo* (ALVES et al., 2010).

Neste método, os radicais hidroxila formam-se através da reação do cloreto férrico ( $FeCl_3$ ) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença do ascobarto que reage formando  $Fe(II)$ -EDTA juntamente com o ascobarto oxidado. Posteriormente, o  $H_2O_2$  reage com o  $Fe(II)$ -EDTA e origina o  $Fe(III)$ -EDTA e  $\cdot OH$  através da reação de Fenton descrita na Figura 19 (ALVES et al., 2010).

Figura 19 – Reação de Fenton

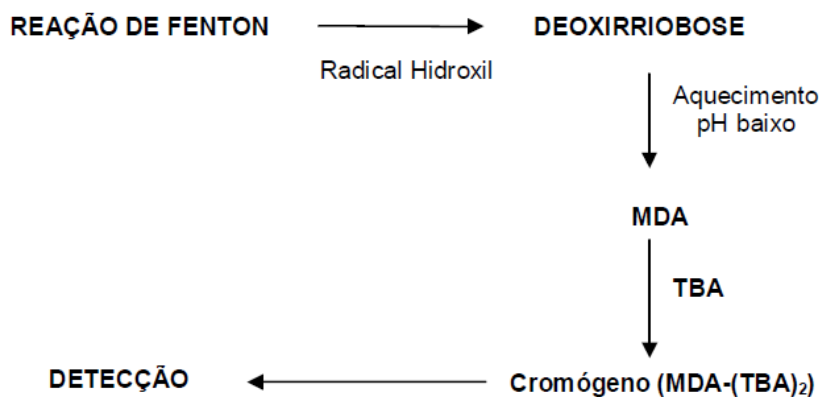


Fonte: Adaptado (ANGELO et al., 2007).

O açúcar deoxirribose (2 deoxi-D-ribose) presente na estrutura do DNA é fragmentado pelo radical hidroxila formando produtos que quando sob aquecimento e pH baixo, se decompõem para formar o malondialdeído (MDA), apresentado na **Erro! Fonte de referência não encontrada. 20**. Pela adição do ácido tiobarbitúrico (TBA) forma-se o cromógeno rosa (MDA-(TBA)<sub>2</sub>) detectado por espectrofotometria em 532 nm (ANGELO et al., 2007).

Compostos antioxidantes competem com o açúcar pelo radical inibindo a formação de MDA e do cromógeno (ANGELO et al., 2007).

Figura 20 – Formação do cromógeno por meio da decomposição da deoxirribose pelos radicais hidroxilas formados pela reação de Fenton



Fonte: Adaptado (ANGELO et al., 2007).

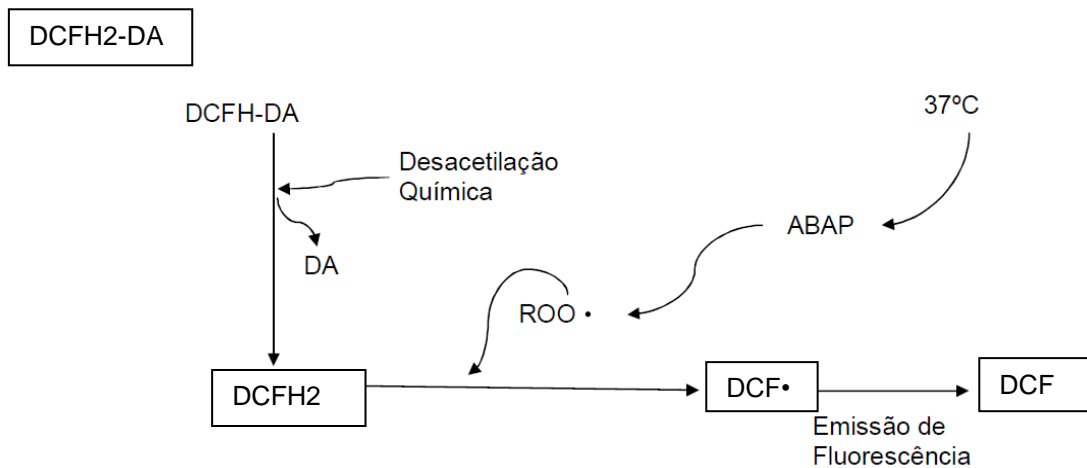
### 2.6.3 Radical Peroxil - Método ANCOMROS

O método ANCOMROS (do inglês, *Antioxidant Competence is Measured by ROS*), desenvolvido por Amado e colaboradores (2009), baseia-se na determinação da capacidade antioxidante total baseada na interação do antioxidante com ROS por fluorescência e emprega o composto DCFH<sub>2</sub>-DA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) como substrato.



Neste ensaio, o antioxidante é exposto para sequestrar o radical peróxil gerado pela decomposição térmica do ABAP (dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) na temperatura de 37 °C, conforme Figura 21. Ao sistema é adicionado o reagente DCFH<sub>2</sub>-DA, após ter sido desacetilado, gerando o composto DCFH<sub>2</sub>. Assim, o composto não fluorescente DCFH<sub>2</sub> é oxidado pelo radical peróxil, gerando a molécula fluorescente DCF•, o qual é detectado por emissão de fluorescência no comprimento de onda de 525 nm, quando excitado em 488 nm (AMADO et al., 2009).

Figura 21 – Termodecomposição do ABAP a 37°C e consequente formação de radicais peróxila que atuam na oxidação do reagente DCFH originando o composto fluorescente DCF



Fonte: Adaptado (AMADO et al., 2009).

## 2.7 TOXICOLOGIA

Apesar de todas as perspectivas de efeitos preventivos e/ou terapêuticos de *J. gossypifolia*, convém ressaltar que a validação do emprego de uma espécie vegetal na terapêutica não pode se dar apenas pela demonstração de sua atividade e eficácia. Há que se considerar a possibilidade de efeitos tóxicos (MARIZ, 2007).

As espécies de *Jatropha* são notadamente conhecidas por seu potencial tóxico. Entretanto, esta toxicidade está relacionada principalmente ao látex e as sementes. O látex é liberado a partir das partes aéreas da planta por lesão mecânica e é extremamente cáustico e irritante para a pele e mucosas. As sementes são ricas

em toxalbuminas (Ex: ricina) que causam aglutinação e hemólise de eritrócitos, bem como danos para outros tipos de células e contêm um complexo de resina lipóide que pode causar dermatite. A sintomatologia é constituída, em geral, de distúrbios gastrintestinais (dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia). Além disso, o curso clínico pode trazer complicações cardiovasculares, neurológicas e renais. Uma das formas de intoxicação em seres humanos ocorre pela ingestão de frutas e sementes devido a sua semelhança com castanhas comestíveis (SCHENKEL et al., 2007).

Alguns estudos têm demonstrado as propriedades tóxicas de *J. gossypifolia*, enquanto outros mostram a ausência de toxicidade. No entanto, é importante observar os modelos utilizados, doses administradas, e tipos de extratos empregados (solventes e partes da planta), entre outros aspectos, para concluir adequadamente sobre sua toxicidade. Devemos considerar que na terapêutica popular, as partes das plantas medicinais raramente são usadas *in natura*, mas sim, sob forma de preparações diversas como, por exemplo: chás, infusos e decoctos. Para obtenção dessas preparações as partes vegetais podem ser submetidas a processos tais como dessecação, trituração e maceração, o que por certo, altera a composição química original do órgão vegetal utilizado, possibilitando a eliminação de constituintes tóxicos e a obtenção de um produto menos tóxico que a planta *in natura* ou até mesmo, relativamente inócuo. Apesar disso, esta é apenas uma hipótese, e assim a toxicidade com extratos de *J. gossypifolia*, a partir das folhas ainda não pode ser descartada, pois estudos evidenciam resultados diversos e ainda inconclusivos (MARIZ, 2007).

Um das primeiras observações relativas à identificação dos constituintes responsáveis pelos efeitos tóxicos das espécies de *Jatropha* foi realizada por um isolamento bio-guiado, o irritante éster poli-insaturado 12-deoxi-16-hidroxilphorbol foi isolado a partir do extrato etéreo das sementes de *J. gossypifolia* por cromatografia em contracorrente. A atividade irritante dérmica foi visualizada na orelha do rato após 24 horas da aplicação das frações e compostos isolados (ADOLF et al., 1984).

O ensaio toxicológico *in vitro* utilizando larvas de *Artemia salina* revelou que o extrato hidroetanólico e metanólico (parte da planta não especificada) apresentou baixa toxicidade. Outro estudo mostrou que a fração aquosa e acetato de etila do extrato metanólico das partes aéreas de *J. gossypifolia* não apresentaram toxicidade contra os mesmos organismos (MACBAE et al., 1988).

Em pesquisa realizada com ratos Wistar, foi avaliada a toxicidade do extrato hidroetanólico da raiz de *J. gossypifolia* em uma concentração de 10, 20 e 30 mg/kg administrada por via oral e observou-se que este extrato apresentou nefrotoxicidade e causou aumento e retenção de uréia no sangue, assim como observado nas análises histológicas e bioquímicas do sangue (MEDUBI et al., 2010).

Uma das principais avaliações da toxicidade de *J. gossypifolia* foi realizada através da toxicologia pré-clínica do extrato bruto etanólico das suas folhas e demonstraram, relativa, baixa toxicidade oral aguda em ratos Wistar. Os ratos foram tratados por via oral com doses únicas de 1,2-5,0 g/kg e observados durante 14 dias, sendo que os sinais mais importantes de toxicidade foram ptose, redução do peso corporal e paralisia dos membros posteriores. Outras alterações significativas ocorreram apenas em machos tratados com dose de 5,0 g/kg e foram o aumento da creatinina, aspartato aminotransferase, níveis séricos de sódio e potássio, redução de ureia e albumina, leucopenia e pequena alteração na cor e consistência das vísceras.

A dose letal média (DL<sub>50</sub>) foi maior do que 4,0 g/kg para machos e superiores a 5,0 g/kg para as fêmeas. Na avaliação histopatológica alguma alteração foi observada no fígado e pulmão apenas na dose de 5,0 g/kg, sugerindo a baixa toxicidade do extrato (MARIZ et al., 2006).

Da mesma forma, a toxicidade oral aguda dos extratos aquosos e etanólicos das folhas de *J. gossypifolia* foi avaliada por Nagaharika e colaboradores (2013) e não mostrou qualquer sinal de toxicidade em ratos até a dose de 2 g/kg, permitindo que os autores concluíssem que este extrato poderia ser considerado seguro. Este pode ser considerado um resultado interessante, uma vez que na maioria dos casos, a planta é usada popularmente como chá que é um extrato aquoso.

Na análise da toxicologia crônica (treze semanas de tratamento), o extrato bruto etanólico mostrou significativa toxicidade crônica por via oral em ratos. Os sinais tóxicos indicaram uma redução da atividade no sistema nervoso central e perturbações digestivas. A análise histopatológica revelou hepatotoxicidade e danos pulmonares. A letalidade testada, sob a dose mais elevada (405 mg/kg) foi de 46,6% e 13,3% para machos e fêmeas, respectivamente. Desta forma o desenvolvimento da fitoterapia com base nesta espécie precisa priorizar o refinamento químico dos extratos brutos para se obter frações menos tóxicas, que devem ser testadas quanto à sua segurança e eficácia terapêutica (MARIZ et al., 2010).

Também foi avaliada a toxicidade do látex bruto de *J. gossypifolia* em ratos Wistar, aplicando diferentes doses em incisão da pele, diariamente, durante 18 dias, baseado no seu uso popular como agente hemostático em lesões cutâneas. Observou-se que a aplicação do látex não produziu nenhuma diferença significativa nos resultados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos obtidos a partir do controle em animais de laboratório, concluindo-se que o mesmo não tem efeitos prejudiciais (ODUOLA et al., 2007).

### **2.7.1 Ensaio de Toxicidade aguda**

A investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios ativos, permitindo uma utilização segura, respeitando seus possíveis riscos toxicológicos (RABÊLO, 2010).

Uma substância altamente tóxica promoverá um efeito danoso ao organismo vivo e/ou ao ambiente, quando empregada em mínimas quantidades, enquanto que as substâncias de baixa toxicidade precisam de altas doses para promover um efeito tóxico (VENANCIO, 2006).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. Na determinação de toxicidade, há necessidade de realizar ensaios pré-clínicos e clínicos. Os ensaios pré-clínicos são realizados em laboratórios através de testes *in vivo* e *in vitro*. Os teste *in vivo* utilizam animais, principalmente roedores e mamíferos, como camundongos, ratos, macacos, cães e outros. Os ensaios *in vitro* empregam frequentemente órgãos isolados, fluídos corpóreos, organismos inferiores e cultura de células e tecidos (JIE YIN et al., 2007).

Um dos primeiros testes realizados para a avaliação do potencial tóxico de quaisquer substâncias é o de toxicidade aguda. Este consiste no efeito que uma substância produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma única dose ou de doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas (KUMAR et al., 2006).

Os estudos de toxicidade aguda são realizados em animais adultos de ambos os sexos e verifica-se o número de animais que morrem durante o período de observação. A avaliação dos resultados permite conhecer a espécie ou o sexo mais sensível. Além de dados de mortalidade e peso corporal, podem ser avaliados vários

parâmetros como sinais de intoxicação, letargia, mudanças comportamentais, morbidade, alteração no consumo de alimento entre outros (GAZDA, 2004).

O teste serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para pesquisas sobre a toxicidade subaguda e crônica, fornece subsídios sobre o modo de ação tóxica da substância teste bem como o binômio dose-efeito letal, que é estimada por um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida como  $DL_{50}$  (KLAASSEN; EATON, 1994).

Além da letalidade, os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda servem também para identificação do potencial tóxico em órgãos específicos, conhecimento do mecanismo de ação da substância; fornecimento de informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe, identificação de toxicocinética e a relação dose-resposta (KLAASSEN; EATON, 1994).

O teste da  $DL_{50}$  foi introduzido por Trevan em 1927, e determina um valor estatisticamente derivado da administração de dose única de uma substância que pode provocar a morte de 50% dos animais, sendo expresso em peso de substância teste por unidade de peso do animal experimental (mg/Kg). O valor da  $DL_{50}$  é usado como um índice para a classificação toxicológica, fornecendo subsídios para estudos de avaliação de risco da exposição humana (SCHLEDE et al., 2005).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e desenvolvimento (OECD 423, 2001, do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*) incorporou o Teste da  $DL_{50}$  em suas diretrizes, fornecendo ensaios com estimativas aproximadas de  $DL_{50}$ , sendo um modelo alternativo internacionalmente aceito e validado que visa reduzir o número de animais utilizados e promover o bem estar animal. O guia da OECD é aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) com injeção automática e detector de massas Agilent 6430 triplo quadrupolo.
- Detector UV-Vis (OceanOptics Spectrometer USB2000+) com lâmpada de Deutério e Tungstênio (DT-Mini-2).
- Programa de Análise Qualitativa MassHunter Workstation (versão B.04.00, Build 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc., 2011).
- Balança analítica Sartorius® (Alemanha) com quatro casas de precisão.
- pHmetro digital Metrohm® 827 pHlab (Suíça) usando eletrodo de vidro combinado.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Synergy® UV (resistividade de 18,2 MΩ.cm@25°C).
- Sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 µm Sartorius® (Alemanha).
- Banho de ultrassom Bandelin Sonorex® RK 510 H (Alemanha).
- Bomba de vácuo Primatec® 131/132 (Brasil).
- Espectrofotômetro da marca Hewlett Packard® (HP 8453) com arranjo de diodos utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.
- Espectrofotômetro de fluorescência Agilent Technologies® modelo Cary Eclipse.
- Kit de diagnóstico laboratorial Bioclin/Quibasa (Minas Gerais, Brasil).
- Analisador bioquímico semiautomático (Genz, Bioplus: Bio-2000).
- Contador automático veterinário Mindray BC 2800.

#### 3.2 AMOSTRAGEM

A *Jatropha gossypifolia* L. foi cultivada no Horto de plantas medicinais e aromáticas da corporação agrícola brasileira de pesquisa da Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA, Brasil. A localização geográfica da coleta foi 1° 27' 21" de latitude Sul e 48° 30' 14" de longitude Oeste. A espécie foi depositada no herbário IAN sob o registro 192905. O material foi coletado em: (1) agosto 2013; (2) Janeiro

de 2015; e (3) de Setembro de 2015. O fruto foi recebido somente em Setembro de 2015. As amostras foram fornecidas como matéria seca e foram armazenadas em dessecadores sob vácuo à temperatura ambiente até a preparação dos extratos.

### 3.3 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados por maceração e infusão, seguindo a metodologia descrita por Simões e colaboradores (2004). Pesou-se 450g de material vegetal seco (folhas) de *J. gossypifolia*, para a primeira e segunda safras. Ainda pesou-se 1446,33g e 71,24 g de folhas e frutos, para a terceira safra, respectivamente. Obteve-se os extratos através da maceração com etanol 70% na proporção 1:10 (droga/solvente), a temperatura ambiente (25°C).

Os macerados foram submetidos a agitações manuais diárias, com esgotamento do material vegetal e renovação semanal do solvente, sendo o procedimento repetido três vezes durante um período de 4 semanas. Ao fim desse período os conteúdos foram filtrados em algodão, seguindo-se de filtração a vácuo em funil de Büchner acoplado a um kitassato e concentrados em evaporador rotatório, à temperatura de 40°C, para eliminação do etanol. O extrato hidroetanólico bruto remanescente foi congelado e logo depois, liofilizado para obtenção do extrato sólido e determinação do rendimento.

O extrato seco foi ressuspendido em água e particionado com solventes de polaridade crescente, sendo submetido a sucessivas extrações líquido-líquido com hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, respectivamente.

As frações orgânicas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório à temperatura de 40°C, com exceção do butanol que necessitou de uma temperatura maior (60°C), e em seguida levadas à secura em placa de Petri que foram colocadas em estufa, para obtenção do extrato seco de cada fração. Os extratos secos foram armazenados a 4 °C até as análises.

O preparo das infusões constituiu-se na pesagem de 5g da matéria seca com posterior infusão em 50 mL de água à temperatura de 90 °C durante 30 minutos. Após o período de infusão os extratos foram filtrados, primeiramente em algodão, e depois em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm.



## 3.4 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR UHPLC-ESI-MS/MS

### 3.4.1 Preparo da amostra

O extrato de *J. gossypifolia* foi preparado por maceração (item 3.3). Para a análise cromatográfica, uma massa de cerca de 0,06 g de cada um dos extratos em pó foi ressuspensa em 3 mL de metanol. Tal solução foi sonicada em banho de ultrassom convencional até completa dissolução (5 min) e diluída com 12 mL água ultrapura. Posteriormente, ácido acético foi adicionado até uma concentração final de 0,1% (v/v). O extrato foi então filtrado através de membrana de PTFE (politetrafluoretileno) hidrofílico com um diâmetro de poro igual a 0,2 µm.

O extrato obtido por infusão (item 3.3), foi filtrado em membrana de PTFE hidrofílico (diâmetro de poro igual a 0,2 µm) e diluído com metanol até uma proporção de 1:4 (MeOH:H<sub>2</sub>O, v/v), sendo posteriormente acidificado com ácido acético a uma proporção final de 0,1% (v/v).

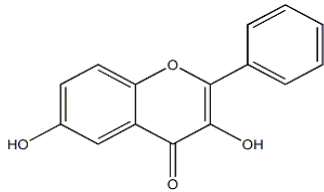
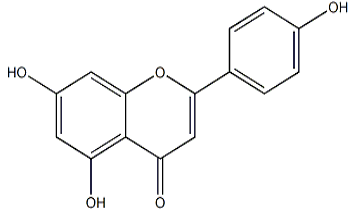
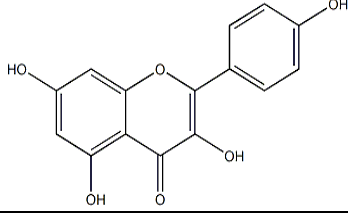
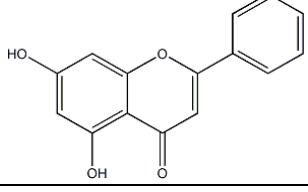
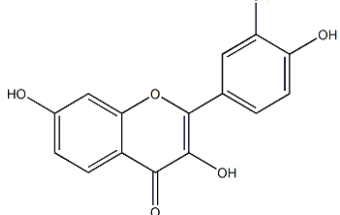
Os extratos líquidos finais obtidos por ambas metodologias foram submetidos a uma etapa de *cleanup* utilizando extração em fase sólida (SPE). Cartuchos do tipo Strata C-18E, 500 mg, 3 mL (Phenomenex, Torrance, EUA) foram condicionados com 6 mL de uma solução de MeOH:CH<sub>3</sub>COOH 0,2% (1:1; v/v) e então equilibrados com 6 mL de uma solução de CH<sub>3</sub>COOH 0,1% (v/v) em água. Um volume fixo de 2 mL dos extratos obtidos com composição MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (20:80:0,1; v/v) foi percolado a uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>, sendo seguido por uma lavagem com 2 mL da solução de CH<sub>3</sub>COOH 0,1% (v/v). Por último, os analitos retidos foram eluídos com 2 mL de MeOH.

Momentos antes da análise cromatográfica, o eluato obtido pelo procedimento de SPE foi diluído 10 vezes com uma solução de MeOH:CH<sub>3</sub>COOH 0,2% (1:1; v/v). Para a quantificação das amostras foi utilizado o método de adição do padrão, sendo que as curvas de calibração foram construídas com 7 níveis de concentração igualmente espaçados, em adição ao extrato branco. Os pontos da curva de calibração foram determinados em triplicata.

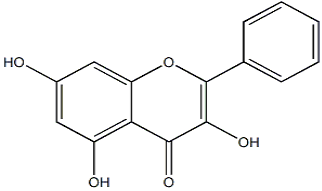
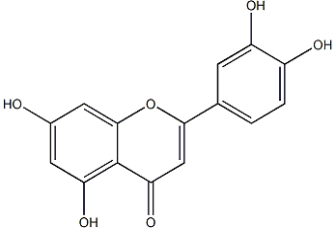
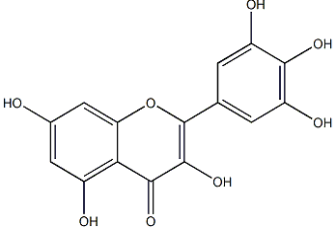
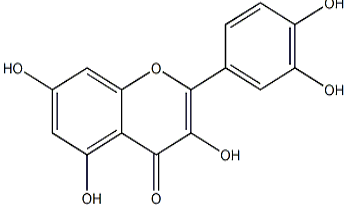
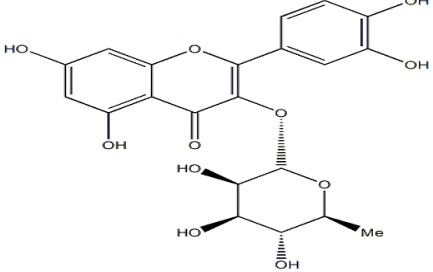
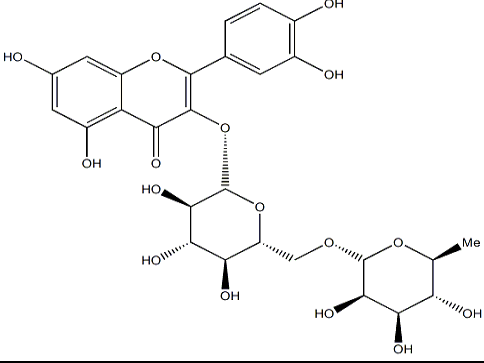
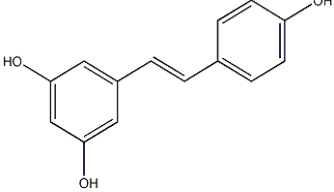
### 3.4.2 Padrões, reagentes e soluções

Os padrões (+)-catequina, 3-acetil cumarina, 3,6 dihidroxiflavona, 4-hidroxicumarina, 6-hidroxicumarina, apigenina, ácido clorogênico, crisina, fisetina, galangina, ácido gálico, camferol, luteolina, miricetina, ácido *p*-cumárico, quercetina, quercetrina, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido trans-cinâmico e ácido vanílico foram adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Os padrões dos ácidos cafeico e ferúlico foram adquiridos de Fluka Analytical (Buchs, Suíça). Todos os padrões eram de grau analítico, com no mínimo 95% de pureza, e foram utilizados sem prévia purificação. Todos os padrões estão representados na tabela 3.

