

BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA

ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE  
*Jatropha multifida* L. (EUPHORBIACEAE).

CURITIBA  
2011

BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA

ESTUDO FITOQUÍMICO E DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE  
*Jatropha multifida* L. (EUPHORBIACEAE).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Co-orientadora : Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA  
2011

Ao meu marido, Marcelo, amado companheiro de todos os momentos.

Aos meus pais, Vanda e Adolar.

Aos meus irmãos Marcelo, Paula e Ana.

À minha família, em especial meus tios Nelson Hirota e Maria Aparecida  
Barbosa Hirota.

Por todo amor, carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela confiança, paciência e orientação.

À minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel, pela co-orientação confiança e apoio.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Luísa Lacava Lordello, do Departamento de Química da UFPR, pela obtenção e contribuição na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Às doutorandas Cristina Mayumi S. Miyasaki e Cristina Peitz, pela obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , pela parceria no trabalho diário, sugestões e amizade.

Às doutorandas Maria Cristina Verdán, Josiane de Fátima G. Dias, Cristiane Bezerra e Milena Kalegari pela parceria, apoio e sugestões.

A todos meus colegas de mestrado, em especial à Camila Mercali pela amizade e Carlos Gemin pelas análises em CLAE.

Aos meus amigos Lilian Gassen, Geraldo Leão, e Luciana Grigolo e Andrea Dillemburg pelo carinho e apoio.

Ao programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

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

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha.”

*Confúncio*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a composição fitoquímica e possíveis atividades biológicas da espécie *Jatropha multifida* L., família Euphorbiaceae. O material foi coletado na cidade de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. O estudo foi realizado a partir das folhas e cascas, com as quais foram preparados extratos etanólicos brutos em aparelho de Soxhlet e posteriormente fracionados com hexano, clorofórmio e acetato de etila. A partir das frações foram isolados três compostos através de colunas cromatográficas, os quais foram identificados com auxílio dos métodos espectroscópicos UV, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional. Os compostos identificados foram os flavonoides Vitexina e Isovitexina e o Triterpeno Lupeol. Através de estudos de algumas atividades biológicas com os extratos e compostos isolados, esta espécie exibiu poder antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico e redução do radical DPPH. Os compostos Vitexina e Isovitexina apresentaram  $\text{IC}_{50}$  54,37 e 87,27  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ . A fração acetato de etila das cascas revelou  $\text{IC}_{50}$  17,23  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , valor equiparado ao dos padrões utilizados. Pelos métodos de letalidade frente à *Artemia salina* e teste de Hemólise alguns extratos apresentaram toxicidade, entretanto, sem interferir na integridade de eritrócitos. Ambos flavonoides não são tóxicos. Os extratos revelaram potencial alelopático relevante nos ensaios de germinação, crescimento, índice mitótico, atividade enzimática frente às enzimas SOD, POD, CAT e  $\alpha$ -amilase, teor de clorofila e respiração. Em todos os ensaios os extratos das cascas foram mais bioativos que os das folhas.

Palavras-chave: *Jatropha multifida*. Euphorbiaceae. Antioxidante. Aleloquímicos. Flavonoides. Atividade hemolítica.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the phytochemical composition and possible biological activities of the species *Jatropha multifida* L., Euphorbiaceae family. The material was collected in Alta Floresta town, Mato Grosso, Brazil. The study was conducted from the leaves and barks, which ethanol extracts were generated in Soxhlet apparatus and then fractionated with hexane, chloroform and ethyl acetate. From the fractions it was possible to isolate three compounds with chromatographic column, which were identified with spectroscopic methods UV, IR and NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , HSQC and HMBC experiments. The compounds identified were, two flavonoids, Vitexin and Isovitexin, and one triterpene, Lupeol. Through studies of some biological activities with the extracts and isolated compounds, this species exhibited antioxidant power beyond the method of reducing the phosphomolybdenum complex and reduction of DPPH radical. The compounds Vitexin and Isovitexin showed  $\text{IC}_{50}$  54.37 and 87.27  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . The ethyl acetate fraction of the barks showed  $\text{IC}_{50}$  17.23  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , equivalent to the value of the standards used. By the methods of Brine shrimp lethality and Haemolysis test, some extracts showed toxicity, but did not interfere in the integrity of erythrocytes. Both flavonoids are not toxic. The extracts showed relevant allelopathic potential in the germination and growth bioassays, mitotic index, enzymatic activity against enzymes SOD, POD, CAT and  $\alpha$ -amylase, chlorophyll content and respiration. In all tests the barks extracts were more bioactive than leaves.

Keywords: *Jatropha multifida*. Euphorbiaceae. Antioxidant. Allelochemicals. Flavonoids. Hemolytic activity.

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo investigar la composición fitoquímica y las posibles actividades biológicas de la especie *Jatropha multifida* L., familia de las euforbiáceas. El material fue recogido en la ciudad de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. Fueron utilizadas para el estudio las hojas y las cortezas, con las cuales fueron preparados extractos etanólicos en el aparato de Soxhlet y fraccionados con hexano, cloroformo y acetato de etilo. De las fracciones se aislaron tres compuestos a través de columnas cromatográficas, que fueron identificados con la ayuda de espectroscopía de UV, IR RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  uni y bidimensional. Los compuestos identificados fueron los flavonoides Vitexina y Isovitexina y el triterpeno Lupeol. A través de estudios de algunas actividades biológicas con los extractos y compuestos aislados, esta especie exhibió potencia antioxidante para reducir el complejo fosfomolibdeno y los radicales DPPH. Los compuestos Vitexina y Isovitexina mostraron  $\text{IC}_{50}$  54.37 y 87.27  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . La fracción de acetato de etilo de las cortezas mostró  $\text{IC}_{50}$  17.23  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , equivalente al valor de los padrones utilizados. Por los métodos de Letalidad de *Artemia salina* y Hemólisis algunos de los extractos mostraron cierta toxicidad, pero no hubo interferencia en la integridad de los eritrocitos. Los dos flavonoides no presentaron toxicidad. Los extractos mostraron considerable potencial alelopático en las pruebas de germinación y crecimiento, índice mitótico, actividad enzimática em contra las enzimas SOD, POD, CAT y  $\alpha$ -amilasa, contenido de clorofila y respiración. En todas las pruebas los extractos de las cortezas fueron más bioactivos que los extractos de las hojas.

Palabras clave: *Jatropha multifida*. Euphorbiaceae. Antioxidante. Aleloquímicos. Flavonoides. Actividad hemolítica.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – FOTO ILUSTRATIVA DE EXEMPLAR DE <i>Jatropha multifida</i> L.....	25
FIGURA 02 – FOTO ILUSTRATIVA DE FLORES E FOLHAS DE <i>Jatropha multifida</i> L. ...	25
FIGURA 03 – DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Jatropha multifida</i> L. NO GLOBO .....	26
FIGURA 04 – ESTRUTURA QUÍMICA DE UM PRECURSOR DOS TANINOS HIDROLIZÁVEIS.....	27
FIGURA 05 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS MONÔMEROS BÁSICOS DOS TANINOS CONDENSADOS .....	28
FIGURA 06 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA PROPOSTA DEGRADAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS CATALISADA POR ÁCIDO MINERAL .....	28
FIGURA 07 – ESTRUTURA QUÍMICA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES .....	29
FIGURA 08 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE PESQUISA .....	37
FIGURA 09 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO PRECIPITADO AEF-1.....	68
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO EM UV DO COMPOSTO AEF-1 .....	68
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS EM CLAE EM 354nm. ....	70
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA APÓS A ADIÇÃO DO COMPOSTO AEF-1 AO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS EM 354nm .....	71
FIGURA 13 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO I4.....	73
FIGURA 14 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO FHF-1.....	74
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FHF-1.....	75
FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA FHF-1 .....	76
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FHF-1 .....	76
FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA FHF-1 .....	77
FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DAS METILAS DA SUBSTÂNCIA FHF-1 .....	78
FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LUPEOL .....	78
FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA AEF-1.....	81
FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DO COMPOSTO AEF-1 .....	85
FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DEPT 135° DO COMPOSTO AEF-1 .....	86
FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DO COMPOSTO AEF-1 .....	87
FIGURA 25 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO AEF-1 CONTENDO AS CORRELAÇÕES DE HIDROGÊNIO E CARBONOS.....	89

FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITEXINA .....	89
FIGURA 27 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA I4 .....	91
FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO AEF-I1 EM METANOL.....	95
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO I4 EM METANOL.....	96
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO AEF-I1 CO-INJETADO COM ISOLADO I4 EM METANOL.....	97
FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA I4 .....	98
FIGURA 32 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA I4, COM INTEGRAÇÃO.....	99
FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ISOVITEXINA .....	100
FIGURA 34 – FOTO ILUSTRATIVA DO RESULTADO NEGATIVO PARA HEMÓLISE	103
FIGURA 35 – FOTO ILUSTRATIVA DO DEPÓSITO DE ERITRÓCITOS NO FUNDO DO TUBO. RESULTADO NEGATIVO.....	104
FIGURA 36 – FOTO DA PLACA DE ÁGAR-SANGUE SEM HALO DE HEMÓLISE: RESULTADO NEGATIVO.....	105
FIGURA 37 – CROMATOGRAFIA EM CCD, ENSAIO DPPH QUALITATIVO. ....	107
FIGURA 38 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (INFLUÊNCIA EXTRATOS CASCA).....	121
FIGURA 39 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (INFLUÊNCIA EXTRATOS FOLHA). ....	123
FIGURA 40 – PROTEÍNAS TOTAIS.....	125
FIGURA 41 – ATIVIDADE SOD.....	126
FIGURA 42 – ATIVIDADE DA PEROXIDASE .....	127
FIGURA 43 – ATIVIDADE DA CALATASE .....	128
FIGURA 44 – ATIVIDADE DA α-AMILASE .....	129
FIGURA 45 – ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E TEOR DE CLOROFILA .....	130
FIGURA 46 – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA (AUMNETO 1000x) DA MORFOLOGIA DA REGIÃO APICAL E ZONA PILÍFERA DE ALFACE SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DAS CASCAS. ....	132
FIGURA 47 – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA (AUMNETO 1000X) DA MORFOLOGIA DA REGIÃO APICAL E ZONA PILÍFERA DE ALFACE SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DAS FOLHAS.....	133