Tabela 3 – Estrutura química dos compostos fenólicos em estudo

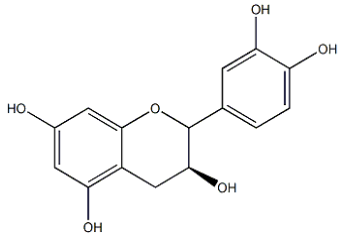
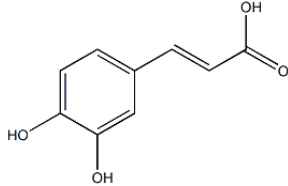
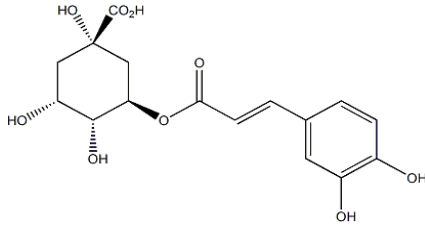
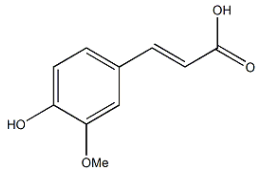
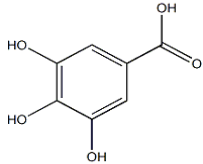
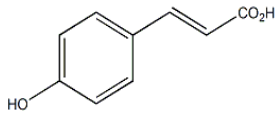
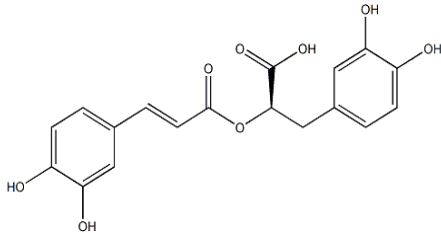
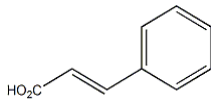
Classe	Exemplo	Estrutura
Flavonóides	3,6 Dihidroxiavona	
	Apigenina	
	Canferol	
	Crisina	
	Fisetina	

---

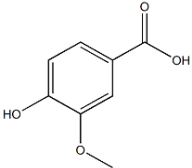
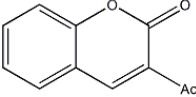
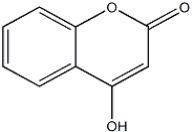
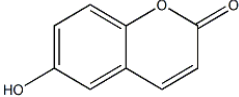
	Galangina	
	Luteolina	
	Miricetina	
Flavonóides	Quercetina	
	Quercitrina	
	Rutina	
Diarileteno	Resveratrol	

---

---

Catequina	Catequina	
Ácidos Fenólicos	Ácido cafeico	
	Ácido Clorogênico	
	Ácido Ferúlico	
	Ácido Gálico	
	Ácido <i>p</i> -cumárico	
	Ácido Rosmarínico	
	Ácido cinâmico <i>trans</i> -	

---

	Ácido vanílico	
Cumarinas	3- acetilcumarina	
	4- hidroxicumarina	
	6- hidroxicumarina	

A água ultrapura foi obtida por meio do sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os solventes metanol e acetonitrila, ambos em grau LC-MS, foram obtidos de Panreac (Castellar del Vallès, Espanha). Ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio, formiato de amônio e hidróxido de amônio foram obtidos de Sigma-Aldrich. As soluções estoque dos padrões ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas das substâncias em metanol grau LC-MS, e então armazenadas em frascos de vidro âmbar a uma temperatura de  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises. As soluções de trabalho dos compostos fenólicos foram preparadas pela diluição das soluções estoque em metanol.

### 3.4.3 Condições de análise por UHPLC-ESI-MS/MS

O método cromatográfico foi desenvolvido por Faccin e colaboradores (2016), para a determinação e quantificação de constituintes fenólicos da espécie em estudo.

As separações foram feitas através de um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência *1260 Infinity Binary* (Agilent, Santa Clara, EUA), capaz de operar em pressões de até 600 bar, utilizando uma coluna de fase reversa *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*,  $2,1 \times 50 \text{ mm}$ ,  $1,8 \text{ }\mu\text{m}$  (Agilent), mantida sob aquecimento a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O volume de injeção adotado foi de  $5 \text{ }\mu\text{L}$ , sendo que as

alíquotas para injeção foram ajustadas para uma composição final de MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH igual a 50:50:0,1 (v/v).

A mistura de compostos fenólicos foi separada por meio de um gradiente de eluição composto por ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), a uma vazão constante de 800  $\mu\text{L min}^{-1}$ , conforme o seguinte programa de eluição: 8,0% B (0,00-0,10 min); 8,0-25,8% B (0,10-3,45 min); 25,8-54,0% B (3,45-6,90 min); 54,0-100,0% B (6,90-7,00 min); 100,0% B (7,00-9,00 min).

O efluente cromatográfico gerado até o tempo de 7,00 min foi ionizado por meio de uma fonte de ionização por eletrospray, a qual teve seus parâmetros otimizados de forma a se obter a melhor resposta dos analitos, tanto em intensidade como em estabilidade de sinal. Como condição otimizada de operação da fonte de ionização obteve-se: vazão de gás (N<sub>2</sub>) igual a 11 L/min; pressão do nebulizador igual a 30 psi; voltagem do capilar igual a  $\pm 2,4$  kV e temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>) igual a 250°C.

Os compostos de interesse foram subsequentemente analisados por meio de um espectrômetro de massas Agilent *6430 Triple Quadrupole*, operando no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), com uma resolução de 0,7  $m/z$  (FWHM). Foi utilizado nitrogênio de alta pureza (99,999%), fornecido por Linde (Munique, Alemanha), como gás para indução da colisão. As energias de colisão foram otimizadas para cada analito e estão demonstradas na tabela 4, a qual também indica as transições de massa monitoradas pelo espectrômetro bem como os tempos de retenção dos analitos estudados. As transições de quantificação foram divididas em três diferentes segmentos temporais de aquisição e o tempo de leitura para cada transição foi otimizado em 20 ms. O efluente cromatográfico gerado entre 7,00 e 9,00 min foi descartado, sem ser introduzido no sistema MS/MS, caracterizando uma etapa de limpeza da coluna cromatográfica. Após o fim do ciclo de gradiente, foi adotado um tempo pós-corrida de 4,00 min, a fim de permitir o completo reequilíbrio do sistema, tendo como base o reestabelecimento da pressão de operação inicial. Os dados adquiridos foram analisados com o uso do *MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis* (versão B.04.00, *build* 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc. 2011).

Tabela 4 – Intervalos de tempos de retenção (TR) e parâmetros do espectrômetro de massas, validados por Faccin e colaboradores (2016), para os compostos fenólicos selecionados

Composto	TR (min)	Fragmentador (V)	Polaridade da fonte	Transição de quantificação*	Transição de confirmação*
Ácido gálico	0,29	106	-	169.0 > 125.1 (10)	-
Ácido clorogênico	0,76	104	-	353.1 > 191.1 (5)	-
(+)-Catequina	0,77	134	-	289.1 > 245.1(10)	289.1 > 203.2(15)
Ácido vanílico	0,98	92	-	167.0 > 152.2 (10)	167.0 > 123.1 (8)
Ácido cafeico	0,99	106	-	179.0 > 135.1 (10)	-
6-hidroxycumarina	1,62	124	-	161.0 > 133.2 (17)	161.0 > 105.2(17)
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,83	96	-	163.0 > 119.1 (9)	-
Ácido feúlico	2,51	88	-	193.1 > 134.1 (9)	193.1 > 178.1 (7)
Rutina	3,16	210	-	609.1 > 300.1 (31)	-
4-Hidroxycumarina	3,36	130	-	161.0 > 117.2 (15)	-
Ácido rosmarínico	3,64	138	-	359.1 > 161.0 (7)	359.1 > 197.1 (7)
Quercitrina	3,66	164	-	447.1 > 301.1 (17)	-
Miricetina	3,74	128	-	317.0 > 150.9 (21)	317.0 > 178.8(21)
Fisetina	3,85	120	-	285.0 > 135.0 (15)	285.0 > 163.0(15)
Resveratrol	3,90	124	-	227.1 > 185.2 (13)	227.1 > 143.0(13)
3-acetilcumarina	4,11	80	+	211.0 > 211.0 (0)	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	4,35	90	-	147.0 > 103.2 (5)	147.0 > 77.1(15)
Quercetina	4,60	126	-	301.0 > 151.1 (17)	301.0 > 179.0(15)
Luteolina	4,65	162	-	285.0 > 133.2 (27)	285.0 > 151.1(27)
Apigenina	5,29	136	-	269.0 > 117.1 (29)	269.0 > 149.0(20)
Canferol	5,35	164	-	285.0 > 239.0 (29)	285.0 > 117.2(31)
3,6-diidroxiflavona	6,38	126	-	253.1 > 197.0 (20)	253.1 > 208.0(21)
Crisina	6,58	130	-	253.1 > 143.1 (25)	253.1 > 106.9(25)
Galangina	6,74	156	-	269.0 > 169.1 (30)	269.0 > 211.2(29)

\*Energia de colisão (V) é fornecida entre parênteses.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR UHPLC-APPI-MS/MS

#### 3.5.1 Preparo da amostra

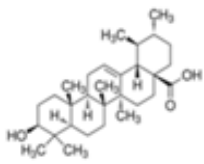
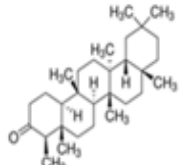
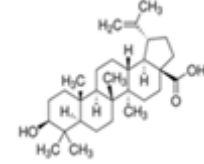
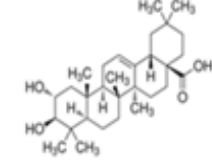
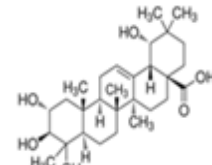
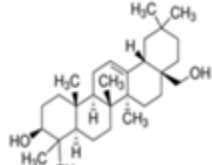
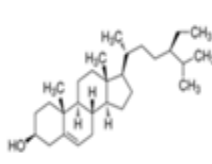
Para a análise cromatográfica, uma massa de cerca de aproximadamente 50 mg do extrato (item 3.3) foi ressuspensa em 5 mL de acetonitrila/água 50% (v/v) homogeneizados em vortex por 30 segundos seguido por 10 minutos de sonicação. Estes extratos preparados a 1% foram diluídos 20 vezes em acetonitrila, filtrados em filtro de PTFE 0,2  $\mu\text{m}$  e injetados no sistema cromatográfico. Para a quantificação das amostras foi utilizado o método de adição do padrão, sendo que as curvas de calibração foram construídas com 5 níveis de concentração igualmente espaçados, em adição ao extrato branco. Os pontos da curva de calibração foram determinados em triplicata.

#### 3.5.2 Padrões, reagentes e soluções

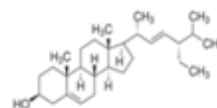
As soluções padrões, para análise, foram preparadas pela dissolução dos compostos triterpênicos em acetonitrila (grau LC-MS) obtida de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA): ácido ursólico (985 mg L<sup>-1</sup>), ácido betulínico (196 mg L<sup>-1</sup>), ácido maslínico (1000 mg L<sup>-1</sup>), ácido arjúnico (1000 mg L<sup>-1</sup>), eritrodiol (1000 mg L<sup>-1</sup>), sitosterol (378 mg L<sup>-1</sup>), estigmasterol (481 mg L<sup>-1</sup>), campesterol (125 mg L<sup>-1</sup>), lupeol (365 mg L<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -amirina (1000 mg L<sup>-1</sup>) e  $\beta$ -amirina (1000 mg L<sup>-1</sup>). Com exceção da friedelina 500 (mg L<sup>-1</sup>) que foi solubilizada em diclorometano grau HPLC. Os padrões foram adquiridos das marcas Fluka Analytical (Buchs, Suíça) e Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) e estão representados na tabela 5.



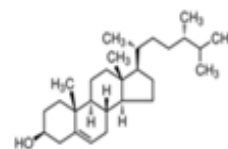
Tabela 5 – Estrutura química dos compostos triterpênicos em estudo

Classe	Composto	Estrutura
Triterpenos	Ácido ursólico	
	Friedelina	
	Ácido betulínico	
	Ácido maslínico	
	Ácido arjúnico	
	Eritrodiol	
	Sitosterol	

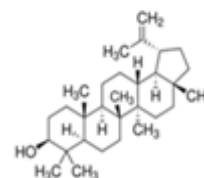
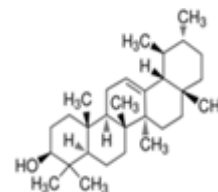
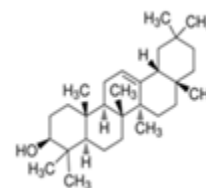
Estigmasterol



Campesterol



Lupeol

 $\alpha$ -amirina $\beta$ -amirina

### 3.5.3 Condições de análise por UHPLC-APPI-MS/MS

O método cromatográfico foi desenvolvido por Gobbo e colaboradores (2016), para a determinação e quantificação de constituintes terpênicos da espécie em estudo.

Os compostos triterpênicos foram determinados por meio da LC-MS, utilizando-se cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity com injeção

automática e o detector de massas Agilent Technologies 6430 Triplo quadrupolo. A coluna cromatográfica empregada era uma Zorbax SB-C18 2,1 x 50 mm, com 1,8  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula a uma temperatura de 37°C.

O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$  e realizou-se a determinação dos triterpenos utilizando um gradiente de eluição que consistiu de acetonitrila/água (70:30) por 4,5 minutos e 100% de acetonitrila, após 4,0 minutos de corrida. O fluxo foi de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durante os primeiros 4,5 minutos e foi aumentado a um máximo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  em 5 minutos, quando manteve-se esta taxa até o final da corrida de 8,5 minutos. Após a corrida, um período de 4 minutos, foi adotado para reequilibrar o sistema.

Cada composto foi individualmente injetado no espectrômetro de massas para obter o seu espectro, adequar o fragmentador e a energia da célula de colisão. Os compostos triterpênicos possuem baixa polaridade inerente e por isso foram convertidos em íons através da aplicação de uma fonte de Fotoionização à Pressão Atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*), usando tolueno como dopante. As energias de colisão foram otimizadas para cada analito, conforme apresentado na Tabela 6, que descreve também as transições monitoradas pelo espectrômetro de massas (MS/MS), como também os intervalos de tempo de retenção, a energia do fragmentador, a polaridade da fonte de ionização, as transições de quantificação e de confirmação para cada analito.

Tabela 6 – Intervalos de tempos de retenção (TR) e parâmetros do espectrômetro de massas, validados por Gobbo e colaboradores (2016), para os compostos triterpênicos selecionados

Composto	TR (min)	Fragmentador (V)	Polaridade da APPI	Transição de quantificação*	Transição de confirmação*
Ácido arjúnico	0,440	120	+	489,3 > 408,9 (10)	489,3 > 472,7 (10)
Ácido maslínico	0,847	75	+	473,3 > 411,0 (6)	473,3 > 149,0 (6)
Ácido betulínico	1,966	90	+	439,4 > 393,5 (15)	439,4 > 287,0 (15)
Ácido ursólico	2,136	120	+	439,4 > 203,3 (20)	439,4 > 191,0 (20)
Eritrodiol	3,271	124	+	425,4 > 217,3 (20)	425,4 > 177,0 (20)
Lupeol	6,590	120	+	409,1 > 109,1 (32)	409,1 > 137,2 (32)
$\beta$ -amirina	6,980	120	+	409,1 > 109,1 (32)	409,1 > 149,1 (32)
$\alpha$ -amirina	7,150	135	+	409,1 > 109,1 (32)	409,1 > 134,9 (32)
Friedelina	7,335	110	+	409,1 > 109,1 (32)	409,1 > 121,1 (32)
Sitosterol	7,779	130	+	396,9 > 109,1 (32)	396,9 > 146,9 (32)
Estigmasterol	7,390	80	+	394,7 > 159,0 (33)	394,7 > 118,9 (33)
Campesterol	7,324	135	+	382,8 > 160,8 (25)	382,8 > 133,0 (25)

\*Energia de colisão (Vpara) é fornecida entre parênteses.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A capacidade antioxidante dos extratos obtidos por maceração, infusão e das frações acetato de etila e butanol de *J. gossypifolia* foi realizada por método *in vitro* baseado na detecção por espectrofotometria para o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) e na detecção fluorimétrica para o radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ).

Foi pesado 0,1g do extrato hidroetanólico, frações acetato de etila e butanol e ressuspendeu-se em 5 mL de metanol. Para as determinações de atividade antioxidante descritas a seguir, as amostras foram testadas diluídas em metanol nas concentrações de 0,1% 1,0% e 2,0%. A infusão obtida (item 3.3) foi testada nas mesmas concentrações, diluída em água.

#### 3.6.1 Frente ao radical Ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) - Sistema Hipoxantina-Xantina Oxidase (HPX/XOD)

A capacidade antioxidante frente ao radical superóxido foi determinada pelo sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase (HPX/XOD) (ZHAO et al., 2006), em que foi adicionado 100  $\mu$ L de ácido etilenodiaminotetracético 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (EDTA), 100  $\mu$ L de hipoxantina 3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (HPX) e 200  $\mu$ L de nitro azul de tetrazólio (NBT, do inglês *nitro-blue tetrazolium*) 1,42  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  a 100  $\mu$ L de amostra. Esperou-se 3 minutos e adicionaram-se 100  $\mu$ L da enzima xantina oxidase (XOD) 0,75  $\text{unit}\cdot\text{mL}^{-1}$ , diluída com tampão fosfato. O volume foi completado a 3 mL com tampão fosfato 0,05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,4, composto de fosfato mono e dibásico.

O branco das amostras continha todos os reagentes exceto o NBT. Concomitantemente, foi conduzido um controle contendo todos os reagentes com o solvente utilizado nas amostras, e um branco do controle sem NBT. Após o tempo reacional de 40 minutos, a leitura espectrofotométrica ocorreu a 560 nm.

A atividade antioxidante ( $O_2^{\cdot-}$ ) é calculada conforme equação 19:

$$\%AA = 1 - \frac{(A - BA)}{(C - BC)} \times 100 \quad (19)$$

Onde: A é a absorvância da amostra, BA é a absorvância do branco da amostra, C é a absorvância do controle e BC é a absorvância do branco do controle.

### 3.6.2 Frente ao radical Hidroxil (HO<sup>•</sup>) - Método deoxirribose

O ensaio para medir a atividade antioxidante frente ao radical hidroxil pelo método da deoxirribose foi feito conforme descrito por ZHAO e colaboradores (2006), em que todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato 25 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

Em um tubo reacional foi adicionado 100 µL da amostra, 100 µL de EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de cloreto férrico hexahidratado 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de deoxirribose 36 mmol.L<sup>-1</sup>, 100 µL de peróxido de hidrogênio 10 mM e 100 µL de ácido ascórbico 1 mmol.L<sup>-1</sup>. O volume final foi ajustado para 1,0 mL com tampão fosfato. Após incubação durante 1 hora a 37 °C, a reação foi estabilizada por meio da adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%.

A mistura foi então aquecida em banho de água durante 15 minutos. Assim que as amostras resfriaram, o volume foi aferido para 5,0 mL e a absorvância medida em 532 nm.

A atividade antioxidante é calculada conforme equação 20:

$$\%AA = 1 - \frac{(A - BA)}{(C - BC)} \times 100 \quad (20)$$

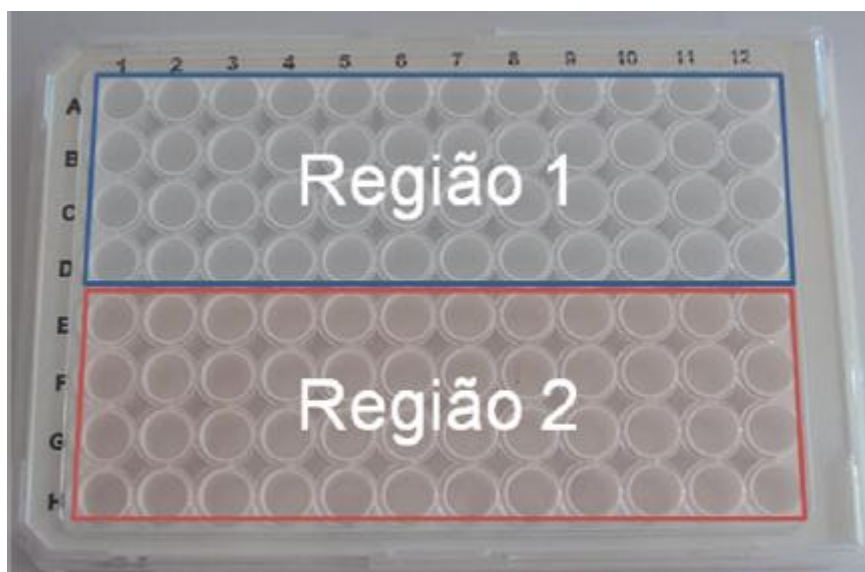
Onde: A é a absorvância da amostra, BA é a absorvância do branco da amostra, C é a absorvância do controle e BC é a absorvância do branco do controle.

### 3.6.3 Frente ao radical Peroxil (ROO<sup>•</sup>) - Método ANCOROS

A determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxil foi avaliada por meio da detecção indireta das espécies reativas de oxigênio (ERO) na presença e na ausência de um gerador radicalar, o qual empregou o diacetato de 2',7' -diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA) como substrato (AMADO et al., 2009).

Uma placa branca contendo 96 poças (Figura 22), foi dividida em duas regiões, sendo a região 1 (branco das medidas): linhas A, B, C e D, e a região 2: linhas E, F, G e H. As 3 primeiras poças, tanto na região 1 quanto na 2, foram reservadas para o solvente utilizado nas amostras (10 µL). No restante da placa, foi adicionado 10 µL de amostra em triplicata (3 poças) na região 1 e na região 2.

Figura 22 – Placa de análise do método ANCOMROS



Fonte: Foto do autor.

Após, foi adicionado 127,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação em todas as poças da placa. Por fim, foi adicionado 7,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura na região 1 e 7,5  $\mu\text{L}$  da solução de 2,2'-azobis(2-metilamodinopropano) (ABAP) 4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  na região 2.

No fluorímetro, antes da leitura da placa, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$  16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , previamente desacetilado e o mesmo foi programado para manter a temperatura a 37°C. O  $\text{DCFH}_2$  (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína desacetilado) sofreu oxidação por ERO e produziu o composto fluorescente  $\text{DCF}^\circ$  (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína oxidado) que foi detectado nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) a cada 5 minutos, fazendo o monitoramento da termodegradação do ABAP e a consequente formação de ERO num intervalo total de 30 minutos.

O tampão de reação utilizado nesta determinação foi composto de HEPES 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (ácido hidroxietil-piperazina etanosulfônico), KCl 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (cloreto de potássio) e  $\text{MgCl}_2$  1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (cloreto de magnésio).

A desacetilação química do  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$ , a qual gera o composto  $\text{DCFH}_2$ , foi realizada com a adição de 2,0 mL de NaOH 0,01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (hidróxido de sódio) em uma solução etanólica de  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$  5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 30 minutos, foi adicionado 10 mL de tampão fosfato 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,4), composto de fosfato mono e dibásico, e a solução foi armazenada em gelo até o momento do uso.

A atividade antioxidante é determinada com base na medida referente ao tempo de 30 minutos de reação, e calculada conforme equação 21:

$$\%AA = 1 - \frac{(FA - FBA)}{(FS - FBS)} \times 100 \quad (21)$$

Onde: FA é a fluorescência da amostra com ABAP, FBA é a fluorescência do branco da amostra sem ABAP, FS é a fluorescência do solvente utilizado nas amostras com ABAP e FBS é a fluorescência do branco do solvente sem ABAP.

### 3.7 TOXICOLOGIA

#### 3.7.1 Animais

Nos ensaios de toxicidade oral aguda, foram utilizados 12 ratos Wistar (160-200g) de ambos os sexos, provindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), os quais foram arbitrariamente distribuídos em diferentes grupos experimentais.

Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno e mantidos na Sala do Laboratório de Fisiologia Experimental da UFSM para se adaptarem as condições locais 72 horas antes do início do experimento. A temperatura ambiental foi mantida entre  $25 \pm 2$  °C e a umidade relativa variou entre 30 a 80%. Realizou-se o controle de ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração *ad libitum*, exceto nas horas de jejum (somente água *ad libitum*) que antecederam o teste.

Após a administração do extrato hidroetanólico, a dieta sólida foi restabelecida dentro de 3-4h. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria sob protocolo 8011210815 (Anexo A), atendendo à lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 e aos Princípios éticos do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 3.7.1.1 Tratamento dos animais

Os animais foram tratados por gavagem com dose única de 2000 mg/kg do extrato hidroetanólico de *J. gossypifolia* (n=3 animais por sexo) para estimativa da ocorrência de mortes. O grupo controle, com 6 animais (3 machos e 3 fêmeas), recebeu apenas água, veículo de ressuspensão do extrato.