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	20
QUADRO 02 – ESTRUTURAS QUÍMICAS BÁSICAS DAS CLASSES DE FLAVONOIDES. ....	31
QUADRO 03 – EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA .....	49
QUADRO 04 – EQUAÇÃO UTILIZADA PARA CÁLCULO DA PORCENTAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA%) .....	50
QUADRO 05 – RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO DA ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DAS CASCAS E FOLHAS DE <i>Jatropha multifida</i> L.....	66

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM NaOH.....	82
GRÁFICO 02 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM NaOAc. ....	83
GRÁFICO 03 – ESPECTRO UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E AEF-1+NaOAc+ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	83
GRÁFICO 04 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM AlCl <sub>3</sub> /HCl.....	84
GRÁFICO 05 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOH. ....	92
GRÁFICO 06 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOAc.....	93
GRÁFICO 07 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOAc.....	93
GRÁFICO 08 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+AlCl <sub>3</sub> +HCl. ....	94
GRÁFICO 09 – RETA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS .....	108
GRÁFICO 10 – RETA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS.....	108
GRÁFICO 11 – RETA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS .....	109
GRÁFICO 12 – RETA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS .....	109
GRÁFICO 13 – RETA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS.....	110
GRÁFICO 14 – RETA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS .....	110
GRÁFICO 15 – RETA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS.....	111
GRÁFICO 16 – RETA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS CASCAS .....	111
GRÁFICO 17 – RETA DA VITAMINA C .....	112
GRÁFICO 18 – RETA DA RUTINA.....	112
GRÁFICO 19 – RETA VITEXINA .....	113
GRÁFICO 20 – RETA ISOVITEXINA.....	113

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – ESQUEMA DA DILUIÇÃO EM SÉRIE DO EXTRATO VEGETAL .....	47
TABELA 02 – TEOR DE UMIDADE DA CASCA DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	62
TABELA 03 – TEOR DE UMIDADE DA FOLHA DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	62
TABELA 04 – CINZAS TOTAIS DA CASCA DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	63
TABELA 05 – CINZAS TOTAIS DE FOLHAS DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	63
TABELA 06 – RENDIMENTO DO EXTRATO DA CASCA DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	63
TABELA 07 – RENDIMENTO DO EXTRATO DA FOLHA DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	64
TABELA 08 – RENDIMENTO DO RESÍDUO CLOROFILIANO DAS FOLHAS DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	64
TABELA 09 – TEOR DE SÓLIDOS EXTRATO BRUTO CASCA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	64
TABELA 10 – TEOR DE SÓLIDOS EXTRATO BRUTO FOLHA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	65
TABELA 11 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA CASCA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	67
TABELA 12 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	67
TABELA 13 – VALORES DE RMN DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C DO COMPOSTO FHF-1 .....	79
TABELA 14 - DADOS DO ESPECTRO EM ULTRAVIOLETA, AEF-1.....	81
TABELA 15 – DESLOCAMNETOS QUÍMICOS (ppm) DE RMN DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C DO ISOLADO AEF-1 E DADOS DE LITERATURA. ....	88
TABELA 16 - DADOS DO ESPECTRO EM ULTRAVIOLETA DO COMPOSTO I4.....	91
TABELA 17 – DESLOCAMNETOS QUÍMICOS (ppm) DE RMN DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C DO ISOLADO I4 E DADOS DE LITERATURA. ....	100
TABELA 18 – RESULTADOS DE TOXICIDADE CASCA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	102
TABELA 19 – RESULTADOS DE TOXICIDADE FOLHA <i>Jatropha multifida</i> L. ....	102
TABELA 20 – RESULTADOS DO ENSAIO PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOXFOMOLIBDÊNIO .....	106
TABELA 21 – RESULTADOS DE IC <sub>50</sub> E TESTE TUKEY PARA A REDUÇÃO DO DPPH.....	114
TABELA 22 – TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO .....	115
TABELA 23 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	117
TABELA 24 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS CASCAS DE <i>Jatropha multifida</i> L. ....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAR%	- Atividade Antioxidante Relativa
AA%	- Atividade Antioxidante
A	- Absorbância
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
°C	- Graus Celsius
GRISEB.	- Grisebach
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
IV	- Infra Vermelho
J.	- <i>Jatropha</i>
L.	- Linnaeus
M	- Mol por litro
µl	- Microlitro
nm	- Nanômetro
N	- Mol por litro
pH	- Potencial Hidrogeniônico
RMN	- Ressonância Nuclear Magnética
UV	- Ultra Violeta
<sup>1</sup> H	- Hidrogênio
<sup>13</sup> C	- Carbono 13
HSQC	- Heteronuclear Multiple Quantun Correlation <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C
HMQC	- Heteronuclear Miltiple Bond Coherence
UEA.gMF	- Unidade de Atividade Enzimática por grama de Material Fresco
mg.ml <sup>-1</sup>	- Miligrama por mililitros
SOD	- Superóxido Dismutase
POD	- Peroxidase
CAT	- Catalase
ha	- hectare
Mo	- Molibdênio
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
p/v	- peso/volume
min	- minutos
°GL	- grau Gay-Lussac
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA <i>Jatropha multifida</i> .....	20
3.1.1 Família Euphorbiaceae .....	20
3.1.2 Gênero <i>Jatropha</i> .....	22
3.1.3 Espécie <i>Jatropha multifida</i> L. ....	24
3.1.4 Taninos .....	26
3.1.5 Flavonoides .....	29
3.2 LETALIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	32
3.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	32
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	33
3.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	34
<b>4 METODOLOGIA DE PESQUISA</b> .....	36
4.1 FASES NO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA .....	36
4.1.1 Obtenção do Material Botânico .....	38
4.1.2 Estudos Fitoquímicos .....	38
4.1.2.1 Marcha Sistemática Fitoquímica .....	38
4.2 LETALIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	45
4.2.1 Preparo da solução salina .....	45
4.2.2 Preparo das amostras .....	45
4.2.3 Eclosão dos ovos .....	46
4.2.4 Avaliação da toxicidade .....	46
4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	46
4.3.1 Operações preliminares .....	46
4.3.2 Teste de hemólise .....	47
4.3.3 Teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue .....	48
4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	48
4.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênico .....	48
4.4.2 Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	49
4.5 AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA .....	51
4.5.1 Preparo das amostras .....	51
4.5.2 Preparo do material .....	52
4.5.3 Teste de germinação .....	52
4.5.4 Teste de crescimento .....	53
4.6 BIOENSAIOS DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	53
4.6.1 Índice Mitótico .....	54
4.6.2 Atividade Enzimática .....	55

4.6.2.1 Preparo do material vegetal .....	57
4.6.2.2 Proteínas Totais .....	57
4.6.2.3 Atividade Superóxido dismutase (SOD) .....	58
4.6.2.4 Atividade da Peroxidase.....	59
4.6.2.5 Atividade da Catalase (CAT) .....	59
4.6.2.6 Atividade da $\alpha$ -amilase .....	60
4.6.2.7 Teor de Clorofila e Respiração .....	60
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA .....	62
5.2 DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS .....	63
5.3 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO EXTRATO .....	63
5.4 CÁLCULO DO TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO BRUTO .....	64
5.5 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	65
5.6 PARTIÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES .....	66
5.7 ISOLAMENTO.....	67
5.7.1 Precipitação de composto da fração Acetato de Etila das Folhas de <i>Jatropha multifida</i> .....	67
5.7.2 Cromatografia Líquida em Coluna da Fração Acetato de Etila das Folhas de <i>Jatropha multifida</i> L.....	72
5.7.3 Isolamento de segundo composto da Fração Acetato de Etila das Folhas (I4).....	72
5.7.4 Isolamento de composto (FHF-1) da Fração Hexano das folhas .....	73
5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS .....	74
5.8.1 Identificação do composto FHF-1 .....	74
5.8.2 Identificação Do Composto AEF-1 .....	80
5.8.3 Identificação Do Composto I4 .....	90
5.9 LETALIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	102
5.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	103
5.10.1 Atividade Hemolítica em Placas de Ágar-Sangue.....	104
5.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	105
5.11.1 Ensaio pelo método de Redução do Complexo do Fosfomolibdênio .....	105
5.11.2 Ensaio pelo método de Redução do Radical DPPH .....	107
5.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	115
5.12.1 Avaliação da Germinação .....	115
5.12.2 Avaliação do Crescimento .....	117
5.12.3 Índice mitótico .....	120
5.13 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	124
5.13.1 Proteínas Totais .....	124
5.13.2 Atividade Superóxidodismutase (SOD) .....	125
5.13.3 Atividade da Peroxidase.....	126
5.13.4 Atividade da Catalase .....	127
5.13.5 Atividade da $\alpha$ -Amilase.....	128
5.13.6 Teor de Clorofila e Respiração .....	129
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>134</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>136</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento popular das plantas medicinais, transmitido através das gerações, comprova a eficácia destas para a cura de doenças. Documentos como “El libro de medicina interna Del Emperador Amarillo” escrito no ano 2000 a.C. mostram quão antigos são os estudos e as observações sobre as plantas e seus efeitos medicinais (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Assim sendo, as plantas medicinais funcionam como um guia para a pesquisa científica, pois medicamentos podem ser desenvolvidos tendo como base uma substância isolada de uma planta. Esta substância pode servir como matéria prima ou como um modelo para síntese de outras moléculas, possibilitando uma diminuição da dependência de fontes naturais. As oportunidades para a identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies e o Brasil está entre os países considerados detentores de megadiversidade (GUERRA; NODARI, 2007).