### 3.7.2 Teste de toxicidade oral aguda

O protocolo experimental para avaliação da toxicidade oral aguda foi orientado conforme o guia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento 423 (OECD, do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development*) de 2001, sendo um procedimento gradual e reprodutível, com o uso de poucos animais de ambos os sexos por etapa (n=3) e foi usado como método de classificação da toxicidade. Dependendo da mortalidade e/ou estado moribundo dos animais, em média 2-4 etapas já são suficientes para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Os animais moribundos com dor ou mostrando sinais de sofrimento grave e continuado devem ser eutanasiados e são considerados na interpretação dos resultados do teste da mesma forma que os animais que morreram durante o ensaio (OECD 423; 2001).

Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo de um valor exato de  $DL_{50}$ , mas permite a determinação de uma faixa de exposição definida nas quais a letalidade é esperada uma vez que a morte de uma proporção dos animais é ainda o ponto principal de extremidade do presente ensaio (VALADARES, 2006).

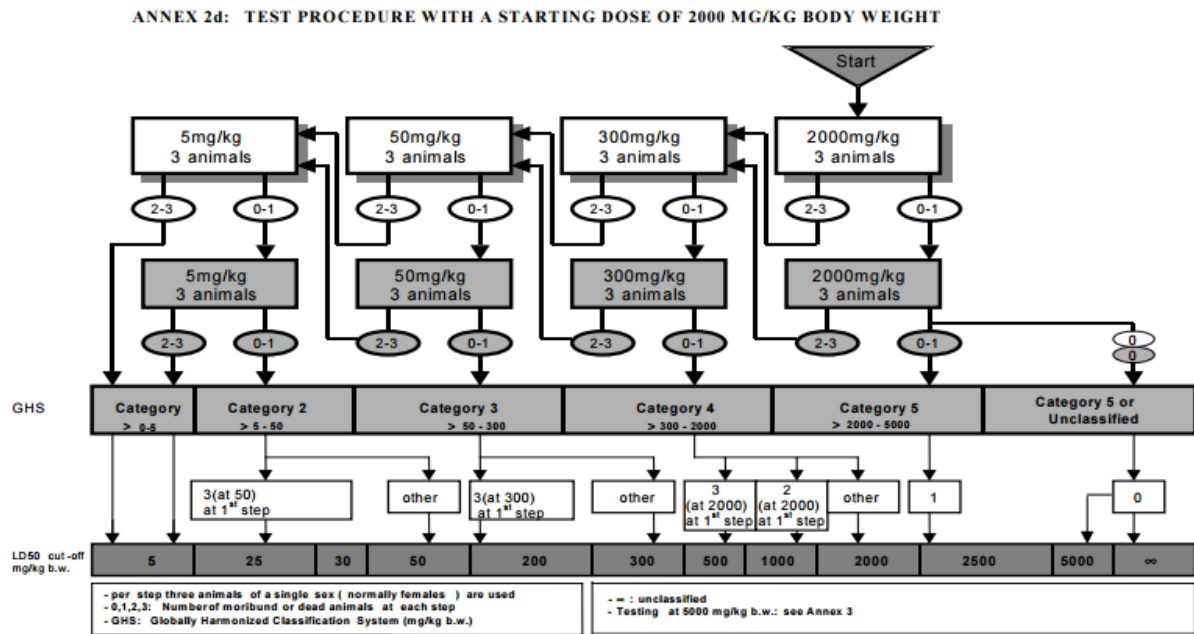
O nível de dose para ser usada como dose de partida foi selecionada a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000mg/Kg de peso corporal. A dose inicial deve ser a que tem maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados (OECD 423, 2001). A Figura 23 descreve o procedimento que deve ser seguido para a dose inicial de 2000mg/Kg.



Figura 23 – Procedimento de teste com uma dose inicial de 2000 mg/Kg de peso corporal

OECD/OCDE

423



Fonte: (OECD 423, 2001).

Sendo a dose escolhida de 2000mg/Kg, como demonstrado na figura acima, e ocorrendo de 2 a 3 mortes ou a observação de sinais clínicos alterados, o protocolo da OECD 423 descreve doses decrescentes a serem administradas em um novo experimento, sendo a dose de 300mg/Kg a próxima a ser selecionada. Não ocorrendo mortes ou sinais de toxicidade na dose de 2000 mg/Kg, a substância é classificada como de toxicidade baixa, pertencendo a categoria 5 com DL<sub>50</sub> estimada de 2500mg/Kg.

Os animais foram observados individualmente após a administração da substância, pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e diariamente a partir daí, por um total de 14 dias. As observações incluíram tremores, convulsões, contorções abdominais, locomoção, salivação, diarreia e letargia. O peso corporal dos animais e o consumo de alimento foi monitorado diariamente durante o período de estudo. Ao fim do período de 14 dias os animais foram submetidos a um rápido jejum de 8 horas e então foram eutanasiados, utilizando tiopental intraperitoneal, como anestésico. O sangue foi coletado por punção

cardíaca em dois tubos: Um com anticoagulante, ácido etilendiaminotetracético (EDTA, do inglês *ethylenediamine-tetraacetate*) e o outro sem nenhum aditivo. O sangue sem anticoagulante foi deixado coagular antes da centrifugação (4000rpm por 10 min) para a obtenção do soro, o qual foi utilizado para a avaliação da glicose, colesterol total, uréia, creatinina e as enzimas indicativas dos efeitos hepatocelulares (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)). O sangue com anticoagulante foi analisado imediatamente para os parâmetros hematológicos: contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas, proteínas plasmáticas e a contagem de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos.

#### *3.7.2.1 Análise estatística*

As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, muitas plantas são utilizadas para uso doméstico como medicamento. Várias destas plantas ainda são inexploradas e precisam ser investigadas através de pesquisa para o uso como novos medicamentos. As plantas medicinais representam as maiores fontes de agentes terapêuticos, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos, existindo compostos fitoquímicos encontrados em apenas uma espécie ou gênero, ou em grupos taxonomicamente relacionados (MAZID et al., 2011). *Jatropha gossypifolia* L. apresenta um importante potencial para a geração de produtos farmacológicos e/ou biotecnológicos, com base em utilizações populares e em estudos biológicos.

Vários estudos realizados nas últimas décadas, através de técnicas diversas como cromatografia, espectroscopia, ressonância magnética nuclear, entre outras, têm contribuído significativamente para identificação qualitativa e quantitativa da diversificada composição química de *J. gossypifolia* e conseqüentemente, para a compreensão dos efeitos biológicos dessa espécie (MARIZ et al., 2010). No entanto, os principais compostos bioativos desta espécie não são totalmente elucidados (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Neste contexto da caracterização de fitocompostos, uma das ferramentas que tem se destacado é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A técnica de LC-MS (do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) é capaz de conferir a alta seletividade exigida para a análise de matrizes complexas, tais como as matrizes vegetais. Ademais, a adoção da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) permite o aumento da eficiência das separações ao passo que os tempos de análise podem ser consideravelmente reduzidos. Somado a isso, a espectrometria de massas sequencial com analisadores do tipo triplo quadrupolo constitui uma poderosa ferramenta de quantificação (GROSS, 2011).

A concentração de metabólitos secundários depende de alguns fatores, tais como técnicas de cultivo, cultivar, as condições de crescimento, maturação, processamento e armazenamento. Alguns fatores podem aumentar a sua presença, como o stress, a radiação UV, infecção por patógenos e parasitas, lesões, poluição do ar e exposição a temperaturas extremas (BARCIA et al., 2014; ROCKENBACH et al., 2011). Este trabalho conduziu um estudo fitoquímico considerando a infusão

como uma forma de extração, solvente com maior uso popular, caracterizando a composição química deste extrato e comparando com o extrato hidroetanólico que é um dos solventes mais utilizados no trabalho científico. Desta forma, contribuindo para a identificação e quantificação de componentes polares nesta espécie.

Existem poucos estudos que aplicam água como solvente de extração dos constituintes de *J. gossypifolia*, mas as pessoas utilizam este solvente quando ocupam esta planta para fins medicinais. Assim, existem poucos compostos polares identificados como taninos e flavonóides. Normalmente, os solventes apolares são usados, o que, devido às suas características, contribui para a caracterização de compostos não-polares, tais como terpenos. Mono, di e triterpenos estão amplamente presentes no gênero *Jatropha* (FELIX-SILVA et al., 2014).

#### 4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS DE *JATROPHA GOSSYPIIFOLIA* L.

O extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia*, obtido na primeira, segunda e terceira safras, resultou em um resíduo seco de coloração marrom-escuro com rendimento de 4,34%, 2,68% e 14,24%, respectivamente.

O extrato hidroetanólico dos frutos, apresentou-se como um resíduo marrom-claro com rendimento de 10,15%.

Esses resultados evidenciaram valores diferentes do encontrado por Mariz (2007), que obteve um rendimento de 7,9% para o extrato obtido por maceração das folhas de *J. gossypifolia*, coletadas no período entre junho e agosto.

#### 4.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

O método cromatográfico aplicado neste estudo foi desenvolvido por Faccin e colaboradores (2016), tendo por objetivo a determinação e quantificação dos constituintes fenólicos de *J. gossypifolia*. Considerando que o uso tradicional desta planta se dá por meio do consumo de chás, foram feitas infusões dos materiais vegetais para elucidar os compostos potencialmente bioativos extraídos por esse método. Na hipótese de extrair o maior número de compostos fenólicos, também foram feitos extratos hidroetanólicos por maceração (item 3.3). Uma vez que os extratos da planta estudada não é isento de compostos fenólicos (não disponibilidade de amostras brancas) e que apresentaram consideráveis efeitos de

supressão iônica por UHPLC-ESI-MS/MS, as quantificações dos extratos analisados foram realizadas pelo método de adição de padrão.

Os compostos fenólicos têm grande distribuição entre os seres vivos, tanto em plantas como em microrganismos e estão entre as classes de compostos que têm ampla faixa de estruturas. O elemento estrutural que os caracteriza é um núcleo de benzeno com pelo menos um hidrogênio substituído por um grupo hidroxila, encontrado na forma livre ou como parte de uma outra função, tal como, por exemplo, éter, éster, glicosídeos. Portanto, exibem solubilidade em água e solventes orgânicos polares. As classes de compostos fenólicos abordados neste estudo foram alguns derivados de ácido benzóico e ácido hidroxicinâmico, flavonóis, flavanóis, flavonas, cumarinas e estilbenos.

As figuras 24 a 35 apresentam os cromatogramas obtidos para análise da infusão (folhas) e extrato hidroetanólico (folhas e frutos) para as diferentes safras de *J. gossypifolia*, ilustrando a separação cromatográfica destes extratos.

Figura 24 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), da infusão das folhas de *J. gossypifolia* (1ª safra)

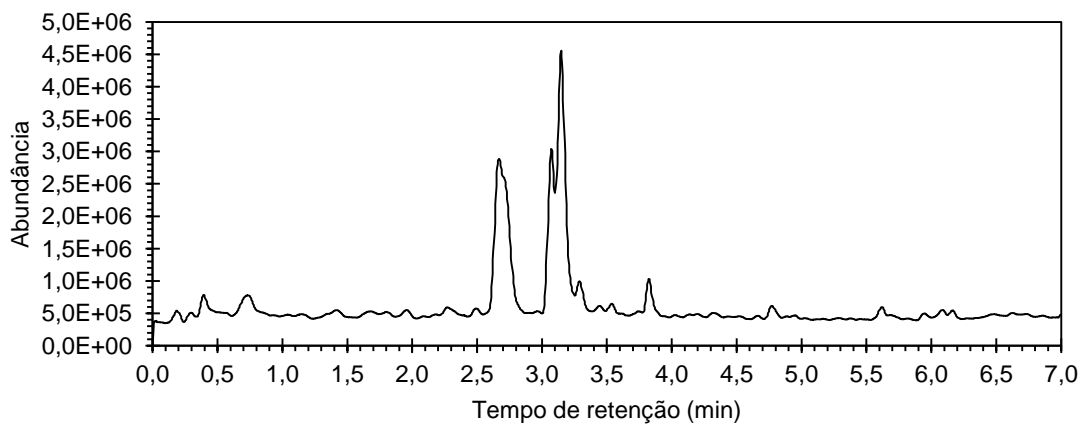
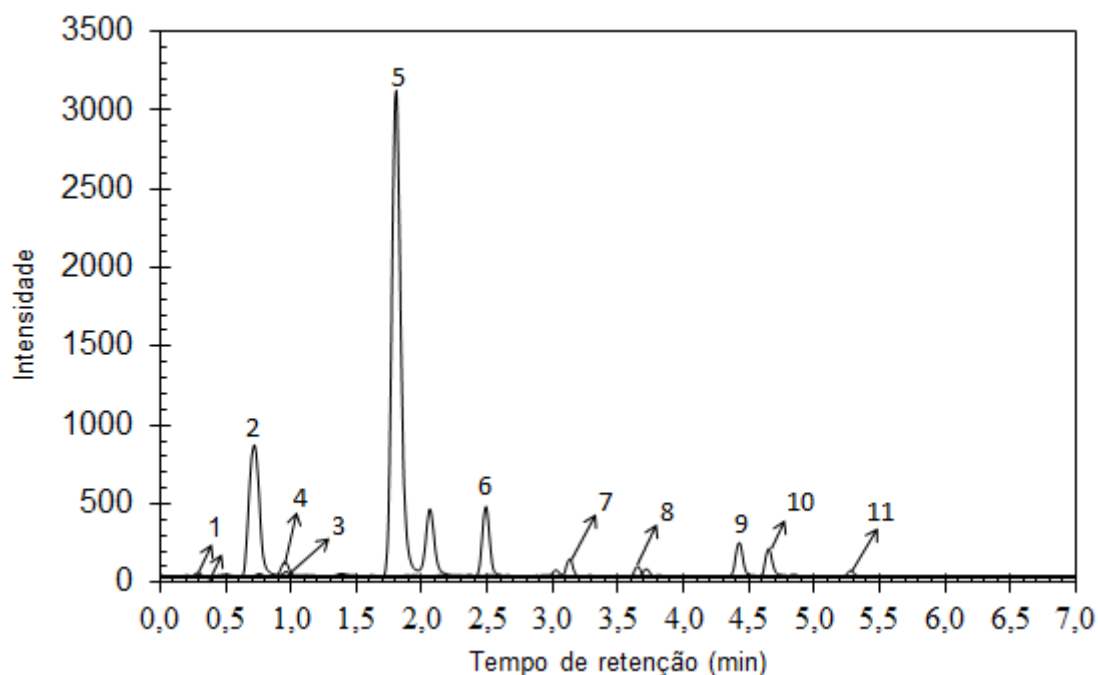


Figura 25 – Cromatograma obtido para a análise da infusão das folhas de *J. gossypifolia* (1ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Coluna: Zorbax SB C18 2,1x50 mm(1,8 $\mu$ m). O gradiente de eluição foi composto por ácido acético a 0,1% em água (A) e acetonitrila (B) como fase móvel a uma taxa de fluxo constante (0,8 ml/min) de acordo com o seguinte programa de eluição: 8,0% B (0,00-10 min); 8,0-25,8% B (0,10-3,45 min); 25,8-54,0% B (3,45-6,90 min); 54,0-100,0% B (6,90-7,00 min); e 100,0% B (7,00-9,00 min). Compostos fenólicos identificados: (1) Ácido gálico, (2) Catequina, (3) Ácido vanílico, (4) Ácido cafeico, (5) Ácido *p*-cumárico, (6) Ácido ferúlico, (7) Rutina, (8) Quercitrina, (9) Ácido *trans*-cinâmico, (10) Luteolina, (11) Apigenina.

Figura 26 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), da infusão das folhas de *J. gossypifolia* (2ª safra)

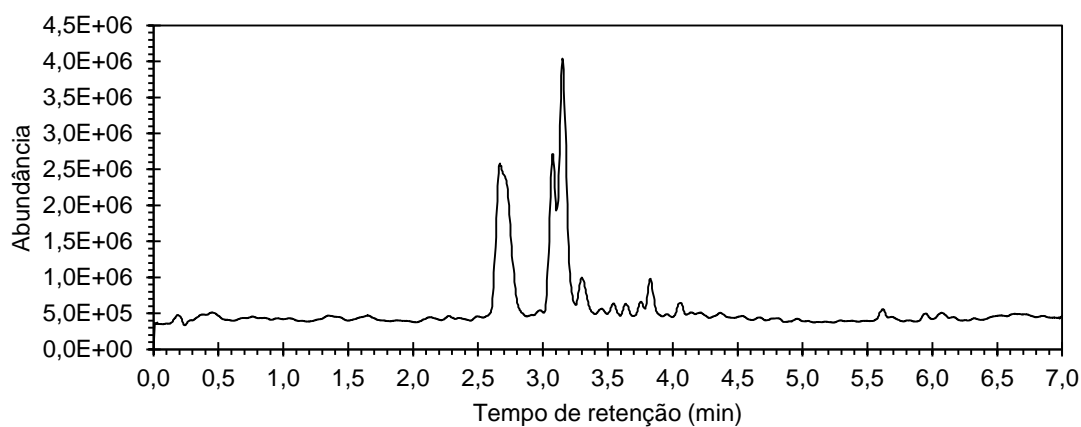
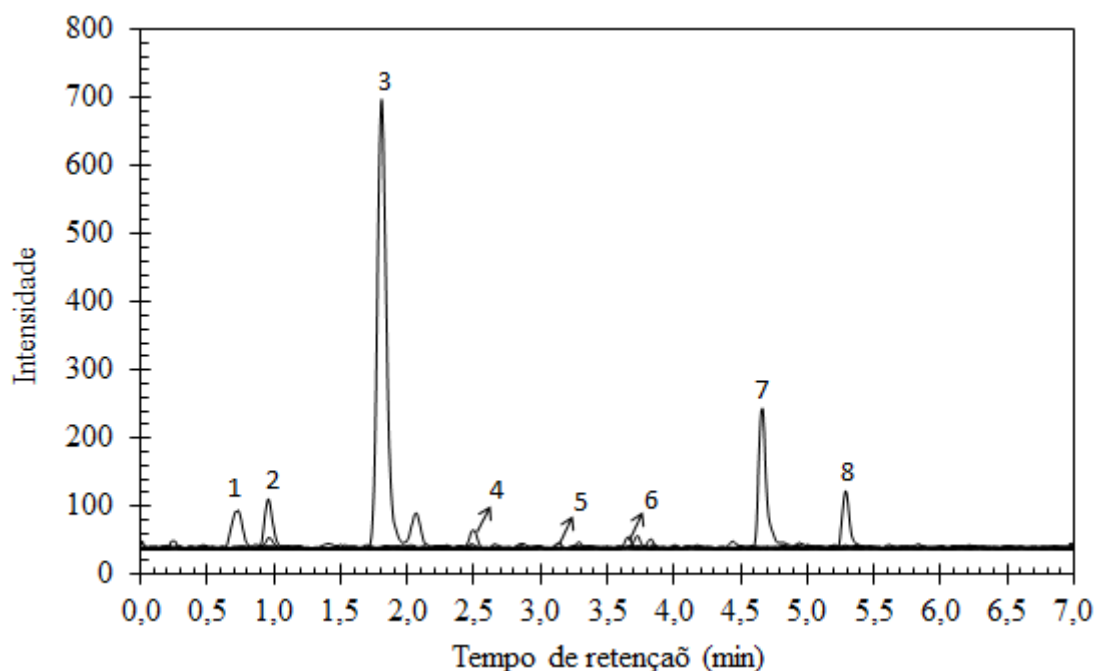


Figura 27 – Cromatograma obtido para a análise da infusão das folhas de *J. gossypifolia* (2ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Compostos fenólicos identificados: (1) Catequina, (2) Ácido vanílico, (3) Ácido *p*-cumárico, (4) Ácido ferúlico, (5) Rutina, (6) Quercitrina, (7) Luteolina, (8) Apigenina.

Figura 28 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (1ª safra)

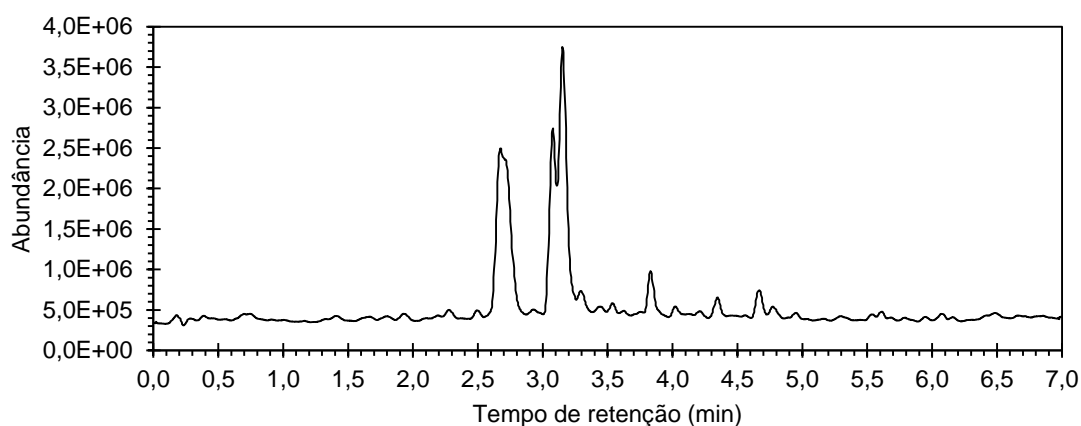
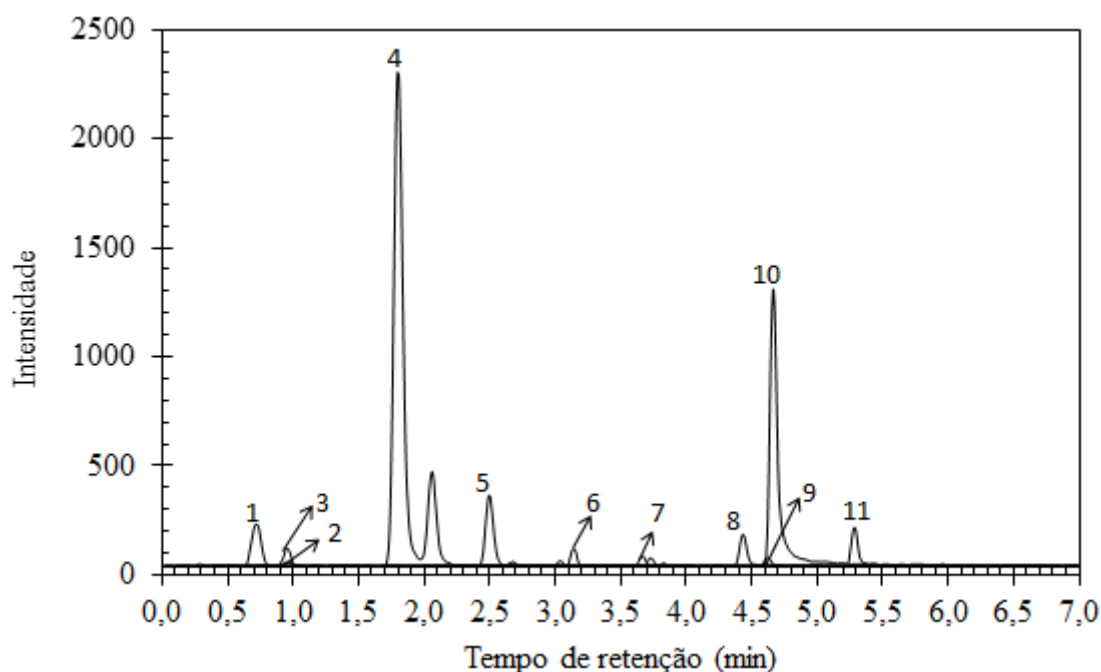


Figura 29 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (1ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Compostos fenólicos identificados: (1) Catequina, (2) Ácido vanílico, (3) Ácido cafeico, (4) Ácido *p*-cumárico, (5) Ácido ferulico, (6) Rutina, (7) Quercitrina, (8) Ácido *trans*-cinâmico, (9) Quercetina, (10) Luteolina, (11) Apigenina.