O estudo da espécie *Jatropha multifida* L. mostrou-se relevante em função dos relatos de moradores da cidade de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil, os quais utilizam o látex desta como cicatrizante. Esta propriedade é também conhecida por moradores das cidades de Jesuítas e Bandeirantes, Paraná, Brasil, que aplicam o látex sobre os ferimentos para cicatrização e em alguns casos é ingerido para tratamento de úlceras gastrointestinais (BUCH; ARANTES; CAMPELO; 2008).

Esta pesquisa ficou circunscrita às cascas e folhas da espécie em questão. As folhas foram selecionadas pela sua fartura – uma boa quantidade de material facilita consideravelmente a pesquisa - e por informações prévias de literatura que atestaram atividades biológicas como ação antifúngica, antiinflamatória e analgésica (HAMZA *et al.*, 2006; MOHARRAM *et al.*, 2007). As cascas foram selecionadas porque não há, até o momento, relatos de estudo com esta parte da planta.

A partir disso a investigação química ocorreu por processos de extração, particionamento e análise fitoquímica dos extratos e frações. As atividades biológicas foram iniciadas com o ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* para detectar possível bioatividade e o potencial tóxico das amostras. Em seguida foi avaliada a atividade hemolítica como um complemento de informação acerca do potencial tóxico e possível emprego das amostras em futuras pesquisas de uso interno humano e animal. Foram realizados então os testes para atividade antioxidante. Por último foi investigada a atividade alelopática através de ensaios de germinação, crescimento e atividade enzimática.

Estes ensaios foram selecionados por serem rápidos, de fácil domínio, econômicos e não necessitem de grande quantidade de amostra. A pesquisa foi direcionada dessa maneira porque estamos em busca de moléculas inéditas ou extratos com atividade antioxidante que não causem danos quando utilizados, e com atividade alelopática com mínimos efeitos nocivos para o ser humano e o meio ambiente.

A necessidade de substâncias com estas propriedades é evidente frente à insatisfação por parte da população em relação ao alto custo, efeitos colaterais e eficiência dos medicamentos sintéticos (NIERO *et al.*, 2003).

Além da área farmacêutica, o interesse por novos compostos se expande para outras áreas de pesquisa, como a agronomia, na qual está inserida a pesquisa de atividade alelopática. Os estudos multidisciplinares entre agronomia e farmácia na área de produtos naturais são convenientes pois as estratégias utilizadas para a descoberta de um aleloquímico são similares às usadas na descoberta de novas drogas: envolvem testes químicos preliminares dos extratos brutos e testes de bioatividade de substâncias puras (GHISALBERTI, 2008). Estudos sobre interações alelopáticas podem resultar no desenvolvimento de novos herbicidas. O interesse nesta classe de produto vem do aumento de resistência de pragas frente aos produtos usados até o momento (MALHEIROS; PERES, 2001).

Este trabalho é compreendido em quatro sessões. A primeira parte apresenta informações pertinentes acerca da espécie estudada. Segue então a metodologia que

empregamos para chegar aos nossos objetivos. Na terceira parte, os resultados iniciam com a discriminação dos rendimentos do processo de extração, posteriormente vem a caracterização das classes químicas presentes nos extratos estudados e então é descrito o isolamento e identificação das substâncias isoladas. Seguem ainda os resultados das atividades biológicas juntamente com a discussão. Na quarta parte estão apresentadas as conclusões e perspectivas para estudos futuros.

Esta pesquisa tem como justificativas os relatos da medicina popular de atividade biológica da espécie em questão, a pouquidade de pesquisas relacionadas à atividade alelopática e às propriedades de partes distintas da planta (cascas), a oportunidade de dispor de uma biodiversidade rica como a brasileira para o estudo e a necessidade de novas substâncias para o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e herbicidas mais eficazes com efeitos nocivos mínimos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como proposta a investigação química e avaliação das atividades biológicas da espécie *Jatropha multifida* L.(Euphorbiaceae) para desenvolver extratos e identificar moléculas com potencial uso na produção de medicamentos, cosméticos e herbicidas. Para tanto serão realizados a análise sistemática fitoquímica, determinação de letalidade frente à *Artemia salina*, avaliação das atividades hemolítica, antioxidante e alelopática dos extratos e frações desta espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coleta e identificação da espécie estudada;

Isolamento de substâncias presentes na espécie em estudo por meio de técnicas cromatográficas;

Determinação da estrutura química dos compostos isolados através de técnicas espectroscópicas como UV, IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;

Realização de estudos da letalidade das frações frente à *Artemia salina*;

Realização de estudos da atividade hemolítica das frações obtidas a partir do extrato bruto;

Realização de estudos da atividade antioxidante das frações e produtos isolados;

Realização de estudos da atividade alelopática das frações frente à sementes de *Lactuca sativa* por ensaios de germinação e crescimento.

Avaliação das propriedades alelopáticas através da atividade enzimática das enzimas SOD, POD, CAT,  $\alpha$ -amilase, índice mitótico, teor de clorofila, e respiração.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA *Jatropha Multifida* L.

Segundo Joly, 2002	Segundo Cronquist, 1988
Divisão Angiospermae	Angiospermas
Classe Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Ordem Geraniales	Euphorbiales
Família Euphorbiaceae	Euphorbiaceae
Gênero <i>Jatropha</i>	<i>Jatropha</i>
Espécie <i>Jatropha multifida</i> L.	<i>Jatropha multifida</i> L.

QUADRO 01 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA *Jatropha multifida* L.

##### 3.1.1 Família Euphorbiaceae

Compreende esta família, uma das maiores das dicotiledôneas, cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África. Presente na flora brasileira são plantas de hábito bastante variado, existindo na forma de ervas, subarbustos, árvores e também trepadeiras (JOLY, 1985).

A esta mesma família pertence a mandioca, também conhecida como aipim ou macaxeira, possuidora de raízes tuberosas as quais são fonte de amido e farinha. O látex, nas Euphorbiaceae que o possuem, pode ser incolor ou leitoso com grãos de amido em forma de fêmur, muito característico (JOLY, 1985).

Os gêneros mais expressivos da família são *Euphorbia*, com 1500 espécies, *Croton* (700), *Phyllanthus* (400), *Acalypha* (400), *Macaranga* (250), *Antidesma* (150), *Drypetes* (150), *Tragia* (150), *Jatropha* (150) e *Manihot* (150) (CRONQUIST, 1981).

Dentre os gêneros nativos no Brasil destacam-se, seja pelo número de espécies seja pela sua utilidade, os seguintes: *Cróton* (sangue-de-dragão, capixingui, marmeleiro do Nordeste e outros), *Phyllantus*, *Euphorbia*, *Jatropha*, conhecidas como pinhão-do-Nordeste, com várias espécies ornamentais ( JOLY, 1985).

Muitas euphorbiáceas possuem látex o qual contém borracha, óleos, taninos, resinas e gomas, em alguns casos este látex é venenoso e irritante. Alguns compostos químicos isolados da família são terpenos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, glicosídeos cianogenéticos e taninos (BITTNER *et. al*, 2001).

As atividades biológicas de espécies de Euphorbiaceae descritas são as mais variadas. Lima e colaboradores (2006) comprovaram atividade larvicida de hidrolatos de quatro espécies de *Croton* contra larvas de *Aedes aegypti*. Os autores detectaram a presença de fenilpropanóides hidrossolúveis em duas das espécies que apresentaram maior atividade, estudos anteriores consideraram estes compostos os mais ativos contra *Aedes aegypti*.

Vários outros efeitos de substâncias de *Croton* têm sido relatadas, incluindo anti-hipertensivos, antiinflamatórios, antimaláricos, antimicrobianos, antiespasmódicos, antiulcerogênicos, antivirais, e miorelaxantes (SALATINO *et al.*, 2007).

Mosquera e colaboradores (2007) constataram atividade antioxidante de espécies desta família através do Método de redução do radical DPPH•. O resultado da análise fitoquímica confirmou a presença de polifenóis como taninos, lignanas, flavonoides como quercetina e catequinas, responsáveis pela atividade antioxidante destas plantas.

Extratos aquosos das folhas e sementes de *Joanesia princeps* Vell., da família Euphorbiaceae, apresentaram potencial alelopático pois causaram efeitos inibitórios na germinação e crescimento inicial, e também pelo atraso na germinação das espécies utilizadas (repolho, alface e tomate). As substâncias alelopáticas detectadas foram saponinas e taninos (CAPOBIANGO; VESTENA; BITTENCOURT, 2009).

São extensos os estudos já realizados de espécies desta família, entretanto, as perspectivas de prospecção de compostos bioativos, já descritos ou inéditos, são promissoras.

### 3.1.2 Gênero *Jatropha*

Recentemente constatou-se que o gênero *Jatropha* contém aproximadamente 170 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da África e América, as plantas deste gênero se apresentam como ervas, arbustos ou árvores (KRISHNAN; PARAMATHMA, 2009).

Espécies do gênero *Jatropha* são conhecidas por serem muito tóxicas e irritantes e a atividade purgativa do óleo de algumas de suas sementes lembra a atividade semelhante mostrada por ésteres diterpenos presentes no óleo de sementes de muitas outras espécies de Euphorbiaceae. Foram isolados e caracterizados quimicamente ésteres diterpenos irritantes extraídos do óleo das sementes de quatro espécies de *Jatropha* - *J. podagrica*, *J. multifida*, *J. curcas* e *J. gossypifolia* (ADOLF; OPFERKUCH; HECKER, 1984).