Figura 30 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (2ª safra)

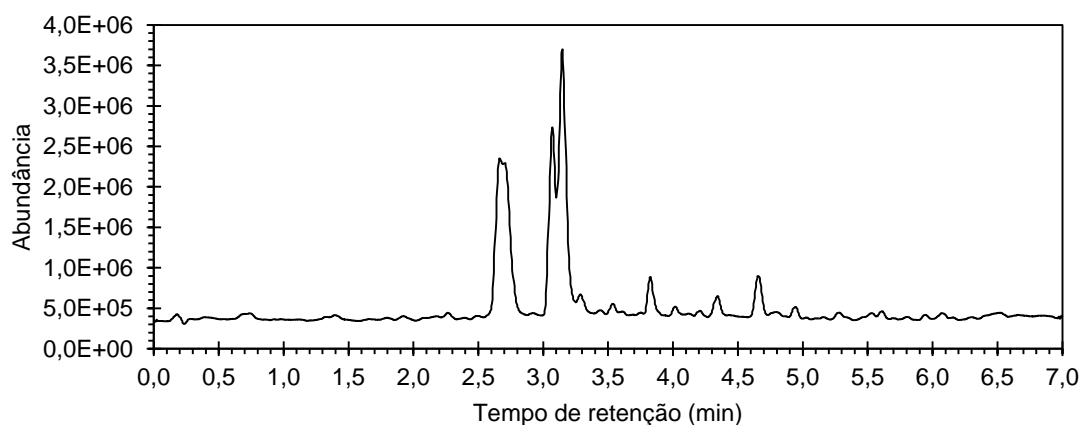
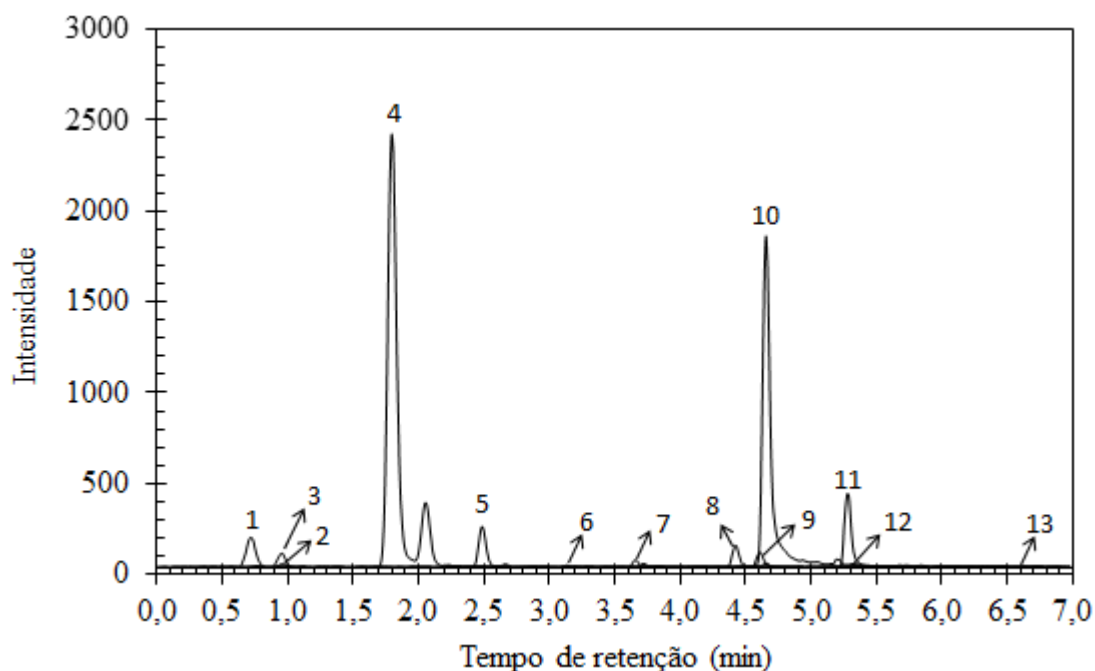




Figura 31 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (2ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Compostos fenólicos identificados: (1) Catequina, (2) Ácido vanílico, (3) Ácido cafeico, (4) Ácido *p*-cumárico, (5) Ácido ferulico, (6) Rutina, (7) Quercitrina, (8) Ácido *trans*-cinâmico, (9) Quercetina, (10) Luteolina, (11) Apigenina, (12) Canferol, (13) Crisina.

Figura 32 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (3ª safra)

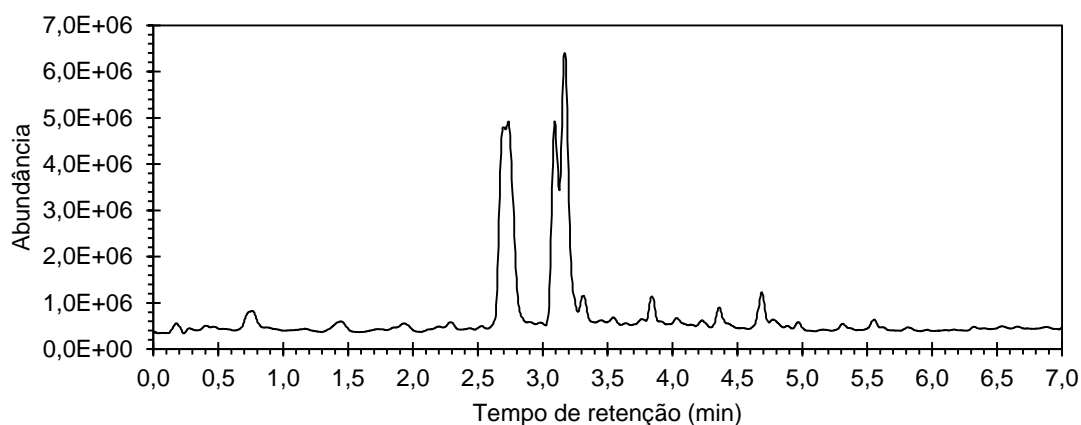
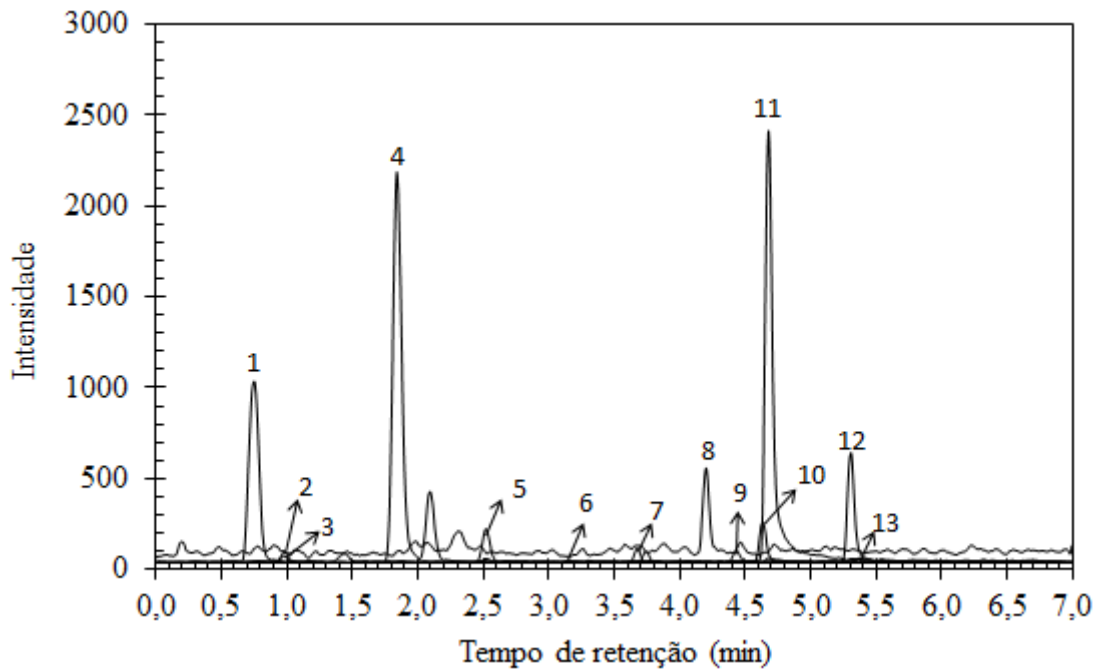


Figura 33 – Cromatograma obtido para a análise do EHE das folhas de *J. gossypifolia* (3ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Compostos fenólicos identificados: (1) Catequina, (2) Ácido vanílico, (3) Ácido cafeico, (4) Ácido *p*-cumárico, (5) Ácido ferulico, (6) Rutina, (7) Quercitrina, (8) 3-acetilcumarina, (9) Ácido *trans*-cinâmico, (10) Quercetina, (11) Luteolina, (12) Apigenina, (13) Canferol.

Figura 34 – Cromatograma de íons totais (TIC), obtido no modo de aquisição de varredura ( $m/z$  135-620, tempo de leitura igual 250 ms), do EHE dos frutos de *J. gossypifolia* (3ª safra)

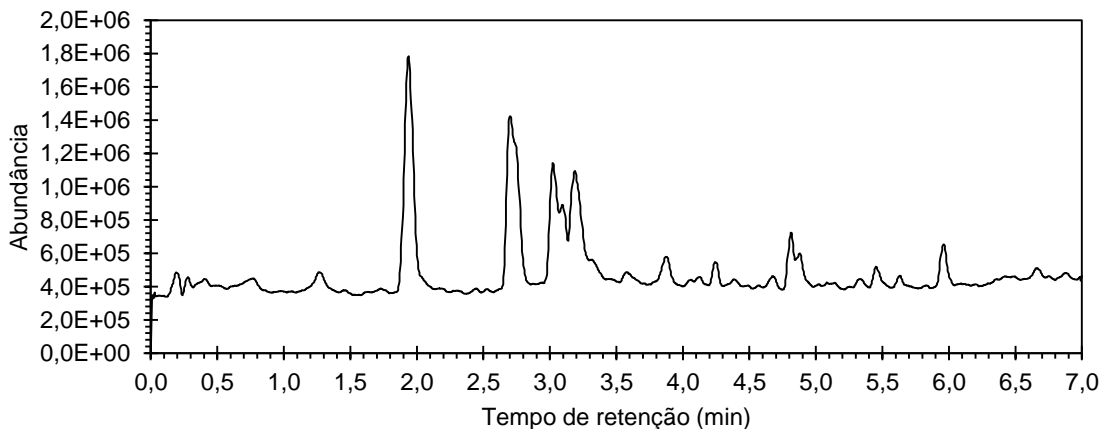
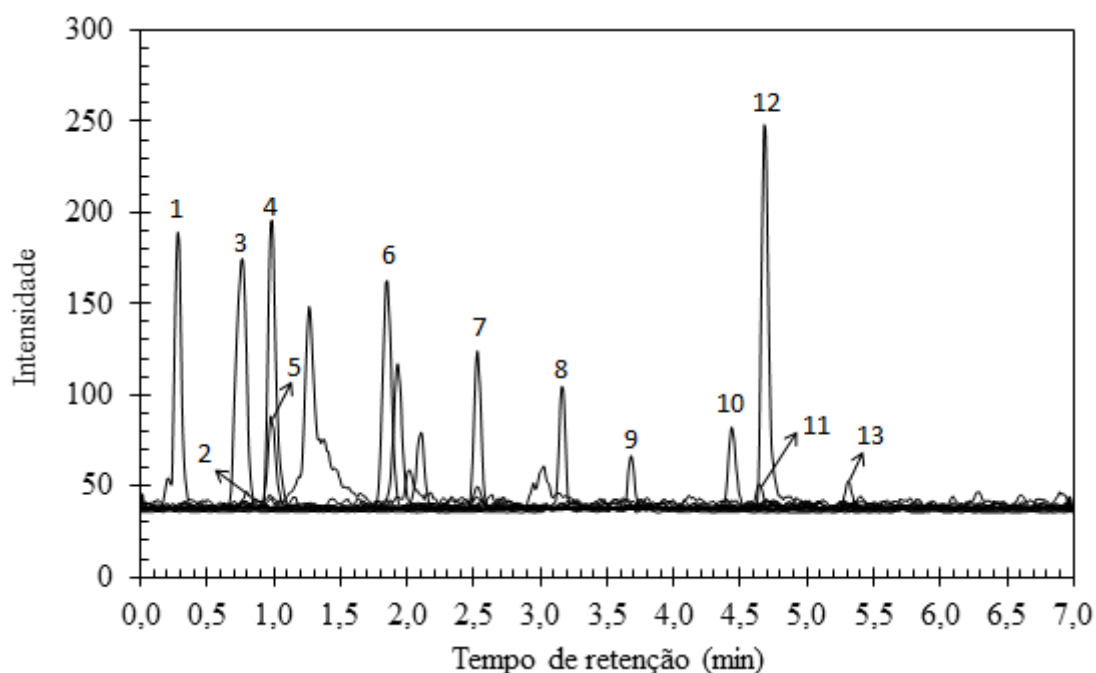


Figura 35 – Cromatograma obtido para a análise do EHE dos frutos de *J. gossypifolia* (3ª safra) por UHPLC-ESI-MS/MS em modo MRM



Compostos fenólicos identificados: (1) Ácido gálico, (2) Ácido clorogênico, (3) Catequina, (4) Ácido vanílico, (5) Ácido cafeico, (6) Ácido *p*-cumárico, (7) Ácido ferúlico, (8) Rutina, (9) Quercitrina, (10) Ácido *trans*-cinâmico, (11) Quercetina, (12) Luteolina, (13) Apigenina.

A Tabela 7 apresenta as concentrações dos compostos fenólicos nas espécie *J. gossypifolia* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS. Os extratos analisados foram infusão das folhas e extrato hidroetanólico das folhas e frutos, respectivamente. Valores são expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de planta seguido pelo desvio padrão em relação a concentração ( $n=3$ ).

Tabela 7 – Concentrações dos compostos fenólicos em *J. gossypifolia* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS usando infusão e extrato hidroetanólico (EHE). Valores são expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de planta seguido pelo desvio padrão em relação a concentração (n=3)

Composto	Infusão (folhas)		EHE (folhas)			EHE(frutos)
	1ª safra	2ª safra	1ª safra	2ª safra	3ª safra	3ª safra
Ácido gálico	0,4 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,2 ± 0,8
Ácido clorogênico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,3 ± 0,6
(+)-catequina	402,6 ± 22,9	27,5±1,1	78,1 ± 2,7	21,9 ± 0,6	360,9 ± 3,2	45,8 ± 2
Ácido vanílico	6,4 ± 1,2	15,9±2,0	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	6,4 ± 0,9	22,2 ± 0,4
Ácido cafeico	5,2 ± 0,5	n.d.	3,4 ± 0,1	1,6 ± 0,04	6,6 ± 0,3	3,4 ± 0,4
6-hidroxycumarina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumarico	117,8 ± 7,3	28,6±0,7	92,5 ± 4,0	26,3 ± 0,3	89,6 ± 0,9	3,6 ± 0,3
Ácido ferulico	50,5 ± 1,3	3,2 ± 0,3	27,2 ± 0,4	6,5 ± 0,1	39,5 ± 0,2	9,1 ± 0,1
Rutina	8,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2	4,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2
4-Hidroxycumarina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido rosmarinico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercitrina	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,02	0,2 ± 0,01	1,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01
Miricetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fisetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-acetilcumarina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28,1 ± 1,6	-
Ácido <i>trans</i> -cinamico	15,7 ± 0,5	n.d.	6,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	4,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3
Quercetina	n.d.	n.d.	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	16,4 ± 0,7	0,7 ± 0,2
Luteolina	9,7 ± 0,3	14,9 ± 0,4	80,9 ± 3,7	13,4 ± 0,4	81,1 ± 1,8	5,7 ± 0,1
Apigenina	2,2 ± 0,2	5,6 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,9 ± 0,2	32,3 ± 1,0	0,6 ± 0,1
Canferol	n.d.	n.d.	n.d.	1,2 ± 0,2	10,7 ± 1,3	n.d.
3,6-dihidroxi-flavona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Crisina	n.d.	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,05	n.d.	n.d.
Galangina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

nd = não detectado.

A apigenina já havia sido encontrada em extratos etanólicos de caules e folhas de *J. gossypifolia* (MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013). O ácido ferúlico foi encontrado nas suas raízes, após extração com acetato de etila (MARIZ et al., 2010).

Para os outros compostos fenólicos analisados não foram encontrados dados sobre a presença na espécie estudada. Até onde sabemos, os dados aqui publicados revelam-se sem precedentes na literatura.

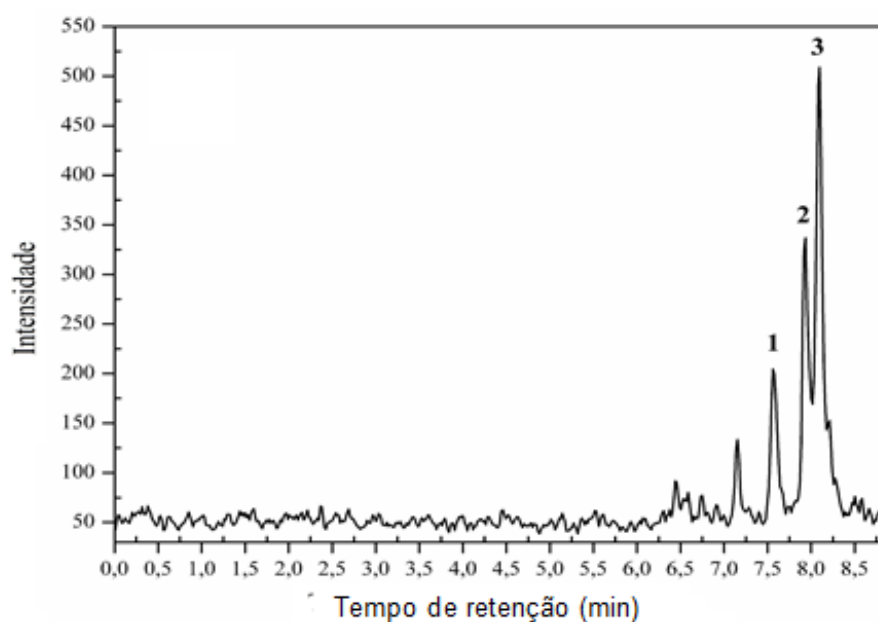
### 4.3 ANÁLISE DOS COMPOSTOS TRITERPÊNICOS

O método cromatográfico foi desenvolvido por Gobbo e colaboradores (2016), tendo por objetivo a determinação e quantificação dos constituintes terpênicos da espécie em estudo.

Os terpenos são os principais compostos isolados do gênero *Jatropha* e também de diferentes partes de *J. gossypifolia*. Pertencem a uma classe de metabolitos secundários e estão amplamente presentes no reino vegetal, especialmente em plantas que possuem abundante clorofila (GOBBO et al., 2016).

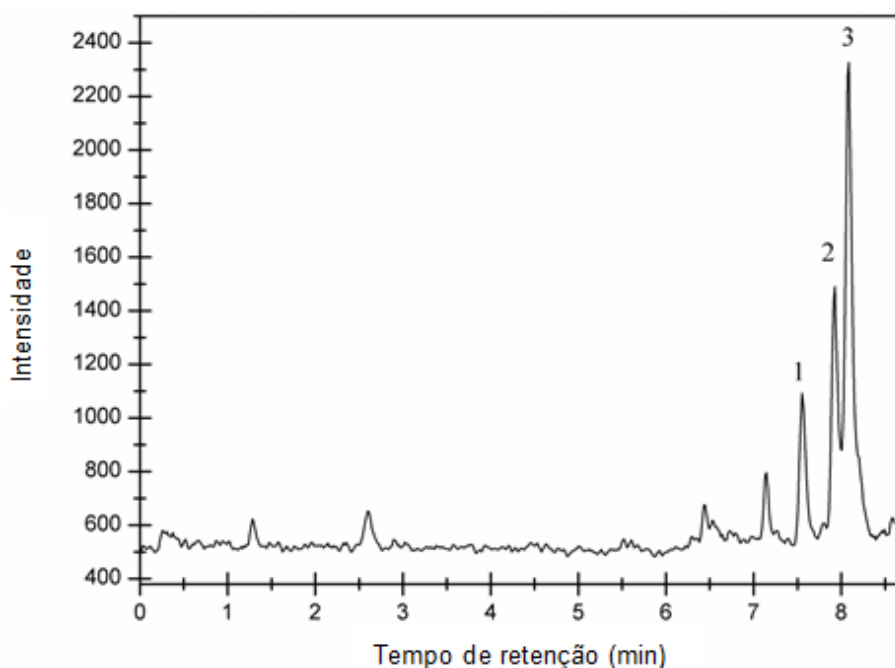
O extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia* (primeira e segunda safras) foi analisado, por UHPLC-APPI-MS/MS em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), para a triagem dos compostos triterpênicos (figura 36 e 37).

Figura 36 – Cromatograma obtido para a análise do extato etanólico das folhas de *J. gossypifolia* (1ª safra) por UHPLC-APPI-MS/MS em modo MRM



Coluna: Zorbax SB C18 2,1x50 mm(1,8 $\mu$ m). Gradiente de eluição da fase móvel: acetonitrila/água (70:30) por 3,5 minutos e 100% de acetonitrila após 4,0 minutos de corrida. O fluxo foi de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> durante os primeiros 3,5 minutos e foi aumentado a um máximo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> em 4 minutos, quando manteve-se esta taxa até o final da corrida de 8,5 minutos. Compostos Triterpênicos identificados: (1) lupeol, (2)  $\beta$ -amirina, (3)  $\alpha$ - amirina.

Figura 37 – Cromatograma obtido para a análise do extato etanólico das folhas de *J. gossypifolia* (2ª safra) por UHPLC-APPI-MS/MS em modo MRM



Compostos Triterpênicos identificados: (1) lupeol, (2)  $\beta$ -amirina, (3)  $\alpha$ -amirina.

Os resultados apresentados indicam a presença de três compostos triterpênicos ( $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol) que podem ser vistos no Tabela 8. As espécies,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol são compostos amplamente encontrados em plantas medicinais de acordo com a literatura (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ et al., 2012).

Tabela 8 – Concentrações de compostos triterpênicos em *J. gossypifolia* determinadas por UHPLC-APPI-MS/MS usando EHE das folhas. Valores são expressos em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de planta seguido pelo desvio padrão em relação a concentração (n=3)

(continua)

Composto	EHE	
	1ª safra	2ª safra
Ácido arjúnico	nd	nd
Ácido maslínico	nd	nd
Ácido betulínico	nd	nd
Ácido ursólico	nd	nd
$\alpha$ -amirina	470,9 $\pm$ 2,3	1267,8 $\pm$ 3,6
$\beta$ -amirina	209,5 $\pm$ 4,9	196,9 $\pm$ 5,4
Campesterol	nd	nd

		(conclusão)
Eritrodiol	nd	nd
Estgmasterol	nd	nd
Friedelina	nd	nd
Lupeol	5,0 ±4,8	46,6 ±3,4
Sitosterol	Nd	nd

nd=não determinado.

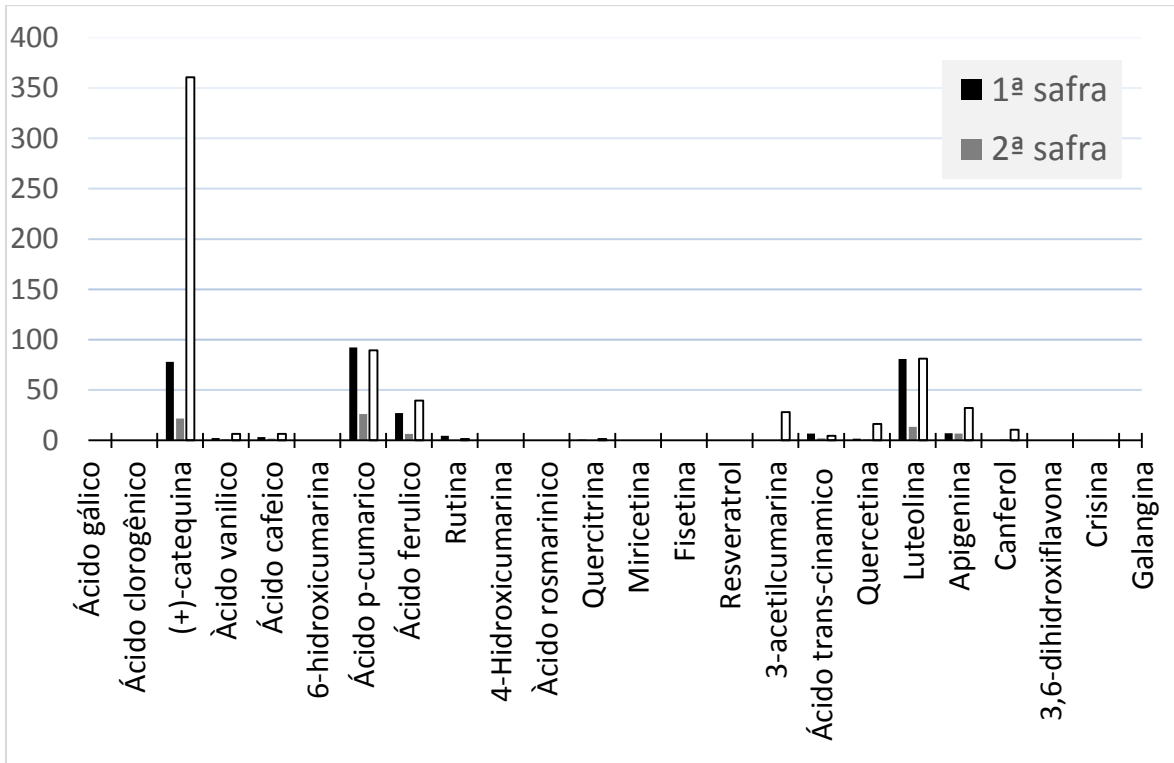
A  $\alpha$ -amirina já foi encontrada nas folhas de *J. gaumeri* (SABANDAR et al., 2013). A  $\beta$ -amirina foi encontrada nas sementes de *J. gossypiifolia*, folhas de *J. gaumeri* e no caule de *J. curcas* (MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013). O  $\beta$ -sitosterol já foi encontrado nas sementes e caule de *J. gossypifolia* (MARIZ et al., 2010).

#### 4.4 VARIAÇÃO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

*J. gossypiifolia* é comumente encontrada vegetando em vários estados brasileiros e em áreas semiáridas se revestem de elevada importância pelas possibilidades de fácil cultivo, adaptação a solos pouco férteis, degradados e pela tolerância à seca (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002). As amostras analisadas são oriundas da região amazônica brasileira, a qual se caracteriza por possuir duas estações do ano bem definidas, regime climático com elevadas temperaturas anuais e regime pluviométrico marcado pela ocorrência de duas estações: verão chuvoso e inverno seco.

Como pode ser visto na Figura 38, a segunda safra, a qual refere-se a estação chuvosa, apresentou menor quantidade de todas substâncias fenólicas analisadas nos extratos hidroetanólicos. Estes resultados, comprovam que a variação sazonal tem influência direta e significativa sobre a quantidade dos compostos nesta espécie vegetal.

Figura 38 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando EHE das folhas de três diferentes coletas da *J. gossypiifolia*. Os valores são dados em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de EHE seco



Os metabólitos secundários representam a interface química entre as plantas e o ambiente circundante, o que torna sua biossíntese frequentemente afetada por condições ambientais. A taxa de produção de metabólitos secundários pode ser coordenada ou alterada por diversos fatores, sendo que os principais são genéticos, sazonalidade, ritmo circadiano, estádios de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica (índice pluviométrico) e de nutrientes, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A época do ano de coleta do material vegetal é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano e influencia no rendimento, composição química e teor dos compostos produzidos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

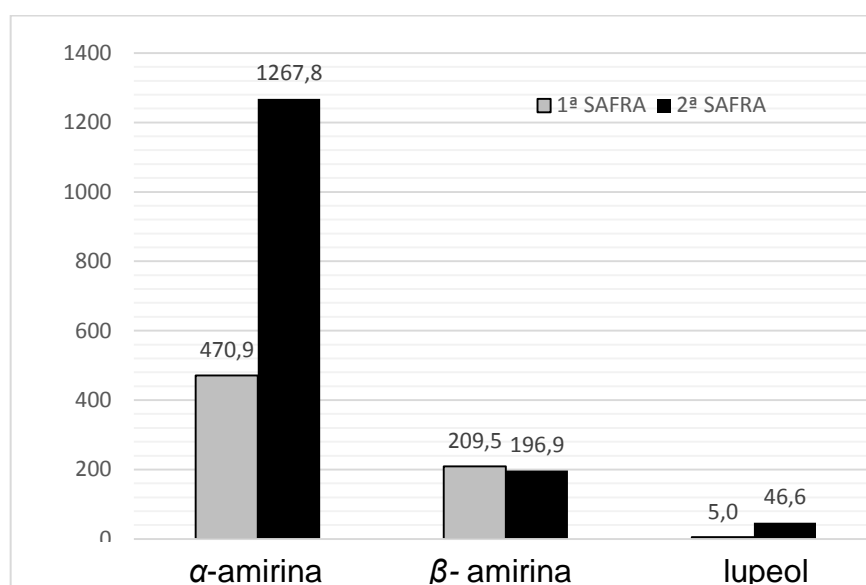
A variação nos teores dos compostos fenólicos de *J. gossypiifolia* pode ser explicada pela fenologia da espécie. A idade e o estágio de desenvolvimento da



planta podem promover variações tanto no teor, como na composição química destes compostos, sendo que tecidos mais velhos geralmente possuem menor taxa biossintética de metabólitos, como é o caso dos ácidos fenólicos e flavonoides. Outro fator é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas por lixiviação (HARTMANN, 1996).

Entretanto, os compostos terpênicos  $\alpha$ -amirina e lupeol apresentaram-se em maior quantidade na segunda safra, que corresponde a época de chuva. Esta variação dos compostos terpênicos identificados na espécie *Jatropha gossypifolia* L., nas duas diferentes safras, pode ser visualizada na Figura 39.

Figura 39 – Variação dos compostos terpênicos quantificados por UHPLC-APPI-MS/MS no EHE das folhas de *J. gossypifolia*, nas duas diferentes safras. Os valores são dados em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de EHE seco



Esta variação pode ser decorrente do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos, podendo levar à menor concentração destes metabólitos por diluição, conseguindo, no entanto, resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

#### 4.5 DEFINIÇÃO DOS MARCADORES ANALÍTICOS DA ESPÉCIE

A determinação de marcadores analíticos para espécies vegetais e a avaliação do perfil cromatográfico destas espécies constituem etapas primordiais no

desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. De acordo com a ANVISA, para o registro de um novo fitoterápico é exigida a elaboração de um relatório técnico do produto a ser comercializado. Tal relatório deve conter um procedimento para o controle de qualidade do material vegetal utilizado e, também, do derivado vegetal produzido e do medicamento acabado. Por sua vez, dentre os itens que devem compor esse procedimento de controle de qualidade estão a análise quantitativa de marcadores e a obtenção do perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica, tanto da droga vegetal, como do derivado vegetal utilizado e do produto acabado (ANVISA, 2014).

A atual legislação brasileira que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos recomenda que os marcadores controlados tenham correlação com o efeito terapêutico da droga vegetal (marcadores ativos) (ANVISA, 2014). Dessa forma, a atribuição de marcadores analíticos inerentes às espécies vegetais também atende aos requisitos e exigências da legislação federal.

Ainda de acordo com a legislação, como complementação ao registro dos medicamentos fitoterápicos, a eficiência dos produtos acabados deve ser constatada por meio da tradicionalidade do uso das espécies vegetais para determinada finalidade, critério esse a ser comprovado por meio de estudos etnofarmacológicos ou etno-orientados.

#### 4.6 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NA ESPÉCIE

É de interesse comum, o conhecimento sobre os compostos químicos presentes na espécie *J. gossypifolia*, em suas diferentes partes, como folhas e frutos, considerando os diversos usos deste gênero. Particularmente em relação ao consumo desta planta pelas comunidades tradicionais e por ser potencial na produção, por exemplo, de ervas medicinais. A Tabela 9 apresenta, de todos os compostos analisados, aqueles que foram identificados e quantificados na espécie *J. gossypifolia*, suas respectivas classes químicas e atividades farmacológicas.

Tabela 9 – Atividade farmacológica dos compostos encontrados

Classificação do composto	Composto	Atividade farmacológica
Ácido Hidroxibenzoico	Ácido vanílico	Anti-helmíntico, antibacteriano, anti-inflamatório e laxativo. <sup>1</sup>
	Ácido gálico	Antiadenovírus, antialérgico, antianafilático, antiasmático, antibronquítico, anti-hepatotóxico, anti-inflamatório, antimutagênico, antisséptico, adstringente, bacteriostático, broncodilatador, hepatoprotetor, imunoestimulante e miorelaxante. <sup>1</sup>
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido caféico	Antiadenoviral, antigripal, antiespasmódico, antihipercolesterolemiantes e fotoproteção. <sup>1</sup>
	Ácido ferúlico	Alelopático, analgésico, antiplaquetário, antialérgico, antibacteriano, antiestrogênico, antihepatotóxico, anti-inflamatório, antimutagênico, antiviral, candidíase, colagogo, colerético, fungicida, hepatoprotetor, inseticida, fotoproteção. <sup>1</sup>
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Alelopático, antioxidante, antihepatotóxico, antiespasmódico e citotóxico. <sup>1</sup>
	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	Antibacteriano, antifúngico e atividade antitumoral. <sup>4</sup>
Cumarina	Ácido clorogênico	Colagogo, hepatoprotetor, antibacteriano e antioxidante. <sup>1</sup>
	3-acetilcumarina	Antioxidante e anti-inflamatório. <sup>1</sup>
Flavona	Apigenina	Antialérgico, antibacteriano, antimutagênico, citotóxico, diurético, estrogênico e hipotensivo. <sup>1</sup>
	Luteolina	Antibacteriano e anti-inflamatório. <sup>1</sup>
	crisina	Antioxidante, anti-inflamatório e ansiolítico. <sup>1</sup>
Flavanol	(+)-catequina	Anticoagulante, antimutagênico, antioxidante, bloqueador dos receptores beta-adrenérgicos e cardioprotetores. <sup>1</sup>
Flavonol	Camferol	Anti-histamínico, antimutagênico, antiespasmódico e colerético. <sup>1</sup>
	Quercetina	Antianafilático, antibacteriano, antimutagênico, antioxidante, antiviral, bradicárdico e citotóxico. <sup>1</sup>
	Quercitrina	Antibacteriano, antihemorrágico, antiherpético, anti-inflamatório, antimutagênico, antiúlcera, colerético, diurético e hipoglicemiante. <sup>1</sup>
	Rutina	Antibacteriano, anticonvulsivante, antidiabético, antihepatotóxico, antiherpético, antihipertensivo, antimalárico, hipocolesterolemiantes, hipotensivo, inseticida, mutagênico e miorelaxante. <sup>1</sup>
Triterpeno	Alfa-amirina	Antinociceptivo e anti-inflamatório. <sup>2</sup>
	Beta-amirina	Antinociceptivo e anti-inflamatório. <sup>2</sup>
	Lupeol	Anti-artrite, anti-inflamatório, antimalárico, antitumoral e hepatoprotetor. <sup>3</sup>

<sup>1</sup>DUKE, 2016; <sup>2</sup>SILVA et al., 2011; <sup>3</sup>GALLO; SARACHINE, 2009; <sup>4</sup>GRAVINA et al., 2011.

Os maiores teores dos compostos fenólicos analisados na espécie foram para catequina, ácido *p*-cumárico e luteolina. A partir destes achados a planta teria um bom potencial para apresentar as seguintes atividades farmacológicas: anticoagulante, antimutagênico, antioxidante, bloqueador dos receptores

beta-adrenérgicos, cardiotônicos, alelopático, antihepatotóxico, antiespasmódico, citotóxico, antibacteriano e anti-inflamatório.

Na literatura, pode-se salientar que o extrato hidroetanólico de *J. gossypiifolia* induziu hipotensão, por via oral, em ratos normotensos conscientes e atividade vasorrelaxante (ABREU et al., 2003). Esta atividade pode se dar devido a presença de catequina em grande quantidade, a qual exerce atividade bloqueadora dos receptores beta-adrenérgicos e cardiotônicos. A apigenina também apresenta efeito hipotensor. A presença dos compostos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol permite inferir que esta espécie pode ser potencial anti-inflamatória.

A utilização de *J. gossypiifolia* como planta medicinal demonstra que esta apresenta um grande potencial como fonte de moléculas bioativas com relevância farmacológica. Contudo, é necessário conhecer os compostos realmente importantes e se o isolamento e purificação destes podem eliminar os efeitos tóxicos ou reduzir o valor medicinal da espécie, pois só desta forma é possível a utilização dos mesmos na produção de medicamentos ou de produtos bioativos naturais para a sua aplicação em medicina alternativa e complementar (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Por fim, muitos outros analitos não abordados neste estudo foram encontrados nos extratos de *J. gossypiifolia* a partir da interpretação dos *fingerprints* obtidos cromatograficamente em modo *full scan* (Figura 24, 26, 28, 30, 32 e 34). Alguns destes compostos apresentaram inclusive uma maior intensidade quando comparado aos analitos estudados, podendo estar associado a uma maior concentração e conseqüente maior relevância farmacológica.

Assim, fica evidente a necessidade do método de “*screening*” sem analito-alvo, associado a estudos de atividades farmacológicas, permitindo assim determinar efetivamente os marcadores ativos para esta espécie.

#### 4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade anti-radicalar foi testada frente ao radical ânion superóxido, hidroxil e peroxil, utilizando infusão, extrato hidroetanólico e frações acetato de etila e butanol, respectivamente. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, os extratos de *J. gossypiifolia* apresentaram atividade antioxidante *in vitro* contra diferentes espécies reativas de oxigênio em três níveis de concentração.

Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos das folhas de *J. gossypifolia* obtidos pelos métodos de infusão, maceração e pelas frações obtidas a partir do EHE: Acetato de etila e butanol, frente aos radicais superóxido, hidroxil e peroxil

Extrato	%	Atividade Antioxidante (%)		
		Radical		
		Superóxido	Hidroxil	Peroxil
Infusão	0,1	8,4 ±3,6	19,9 ±6,2	84,8 ±5,8
	1,0	66,8 ±0,2	56,8 ±0,7	99,7 ±13,9
	2,0	22,2 ±0,4	11,3 ±4,4	38,0 ±4,8
EHE	0,1	90,4 ±1,9	96,6 ±3,0	51,3 ±5,2
	1,0	APO	87,3 ±4,7	74,7 ±6,3
	2,0	APO	63,1 ±7,3	83,8 ±3,3
Fração Acetato de etila	0,1	74,2 ±0,1	72,3 ±5,1	47,4 ±10,3
	1,0	APO	84,8 ±8,5	69,2 ±13,6
	2,0	APO	86,5 ±3,1	95,0 ±4,4
Fração Butanol	0,1	89,7 ±1,3	53,2 ±5,3	78,4 ±4,5
	1,0	APO	29,6 ±6,6	72,4 ±4,3
	2,0	APO	11,8 ±1,5	92,0 ±3,8

APO = atividade pro-oxidante.

A atividade antioxidante observada para as espécies reativas de oxigênio não foi igual para todas as amostras, nas diferentes concentrações, uma vez que estes radicais têm o tempo de meia-vida e potencial de reduções diferentes entre si, e diferentes concentrações dos extratos significam alterações na concentração de espécies antioxidantes encontradas na planta. A determinação quantitativa por UHPLC-ESI-MS/MS mostrou que os principais constituintes desta planta, são os antioxidantes: flavonóides e compostos fenólicos.

Os extratos obtidos por infusão e maceração de *J. gossypifolia* apresentam ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, catequina, quercitrina e luteolina, entre outros compostos fenólicos (Tabela 7), que podem estar associados com os resultados da atividade antioxidante frente aos radicais estudados. O potencial antioxidante mais elevado foi encontrado frente ao radical peroxil, provavelmente por causa da sua maior estabilidade quando comparado com os outros radicais.

A infusão apresentou potencial antioxidante frente todas as espécies de oxigênio estudadas. Todavia, o extrato hidroetanólico e as frações acetato de etila e butanol apresentaram atividade pró-oxidante frente ao radical superóxido. Isto pode ser explicado pela propensão de um flavonóide em inibir a propagação de radicais livres, regulado pela sua estrutura química e efeitos de ressonância. Vários grupos hidroxila conferem sobre a molécula significativa atividade antioxidante, quelante e pró-oxidante (HEIM et al., 2002). Neste contexto, observou-se que a atividade pro-oxidante frente ao radical superóxido foi para as frações de maior concentração (1,0 e 2,0% m/v). Mostrando ser diretamente proporcional ao número de grupos hidroxila dos flavonoides encontrados nesses extratos.

Assim, altas concentrações de flavonóides e compostos fenólicos podem apresentar atividade pro-oxidante *in vitro* (CAO et al., 1997). Desta forma, sugere-se um estudo de toxicidade destes extratos em diferentes concentrações para uma melhor compreensão dos efeitos de *J. gossypiifolia in vitro* e *in vivo*.

#### 4.8 TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

Não foram observados sinais de toxicidade, assim como mudanças comportamentais, alterações na ingestão alimentar e modificações no ganho de peso corporal em ratos de ambos os sexos.

A avaliação da toxicidade oral aguda em ratos machos e fêmeas, depois da administração de 2000mg/Kg de *J. gossypiifolia*, não demonstrou mortalidade. Em acordo com a determinação da OECD 423, o EHE das folhas de *J. gossypiifolia* deveria estar incluído na categoria 5 e com DL<sub>50</sub> estimada entre 2000-5000mg/Kg, a qual é caracterizada como de baixa toxicidade.

A dose de 2000mg/Kg é cerca de 8 vezes maior que a maior dose experimental hipotensora nos estudos de Abreu e colaboradores (2003), que foi de 250 mg/Kg, sugerindo uma possível indicação da relativa segurança de administração a curto prazo da planta.

Em estudos anteriores MARIZ (2007) constatou que o extrato etanólico de *J. gossypiifolia* foi letal apenas para alguns animais machos e nas duas maiores doses empregadas: 4,0 g/Kg e 5 g/Kg, o que está bem acima do limite de testagem para a DL<sub>50</sub> estabelecido como 2,0 g/Kg, segundo a maioria dos autores.

Em conformidade, Gasperi-Campani e colaboradores (1980), verificaram que o extrato etéreo de sementes de *J. gossypiifolia* apresentou baixa toxicidade demonstrada pela fraca inibição da síntese protéica em reticulócitos de coelho. Neste aspecto, outros estudos de avaliação de toxicidade *in vitro*, usando-se larva de camarão (*Artemia salina* Leach) e testando extratos de 41 espécies de Euforbiáceas, evidenciaram que os extratos etanólico e metanólico de *J. gossypiifolia* apresentaram baixa toxicidade indicada por uma concentração letal mediana (CL50) superior a 1.000 µg/mL, para a referida espécie animal (AWACHIE; UGNU, 1997).

Não foram observadas alterações bioquímicas estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ , ANOVA) para os níveis de colesterol total, ureia (machos), creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (fêmeas), nos animais tratados, em relação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros bioquímicos obtidos de soro de ratos Wistar, tratados com EHE de *J. gossypiifolia* (2000 mg/Kg) por via oral

Sexo	Parâmetro	Grupo de estudo		Valores de referência*
		Controle	2000 mg/kg	
Macho	Glicose (mg/dL)	192,02±57,52	212,46±42,26	72-193
	Colesterol total (mg/dL)	69,00 ± 5,72	65,50 ± 8,11	45-76
	Uréia (mg/dL)	53,40 ± 6,70	56,40 ± 3,59	26-58
	Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,06	0,52 ± 0,04	0,24-1,20
	AST (U/L)	69,05 ± 5,83	73,32 ± 9,45	61-210
	ALT (U/L)	44,33 ± 2,65	58,00 ± 7,34	38-82
Fêmea	Glicose (mg/dL)	195,40±40,77	214,92±44,59	53-172
	Colesterol total (mg/dL)	72,16 ± 5,23	75,66 ± 4,92	54-96
	Uréia (mg/dL)	51,01 ± 5,10	52,36 ± 8,14	24-49
	Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,00	0,51 ± 0,04	0,28-1,10
	AST (U/L)	70,46 ± 3,70	68,97 ± 9,26	51-211
	ALT (U/L)	43,83 ± 2,72	46,00 ± 6,78	32-63

\*Valores de referência de acordo com MELO et al., 2012.

Apenas a ALT sofreu alteração (31%), estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) em ratos machos tratados ( $58,00 \pm 7,34$ ) com o extrato hidroetanólico da

planta quando comparado ao grupo controle ( $44,33 \pm 2,65$ ), porém os valores encontraram-se dentro da faixa de referência (38-82), o que não tem relevância em termos clínicos.

Os valores de glicose situaram-se 0,51% abaixo do valor máximo de referência (72-193) para machos controle ( $192,02 \pm 57,52$ ) e 13,6% acima do valor de referência (53-172) para as fêmeas controle ( $195,40 \pm 40,77$ ). Isto pode ocorrer devido a fatores extrínsecos ou intrínsecos, dependendo das condições a que os animais são submetidos. Aumento nos níveis sanguíneos de glicose, para ambos os sexos, não podem ser justificados pela ação do extrato, pois os controles já tinham esses valores alterados. Mesmo assim, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle, pois o desvio padrão foi relativamente alto para ambos e mostrou não ter importância clínica, uma vez que encontram-se dentro da faixa de referência, segundo Melo e colaboradores (2012).

Os níveis de uréia para as fêmeas, tanto controle ( $51,01 \pm 5,10$ ) como tratadas ( $52,36 \pm 8,14$ ) estavam aumentados 4,1% e 6,85%, respectivamente. Não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e sem relevância clínica, considerando-se o desvio padrão, os valores encontraram-se dentro da faixa de referência (24-49).

Para Mariz (2007), ratos machos tratados com a maior dose (5g/Kg) do extrato hidroetanólico de *J. gossypifolia*, apresentaram sensibilidade ao tratamento oral agudo, sofrendo alterações bioquímicas e hematológicas significativas. Os valores encontrados para Uréia e Creatinina estavam dentro da normalidade. Porém, em outro estudo desta espécie, foi constatado que a hipouremia, pode ser relacionada ao dano hepático grave e geralmente é associada com a dosagem de creatinina (prova de função renal). Assim, evidenciou-se uma elevação da creatinina de 10% em relação à referência máxima: 0,6 mg/dL, o que indicou dano renal grave (MELO-DINIZ, 2000).

Após 14 dias da administração de *J. gossypifolia*, foram avaliados os parâmetros hematológicos em ratos machos e fêmeas. Os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, plaquetas e proteínas plasmáticas não mostraram alterações significativas quando comparado ao grupo controle, em ambos os sexos, conforme a Tabela 12.



Tabela 12 – Parâmetros hematológicos (eritograma) obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com extrato hidroetanólico de *J. gossypifolia* (2000 mg/Kg) por via oral

Sexo	Parâmetro	Grupo de estudo		Valores de referência*
		Controle	2000 mg/kg	
Macho	Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	7,56 $\pm$ 0,49	7,90 $\pm$ 0,56	4,72-10,25
	Hemoglobina (g/dL)	13,65 $\pm$ 0,71	14,33 $\pm$ 0,74	10,20-17,80
	Hematócrito (%)	42,36 $\pm$ 2,23	44,53 $\pm$ 2,96	23,80-51,90
	VCM (fL)	56,15 $\pm$ 2,22	56,42 $\pm$ 0,93	43,60-52,60
	CHCM (g/dL)	32,17 $\pm$ 0,55	32,15 $\pm$ 0,90	31,60-37,80
	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1187,25 $\pm$ 211,73	1031,83 $\pm$ 156,66	727-1351
	Proteínas plasmáticas (g/dL)	6,23 $\pm$ 0,29	6,17 $\pm$ 0,26	4,0-6,9
Fêmea	Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	7,28 $\pm$ 0,63	7,73 $\pm$ 0,27	5,21-8,83
	Hemoglobina (g/dL)	13,21 $\pm$ 0,96	13,80 $\pm$ 0,52	11,10-17,10
	Hematócrito (%)	42,80 $\pm$ 4,04	45,00 $\pm$ 2,24	27,20-48,50
	VCM (fL)	58,87 $\pm$ 1,66	58,25 $\pm$ 1,24	45-56,70
	CHCM (g/dL)	30,90 $\pm$ 0,94	30,62 $\pm$ 0,84	30,40-43,90
	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1043,33 $\pm$ 198,65	1011,50 $\pm$ 232,40	760-1313
	Proteínas plasmáticas (g/dL)	6,20 $\pm$ 0,28	6,43 $\pm$ 0,26	5,0-7,77

\*Valores de referência de acordo com MELO et al., 2012.

O VCM encontrou-se acima do valor máximo de referência para animais controle e tratados, de ambos os sexos. Diante disto, fica evidente que esta elevação não ocorreu devido a administração do extrato, pois já havia alterações anteriores ao tratamento. Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle, tampouco importância clínica, pois os valores estavam muito próximos da referência máxima, segundo Melo e colaboradores (2012).

Os níveis de leucócitos totais não foram estatisticamente modificados em ratos machos e fêmeas tratados com *J. gossypifolia*, quando comparados aos grupos controle conforme a tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros hematológicos (leucograma) obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com extrato hidroetanólico de *J. gossypifolia* (2000 mg/Kg) por via oral

Sexo	Parâmetro	Grupo de estudo		Valores de referência*
		Controle	2000 mg/kg	
Macho	Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8,53 ± 2,91	9,18 ± 1,64	3,41-13,70
	Linfócitos (%)	75,00 ± 10,06	80,83 ± 6,30	43,10-93,7
	Neutrófilos (%)	22,83 ± 10,49	15,83 ± 6,94	4,0-49,90
	Monócitos (%)	1,17 ± 1,47	2,50 ± 2,59	1,00-15,20
	Eosinófilos (%)	0,66 ± 0,82	0,83 ± 0,75	0,00-3,60
Fêmea	Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	6,60 ± 0,74	7,22 ± 1,19	2,30-9,90
	Linfócitos (%)	75,00 ± 3,63	81,83±4,11	30,10-95,0
	Neutrofilos (%)	22,00 ± 2,60	15,16±3,86	3,00-46,20
	Monócitos (%)	1,83 ± 0,98	1,00±0,63	1,00-13,50
	Eosinófilos (%)	1,17 ± 0,98	1,83±0,75	0,00-2,00

\*Valores de referência de acordo com MELO et al., 2012.