Os compostos majoritários do óleo de sementes de *Jatropha curcas* L., *J. mollissima* L., e *J. podagrica* Hook são os ácidos palmítico, ácido oléico e ácido linoléico. As sementes de *J. podagrica* apresentaram o mais elevado teor de óleo, 46% (TEIXEIRA, 1987).

A espécie mais estudada do gênero até o momento é a *Jatropha curcas* devido ao seu potencial uso como biodiesel (ACHTEN *et al.*, 2008). Apesar de resultados otimistas ainda não se sabe se ela atende aos quesitos essenciais para que seu óleo substitua os combustíveis fósseis como produção de material bruto renovável e se seu uso tem um impacto negativo menor sobre o meio-ambiente (ACHTEN *et al.*, 2008). Esta espécie é conhecida no Brasil como pinhão manso (PINTO *et al.*, 2009).

No setor produtivo a cultura de *J. curcas* é atrativa graças ao seu alto potencial de rendimento. Enquanto a soja produz 500Kg de óleo/ha, o pinhão manso tem potencial para produção de 1500Kg óleo/ha. O alto teor protéico dos frutos, 58-60%, tem chamado a atenção de pesquisas no sentido de detoxificar o óleo e outros extratáveis para uso animal (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

A investigação fitoquímica do extrato metanólico das folhas revelou a presença das seguintes classes de substâncias: alcaloides, glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos, flobataninos, taninos, flavonoides e saponinas (EBUEHI; OKORIE, 2009).

O exudato de *Jatropha gossypifolia* L foi avaliado quanto á sua composição fitoquímica, alcaloides foram isolados em abundância, entre eles alcalóides imidazóis e piperidínicos (AHMAD *et al.*, 1992). Estudos sobre esta espécie, conhecida no Pará como pião-roxo, demonstrou que as frações acetato de etila e residual inibiram o crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* como também apresentaram potencial antioxidante. Esta planta é utilizada no tratamento de hemorróidas, queimaduras, dores estomacais, entre outras doenças (VEIGA, 2008).

Podaciclina A e B, dois peptídeos cíclicos, foram isoladas do látex de *Jatropha podagrifa* Hook, entretanto ainda pouco se sabe acerca de suas atividades biológicas (VAN DEN BERG *et al.*, 1996). O extrato das cascas foi ativo contra *S. aureus* isolados (GMC30) e *E. coli* (RGBC786), e apresentou atividade moderada contra *Candida albicans*. A análise fitoquímica detectou a presença de esteróides e triterpenos (BRASKARWAR, 2008). Os extratos de raízes e cascas foram ativos contra *Trypanosoma evansi* e citotóxicos para linhas de células MRC – 5 *in vitro* (BAWM *et al.*, 2010).

As proteínas de *Jatropha* possuem propriedades nutricionais e biomédicas interessantes. O alto conteúdo de proteínas com digestibilidade e sua composição de aminoácidos fazem com que haja a possibilidade incorporá-las em dietas de ruminantes e animais monogástricos, incluindo peixes. Uma proteína em particular, a cursina, tem potencial para ser utilizada como imunoconjugado na quimioterapia. Muitos peptídeos cíclicos de sementes de *Jatropha* possuem importância clínica e mostraram potencial para uso farmacêutico (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010).

Amiúde são publicados artigos reportando a presença de compostos bioativos em outras espécies deste gênero, daí o interesse crescente por parte da comunidade científica nele.

### **3.1.3 Espécie *Jatropha multifida* L.**

A *Jatropha multifida* L. é conhecida pelos nomes populares flor-de-coral, coral, coral-dos-jardins, flor-de-sangue (Figura 1). As flores são pequenas de cor vermelho-brilhante e agrupadas em cachos (Figura 2), a folha tem de 10 a 20 cm de largura e divididas em segmentos ou lóbulos estreitos, longos e podem ter as extremidades lisas ou dentadas, os frutos são amarelos e contém três sementes. Apresenta seiva abundante leitosa ou incolor e o contato com a pele pode causar dermatite (QUEENSLAND GOVERNMENT, acesso em 2009).



FIGURA 01 – FOTO ILUSTRATIVA DE EXEMPLAR DE *Jatropha multifida* L.

FONTE: A AUTORA, 2008.



FIGURA 02 – FOTO ILUSTRATIVA DE FLORES E FOLHAS DE *Jatropha multifida* L.

FONTE: A AUTORA, 2008

Extratos das raízes demonstraram atividade antibiótica (AIYELAAGBE, 2000), em estudo posterior apresentou atividade contra bactérias e fungos responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis (AIYELAAGBE *et al.*, 2008). Do látex foram isolados peptídeos cíclicos com atividade imunomoduladora (KOSASI *et al.*, 1989), e antifúngicas (PICCHI, 2007) e das hastes compostos com atividade antifúngica (HAMZA *et al.*, 2006). Recentemente diterpenóides isolados das hastes de *Jatropha*

*multifida* L. estão sendo identificados (DAS *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2009a, 2009b, 2009c).

Esta espécie da família *Euphorbiaceae* é distribuída nas áreas de clima tropical (LEVIN *et al.*, 2000) como Brasil, América Central, África (NOGUEIRA E MACHADO, 1957) e Índia (DAS *et al.*, 2008). Abaixo segue o mapa com a distribuição da *Jatropha multifida* L. (Figura 3).

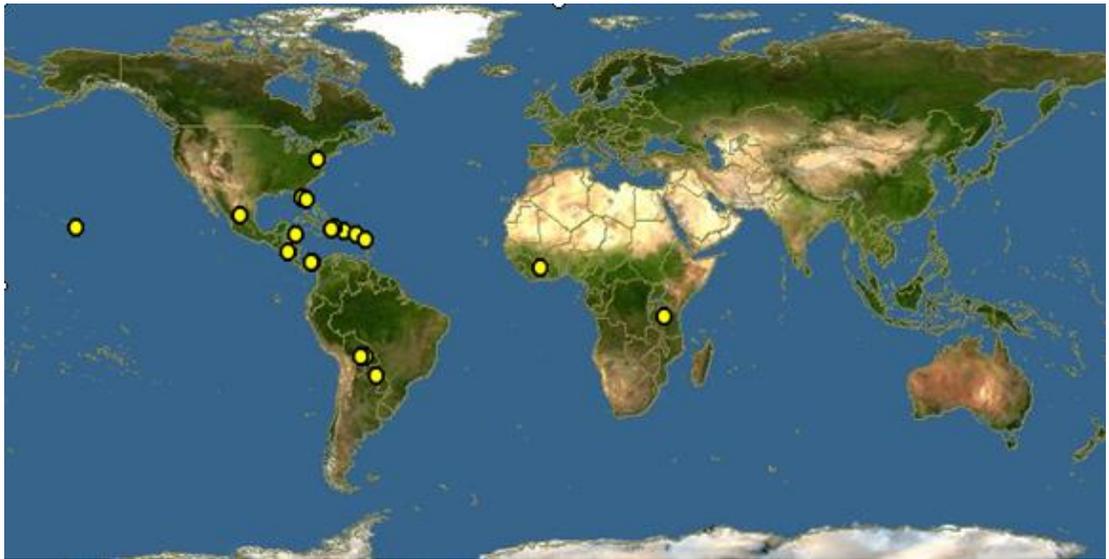


FIGURA 03 – DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Jatropha multifida* L. NO GLOBO

FONTE: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Jatropha+multifida> acesso em 20 ago 2009.

### 3.1.4 Taninos

A pesquisa fitoquímica realizada com extratos de raízes de espécies de *Jatropha* apontou a presença de taninos (AIYELAAGBE, 2000).

De uma forma simplificada, os taninos podem ser descritos como compostos fenólicos hidrossolúveis com peso molecular entre 500 e 3000 Da, que precipitam em água alcalóides, gelatina e outras proteínas. A complexação entre taninos e proteínas é

a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas. Os taninos podem ser classificados como hidrolizáveis (galotaninos e elagitaninos) e taninos condensados. Os taninos hidrolizáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (SANTOS; MELLO, 2007).

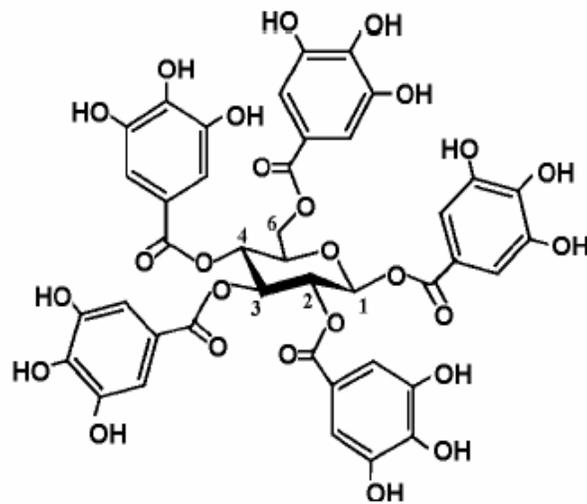


FIGURA 04 – ESTRUTURA QUÍMICA DE UM PRECURSOR DOS TANINOS HIDROLIZÁVEIS

FONTE: SIMÕES (2007)

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de Flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe de taninos pode ser dividida em dois tipos de acordo com a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A (SANTOS; MELLO, 2007).



### 3.1.5 Flavonoides

Em 1930 uma nova substância foi isolada a partir de laranjas. Acreditando-se ser um membro de uma nova classe de vitaminas, foi denominada vitamina P. Quando foi descoberto que esta substância era um flavonoide (rutina) foram intensificadas pesquisas no sentido de isolar flavonoides e elucidar seu mecanismo de ação (NIJVELDT *et al.*, 2001).

A forma de glicosídeo é a mais encontrada nas plantas, conferem coloração amarela, laranja, azul e vermelho das flores e a cor amarela das folhas de outono. Apesar de não serem considerados nutrientes são constantes na dieta humana, pois são encontrados em uma grande variedade de vegetais, bebidas como o chá e o vinho tinto e nas frutas cítricas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Os flavonoides apresentam-se em diversas formas estruturais. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono entre elas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

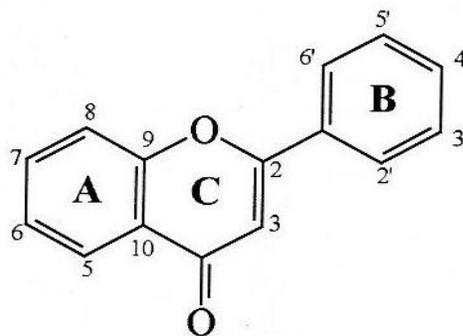


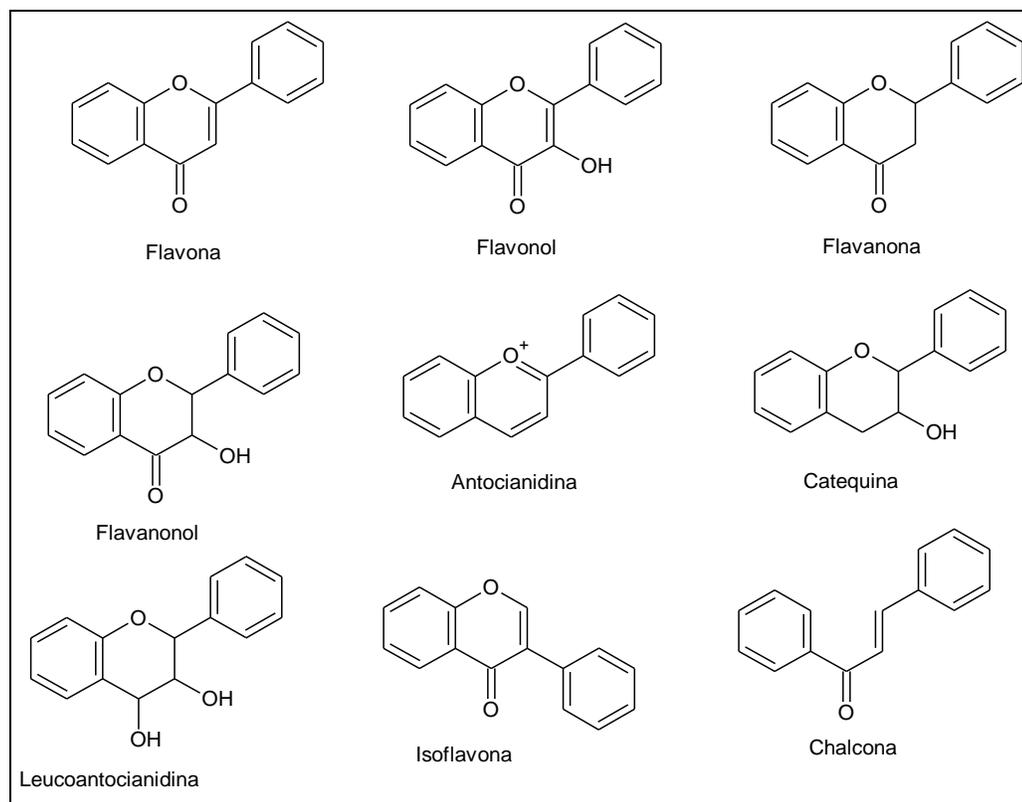
FIGURA 07 – ESTRUTURA QUÍMICA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES

FONTE: SIMÕES, 2007

Nas plantas os flavonoides desempenham funções como proteção contra incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, antioxidantes, agentes alelopáticos, dentre outros. Já foram identificados mais de 4.200 flavonoides diferentes. O interesse econômico pelos flavonoides consiste na possibilidade de utilizá-los como pigmento e para conferir valor nutricional a alguns alimentos. Atividades biológicas dos flavonoides têm sido reportadas, como antiviral, antiinflamatória, antioxidante e antitumoral (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). A estrutura básica destes compostos é variada e por isso dá origem a substâncias com características peculiares quanto ao seu grau de substituição e de oxidação, como demonstra o Quadro 2 (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).

Flavonoides como quercetina, mircetina e kaempferol podem ser encontrados no café, chá, frutas e vegetais. Compostos desta classe possuem a tendência de serem potentes agentes antioxidantes e quelantes de íons metálicos (SIMON, 2002).

Gosslau *et al.*, (2004) afirmam que flavonoides presentes na dieta podem ser utilizados como nutracêuticos, uma vez que atuam como quimiopreventivos da apoptose em estudos com células humanas.



QUADRO 02 – ESTRUTURAS QUÍMICAS BÁSICAS DAS CLASSES DE FLAVONOIDES.

FONTE: MUSCHIETTI; MARTINO (2009)

Quanto á toxicidade, Nijveldt *et al.*,(2001) relatam resultados contraditórios em estudos, com a possibilidade dos flavonoides serem tóxicos para células cancerosas ou células imortalizadas, mas serem pouco ou não tóxicos para células normais.

Os flavonoides representam a classe mais diversa de metabólitos secundários com potencial para efeitos benéficos na saúde humana. Sofalcona (uma chalcona), quercetina e narigenina (flavanonas) apresentam atividade gastroprotetora e aceleram a cura de úlceras gástricas, sendo assim possíveis alternativas ou agentes aditivos na terapia atual, inclusive de úlceras pépticas (MOTA *et al.*, 2009).

### 3.2 LETALIDADE FRENTE À *Artemia salina*

O Teste de Letalidade frente à *Artemia salina* é um bioensaio inicial capaz de detectar se um extrato bruto possui bioatividade. É uma técnica rápida (24h), simples (não necessita de técnicas assépticas, por exemplo), de fácil domínio, acessível economicamente e utiliza poucas quantidades de amostra (2-20mg ou menos) (GHISALBERTI, 2008).

Os ovos do crustáceo *Artemia salina* são facilmente encontrados em pet shops como alimento para peixes tropicais e podem manter-se viáveis por anos neste estágio. Utilizando água do mar artificial, os ovos eclodem em 48 horas fornecendo grande número de larvas (ou náupilos). Dentre os bioensaios realizados com aplicação prévia desta técnica cita-se análise de resíduos de pesticidas, micotoxinas, poluentes fluviais, anestésicos, toxinas, toxicidades de óleos dispersantes e toxicantes em ambiente marinho (MEYER *et al.*, 1982).

O objetivo deste método é avaliar de forma preliminar se as amostras são relevantes para serem submetidas a bioensaios mais específicos e sofisticados e se existe a possibilidade de isolamento de compostos ativos. Desde 1982, quando este teste foi introduzido pela primeira vez, vem sendo utilizado no isolamento de agentes antitumorais ativos *in vivo* e pesticidas produzidos por plantas (GHISALBERTI, 2008).

### 3.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O teste de hemólise foi utilizado em pesquisas multidisciplinares como ensaio toxicológico para extratos de plantas (OMS, 1998) e extratos de organismos marinhos (DRESCH *et al.*, 2005), investigação de hemolisinas em microorganismos (ANDRADE; SUASSUNA, 1988) e pesquisa de capacidade hemolítica para cepas de *Candida* (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009). A avaliação da atividade hemolítica também está

presente no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Anvisa de 2003 (ANVISA, 2003), mostrando-se um ensaio de ampla aplicação. A técnica realizada, com adaptações, está descrita no manual de Métodos de Controle de Qualidade para Materiais de Plantas Medicinas da Organização Mundial as Saúde, 1998.

### 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio implica na deterioração oxidativa de alimentos e está relacionada a muitas patologias humanas como aterosclerose, diabetes melitus, desordens neurodegenerativas e certos tipos de câncer. Os efeitos protetores dos antioxidantes contra as reações deletérias induzidas por oxidação têm recebido maior atenção, especialmente nas áreas biológica, médica, nutricional e agroquímica (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Enquanto “oxidante” e “reduzidor” são termos químicos, os termos pró-oxidante e antioxidante respectivamente são utilizados para ambientes biológicos. Assim, pró-oxidante é uma substância que pode induzir dano oxidativo em alvos biológicos, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Um antioxidante é uma substância que pode eficientemente reduzir um pró-oxidante com concomitante formação de produtos de baixa ou nenhuma toxicidade (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Outra definição ampla de antioxidante foi sugerida por Halliwell *et at.*, (1995) como “qualquer substância, presente em baixas concentrações comparando-se com um substrato oxidável, que diminui ou previne significativamente a oxidação deste substrato”.

Portanto, de acordo com estas definições, nem todos os redutores em uma reação química são antioxidantes, somente aqueles compostos capazes de proteger alvos biológicos preenchem este critério. Esta proteção pode ser baseada em vários mecanismos de ação como: (i) inibição da geração e capacidade de sequestrar

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, (ii) capacidade redutora, (iii) capacidade de quelar metais, (iv) ação como enzima antioxidativa, (v) inibição de enzimas oxidativas (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Dois métodos comuns para avaliação de atividade antioxidante foram utilizados neste trabalho. Um é o método do Fosfomolibdênio, o qual baseia-se na redução de Mo(VI) a Mo(V), e o ensaio de Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o qual é caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH•. Ambos utilizam leituras espectrofotométricas na região do UV para apresentar os resultados.