Ocorreu uma diferença significativa (31,1%) nos níveis de neutrófilos, de fêmeas tratadas (15,16±3,86), considerando-se o desvio padrão, em relação ao grupo controle (22,00 ± 2,60), porém estes valores acharam-se dentro da faixa de referência (3,00-46,20) para este parâmetro. Este fato não apontou, portanto, para um significado clínico.

Rocha e colaboradores (1995) também relataram que o tratamento de ratos com o extrato hidroetanólico de partes aéreas da planta por 30 dias (avaliação subcrônica), não produziu alterações bioquímicas e/ou hematológicas significativas nesses animais.

Entretanto, em outro estudo desta espécie, constatou-se que estes mesmos parâmetros hematológicos avaliados em 14 dias, após o tratamento por via oral utilizando o extrato em dose única, sofreram uma forte redução na contagem global de leucócitos (49,1% em relação à referência mínima de  $6,8 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ ), sem alterações na contagem diferencial, o que caracterizou uma leucopenia inespecífica (MELO-DINIZ, 2000).

Portanto, não é possível afirmar que o extrato hidroetanólico das folhas de *J. gossypifolia* é recomendável para uso terapêutico, sem antes observar os seus efeitos em uma situação de exposição prolongada, administrando doses menores e

avaliadas pela maioria dos estudos experimentais que têm demonstrado alguma atividade biológica com relação a esta espécie.



## 5 CONCLUSÃO

Do estudo químico e biológico realizado com a espécie *Jatropha gossypifolia* L. podemos concluir que:

- Os compostos fenólicos de maior concentração, tanto nos extratos obtidos por infusão e maceração, nas três diferentes coletas de material vegetal, demonstraram ter eficácia como marcadores analíticos para fins de controle de qualidade em produtos fitoterápicos.

- Os triterpenos encontrados majoritariamente na espécie estudada foram o  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol, sugerindo que a espécie possa apresentar potencial antiinflamatório, devido aos compostos de estrutura triterpênica.

- Verificou-se a presença de catequina como composto majoritário, na infusão, demonstrando seu uso popular como hipotensor.

- A espécie apresenta potencial antioxidante, que pode estar relacionada aos flavonóides e ácidos fenólicos encontrados, os quais apresentam propriedades farmacológicas comprovadas e podem estar associadas ao uso popular dessa planta medicinal.

- O estudo da toxicidade oral aguda, demonstrou que o EHE de *J. gossypifolia* não ocasionou alterações significativas ( $P > 0,05$ , ANOVA) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos, caracterizando-se como de baixa toxicidade na dose de 2000 mg/Kg de acordo com a OECD 423 (2001).



## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. C. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of the ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. **Fitoterapia**, Amsterdã, v. 74, p. 651-657, 2003.
- ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, Amsterdã, v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.
- AFONSO, M. S. **Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 16, p. 273-285, 2002. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XS2010100316>>. Acesso em: 16 out. 2015.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, Amsterdã, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- ANASTASIADI, M. et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Amsterdã, v. 43, n. 3, p. 805-813, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDE, E. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496-1547, 2007.
- APU, A. S. et al. Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, p. 1125-1130, 2013.
- \_\_\_\_\_. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 4, p. 20-24, 2013.

AWACHIE, P. I. A.; UGWU, F. O. Preliminary investigation of the antimicrobial and Brine Shrimp lethality properties of some nigerian medicinal plants. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 5, p. 338-343, 1997.

AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Diversity, conservation status and medicinal plants of the family Euphorbiaceae in Tirunelveli Hills, Southern India. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, p. 12-16, 2010.

BAE, G. U.; SEO, D. W.; KWON, H. K. Hydrogen Peroxide Activates p70s6k Signaling Pathway. **The journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32596-32602, 1999.

BAHADUR, B.; PULLAIAH, T.; MURTHY, G. V. S. Systematics of Indian Jatrophas. **Springer**, p. 153-186, 2013.

BALASUBRAMANIAN, L. et al. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory activity of synthesized 3 (Substituted) Chromen-2-One. **International Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 474-478, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARCIA, M. T. et al. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, v. 159, p. 95-105, 2014.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-67.

BIGHETTI, A. E. et al. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luhea divaricata* Martus et Zuccarini. **Lecta**, v. 22, n.1/2, p. 53-58, 2004.

BORA, K. et al. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante de diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksoniasellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 6-15, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14/2010**. Regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

\_\_\_\_\_. **Resolução RDC nº 26/2014**. Cria a categoria de Produtos Tradicionais e estabelece regras para o registro e comercialização destes e dos Medicamentos Fitoterápicos, 2014.

\_\_\_\_\_. **Resolução RDC nº 90/2004**. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004. Seção 1, v. 53, p. 34-35.

\_\_\_\_\_. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.



BRASIL. Ministério da Saúde. **Fitoterapia: plantas de interesse ao SUS**. 2011. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2016.

\_\_\_\_\_. **Portal da saúde: uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994.

CALIXTO, J. B.; SANT'ANA, A. E. G. Pharmacological analysis of the inhibitory effect of jatrophone, a diterpene isolated from *Jatropha elliptica*, on smooth and cardiac muscles. **Phytotherapy**, v. 1, n. 3, p. 122-126, 1987.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **FrEHE Radic Biol Med**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA DO RIO GRANDE DO SUL (CIT-RS). Relatório Anual 2014: Dados de atendimento. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2014.pdf>>. Acesso em: 10 Jan.2017

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: the secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Nova York: E. Wiley Blackwell, 2000. p. 1250-1318.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: E. Blackwell Publishing, 2006.

CUNHA, A. M. da et al. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DAS, S.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 3, n. 69, p. 499-508, 2006.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 3, p. 301-322, 2010.

\_\_\_\_\_. *Jatropha* toxicity: a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health B: Critical Reviews**, v. 13, n. 6, p. 476–507, 2010a.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

\_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009.

DR. DUKE'S. **Phytochemical and Ethnobotanical databases**. Disponível em: <<https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/chemicals/show/35?et>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

EBERHARD, B. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. 1. ed. E. Wiley, 2006.

EMERY, F. S. et al. A química na natureza. **Sociedade Brasileira de Química**, v. 7, 2010.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FACCIN, H. et al. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 111-124, 2016.

FALODUN, A. et al. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, p. 636-639, 2012.

FARIAS, E. M. F. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). In: Congresso Brasileiro de Química, 2007, Natal/RN. **Anais...** Natal/RN: Sociedade Brasileira de Química, 2007.

FÉLIX-SILVA, J. et al. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-32, 2014.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 4, n. 2, p. 32-39, 2007.

FIGUEREDO, C. A. **Fitoterapia**, NEPHF, UFPB, 2008.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological Activities of Lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 46-66, 2009.

GASPERI-CAMPANI, A. et al. SEHEd extracts inhibiting protein synthesis *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 186, p. 439-441, 1980.

GAZDA, V. E. **Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)**. 2004. 164 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GOBO, L. A. et al. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of triterpenoids in medicinal plant extracts. **Journal of chromatography A**, 2016.

GRAVINA H. D. et al. *In vitro* assessment of the antiviral potential of *trans*-cinnamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 58-162, 2011.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 2. ed. Springer Science & Business Media, 2011.

HALLIWELL, B. FrEHE radicals and antioxidants – *quo vadis?*. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **FrEHE radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-179, 1996.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolismo and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L**: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 1. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 1996.

HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, J. L.; PALAZON, A.; NAVARRO, O. A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. **Intech**, Rijeka, p. 488-502, 2012.

HILGEMANN, M. **Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de plantas medicinais**. 2010. Tese (Doutorado em Química)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

JIE YIN, G. J. K.; MYEONG, H. W. The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. **Nutrition Research Practice**, v. 1, n. 3, p. 189-194, 2007.

JONES, P. J. H. et al. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, n. 75, p. 217-227, 1997.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicol Appl Pharm**, v. 243, n. 2, p. 198-216, 2010.

KHYADE, M. S.; VAIKOS, N. P. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, p. 177-180, 2011.

KLAASSEN, C. D.; EATON, D. L. Principles of toxicology. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 4. ed. New York: E. McGraw-Hill Inc, 1994. p. 12-49.

KUMAR, A.; SINGH, N. *Jatropha gossypifolia* L.: a potential genetic resource for herbal dye. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 5, p. 949-954, 2012.

KUMAR, C. G.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and products**, v. 28, p. 1-10, 2008.

KUMAR, V. P. et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 107, n. 2, p. 182-188, 2006.

LANDETE, J. M. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 936-948, 2012.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS; Ed. UFSC, 2004. p. 181-196.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: \_\_\_\_\_. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 43-58.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, n. 75, p. 1549-1560, 2009.

LI, S. et al. Chemical markers for the quality of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, p. 1-16, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 2008.

LU, F. C. **Toxicologie: données générales, procédures d'evaluation, organes cibles, evaluation du risque**. Paris: Masson, 1991.

MACBAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of amazonian euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 3, p. 89-99, 2007.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007. 186 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)–Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MARIZ, S. R. et al. Possibilidades terapêuticas e riscos toxicológicos de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 346-357, 2010.

MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** Fortaleza: Ed. UFC, 2004.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MEDUBI, L. J. et al. Effects of administration of ethanolic root extract of *Jatropha gossypifolia* and prednisolone on the kidneys of Wistar rats. **Electronic Journal of Biomedicine**, v. 2, p. 41-48, 2010.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2012.

MELO-DINIZ, M. F. F. M. **Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich.** 2000. 147 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)–Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle de qualidade do fruto de *Syzygiumcumini* (L.) SkEHEIs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MONTOYA PELÁEZ, G. L. et al. Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 23, p. 754-761, 2013.

MOREIRA, A. V.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, local, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 1-15, 2011.

MWINE, J. T.; DAMME, P. V. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants: a review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

NAGAHARIKA, Y. et al. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 2, p. 156-158, 2013.

NEVES, F. et al. Diversity of arboreal ants an a brazilian tropical dry forest: effects of seasonality and successional Stage. **Sociobiology**, 2010.

ODUOLA, T. et al. Use of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent: how safe is it?. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2007.

OJEWOLE, J. A. O.; ODEBIYI, O. O. Mechanism of the hypotensive effect of tetramethylpyrazine, an amide alkaloid from the Stem of *Jatropha podagrica*. **Planta Medica**, v. 41, p. 281-287, 1981.

\_\_\_\_\_. Neuromuscular and cardiovascular actions of Tetramethylpyrazine from the stem of *Jatropha podagrica*. **Planta Medica**, v. 38, p. 332-338, 1980.

OKIGBO, R. N.; ANUAGASI, C. L.; AMADI, E. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 86-95, 2009.

OKUYAMA, E. et al. Pharmacologically active components of a peruvian medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillata*). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, p. 333-336, 1996.

OLIVEIRA, J. S. et al. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass and bioenergy**, v. 33, p. 449-453, 2009.

OLIVEIRA, L. I. et al. Intoxicação experimental com as folhas de *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 275-278, 2008.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline 423**. Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method. (Adotado pelo conselho em 17 de dezembro de 2001).

OUEDRAOGO, M. et al. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 3, p. 492-512, 2012.

PAES, A. M. A. et al. Relaxant effect of *Jatropha gossypifolia* L. on uterine smooth muscle. **International Journal of phytomedicine**, v. 4, p. 310-313, 2012.

PETISCA, C. I. B. **Quantificação dos compostos bioativos em infusões de chá verde dos açores**: comparação com os teores presentes em bebidas comerciais com chá verde. Trabalho de Investigação da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2008. Disponível em: <[http://repositorio.aberto.up.pt/bitstream/10216/54767/1/120839\\_0833TCD33.pdf](http://repositorio.aberto.up.pt/bitstream/10216/54767/1/120839_0833TCD33.pdf)>. Acesso em: 4 dez. 2015.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PREZIOSI, P. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. **Pure and Applied Chemistry**, n. 9, p. 1617-1631, 1998.

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

RANDALL, A.; CAMPBELL, S.; VOGLER, W. **Bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*): control options and management case studies from across Australia**. Queensland: Department of Employment, Economic Development and Innovation, 2009.

RATES, S. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RHOURRI-FRIH, B. et al. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin.: isolation, identification and biological properties. **Fitoterapia**, n. 88, p. 101-108, 2013.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIZEA, G. D. et al. The content in frEHE radical scavenging compounds in plants used in cardiovascular phytotherapy. **Journal of EcoAgriTourism**, v. 6, n. 4, p. 94-100, 2010.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **The world medicines situation-traditional medicines: global situation, issues and challenges**. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 2011.

ROCHA, M. O. et al. Avaliação toxicológica do tratamento sub-crônico com extrato de *Cecropia adenopus* Mart., *Sechium edule* e *Jatropha gossypifolia* L. nos compostos bioquímicos do sangue. In: Reunião anual da SBPC, 47, 1995, São Luís. **Anais...** São Luís/MA, 1995. p. 506.

ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of sEHED and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897-901, 2011.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Revista internacional de desenvolvimento local**, v. 17, n. 2, 2016.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade aguda. In: ALMEIDA, R. N. (Org.) **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.124-130.

SABANDAR, C. W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SAINI, V. et al. Analysis of the Phytochemical Content of *Jatropha gossypifolia* L. **Chemical and Process Engineering Research**, p. 99-104, 2015.

SALAH, N. et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 339-346, 1995.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. **Food Chemistry**, n. 141, p. 4375-4381, 2013.

SCHENKEL, E. P. et al. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS; Ed. UFSC, 2007. p. 959-993.

SCHLEDE, E. et al. Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD 50 test. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 42, p. 15-23, 2005.

SCHMELZER, G. H.; GURIB-FAKIM, A. **Plant Resources of Tropical Africa 11(1): medicinal plants 1**. Wageningen: Fondation PROTA, 2008.

SELL, C. S. Terpenoids. **Encyclopedia of Chemical Technology**, E. Wiley, 2006.

SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, n. 28, p. 543-593, 2011.

SIDDIQUE, H. R.; SALEHEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Science**, n. 88, p. 285-293, 2011.

SILVA, A. M.; BRUM, R. L.; CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein: a comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sciences**, v. 57, p. 863-871, 1995.

SILVA, K. A. et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v. 152, p. 1872-1887, 2011.

SILVA, P. S. **Verbenaceae da Serra do Cipó: aspectos biosistemáticos, químicos e farmacológicos**. 2008. 206 p. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

SILVA, S. N. et al. Antispasmodic effect of *Jatropha gossypifolia* is mediated through dual blockade of muscarinic receptors and  $Ca^{2+}$  channels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, p. 715-720, 2011.



SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS, Ed. UFSC, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SUJATHA, M.; BAHADUR, B.; REDDY, T. P. Interspecific Hybridization in the Genus *Jatropha*. In: SUJATHA, M.; BAHADUR, B.; CARELS, N. ***Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: genetic improvement and biotechnology***. v. 2. New York: Springer, 2013. p. 423-443.

THAKUR, H. A.; PATIL, D. A. The family Euphorbiaceae: anatomical conspectus. **World Journal of Science & Technology**, v. 2, p. 51-57, 2012.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL<sub>50</sub> test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALENTÃO, P. C. R. **Limonete, Hipericão-do-Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra – Metodologias de controle de qualidade com base na fracção fenólica: estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora**. 2002. 316 f. Tese (Doutorado)– Universidade do Porto, Porto, 2002. Disponível em: <<http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/9820>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

VALKO. et al. FrEHE radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F. Espécies reativas de oxigênio e denitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VENANCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em *Mus musculus* (camundongos)**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)– Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2006.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 13-25, 2002.

VOLPATO, G. T. et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol**, v. 1, n. 116, p.131-137, 2008.

W.H.O. **Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**. Geneva: Ed. WHO, 2013.

ZHANG, X. P. et al. Chemical Constituents of the Plants from Genus *Jatropha*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 2166-2183, 2009.

ZHAO, H. et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for frEHE phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277–7286, 2006.

## ANEXO

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



*Comissão de Ética no Uso de Animais*

da *Universidade Federal de Santa Maria*

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA *Jatropha gossypifolia* L.", protocolada sob o CEUA nº 8011210815, sob a responsabilidade de **Carine Viana Silva** e equipe; *Juliana Calil Brondani*; *Rachel de Lima*; *Rudinei da Silva Silveira*; *Liliane de Freitas Bauermann* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino

- está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 14/01/2016.

We certify that the proposal "DETERMINATION OF CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF TOXICITY *Jatropha gossypifolia* L.", utilizing 36 Heterogenic rats (males or females), protocol number CEUA 8011210815, under the responsibility of **Carine Viana Silva** and team; *Juliana Calil Brondani*; *Rachel de Lima*; *Rudinei da Silva Silveira*; *Liliane de Freitas Bauermann* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 01/14/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)  
([Acadêmica](#))

Vigência da Proposta: de [10/2015](#) a  
[07/2016](#)

Área: [Farmácia Industrial](#)

Origem: [Biotério](#)

[Central UFSM](#) Espécie:

sexo: [Machos ou](#)

idade: [7 a 7 semanas](#)

N:

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 250 g](#)

Resumo: Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. As observações populares sobre o uso de plantas medicinais contribuem para a sugestão dos efeitos medicinais e a utilização desses para estudos farmacológicos e químicos. *Jatropha gossypifolia* L. têm relatos de uso na medicina popular de várias partes da planta para o tratamento anticonvulsivante, antidiarreico, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-neoplásico, cicatrizante e diurético. Assim, devido ao vasto uso desta planta, torna-se importante avaliar a toxicidade aguda de seus extratos, administrada oralmente uma dose única de 2000 mg/Kg em ratos machos e fêmeas para observações físicas, comportamentais e testes bioquímicos.

Local do experimento: Biotério do prédio 21

Santa Maria, 24 de janeiro de 2017



Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Broock Rosemberg Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria



Prof. Dr. Denis  
Vice-  
Universidade Federal de

## ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO

International Journal of Food Sciences &amp; Nutrition



**Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS) determination of phenolic compounds and triterpenoids in *Jatropha gossypifolia* L.**

Journal:	<i>International Journal of Food Sciences and Nutrition</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	SILVEIRA, RUDINEI; Universidade Federal de Santa Maria Faccin, Henrique; Universidade Federal de Santa Maria GOBO, LUCIANA; Universidade Federal de Santa Maria DAL MOLIN, THAIS; Universidade Federal de Santa Maria SILVEIRA, GESSICA; Universidade Federal de Santa Maria LAMEIRA, OSMAR; EMBRAPA Amazônia Oriental, Laboratory of Agrobiotechnology carvalho, leandro; Universidade Federal de Santa Maria VIANA, CARINE ; Universidade Federal de Santa Maria,
Keywords:	<i>Jatropha gossypifolia</i> L., UHPLC-MS/MS, Phenolic compounds, Triterpenic compounds

SCHOLARONE™  
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/cijf> Email: [daniele.delrio@unipr.it](mailto:daniele.delrio@unipr.it)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric  
(UHPLC-MS/MS) determination of phenolic and triterpenic compounds in  
*Jatropha gossypifolia* L.

R. Silveira<sup>a</sup>, H. Faccin<sup>b</sup>, L.A. Gobo<sup>b</sup>, T.R. Dal Molin<sup>a</sup>, G.D. Silveira<sup>b</sup>, M.T.S. Souza<sup>c</sup>, O.A.  
Lameira<sup>d</sup>, L.M. Carvalho<sup>a,b</sup>, C. Viana<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa  
Maria-RS, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil.

<sup>c</sup> Graduation in Pharmacy, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil.

<sup>d</sup> Laboratory of Agrobiotechnology, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-RS, Brazil.

\* Corresponding author. E-mail: [carineviana@yahoo.com.br](mailto:carineviana@yahoo.com.br). Federal University of Santa  
Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil, PO Box 5051, Zip Code 97105-970, Santa Maria-RS,  
Brazil

1  
2  
3 **Abstract**  
4  
5  
6  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

This work describes the chemical characterization of extracts of *Jatropha gossypifolia* (from Amazonia region) concerning the presence of phenolic and triterpenic compounds using a UHPLC-MS/MS method. The studied compounds belong to the most frequently found classes in medicinal plants (triterpenes, flavonoids, flavones, hydroxycinnamic acids, coumarins, catechins and stilbenes), which have been analyzed as chemical and bioactive markers in infusion and hydroethanolic extracts. Several polyphenolic compounds identified herein are unprecedented in the scientific literature for this species. The chemical markers identified and quantified in *J. gossypifolia* were gallic acid, chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferullic acid, rutin, quercitrin, 3-acetylcoumarin, *trans*-cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, chrysin,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin and lupeol. As the major compounds, (+)-catechin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, luteolin,  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin were found to be present at mg kg<sup>-1</sup> levels. *J. gossypifolia* extracts presented high *in vitro* activity against hydroxyl, peroxy, and superoxide anion radicals.

**Keywords:** *Jatropha gossypifolia* L., UHPLC-MS/MS, Phenolic compounds, Triterpenic compounds.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80

## 53 1 Introduction

54

55 Traditional medicine (TM) is an important and often underestimated part of health services.  
56 In some countries, including Brazil, traditional medicine or non-conventional medicine may be  
57 termed complementary medicine. TM has a long history of use in health maintenance and in disease  
58 prevention and treatment, particularly for chronic diseases. According to the World Health  
59 Organization (WHO) Traditional Medicine Strategy 2014-2023, policies and regulations to promote  
60 the safe and effective use of Traditional and complementary medicine (T&CM) products have  
61 increased all over the world (WHO 2013).

62 Herbs are used throughout the world and their use is on the rise, with available data  
63 suggesting that the T&CM products market is substantial. However, the diversity of regulatory  
64 categories for T&CM products makes it difficult to assess the size of the market with any degree of  
65 accuracy. For example, the output of Chinese *materia medica* was estimated to amount to US\$83.1  
66 billion in 2012, annual expenditure on TM in the Republic of Korea was US\$7.4 billion in 2009,  
67 and out-of-pocket spending for natural products in the United States reached US\$14.8 billion in  
68 2008 (WHO 2013).

69 The genus *Jatropha* belongs to the Euphorbiaceae and comprises about 200 species which  
70 are distributed mainly in the tropical and subtropical regions of Americas and Africa (Zhang et al.  
71 2009). Species from this genus are popularly used to cure stomachache, toothache, swelling,  
72 inflammation, leprosy, dysentery, dyscrasia, vertigo, anemia, diabetes, as well as to treat HIV and  
73 tumors, ophthalmia, ringworm, ulcers, malaria, skin diseases, bronchitis, and asthma and as an  
74 aphrodisiac (Sabandar et al. 2013).

75 *Jatropha gossypifolia* Linneus is popularly known worldwide as "bellyache bush" or "black  
76 physicnut". In Brazil, it is known by various popular names, the most common of which are  
77 "pinhão-roxo," "pião-roxo," "peão-roxo," "batata-de-teu," "erva-purgante," "jalapão,"



1  
2  
3 78 "mamoninha," "raiz-de-teiú," "peão-curador," "peão-pajé," "pião-caboclo," and "pião-preto." *J.*  
4  
5 79 *gossypifolia* is a small shrub with dark green or more frequently purplish-red dark leaves, with a  
6  
7 80 length of 16–19 cm and a width of 10–12.9 cm; they are alternate, palmate, and pubescent, with an  
8  
9 81 acuminate apex, cordate base, and serrated margin. The flowers are unisexual, purple, and in  
10 82 cymose summits, with the calyx having five petals; in male flowers, these may form a petaloid tube.  
11  
12 83 The fruit is capsular, with three furrows, containing a dark seed with black spots (Félix-Silva et al.  
13  
14 84 2014). Regarding its phytochemical constitution, alkaloid, steroids, saponin, lignan, tannin,  
15  
16 85 phenolic compounds, flavonoid, curcun, triterpenes, diterpene, jatrophone, jatropholones A and B,  
17  
18 86 jatrophatrione, apigenin, and cyclogossine A have been reported in different extracts from different  
19  
20 87 parts of this plant (Khyade & Vaikos 2011, Apu et al. 2013, Félix-Silva et al. 2014, Saini et al.  
21  
22 88 2015).

23  
24  
25  
26  
27 89 *J. gossypifolia* is applied for the treatment of various types of disorders in T&CM. Several  
28  
29 90 uses are described for different parts (leaves, stems, roots, seeds, and latex) and preparations  
30  
31 91 (infusion, decoction, and maceration, among others) based on this plant, via different routes (oral or  
32  
33 92 topical) (Félix-Silva et al. 2014). The leaves of the plant are traditionally topically applied to boils,  
34  
35 93 carbuncles, eczema, itches and venereal diseases. Orally, the most frequent reports concern its use as  
36  
37 94 an antihypertensive, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antimicrobial, emetic, purgative,  
38  
39 95 anti-anemic, antidiabetic, and anti-hemorrhagic (Sabandar et al. 2013). To establish its traditional  
40  
41 96 uses, *J. gossypifolia* has been investigated for its antihypertensive, anti-allergic, molluscicidal,  
42  
43 97 larvicidal, antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anti-neoplastic, coagulating, and anti-  
44  
45 98 coagulating activities (including various types of extracts from different parts of the plant) (Apu et  
46  
47 99 al. 2013, Félix-Silva et al. 2014).

50  
51  
52 100 *J. gossypifolia* is included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the  
53  
54 101 Brazilian Public Health System (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema  
55  
56 102 Único de Saúde – RENISUS). In February 2009, the Brazilian Health Ministry published the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

103 relation that contains 71 medicinal plants with the potential to generate pharmaceutical products of  
104 interest in Brazilian public health. Therefore, this study was carried out aiming to define the activity  
105 of *J. gossypifolia* extracts against different oxygen free radical and quantify 24 phenolic  
106 compounds and 12 triterpenic compounds by UHPLC-MS/MS methods. The studied compounds  
107 belong to the most frequently found classes in medicinal plants (terpenics, flavonoids, flavones,  
108 hydroxycinnamic acids, coumarins, catechins and stilbenes), which have been analyzed as chemical  
109 and bioactive markers in extracts.

110

## 111 2 Material and methods

112

### 113 2.1 Instrumentation, reagents and solutions

114

115 An Agilent 1260 Infinity UHPLC-MS chromatograph (Santa Clara, CA, United States) with  
116 automatic injection and an Agilent 6430 triple quadrupole mass spectrometer were used. High  
117 purity nitrogen (99.999%) obtained from Linde (Munich, Germany) was used as the gas to induce a  
118 collision at the ESI source and as the drying gas. A Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column  
119 (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent) was used at a temperature of 40°C. Ultrapure water was obtained  
120 from a Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) system. Acetonitrile and  
121 methanol were of Chromasolv LC-MS grade and supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,  
122 United States). Acetic acid was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, US. ).

123 The standards (+)-catechin, 3-acetyl coumarin, 3,6-dihydroxyflavone, 4-hydroxycoumarin, 6-  
124 hydroxycoumarin, apigenin, chlorogenic acid, chrysin, fisetin, galangin, gallic acid, kaempferol,  
125 luteolin, myricetin, *p*-coumaric acid, quercetin, quercitrin, *trans*-resveratrol, rosmarinic acid, rutin,  
126 *trans*-cinnamic acid and vanillic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).  
127 Caffeic and ferulic acids were obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). All standards

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

128 were of analytical grade with a minimum of 95% purity, and were used as received. Stock solutions  
129 of the phenolic standards (1000 mg L<sup>-1</sup>) were prepared by dissolution of appropriate amounts of  
130 substances in LC-MS grade methanol.

131 The triterpenoids: arjunic acid, maslinic acid, betulinic acid, ursolic acid, erythrodiol, lupeol,  $\beta$ -  
132 amyryn,  $\alpha$ -amyryn, friedelin, sitosterol, stigmasterol and campesterol were purchased from Fluka and  
133 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). The standard solutions of each triterpenic compound  
134 as well the mixtures were prepared in acetonitrile as follows: 1000 mg L<sup>-1</sup> for maslinic acid, arjunic  
135 acid,  $\beta$ -amyryn,  $\alpha$ -amyryn, and erythrodiol; 985 mg L<sup>-1</sup> for ursolic acid; 125 mg L<sup>-1</sup> for campesterol;  
136 196 mg L<sup>-1</sup> for betulinic acid; 378 mg L<sup>-1</sup> for sitosterol; 365 mg L<sup>-1</sup> for lupeol; 481 mg L<sup>-1</sup> for  
137 stigmasterol; and 500 mg L<sup>-1</sup> for friedelin.

138 All solutions were stored in amber glass vessels at -30 °C until use. Working solutions of the  
139 studied phenolic and terpenic compounds were prepared by dilution of the stock solutions in the  
140 respective solvents.

141 For the evaluation of antioxidant activity, carbon dioxide (99.9% purity) was purchased from  
142 White and Martins®. Sodium hydroxide, xanthine oxidase (XOD) 25UN, hypoxanthine (HPX),  
143 nitro tetrazolium blue chloride (NBT) were obtained from Sigma-Aldrich. DMSO (dimethyl  
144 sulfoxide) was obtained from Isofar® (Rio de Janeiro, Brazil). Sodium carbonate was obtained  
145 from Merck. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was obtained from Nuclear® (Brazil).

## 147 2.2 Sample collection

148  
149 *Jatropha gossypifolia* L. (deposit n° IAN 192905) was obtained from the herbal collection of  
150 the Brazilian agricultural research corporation Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA, Brazil. The  
151 species was sourced from the Amazonian region and cultivated in the Horto of medicinal and  
152 aromatic plants. The geographical location of collection was 1°27'21''S latitude and 48°30'14''W

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

153 longitude. The fresh plant species were manually cleaned for macroscopic particles, dried at 40°C  
154 for 12 h, ground into a fine powder in a laboratory mill, and finally supplied as a dry, powdered  
155 material. Three harvests were received: (1) August 2013, (2) January 2015, and (3) September  
156 2015. The dried sample materials were stored in desiccators under vacuum at room temperature  
157 until their sample preparation for use in HPLC analysis.

### 159 2.3 Sample preparation

161 Dry extract of *Jatropha gossypifolia* L. was obtained by maceration at room temperature (25  
162 °C). Then, 450 g of the dried plant material was maintained in 70% (v/v) ethanol for 7 days with  
163 occasional agitation of the maceration bath. The solvent was renewed and the procedure was  
164 repeated three times, over a 4-week extraction process. After completing the maceration process,  
165 part of the extract was filtered and evaporated under pressure in a rotary evaporator to obtain the  
166 crude hydroalcoholic extract. In this way, the remaining ethanolic extract was subjected to  
167 successive liquid-liquid extractions with chloroform, ethyl acetate and n-butanol. The resulting  
168 ethyl acetate and butanolic liquid extracts were evaporated under pressure in a rotary evaporator to  
169 obtain dry extracts. These dry extracts were stored at 4°C until further use.

170 For the analysis of phenolic compounds, approximately 0.06 g of each of the dried extract was  
171 resuspended in 3 mL of methanol, sonicated until complete dissolution, diluted with 12 mL of  
172 ultrapure water and then acetic acid was added to a final proportion of 0.1% (v/v). Then, the  
173 extracts were filtered through hydrophilic PTFE membranes with a 0.2 µm pore size. The final  
174 extracts obtained were submitted to a cleanup step using solid phase extraction (SPE). The Strata  
175 C18-E cartridges (Phenomenex, Torrance, USA), 500 mg, 3 mL, were conditioned with 6 mL of  
176 MeOH:0.2% CH<sub>3</sub>COOH (1:1, v/v) and equilibrated with 6 mL of 0.1% CH<sub>3</sub>COOH (v/v) in water.  
177 A fixed volume of 2 mL of the obtained extracts with a final MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH composition

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

178 of 20:80:0.1 (v/v) was percolated with a 2 mL min<sup>-1</sup> flow rate, followed by washing with 2 mL of  
179 0.1% CH<sub>3</sub>COOH. Lastly, the cartridge was eluted with 2 mL of MeOH. Just before the  
180 chromatographic analysis, the eluate obtained from the SPE procedure was diluted in a MeOH:0.2%  
181 CH<sub>3</sub>COOH (1:1, v/v) solution.

182 For the analysis of triterpenic compounds, approximately 50 mg of the dried extract was  
183 resuspended in 5 mL of 50% acetonitrile in H<sub>2</sub>O (v/v) and vortexed for 30 seconds followed by 10  
184 min sonication. This 1% extract was diluted 20 times in acetonitrile, filtered through a 0.2 µm PTFE  
185 filter and injected into the chromatographic system.

## 186

### 187 2.4 UHPLC-MS/MS conditions

#### 189 2.4.1 Chromatographic analysis of phenolic compounds

190

191 The phenolic compounds were determined by the method previously developed by Faccin et al.  
192 (2016). This method used a gradient elution composed of 0.1% acetic acid in water (A) and  
193 acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate (0.8 mL min<sup>-1</sup>) according to the  
194 following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B  
195 (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). The injection  
196 volume was 5 µL, and the injected aliquots were acidified to a final concentration of 0.1% acetic  
197 acid (v/v). An electrospray ionization source (ESI) was used to ionize the chromatographic effluent  
198 generated up until 7.0 min. The parameters for ESI were optimized to give the best response for the  
199 analytes, especially for intensity and signal stability. The source and detector final parameters  
200 conditions are shown in Table 1. The mass spectrometer operates in the multiple reaction  
201 monitoring (MRM) mode with a resolution of 0.7 *m/z* (FWHM). The quantification transitions were  
202 divided into three temporal segments of acquisition and the dwell time for each transition was

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

203 optimized to 20 ms. The collision energies for each analyte are shown in Table 2, along with the  
204 transitions monitored by the mass spectrometer and the retention times as well.

205 After finishing the gradient program, a post-run time of 4.0 min was adopted for re-  
206 equilibrating the system. The acquired data were analyzed by using the MassHunter Workstation  
207 Software Qualitative Analysis (version B.07.00, Build 7.0.7024.0, Agilent Technologies, Inc.  
208 2014). The standard addition method was used to quantify the samples. The calibration curves were  
209 built with seven equally spaced concentration levels, in addition to a blank extract. The data points  
210 of the calibration curve were determined in triplicate.

211

#### 212 2.4.2 Chromatographic analysis of triterpenic compounds

213

214 The triterpenic compounds were determined by the method previously developed by Gobo et  
215 al. (2016). This method used an APPI ion source and toluene as a dopant. The source and detector  
216 conditions are shown in Table 1. The collision energies for each triterpenic compound are also  
217 shown in Table 2, which describes the transitions monitored by the mass spectrometer and the  
218 retention times as well. The determination of triterpenes was performed using a gradient elution that  
219 consisted initially of 70% acetonitrile/water from 0 to 3.5 min followed by a ramp gradient, which  
220 achieved the end condition of 100% acetonitrile after 4.0 min. This condition was maintained until  
221 the end of the run (8 min). The flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup> during the first 4.5 min and was  
222 increased up to 0.8 mL min<sup>-1</sup> at 5 min run. The flow rate was maintained at 0.8 mL min<sup>-1</sup> until the  
223 end of the chromatographic run. The detection of triterpenic compounds by tandem mass  
224 spectrometry (MS/MS) was carried out by using an atmospheric pressure photoionization source  
225 (APPI). The standard addition method was used to quantify the samples.

226

227

## 228 2.5 Radical scavenging activity

229

230 Radical scavenging activity against peroxy radicals was evaluated through ROS  
231 determination in samples treated or not with a peroxy radical generator (Amado et al. 2009).  
232 Briefly, a white 96-well microplate was divided into two regions, where region 1 (background)  
233 corresponds lines A, B, C, and D, and region 2 corresponds to the lines E, F, G and H. The first 3  
234 wells in both regions are reserved for the solvent; here, 10  $\mu$ L of solvent used for the samples was  
235 added. In the rest of the microplate, 10  $\mu$ L of sample was added in triplicate (three wells) in region  
236 1 and region 2. The reaction buffer (127.5  $\mu$ L) containing 30 mM HEPES (pH 7.2), 200 mM KCl  
237 and 1 mM  $MgCl_2$  was added to all plate pools. Then, 7.5  $\mu$ L of ultrapure water was added in region  
238 1, and 7.5  $\mu$ L of 2,2'-azobis 2-methylpropanamide dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich) in  
239 region 2 of the microplate. After this step, the microplate was put into a fluorescence microplate  
240 reader (Victor 2, Perkin Elmer), programmed to maintain the temperature at 37 °C. At this  
241 temperature, peroxy radicals were produced by the thermal decomposition of ABAP. Immediately  
242 before the microplate reading, 10  $\mu$ L of the fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate  
243 (H<sub>2</sub>DCF-DA) at a final concentration of 40  $\mu$ M was added to all wells. Thereafter, the non-  
244 fluorescent compound H<sub>2</sub>DCF was oxidized by ROS to the fluorescent compound DCF, which is  
245 detected at wavelengths of 488 and 525 nm, for excitation and emission, respectively. The thermal  
246 decomposition of ABAP and ROS formation was monitored for 30 min, with readings every 5 min.

247 Total fluorescence production was calculated by integrating the fluorescence units (FU)  
248 along the time of the measurement, after adjusting FU data to a second order polynomial function.  
249 The results were expressed as area difference of  $FU \times \text{min}$  in the same sample with and without  
250 ABAP addition and standardized to the ROS area without ABAP (background area). The relative  
251 difference between ROS area with and without ABAP was considered as a measure of antioxidant

252 capacity, with high area differences meaning low antioxidant capacity, since high fluorescence  
253 levels were obtained after adding ABAP, meaning low ability to neutralize peroxy radicals.

254 Radical scavenging activity against hydroxyl radical was determined according to the  
255 deoxyribose method with some modifications (Zhao et al. 2006). The solution of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  
256 ascorbic acid was prepared exclusively with deionized water. Thus, the following reagents were  
257 added to a test tube containing the plant extract: 100  $\mu\text{L}$  of 1 mM EDTA, 100  $\mu\text{L}$  of 1 mM  
258  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  of 36 mM deoxyribose, 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{L}$  of 1 mM ascorbic  
259 acid and 100  $\mu\text{L}$  of the extract. The volume was made up to 1 mL using phosphate buffer (25 mM,  
260 pH 7.4). The mixture was incubated for one hour at 37 °C and reaction stopped by the addition of 1  
261 mL 10% trichloroacetic acid (w/v) and 1 mL of 1% thiobarbituric acid (m/v) in buffer phosphate  
262 (pH 7.4). The tube was heated in a water bath for 15 min at 37 °C, removed and cooled. Water was  
263 added (final volume = 5 mL) and the absorbance measured at 532 nm.

264 Radical scavenging activity against superoxide radical was measured using the  
265 hypoxanthine/xanthine oxidase system (HPX/XOD) following the procedure described by Zhao et  
266 al. (2006) with short modifications. First, 100  $\mu\text{L}$  of EDTA ( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  of HPX ( $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  
267 and 200  $\mu\text{L}$  of NBT ( $1.42 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of plant extract. After 3  
268 minutes, the xanthine oxidase enzyme ( $0.75 \text{ unit} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was added to initiate the reaction. The  
269 reaction mixture was left in the dark for 40 minutes, and quenched with buffer solution ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
270  $\text{pH}$  7.4) until final volume = 3 mL. Then, the absorbance was measured at 560 nm, in an UV-Vis  
271 8453 Hewlett Packard spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). After, a blank  
272 sample was assessed, which was prepared in the same manner, but without the presence of NBT,  
273 and was run with a control test containing all reagents with the solvent employed in the sample,  
274 both as a blank control.

275  
276



### 277 3 Results and discussion

278

279 In Brazil, many plants are used for domestic use as medicaments. Several of these plants are  
280 still unexplored and need to be scientifically investigated for their use as new drugs. Medicinal  
281 plants represent the greatest sources of therapeutic agents due to the large structural diversity of  
282 metabolites produced (Fabricant et al. 2001). However, there are phytochemical compounds found  
283 in just one specie or genus, or in taxonomically related groups (Mazid et al. 2011). *J. gossypifolia*  
284 presents an important potential for the generation of pharmacological and/or biotechnological  
285 products, based on popular uses and biological studies. However, their major bioactive compounds  
286 are not fully exploited up to date (Félix-Silva et al. 2014).

287 The concentration of secondary metabolites depends on factors such as cultivation  
288 techniques, cultivar, growing conditions, ripening process, processing and storage. Some factors  
289 may increase their presence, such as stress, UV radiation, infection by pathogens and parasites,  
290 injuries, air pollution and exposure to extreme temperatures (Barcia et al. 2014, Rockenbach et al.  
291 2011). There are few studies applying water as extraction solvent of constituents from *J.*  
292 *gossypifolia*, but the people use this extractor when use this plant for medicinal purposes. Thus,  
293 there are few polar compounds identified as tannins and flavonoids. Normally, nonpolar solvents  
294 are used, which, due their features, contribute to the characterization of non-polar compounds, such  
295 as terpenes. Mono-, di- and triterpenes are widely present in the genus *Jatropha* (Felix-Silva et al.  
296 2014). This work led a phytochemical study considering also the infusion as an extraction method,  
297 solvent with greater popular use. The chemical composition of infusion was characterized, and  
298 compared with the ethanolic extract, which is the most frequently applied solvent in scientific  
299 works. This contributes to the identification and quantification of polar components in this species.

300 As plant extracts constitute a mixture of molecules with entirely different physicochemical  
301 properties, the use of analytical tools to allow the identification of the main bioactive compounds is

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

302 crucial to assess any information of those properties as well as to establish quality control parameters  
303 (Borges et al. 2007). Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has excelled  
304 as an analytical tool because it is able to provide the high selectivity required for analyzing complex  
305 matrices, such as vegetable matrices. Moreover, the use of ultra-high performance LC (UHPLC)  
306 allows an increase in the separation efficiency, while the analysis times can be considerably  
307 reduced. Additionally, tandem mass spectrometry using triple quadrupole analyzers is a powerful  
308 quantification tool (Faccin et al. 2016).

### 310 3.1 Analysis of phenolic compounds

311  
312 Phenolic compounds have great distribution in living beings, both in plants and  
313 microorganisms and are among the classes of compounds that have a wide range of structures. The  
314 structural element that characterizes them is a benzene nucleus with at least one hydrogen  
315 substituted by a hydroxyl, found in the free form or as part of another function such as, for example,  
316 ether, ester, glycosides. Therefore, these exhibit solubility in water and polar organic solvents. The  
317 classes of phenolic compounds addressed in this study were some derivatives of benzoic acid and  
318 hydroxycinnamic acid, flavonols, flavanols, flavone, coumarin and stilbene.

319 The chromatographic method applied in this study was developed by Faccin et al. (2016),  
320 aimed at the determination and quantification of some of the phenolic constituents of *J.*  
321 *gossypifolia*. The traditional use of this plant is through teas; thus, infusions were made to elucidate  
322 some of the potentially bioactive compounds to be extracted in this way. However, in the  
323 hypothesis that more phenolic compounds could be extracted, ethanolic maceration was also made,  
324 as described in section 3.3. Since the plant extracts were not free of phenolic compounds (non-  
325 availability blank samples), and considerable effects of ion suppression were seen by UHPLC-ESI-  
326 MS/MS, the quantifications were performed by standard addition methods.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

327 Figure 1A presents the chromatograms obtained for the analysis of the hydroalcoholic  
328 extract of *J. gossypifolia* (first harvest) by UHPLC-ESI-MS/MS in MRM mode. Sixteen of the  
329 twenty-four phenolic compounds analyzed were identified: gallic acid, chlorogenic acid, catechin,  
330 caffeic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferullic acid, rutin, quercitrin, 3-acetylcoumarin, *trans*-  
331 cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, and chrysin. Concentrations of phenolic  
332 compounds in *Jatropha gossypifolia* L. extracts determined by UHPLC-MS/MS are given in Table  
333 3.

334 Apigenin has already been found in ethanolic extracts of stems and leaves of *J. gossypifolia*  
335 (Mariz et al. 2010, Sabandar et al. 2013). Ferulic acid was found in its roots, after extraction with  
336 ethyl acetate (Mariz et al. 2010). For other phenolic compounds, no data were found in the presence  
337 of the studied species. To the best of our knowledge, the data published here appear to be  
338 unprecedented in the literature.

### 340 3.2 Analysis of triterpenic compounds

341  
342 The main compounds isolated from *Jatropha* genus are the terpenoids. In fact, many of them  
343 were isolated from different parts of *J. gossypifolia*. These compounds belong to a class of  
344 secondary metabolites in plants and are widely present in the plant kingdom, especially in plants  
345 that possess abundant chlorophyll (Gobbo et al. 2016).

346 The hydroalcoholic extracts were analyzed for screening of the studied terpenes. Figure  
347 1B presents the chromatograms obtained from UHPLC-APPI-MS/MS analysis of the  
348 hydroalcoholic extract of *Jatropha gossypifolia* L (first harvest) by UHPLC-ESI-MS/MS in MRM  
349 mode. The results reported here indicate the presence of three triterpenic compounds,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -  
350 amyryn and lupeol, which can be seen in Table 3. These species are compounds that are widely  
351 found in medicinal plants according to the literature (Hernández-Vázquez et al. 2012).  $\alpha$ -amyryn has

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

352 already been found in leaves of *J. gaueri* (Sabandar et al., 2013).  $\beta$ -amyrin was found in seeds of  
353 *J. gossypifolia*, *J. gaueri* leaves, and in *J. curcas* stems (Mariz et al. 2010, Sabandar et al. 2013).  
354  $\beta$ -Sitosterol has already been found in the seeds of *J. gossypifolia* stems (Mariz et al., 2010).

355

### 356 3.3 Seasonal variation of chemical markers analyzed

357

358 *Jatropha gossypifolia* L. is commonly found vegetating several Brazilian states; in semi-  
359 arid areas, this is of great importance due to its easy cultivation, adaptation to low fertility soils,  
360 degraded soils and drought tolerance (Albuquerque & Andrade 2002). The samples analyzed in this  
361 work came from the Brazilian Amazon region, which is characterized by climate with high annual  
362 temperatures and pluviometric regime marked by the occurrence of two seasons: rainy summer and  
363 dry winter. Herein, the harvest that refers to the dry season showed less quantity of all phenolic  
364 substances analyzed. However, the triterpenes  $\alpha$ -amyrin and lupeol were significantly higher in that  
365 harvest. Finally, these results confirm that seasonal variation has a direct and significant influence  
366 on the amount of the compounds in this plant species.

367

### 368 3.4 Radical scavenging activity

369

370 According to the results shown in Table 4, *J. gossypifolia* L. extracts presented *in vitro* activity  
371  
372 activity observed was not equal for all concentrations and reactive oxygen species, since these  
373 radicals have a half-life time and different potential reductions between them, and different  
374 concentrations of the extracts lead to changes in the concentration of antioxidant species shown in  
375 the plant. Moreover, the quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-MS/MS has  
376 shown flavonoids and phenolic compounds to be the main constituents of the plant. Infusion and

against different reactive oxygen species in three concentration levels. The radical scavenging

For Peer Review Only

47  
48  
49 372 activity observed was not equal for all concentrations and reactive oxygen species, since these  
50  
51 373 radicals have a half-life time and different potential reductions between them, and different  
52  
53 374 concentrations of the extracts lead to changes in the concentration of antioxidant species shown in  
54  
55 375 the plant. Moreover, the quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-MS/MS has  
56  
57 376 shown flavonoids and phenolic compounds to be the main constituents of the plant. Infusion and  
58  
59  
60

1  
2  
3 377 ethanolic extracts of *J. gossypifolia* L. showed the presence of flavonoids and phenolic acids such  
4  
5 378 as gallic, ferulic, p-coumaric acid, catechin, quercitrin, luteolin and others (Table 3), which could be  
6  
7 379 associated with the results of *J. gossypifolia* L. scavenging activity against superoxide, hydroxyl  
8  
9 380 and peroxy radicals. The higher antioxidant activity was found for the peroxy radical, probably  
10  
11 381 because of its greater stability when compared to other radicals.

12  
13 382 The infusion presented antioxidant activity against all oxygen species studied, while acetate,  
14  
15 383 butanolic and ethanolic fractions showed pro-oxidant activity against superoxide radicals. It could  
16  
17 384 be explained by the propensity of a flavonoid to inhibit free radical-mediated events being governed  
18  
19 385 by its chemical structure. Multiple hydroxyl groups confer upon the molecule substantial  
20  
21 386 antioxidant, chelating and pro-oxidant activities (Heim et al. 2002). In this context, the observed  
22  
23 387 pro-oxidant activity against superoxide radical for the fractions in higher concentration (1.0 and  
24  
25 388 2.0% w/v) is thought to be directly proportional to the number of hydroxyl groups of the flavonoids  
26  
27  
28 389 found in these extracts. Moreover, in higher concentrations, flavonoids and phenolic compounds  
29  
30 390 could present *in vitro* pro-oxidant activity (Cao et al. 1997). In this way, a toxicity study of these  
31  
32 391 extracts in different concentrations has been suggested for better understanding of the effects of *J.*  
33  
34 392 *gossypifolia* L. extracts *in vivo* and *in vitro*.