### 3.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O termo alelopatia deriva das palavras gregas *allelon* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) e foi utilizado pela primeira vez por Molish em 1937 em seu trabalho “Der Einfluss einer pflanze auf die andere – Allelopathie” (A influência de uma planta sobre a outra – Alelopatia). O termo desde então passou por algumas modificações e segundo alguns autores, o termo alelopatia ficou relacionado a interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas, incluindo microorganismos tradicionalmente locados no reino vegetal (MALHEIROS; PERES, 2001).

A Sociedade Internacional de Alelopatia ampliou a definição de alelopatia aos processos que envolvem produção de metabólitos secundários por plantas, microorganismos, vírus e fungos que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (MALHEIROS; PERES, 2001).

Os compostos liberados por plantas, ou seus resíduos, e que podem ter um efeito negativo ou positivo em outra planta são denominados aleloquímicos. A importância da alelopatia foi estudada intensamente nas últimas três décadas, sendo que a maioria dos trabalhos abordaram a extração e identificação dos compostos e

relataram seus efeitos em experimentos realizados em laboratório (VIDAL; BAUMAN, 1997).

Apesar de ser uma atividade biológica de ampla possibilidade de aplicação, as investigações em alelopatia têm se concentrado nas interações entre espécies vegetais cultivadas e na prospecção de novas moléculas com propriedades herbicidas (CARMO; BORGES; TAKAKI, 2007). Os herbicidas são compostos que realizam o controle químico de plantas daninhas (VICTORIA FILHO, 1987).

Maximizar a eficiência da agricultura mundial depende do controle de uma variedade de pestes e doenças. As ervas daninhas são definidas como plantas que crescem em locais indesejáveis, competem com culturas por recursos, diminuem o rendimento da cultura, podem contaminar a cultura com suas sementes perpetuando o problema nas estações posteriores (VYVYAN, 2002).

É necessário o desenvolvimento de novos herbicidas uma vez espécies de ervas daninhas resistentes estão aumentando e a eficiência dos herbicidas convencionais sintéticos diminuindo. Os produtos de origem natural apresentam algumas vantagens sobre os produtos sintéticos: possuem maior diversidade de estrutura molecular de seus compostos, o que facilita a detecção um produto inédito, e apresentam tempo de meia-vida curto, motivo pelo qual são considerados seguros do ponto de vista da toxicologia ambiental (BHOWMIC; INDERJIT, 2003).

A resistência aos herbicidas é desenvolvida através da introdução de um mecanismo de degradação do herbicida e/ou modificação de moléculas-alvo (DUKE, 2000).

O isolamento de compostos inéditos pode ser a melhor forma de descobrir fitotoxinas naturais e novas moléculas-alvo, que podem ser importantes num herbicida comercial (DUKE, 2000).

Moléculas da classe das cumarinas, flavonoides e terpenos isolados de produtos naturais apresentaram interação alelopática com outras plantas, sendo assim considerados como aleloquímicos (VYVYAN, 2002).

Atualmente, a alelopatia caracteriza-se como uma nova ciência prioritária nos países desenvolvidos, e está se tornando corrente na maioria dos países do mundo (MALHEIROS; PERES, 2001).

## **4 METODOLOGIA DE PESQUISA**

### **4.1 FASES NO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

As fases no desenvolvimento da pesquisa estão resumidas de acordo com fluxograma da Figura 8.

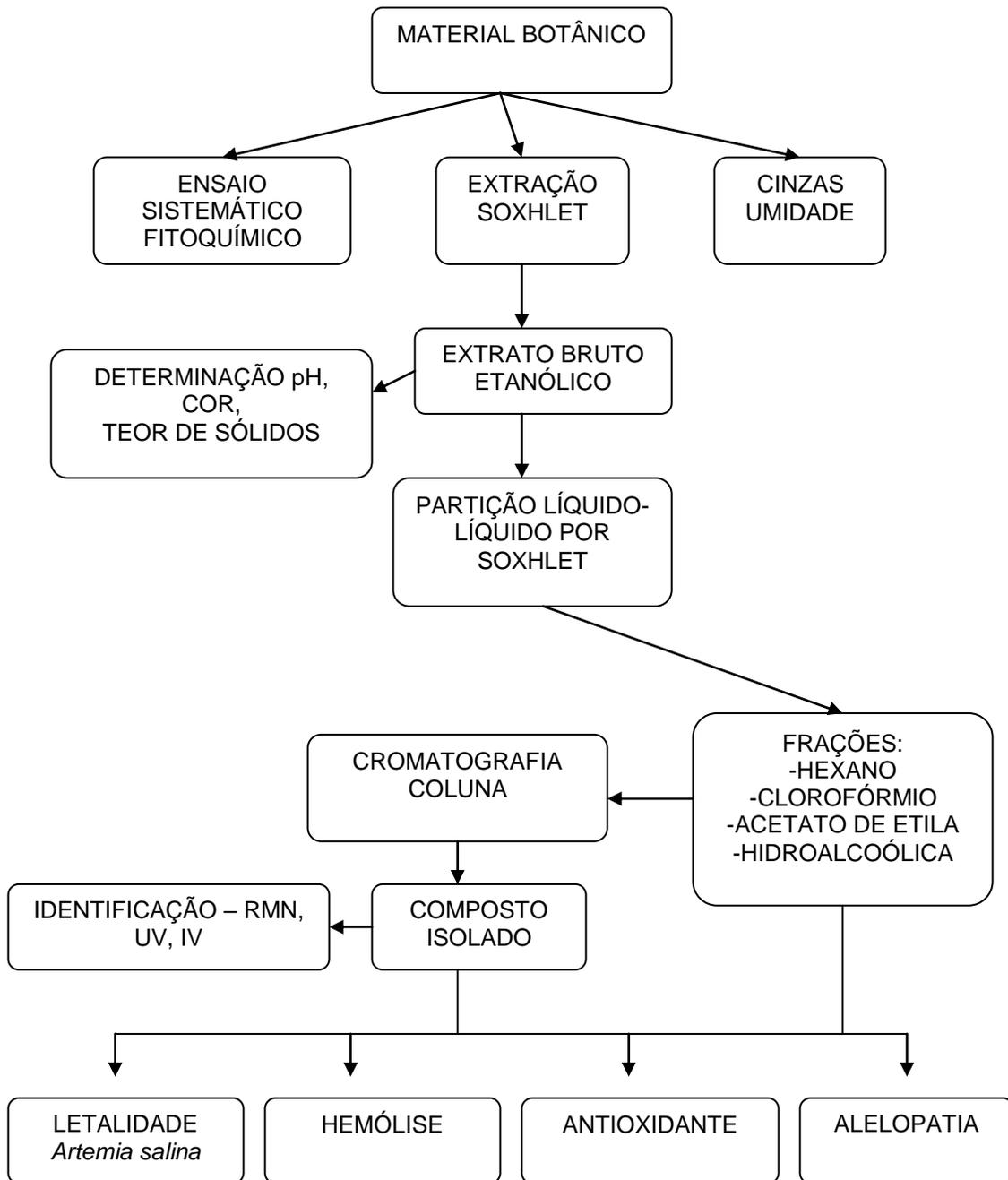


FIGURA 08 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE PESQUISA

#### 4.1.1 Obtenção do Material Botânico

O material botânico foi coletado na região da cidade de Alta Floresta, no estado do Mato Grosso no mês de setembro de 2009.

A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas. As exsiccatas depositadas neste local receberam o número de identificação 226619.

#### 4.1.2 Estudos Fitoquímicos

Para a investigação fitoquímica foram utilizadas as partes aéreas e as cascas as quais foram submetidas à seleção visual. Foram descartados materiais oxidados, atacados por fungos e insetos, partes não sadias e material orgânico estranho. Em seguida as amostras foram secas em temperatura ambiente e na sombra. Após a secagem o material foi triturado e acondicionado em recipiente apropriado e protegido da luz.

##### 4.1.2.1 Marcha Sistemática Fitoquímica

A marcha sistemática fitoquímica foi realizada de acordo com Moreira (1979), adaptada por Miguel (2003), pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% e extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

Extrato Aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogénicos, taninos condensados, taninos hidrolizáveis, aminogrupos e flavonoides.

Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

#### 4.1.2.1.1 Preparo do Extrato hidroalcoólico a 20%

A extração foi feita por maceração de 40g das partes aéreas e das cascas da planta secas e trituradas em 200 ml de álcool etílico a 70% em banho-maria a 70°C por 90 minutos. Os macerados foram filtrados por meio de papel de filtro e o volume completado com o mesmo solvente até 200 ml. Os extratos ficaram sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

#### 4.1.2.1.2 Preparo do Extrato Aquoso a 20%

Foram extraídas por maceração em banho-maria a 70°C por 90 minutos, 40g das partes aéreas e cascas da planta secas e trituradas em 200 ml de água destilada. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e o volume completado com água destilada até 200 ml. Os extratos ficaram sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

#### 4.1.2.1.3 Pesquisa de Alcalóides

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Bertand); levou-se á secura 50 ml de extrato hidroalcoólico em banho-maria a 70%, seguido de dissolução do resíduo em 1 ml de etanol e 20 ml de ácido clorídrico a 1%. Foi transferido o extrato clorídrico para 5 tubos

de ensaio (1 ml em cada tubo) e adicionado em cada um os reativos, reservou-se um dos tubos como branco. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para contra-prova, 15ml do extrato hidroalcoólico foi transferido para um funil de separação e alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 10. Procedeu-se à extração com uma mistura de éter e clorofórmio (3:1) e o extrato foi submetido aos mesmos reativos para alcalóides.

#### 4.1.2.1.4 Pesquisa de ácidos orgânicos

O restante da solução etérea da pesquisa de alcalóides foi levado á secura e dissolvido em 5 ml de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

#### 4.1.2.1.5 Pesquisa de fenóis

Utilizou-se 2 ml da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos e adicionou-se 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração indica a presença de fenóis.

#### 4.1.2.1.6 Pesquisa de flavonoides

Os flavonoides devem ser pesquisados no extrato alcoólico total e com os extratos seletivos pela reação de Shinoda ou reação de cianidina.

Em um tubo de ensaio foram transferidos 5 ml de extrato hidroalcoólico e adicionou-se 200mg de limalha de magnésio e 1 ml de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. A formação de cor alaranjada indica presença de flavonoides.

#### 4.1.2.1.7 Pesquisa de cumarinas

Transferiu-se para um béquer 30 ml de extrato hidroalcoólico e acidificou-se até pH1, concentrou-se em banho-maria a 60°C até 10 ml. Foi adicionado ao resíduo 5 ml de água deionizada e extraiu-se em funil de separação com éter etílico em três porções de 10 ml. O volume do extrato orgânico foi reduzido para 5 ml em banho-maria a 60°C. Colocou-se 3 gotas do extrato etéreo em dois pontos de um papel de filtro previamente marcado o qual foi seco e adicionou-se 1 gota de hidróxido de sódio N em cada mancha.

Cobriu-se uma das manchas e foi observado sob luz ultravioleta de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

#### 4.1.2.1.8 Pesquisa de antraquinonas

Foi levado á fervura 20 ml do extrato alcoólico por 15 min sob refluxo e adicionou-se 3 ml de ácido sulfúrico 10%. Após resfriamento foi transferido para um funil de separação junto com 30 ml de água destilada e extraído 3 vezes com 10 ml de tolueno. Concentrou-se o extrato tolueno a 10 ml e este foi transferido para um tubo de ensaio. Agitou-se com 10 ml de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

#### 4.1.2.1.9 Pesquisa de esteróis e triterpenos

Foi evaporado 20 ml do extrato alcoólico e extraído três vezes com 5 ml de diclorometano. Concentrou-se os extratos obtidos até o volume de 3 ml e transferiu-se para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado 2 ml de anidrido acético. Foram adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico cautelosamente. O desenvolvimento de coloração azul passando a verde demonstra a presença de esteróides e/ou triterpenos.

#### 4.1.2.1.10 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Separou-se 3 porções de 5 ml do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e neutralizou-se com solução de hidróxido de potássio 5% até obter pH 5,5 (pH do extrato aquoso), 4,0 (neutro) e 9,5 (básico). Mudança na coloração das porções neutralizadas indica presença de heterosídeos antociânicos.

#### 4.1.2.1.11. Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitou-se os três tubos obtidos no ensaio de heterosídeos antociânicos energicamente durante 5 min. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

#### 4.1.2.1.12. Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Foram transferidos 15 ml do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Foi adicionado 1 ml de ácido sulfúrico 1N e então prendeu-se com o auxílio de uma rolha um tira de papel picro-sódico dentro do tubo. O tubo de ensaio foi levado ao banho-maria em temperatura de 60°C por 30min. A formação de cor vermelha no papel indica presença de heterosídeos cianogénéticos.

#### 4.1.2.1.13. Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

Às duas porções de 5 ml de extrato aquoso foram adicionadas 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado é indicativo da presença de gomas, taninos e mucilagens.

#### 4.1.2.1.14.I Pesquisa de taninos

Adicionou-se a 5 ml de extrato aquoso 5 gotas de cloreto férrico 1%. Na formação de precipitado escuro, transferiu-se 5 ml do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 ml e nele acrescentou-se 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 ml de ácido clorídrico. A mistura foi levada para o refluxo por 1 h. Após seu resfriamento, filtrou-se a solução e o material retido foi lavado com água destilada e álcool. Se no material retido no filtro houver a formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indica a formação de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto férrico 1%, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolizáveis.

#### 4.1.2.1.15 Pesquisa de aminogrupos

Concentrou-se 10 ml de extrato aquoso á metade sob temperatura de 50°C. Em um papel de filtro, foram depositadas 5 gotas deste extrato concentrado e após secar, nebulizou-se com solução butanólica de ninhidrina. Aqueceu-se em estufa a 90 – 100°C por 15 min. O aparecimento de cor azul-violácea indica presença de aminogrupos.

#### 4.1.2.1.16 Pesquisa de Ácidos Voláteis

Acidificou-se 10 ml do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N e em um tubo de ensaio foi fervido no banho-maria. Com papel indicativo de pH mediu-se a acidez dos vapores. A coloração ácida indica a presença de ácidos voláteis.

#### 4.1.2.2 Ensaio de Pureza

##### 4.1.2.2.1 Cinzas totais

Pesou-se cerca de 0,5g da droga pulverizada em um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado. Incinerou-se a amostra aumentando-se a temperatura gradativamente, mas não ultrapassando 450°C. Retirou-se o cadinho da mufla e resfriou-se em dessecador em temperatura ambiente e pesou-se novamente. A relação de cinzas totais se dá pela subtração do peso final do cadinho e seu peso inicial e dividindo pelo total da amostra (FARMACOPÉIA, 1988).

## 4.2 LETALIDADE FRENTE À *Artemia salina*

### 4.2.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial é preparada dissolvendo 14,31g de sal artificial para 400ml de água purificada, sendo o sal da marca Instant Ocean Sea Salt. Ajustar o pH para 9,0 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para evitar o risco de morte dos náupilos por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan *et al.*, (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

### 4.2.2 Preparo das amostras

Realizou-se o estudo com as frações e as substâncias isoladas AEF-1 e I4. As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), pesou-se aproximadamente 1000mg e adicionou-se solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/ml, a qual foi denominada solução 1. Tomou-se 1mL da solução 1 e adicionou-se mais 9mL de solvente. Esta foi denominada solução 2 sendo a concentração final desta de 1mg/ml.

Da solução 1 foram transferidos 25 e 250  $\mu\text{l}$  com pipeta automática para tubos do tipo vial correspondendo respectivamente a 100 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ , em triplicata. Da solução 2 transferiu-se 25 $\mu\text{l}$  para tubos do tipo vial correspondendo a 10 $\mu\text{g/ml}$ , em triplicata. Evaporou-se o solvente por 12 h (MEYER *et al.*, 1982).

### **4.2.3 Eclosão dos ovos**

Colocou-se os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 ml) para eclodir em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna. Controlou-se a temperatura entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente (UTYAMA, 2003).

### **4.2.4 Avaliação da toxicidade**

Após a eclosão dos ovos, transferiu-se 10 náupilos de *Artemia salina* para cada tubo do tipo vial contendo as amostras e para os tubos controles. Os controles negativos consistem de tubos com o solvente utilizado para dissolver a fração, o qual é evaporado juntamente com as amostras. Ajustar o volume de todos os tubos com mar artificial para 2,5 ml.

Os resultados são expressos em  $L_{c50}$  e para o seu cálculo foi utilizado o programa estatístico Probitos.

## **4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA**

### **4.3.1 Operações preliminares**

Transferiu-se 1ml de sangue de carneiro (Newprov) para balão volumétrico de 50ml e completou-se o volume com tampão fosfato pH7,4 (suspensão diluída 2%). A solução pode ser usada enquanto o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor e deve ser mantida sob refrigeração.

#### 4.3.2 Teste de Hemólise

Preparou-se a diluição em série do extrato vegetal com o tampão fosfato e a suspensão de sangue 2% partindo do extrato bruto na concentração de 1000 $\mu$ g/ml conforme a Tabela 1.

TABELA 01 – ESQUEMA DA DILUIÇÃO EM SÉRIE DO EXTRATO VEGETAL

Tubo	1	2	3	4
Extrato vegetal (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

Após os preparo das diluições agitou-se cuidadosamente os tubos para evitar a formação de espuma. Esperou-se 30min e agitou-se novamente. Os tubos foram deixados em repouso por 150min e então foram levado á centrífuga por 5min a 3000rpm. Examinou-se os tubos e anotou-se em qual deles houve hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósitos de eritrócitos. Caso ocorra hemólise, a técnica preconiza uma segunda bateria de diluições, comparação com o padrão de Saponinas R e proceder ao cálculo da Atividade Hemolítica. Devido

aos resultados apresentados, não foi necessário realizar demais ensaios complementares desta técnica.

### **4.3.3 Teste de Atividade Hemolítica em Placas de Ágar Sangue**

Para este teste seguiu-se o procedimento de Flach, Karnopp, Corção (2005) com adaptações. Em placas de Ágar-sangue (Newprov®) foram colocados discos de papel estéreis impregnados com 1000µg dos extratos e frações. As placas foram incubadas a 36°C por 24h. Após este período verificou-se se houver formação de halo de hemólise. Como controles positivos foram utilizados solução de Saponina R e Triton 1000µg. Discos impregnados com os solventes utilizados também foram submetidos ao teste para descartar a influência destes.

## **4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

### **4.4.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico**

Esse ensaio baseia-se no método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) com modificações. O reativo para formação do complexo requer o preparo de uma solução que consiste na mistura de soluções de fosfato de sódio 0,1mol/l (28 ml), molibdato de amônio 0,03mol/l (12 ml) e ácido sulfúrico 3mol/l (20 ml), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo é preparado no momento do uso.

Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, devem estar na concentração de 200 µg/ml (TREVISAN, 2010).

Em um tubo de ensaio, retirou-se uma alíquota de 0,3 ml da amostra, adicionou-se 1 ml de solução reagente e 1,5ml de água destilada. Realizou-se o mesmo para os padrões. O branco é constituído de 0,3 ml do solvente sem amostra, 1 ml de reativo e 1,5ml de água destilada. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. A série de tubos foi mantida em banho-maria a 95°C por 90 min. Ao atingir a temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorbâncias (A) em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Expressaram-se os resultados em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações do Quadro 03.

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C	$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$
AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA	$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$

QUADRO 03 – EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA

FONTE: TREVISAN, 2010.