35  
36  
37  
38 393

39  
40  
41 394

### 42 395 **3.5 Pharmacological potential of *Jatropha gossypifolia* L.**

43  
44  
45 396

46  
47 397 Considering the diverse uses of the genus *Jatropha*, knowledge about the chemical compounds  
48  
49 398 present in the species *J. gossypifolia*, in different parts like leaves and fruits, is of common interest.  
50  
51 399 This is particularly in relation to the consumption of this plant by traditional communities and for  
52  
53 400 being potential in the production, for example, herbal medicines. Table 5 presents the compounds  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

401 analyzed, the compounds identified and quantified in the species, their respective chemical classes,  
402 and pharmacological activities.

403 Catechin, p-coumaric acid and luteolin were phenolic compounds analyzed with higher levels.  
404 From these findings, the plant would have the potential to present the following pharmacological  
405 activities: anticoagulant, anti-mutagenic, antioxidant, beta-adrenergic receptor blocker, cardiotoxic,  
406 allelopathic, anti-hepatotoxic, antispasmodic, cytotoxic, antibacterial and anti-inflammatory.

407 It can be highlighted that the ethanolic extract of *J. gossypifolia* L. induced oral hypotension in  
408 conscious normotensive rats and vasorelaxant activity (Abreu et al. 2003). This activity may occur  
409 due to the presence of catechin in large quantities, which exerts blocking activity of beta-adrenergic  
410 receptors and cardiotoxic. Apigenin also has a hypotensive effect. The presence of  $\alpha$ -amyrin  
411 compounds,  $\beta$ -amyrin and lupeol that could infer that this species can present anti-inflammatory  
412 potential.

413 The use of *J. gossypifolia* as a medicinal plant demonstrates that it has great potential as a  
414 source of bioactive molecules with pharmacological relevance. However, it is necessary to know  
415 the really important compounds in the pharmacological actions, aspiring to the chemical refinement  
416 of the products to eliminate the eventual toxic effects, or which could reduce the medicinal value of  
417 the species. In this way, it is possible to use them in the production of drugs or natural bioactive  
418 products for their application in T&CM (Félix-Silva et al. 2014).

419 Finally, other analytes not covered by this study were found to be present based on the  
420 interpretation of the fingerprints chromatograms obtained by LC-MS/MS in full scan mode from *J.*  
421 *gossypifolia* extracts. Some of these compounds were even more intense when paralleled to the  
422 studied analytes, and may be associated with a higher concentration and consequent greater  
423 pharmacological relevance.

424

425 **Conclusion**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

426

427 *Jatropha gossypifolia* has a therapeutic potential as a phytomedicine and therefore the  
428 establishment of innovative analytical methods to characterize their active components is crucial to  
429 the future development of a product with chemical markers of its quality. In last years, plant  
430 secondary metabolites with unknown pharmacological activities have been extensively investigated  
431 as a source of medicinal agents. In this work, *J. gossypifolia* extracts showed a large number of  
432 chemical constituents, which may be responsible for various pharmacological activities. Several  
433 polyphenolic compounds identified herein are unprecedented in the scientific literature for this plant  
434 species. Thus, this plant can be a new source of bioactive molecules for therapeutic purposes. The  
435 major chemical markers identified and quantified in the studied extracts of *J. gossypifolia* were (+)-  
436 catechin, *p*-coumaric acid, ferulic acid, luteolin,  $\alpha$ -amyryn and  $\beta$ -amyryn at  $\text{mg kg}^{-1}$  levels.

437

#### 438 Acknowledgments

439

440 The authors specifically thank the Research Program for the SUS (PPSUS) implemented by  
441 Decit/SCTIE/MS through the CNPq with the support of FAPERGS and SES/RS. The authors also  
442 thank *Embrapa Amazônia Oriental* (Belém/PA) for supplying the medicinal plants studied. This  
443 study was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq*  
444 (processes 487028/2012-0 and 440132/2014-2).

445

#### 446 References

447 Anastasiadi M, Pratsinis H, Kletsas D, Skaltsounis AL, Serkos A. 2010. Bioactive non-coloured  
448 polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant  
449 activities of their extracts. *Food Res Int.* 43:805–813.



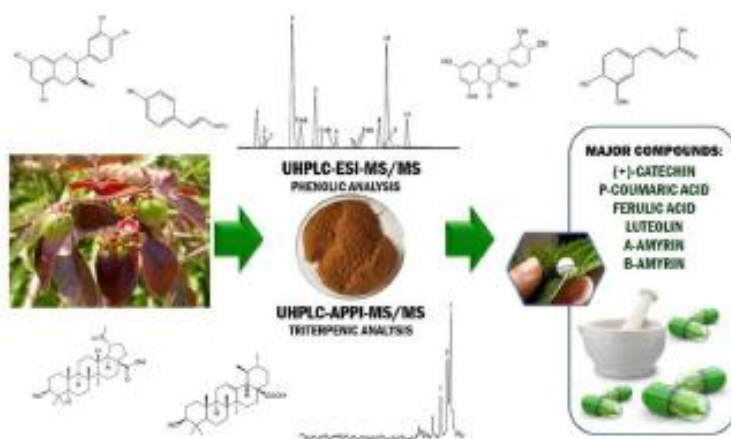
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 450 Apu AS, Hossain F, Rizwan F, Bhuyan SH, Matin M, Jamaluddin ATM. 2013. Study of  
451 pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *J Basic Clin Pharm.*  
452 4:20-24.
- 453 Barcia MT, Pertuzatti PB, Gómez-Alonso S, Godoy HT, Hermosín-Gutiérrez I. 2014. Phenolic  
454 composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and  
455 BRS Lorena. *Food Chem.* 159:95–105.
- 456 Borges CN, Bruns F., Almeida AA, Scarminio IS. 2007. Mixture–mixture design for the  
457 fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia*  
458 *siniensis*. *Anal Chim Acta.* 595:26–37.
- 459 Brasil. Fitoterapia: plantas de interesse ao SUS. Ministério da Saúde do Brasil. 2011. [cited 2016  
460 Sep 24]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>
- 461 Duke JA. Phytochemical and Ethnobotanical databases. [cited 2016 Dec 14]. Available from:  
462 <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/chemicals/show/35?et=>
- 463 Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug  
464 discovery. *Environ Health Perspect.* 109:69-75.
- 465 Faccin H, C. Viana, P.C. do Nascimento, D. Bohrer, L.M. de Carvalho. 2016. Study of ion  
466 suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography–  
467 electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1427:111–124.
- 468 Félix-Silva J, Giordani RB, Silva-Jr AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MF. 2014. *Jatropha*  
469 *gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology,  
470 and Toxicology of This Medicinal Plant. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:1-32.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 471 Gallo MBC, Sarachine MJ. 2009. Biological Activities of Lupeol. *International J Biomed Pharm*  
472 *Sci.* 3:46-66.
- 473 Gobo LA, Viana C, Lameira OA, Carvalho LM. A liquid chromatography-atmospheric pressure  
474 photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of  
475 triterpenoids in medicinal plant extracts. *J Mass Spectr.* 51: 558–565.
- 476 Gravina HD, Tafuri NF, Silva Júnior A, Fietto JLR, Oliveira TT, Diaz MAN Almeida MR. 2011. *In*  
477 *vitro* assessment of the antiviral potential of *trans*-cinnamic acid, quercetin and morin against Equid  
478 herpes virus 1. *Res Veter Sci.* 91:158–162.
- 479 Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and  
480 structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 13:572 -584
- 481 Hernández-Vázquez L, Palazon J, Navarro-Ocaña A. 2012. The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -  
482 amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. In: Venke-teshwer. R. A Global  
483 Perspective of the Role in Nutrition and Health. Ed. Phytochemicals. 487-501. [cited 2016 Dec 24].  
484 Available from: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/32958/InTech-](http://cdn.intechopen.com/pdfs/32958/InTech-The_pentacyclic_triterpenes_amyrius_a_review_of_sources_and_biological_activities.pdf)  
485 [The\\_pentacyclic\\_triterpenes\\_amyrius\\_a\\_review\\_of\\_sources\\_and\\_biological\\_activities.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/32958/InTech-The_pentacyclic_triterpenes_amyrius_a_review_of_sources_and_biological_activities.pdf)
- 486 Khyade MS, Vaikos NP. 2011. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of  
487 *Jatropha gossypifolia* L. *Int J Res Ayurveda Pharm.* 2:177–180.
- 488 Lakshmi Narayanan BL, Pradeep Rajkumar LA, Arulanandham A, Satheesh Babu N, Gayathri T,  
489 Raju A. 2012. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory activity of synthesized 3(Substituted)  
490 Chromen-2-One. *Int. J Pharm. Sci Res.* 3:474-478.
- 491 Mariz SR, Borges ACR, Melo-Diniz MFF, Medeiros IA. 2010. Possibilidades terapêuticas e risco  
492 toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Rev Bras Pl Med*  
493 *Botucatu.* 12:346-357.

- 1  
2  
3 494 Mazid M, Khan TA, Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of  
4  
5 495 plants. *Biol and Medic.* 3:232-249.  
6  
7  
8 496 Rockenbach II, Gonzaga LV, Rizelio VM, Gonçalves AESS, Genovese MI, Fett R. 2011. Phenolic  
9  
10 497 compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis*  
11  
12 498 *labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International.* 44:897-901.  
13  
14  
15 499 Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM, Sahidin I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and  
16  
17 500 pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry.* 85:7-29.  
18  
19  
20 501 Saini V, Mishra R, Mandloi S, Yadav N. 2015. Analysis of the Phytochemical Content of *Jatropha*  
21  
22 502 *gossypifolia* L. *Chemical and Process Engineering Research.* 35:99-104.  
23  
24  
25  
26 503 Silva KA, Paszcuk AF, Passos GF, Silva ES, Bento AF, Meotti FC, Calixto JB. 2011. Activation of  
27  
28 504 cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and  
29  
30 505 neuropathic persistent pain in mice. *Pain.* 152:1872-1887.  
31  
32  
33 506 WHO. 2013. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. WHO Library Cataloguing-in-  
34  
35 507 Publication Data. [cited 2016 Oct 19]. Available from:  
36  
37 508 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1)  
38  
39  
40  
41 509 Wolfender JL. 2009. HPLC in natural product analysis: the detection issue. *Planta Med.* 75: 719-  
42  
43 510 734.  
44  
45  
46  
47 511 Zhang XP, Zhang ML, Su XH, Huo CH, Gu YC, Shi QW. 2009. Chemical Constituents of the  
48  
49 512 Plants from Genus *Jatropha*. *Chem Biodiv.* 6:2166-2183.  
50  
51  
52  
53 513 Zhao H., Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W, Gu G. 2006. Effects of extraction  
54  
55 514 solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for  
56  
57 515 free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem.* 54:7277-7286.  
58  
59  
60



338x20um x 96 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

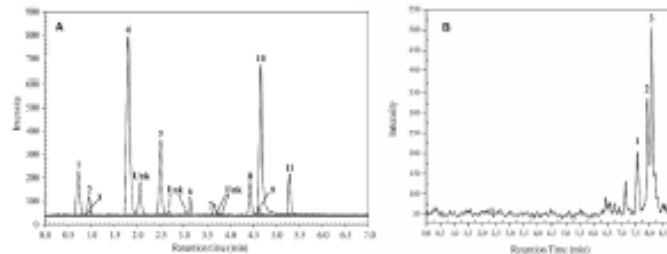


Figure 1 (A) Chromatograms obtained for the analysis of the hydroalcoholic extract of *Jatropha gossypifolia* L. (first harvest) by UHPLC-ESI-MS/MS in MRM mode. Column: Zorbax SB C18 2.1x50 mm (1.8  $\mu$ m). Gradient elution with 0.1% acetic acid in water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate (0.8 mL min<sup>-1</sup>) according to the following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). Phenolic compounds identified: (1) Catechin, (2) Caffeic acid, (3) Vanillic acid, (4) p-coumaric acid, (5) Ferullic acid, (6) Rutin, (7) Quercitrin, (8) trans-cinnamic acid, (9) Quercetin, (10) Luteolin, (11) Apigenin. (B) Chromatograms obtained from UHPLC-APPI-MS/MS analysis of the hydroalcoholic extract of *Jatropha gossypifolia* L. (first harvest) in MRM mode. Column: Zorbax SB C18 2.1x50 mm (1.8  $\mu$ m). Mobile phase gradient: 70% acetonitrile/water from zero to 3.5 min and 100% acetonitrile after 4.0 min (8 min run). Flow rate gradient: 0.6 mL min<sup>-1</sup> from zero to 4 min and 0.8 mL min<sup>-1</sup> after 5 min run (8 min run). Triterpenic compounds identified: (1) lupeol, (2)  $\beta$ -amyrin, (3)  $\alpha$ -amyrin.

Figure 1A

2318x865mm (96 x 96 DPI)

**Table 1.** Parameters and conditions of the UHPLC-MS/MS analysis of phenolic and triterpenic compounds.

Parameter	<i>Phenolic compounds</i>	<i>Triterpenic compounds</i>
Vaporizer temperature (°C)	–	300
Gas temperature (°C)	250	350
Nebulizer (psi)	30	45
Gas flow (L min <sup>-1</sup> )	11	10
Capillary Voltage (V)	2400	5500
Dopant flow (μL min <sup>-1</sup> )	–	55

**Table 2** - Retention time windows (RTW) and MS/MS parameters of the phenolic and triterpenic compounds.

Compound	RTW (min)	Fragmentor (V)	Source polarity	Quantification transition*	Confirmation transition*
<i>Phenolic compounds</i>					
Gallic acid	0.24-0.43	106	-	169.0 > 125.1 (10)	-
Chlorogenic acid	0.61-0.94	104	-	353.1 > 191.1 (5)	-
(+)-catechin	0.66-0.88	134	-	289.1 > 245.1 (10)	289.1 > 203.2 (15)
Vanillic acid	0.87-1.13	92	-	167.0 > 152.2 (10)	167.0 > 123.1 (8)
Caffeic acid	0.89-1.10	106	-	179.0 > 135.1 (10)	-
6-hydroxycoumarin	1.48-1.77	124	-	161.0 > 133.2 (17)	161.0 > 105.2 (17)
<i>p</i> -coumaric acid	1.70-2.01	96	-	163.0 > 119.1 (9)	-
Ferulic acid	2.40-2.66	88	-	193.1 > 134.1 (9)	193.1 > 178.1 (7)
Rutin	2.87-3.43	210	-	609.1 > 300.1 (31)	-
4-Hydroxycoumarin	3.26-3.54	130	-	161.0 > 117.2 (15)	-
Rosmarinic acid	3.50-3.77	138	-	359.1 > 161.0 (7)	359.1 > 197.1 (7)
Quercitrin	3.48-3.82	164	-	447.1 > 301.1 (17)	-
Myricetin	3.63-3.91	128	-	317.0 > 150.9 (21)	317.0 > 178.8 (21)
Fisetin	3.71-4.07	120	-	285.0 > 135.0 (15)	285.0 > 163.0 (15)
<i>trans</i> -Resveratrol	3.82-4.10	124	-	227.1 > 185.2 (13)	227.1 > 143.0 (13)
3-acetylcoumarin	4.02-4.31	80	+	211.0 > 211.0 (0)	-
<i>trans</i> -cinnamic acid	4.26-4.54	90	-	147.0 > 103.2 (5)	147.0 > 77.1 (15)
Quercetin	4.37-4.96	126	-	301.0 > 151.1 (17)	301.0 > 179.0 (15)
Luteolin	4.37-4.97	162	-	285.0 > 133.2 (27)	285.0 > 151.1 (27)
Apigenin	5.19-5.53	136	-	269.0 > 117.1 (29)	269.0 > 149.0 (20)
Kaempferol	5.25-5.49	164	-	285.0 > 239.0 (29)	285.0 > 117.2 (31)
3,6-dihydroxyflavone	6.16-6.51	126	-	253.1 > 197.0 (20)	253.1 > 208.0 (21)
Chrysin	6.26-6.84	130	-	253.1 > 143.1 (25)	253.1 > 106.9 (25)
Galangin	6.60-6.87	156	-	269.0 > 169.1 (30)	269.0 > 211.2 (29)
2-naphthol (IS)	5.15-5.40	134	-	143.0 > 115.1 (24)	-
<i>Triterpenic compounds</i>					
Arjunic acid	0.440	120	+	489.3 > 408.9 (10)	489.3 > 472.7 (10)
Maslinic acid	0.847	75	+	473.3 > 411.0 (6)	473.3 > 149.0 (6)
Betulinic acid	1.966	90	+	439.4 > 393.5 (15)	439.4 > 287.0 (15)
Ursolic acid	2.136	120	+	439.4 > 203.3 (20)	439.4 > 191.0 (20)
Erythrodiol	3.271	124	+	425.4 > 217.3 (20)	425.4 > 177.0 (20)
Lupeol	6.590	120	+	409.1 > 109.1 (32)	409.1 > 137.2 (32)
$\beta$ -amyrin	6.980	120	+	409.1 > 109.1 (32)	409.1 > 149.1 (32)
$\alpha$ -amyrin	7.150	135	+	409.1 > 109.1 (32)	409.1 > 134.9 (32)
Friedelin	7.335	110	+	409.1 > 109.1 (32)	409.1 > 121.1 (32)
Sitosterol	7.779	130	+	396.9 > 109.1 (32)	396.9 > 146.9 (32)
Stigmasterol	7.390	80	+	394.7 > 159.0 (33)	394.7 > 118.9 (33)
Campesterol	7.324	135	+	382.8 > 160.8 (25)	382.8 > 133.0 (25)

\*Collision energy (V) is given in brackets.

Table 3. Concentrations of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypifolia* L. extracts determined by UHPLC-MS/MS. Values are given in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of plant followed by standard deviation of concentration (n=3).

Compound	Infusion		Hydroethanolic crude extract			Fruit
	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	3 <sup>rd</sup> harvest	
Gallic acid	0.4 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.2 ± 0.8
Chlorogenic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.3 ± 0.6
(+)-catechin	402.6 ± 22.9	27.5 ± 1.1	78.1 ± 2.7	21.9 ± 0.6	360.9 ± 3.2	45.8 ± 2
Vanillic acid	6.4 ± 1.2	15.9 ± 2.0	2.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2	6.4 ± 0.9	22.2 ± 0.4
Caffeic acid	5.2 ± 0.5	-	3.4 ± 0.1	1.6 ± 0.04	6.6 ± 0.3	3.4 ± 0.4
p-coumaric acid	117.8 ± 7.3	28.6 ± 0.7	92.5 ± 4.0	26.3 ± 0.3	89.6 ± 0.9	3.6 ± 0.3
Ferulic acid	50.5 ± 1.3	3.2 ± 0.3	27.2 ± 0.4	6.5 ± 0.1	39.5 ± 0.2	9.1 ± 0.1
Rutin	8.9 ± 0.3	1.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2
Quercitrin	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.02	0.2 ± 0.01	1.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01
3-acetylcoumarin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28.1 ± 1.6	n.d.
trans-cinnamic acid	15.7 ± 0.5	n.d.	6.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1	1.8 ± 0.3
Quercetin	n.d.	n.d.	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	16.4 ± 0.7	0.7 ± 0.2
Luteolin	9.7 ± 0.3	14.9 ± 0.4	80.9 ± 3.7	13.4 ± 0.4	81.1 ± 1.8	5.7 ± 0.1
Apigenin	2.2 ± 0.2	5.6 ± 0.2	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.2	32.3 ± 1.0	0.6 ± 0.1
Kaempferol	n.d.	n.d.	n.d.	1.2 ± 0.2	10.7 ± 1.3	n.d.
Chrysin	n.d.	n.d.	n.d.	0.1 ± 0.05	n.d.	n.d.
α-amyrin	n.a.	n.a.	470.9 ± 2.3	1267.8 ± 3.6	n.a.	n.a.
β-amyrin	n.a.	n.a.	209.5 ± 4.9	196.9 ± 5.4	n.a.	n.a.
Lupool	n.a.	n.a.	5.0 ± 4.8	46.6 ± 3.4	n.a.	n.a.

n.d.=not detected; n.a.= not analyzed



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49**Table 4.** Antioxidant activity of different extracts of *Jatropha gossypifolia* against superoxide, hydroxyl and peroxy radicals.

Extract	Concentration (%)	Antioxidant Activity (%)		
		Free radical		
		Superoxide	Hydroxyl	Peroxy
Infusion	0.1	8.4 ±3.6	19.9 ±6.2	84.8 ±5.8
	1.0	66.8 ±0.2	56.8 ±0.7	99.7 ±13.9
	2.0	22.2 ±0.4	11.3 ±4.4	38.0 ±4.8
Hydroethanolic Extract	0.1	90.4 ±1.9	96.6 ±3.0	51.3 ±5.2
	1.0	POA	87.3 ±4.7	74.7 ±6.3
	2.0	POA	63.1 ±7.3	83.8 ±3.3
Acetate Fraction	0.1	74.2 ±0.1	72.3 ±5.1	47.4 ±10.3
	1.0	POA	84.8 ±8.5	69.2 ±13.6
	2.0	POA	86.5 ±3.1	95.0 ±4.4
Butanolic Fraction	0.1	89.7 ±1.3	53.2 ±5.3	78.4 ±4.5
	1.0	POA	29.6 ±6.6	72.4 ±4.3
	2.0	POA	11.8 ±1.5	92.0 ±3.8

POA = prooxidant activity

**Table 5** - Chemical class and pharmacological activity of compounds isolated from *Jatropha gossypifolia*.

Chemical class	Compound	Pharmacological activity
Hydroxybenzoic acids	Vanillic acid	Anthelmintic, antibacterial, anti-inflammatory and laxative. <sup>1</sup>
	Gallic acid	Antiadenovirus, anti-allergic, anti-anaphylactic, anti-asthmatic, anti-bronchitic, anti-fu, anti-hepatotoxic, anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-septic, astringent, bacteriostat, bronchodilator, hepatoprotective, immunostimulant and myorelaxant. <sup>1</sup>
Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	Anti-adenoviral, anti-fu, antispasmodic, anti-hypercholesterolemic and sunscreen. <sup>1</sup>
	Ferulic acid	Allelopathic, analgesic, anti-aggregant, anti-allergic, antibacterial, anti-estrogenic, anti-hepatotoxic, anti-inflammatory, anti-mutagenic, antiviral, candidicide, cholagogue, choleric, fungicide, hepatoprotective, herbicide, insecticide, sunscreen. <sup>1</sup>
	<i>p</i> -coumaric acid	Allelopathic, antibacterial, antioxidant, anti-hepatotoxic, antispasmodic, and cytotoxic. <sup>1</sup>
	<i>trans</i> -cinnamic acid	Antimicrobial, antifungal and antitumor activity. <sup>4</sup>
Coumarins	3-acetylcoumarin	Anti-oxidant and anti-inflammatory activity. <sup>5</sup>
Flavones	Apigenin	Anti-allergic, antibacterial, anti-dermatitic, anti-mutagenic, cytotoxic, diuretic, estrogenic and hypotensive. <sup>1</sup>
	Luteolin	Antibacterial and anti-inflammatory. <sup>1</sup>
Flavanols	(+)-catechin	Anticoagulant, anti-mutagenic, antioxidant, beta-adrenergic receptor blocker and cardiotoxic. <sup>1</sup>
Flavonols	Kaempferol	Antihistaminic, anti-mutagenic, antispasmodic and choleric. <sup>1</sup>
	Quercetin	Anti-anaphylactic, antibacterial, anti-mutagenic, antioxidant, antiviral, bradycardiac and cytotoxic. <sup>1</sup>
	Quercitrin	Antibacterial, anti-fu, anti-hemorrhagic, anti-herpetic, anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-ulcer, choleric, diuretic and hypoglycemic. <sup>1</sup>
	Rutin	Antibacterial, anti-couvolusant, anti-dermatitic, anti-diabetic, anti-hepatotoxic, anti-herpetic, anti-hypertensive, anti-malarial, hypocholesterolemic, hypotensive, insecticide, mutagenic and myorelaxant. <sup>1</sup>
Triterpenes	$\alpha$ -amyrin	Antinociceptive and anti-inflammatory properties. <sup>4</sup>
	$\beta$ -amyrin	Antinociceptive and anti-inflammatory properties. <sup>2</sup>
	Lupeol	Anti-arthritis, anti-inflammatory, anti-malarial, anti-tumor, chemopreventive agent, hepatoprotective. <sup>3</sup>

Duke, 2016; <sup>4</sup>Silva et al. 2011; <sup>5</sup>Gallo et al. 2009; <sup>2</sup>Gravina et al. 2011; <sup>3</sup>Lakshmi et al. 2012.