#### 4.4.2 Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Esse ensaio foi realizado de duas formas, uma qualitativa e uma quantitativa.

A técnica qualitativa descrita por Conforti *et al.*, (2002), baseia-se na análise da amostra por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), seguida da revelação por uma solução de DPPH.

Selecionou-se a fase móvel (Acetato de Etila/ Ácido Fórmico/ Ácido Acético Glacial/ Água 100:11:11:27) e promoveu-se a migração ascendente das amostras na cromatoplaca de sílica gel SG-60 Merck®, a revelação foi feita com uma solução de DPPH a 0,2% (p/v) em metanol. Realizou-se a análise após 30 min sob luz natural e

verificou-se a presença de manchas amarelas contra um fundo púrpura, o que indica a presença de compostos antioxidantes na amostra. Como padrão, utilizou-se a vitamina C e Rutina. As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 10 mg/ml.

A metodologia para o ensaio quantitativo é baseada nas técnicas descritas por Choi *et al.*, (2002), Molyneux (2004) e Mosquera *et al.*, (2007).

De acordo com Mosquera *et al.*, (2007) antioxidantes reagem com o radical DPPH• formando DPPH-H resultando num decréscimo da absorbância, medida em espectrofotômetro UV-VIS.

Preparou-se a solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,3mM/l em etanol absoluto. Preparou-se soluções estoque de amostras em concentrações crescentes e a 2,5ml de cada solução adicionou-se 1 ml da solução de DPPH e deixou-se reagir em repouso por 30min a temperatura ambiente. As mesmas soluções amostra (2,5 ml) adicionadas a 1ml de etanol constituíram o branco da reação. Para controle negativo foi utilizado 1ml da solução de DPPH adicionados a 2,5ml de solvente, sem amostra. Utilizou-se como padrões a Vitamina C e a Rutina.

Após os 30 min, mediu-se a absorbância (A) das soluções em 518nm. Todas as etapas devem ser feitas em triplicata. Medir a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) através da fórmula no Quadro 04.

$$AA\% = 100 - \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle\ positivo} \cdot X100$$

QUADRO 04 – EQUAÇÃO UTILZADA PARA CÁLCULO DA PORCENTAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA%)

FONTE: CHOI *et al.* (2002).

Os valores das concentrações e suas respectivas AA% foram compiladas em gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo  $y = ax + b$ , serve de base para determinação do valor de  $IC_{50}$  que é o valor da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante.

## 4.5 AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA

O estudo da atividade alelopática foi realizado com o extrato bruto etanólico, extraído em aparelho de Soxhlet convencional e das frações solúveis obtidas a partir deste extrato em aparelho de Soxhlet conforme Carvalho (2001), em diferentes concentrações, sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* conforme Peitz (2003) e Dias (2005).

### 4.5.1 Preparo das amostras

Para os ensaios alelopáticos foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* (alface). Os fatores que determinaram a escolha da espécie: sementes pequenas mas com grande superfície de contato, alta sensibilidade ao meio que as rodeia e aos aleloquímicos, não requerendo nenhuma manipulação além do contato no meio, requer pouco tempo para sua germinação (24 a 48 h) e para o crescimento (7 dias) e apresenta germinação uniforme (DIETZ; WINTERHALTES, 1996; FERREIRA; AQUILA, 2000; MALHEIROS; PERES, 2001). A *Lactuca sativa* não precisa de foto-período e a radícula da plântula apresenta um eixo único, o que facilita a leitura do crescimento (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Foram preparadas soluções em concentrações decrescentes em 3 ml de solvente das amostras. As diluições foram feitas em duplicata para os testes de germinação e de crescimento. Como controle foi empregado o solvente solubilizador de cada amostra.

#### 4.5.2 Preparo do material

Caixas Gerbox foram previamente lavadas e higienizadas com hipoclorito de sódio 10% e posteriormente com álcool 70°GL. Papéis de filtro Whatman nº6 no tamanho das caixas foram embebidos com as soluções das amostras preparadas anteriormente, assim como os controles, e levados á estufa a 40°C, durante 24 h, para evaporação total do solvente.

Após 24 h, sob fluxo laminar, os papéis de filtro secos foram acondicionados nas caixas Gerbox e umedecidos com água destilada. A quantidade de água empregada foi conforme Krzyzanowski; Vieira; Neto (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Dez sementes de *Lactuca sativa* foram distribuídas em 4 repetições, totalizando 40 sementes por caixa.

As caixas foram envolvidas em papel alumínio e colocadas em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com temperatura controlada em 25°C. Para análise estatística foi utilizado o programa Sisvar (FERREIRA, 2000). Para a verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas foi empregado o teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O teste Scott-Knott foi escolhido por ser claro, objetivo e isento de ambigüidades e o tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições apresentam o mesmo grupo de médias (DIAS, 2005).

#### 4.5.3 Teste de Germinação

Foram realizadas leituras diárias das caixas do estudo de germinação, sempre no mesmo horário, com a abertura das mesmas sob fluxo laminar, posterior contagem e

retirada das sementes germinadas até que todas as sementes germinassem. Como critério de germinação foi utilizado o tamanho da radícula que deve ter no mínimo 50% do tamanho da semente para evitar falsa germinação por expansão do embrião com a embebição (LABORIAU, 1983).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo (MAGUIRE, 1962) para cada repetição de cada tratamento, utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo número de dias da germinação e somando-se até o último dia de germinação. Por exemplo: tomando-se como base uma germinação com repetição de 10 sementes, se no primeiro dia germinar três sementes, dividir 3 por 1, no segundo dia germinar duas, dividir 2 por 2, no terceiro dia germinar três, dividir 3 por 3, no quarto dia germinar uma, dividir 1 por 4 e assim por diante. No final, somar os resultados das divisões. Os índices de velocidade foram submetidos ao teste Scott-Knott.

#### **4.5.4 Teste de crescimento**

As caixas separadas para a leitura do crescimento foram mantidas no germinador por 7 dias. Após esse período foi efetuada a medida do comprimento da radícula (que origina da raiz) e do hipocótilo (que origina do caule) com auxílio de papel milimetrado.

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias considerando-se o tratamento controle como 100%.

#### **4.6 BIOENSAIOS DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA**

#### 4.6.1 Índice Mitótico

A mitose é o processo pelo qual os cromossomos previamente replicados são alinhados, separados e distribuídos ordenadamente nas células-filhas (TAIS; ZEIGER, 2009, p. 25). A redução do crescimento de plantas na presença de aleloquímicos é associada a uma forte inibição da mitose e/ou rompimento da estrutura de organelas, como por exemplo, núcleo e mitocôndrias. A análise do Índice Mitótico é um método eficiente usado para avaliar o efeito alelopático de uma planta sobre outra (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Atualmente, a maioria das pesquisas em alelopatia refere-se ao efeito aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, não considerando os efeitos celulares relacionados às suas mudanças fisiológicas (PRATES *et al.*, 2001).

A citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias pode ser avaliada, respectivamente, através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (SOUZA *et al.*, 2005).

Segundo Chou e Kuo (1986), a fitotoxicidade de extratos vegetais sobre outras plantas é atribuída à diversidade de aleloquímicos presentes em sua composição, originados do metabolismo secundário dos vegetais.

Dessa forma tornou-se necessário investigar se as frações avaliadas causam ou não interferência a nível celular. Para determinação desse índice, foi empregada a metodologia descrita por Oliveira *et al.*, (1996), com algumas modificações. Foram coletados de cada plântula dois centímetros da raiz primária, a partir da extremidade distal, e imersos em fixador de Farmer (3:1, etanol:ácido acético glacial) (Jensen, 1962), durante 2 horas, a 25 °C e, em seguida, foram transferidos para uma solução de álcool 70 % e armazenados a 8 °C. Para determinação do índice mitótico, as pontas de raízes

foram tratadas na seguinte ordem: 1) água destilada por cinco minutos; 2) ácido clorídrico 1 M por 30 min à temperatura ambiente; 3) água destilada por cinco minutos e 4) azul de toluidina 2 % por 5 min. As pontas das raízes coradas tiveram o ápice, 2,0 mm iniciais, cortado sobre lâmina de microscópio, colocando-se em seguida a lamínula e pressionando sob esta o papel de filtro para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio ótico comum, com aumento de 1000x, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos/lâmina. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100.

#### **4.6.2 Atividade Enzimática**

A ação dos aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, motivo pelo qual torna-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos. No entanto, alguns autores listam vários mecanismos de ação dos aleloquímicos, os quais podem afetar os processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura de estômatos, nível de fitormônios, disponibilidade mineral, divisão e alongamento celular, estrutura e permeabilidade de membranas e parede celular (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Dentre os diversos efeitos dos aleloquímicos nas plantas o controle da produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que se acumula nas células em respostas ao aleloquímico, é responsável por danificar as células causando a sua morte (TESTA, 1995).

Os aleloquímicos estimulam a produção de EROs por diversos mecanismos. Dentre eles, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o  $O_2$  formando superóxido. O sorgolene, uma substância presente no sorgo (*Sorghum bicolor*), é capaz de inibir a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II (PSII) para fotossistema I (PSI) (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005), além de aumentar a produção de EROs que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares. Os aleloquímicos também podem formar radicais semioquímicos, um composto derivado das quinonas, o qual é altamente reativo e doa elétrons para o  $O_2$ , formando o superóxido (WEIR *et al.*, 2004). Um outro mecanismo conhecido na formação de EROs é a atividade dos aleloquímicos sobre a NADPH oxidase, uma enzimas que transfere elétrons do NADPH e doa para um aceptor ( $O_2$ ) formando o superóxido (FOREMAN *et al.*, 2003).

Alguns aleloquímicos podem atuar no aumento da atividade destas enzimas (ŠAMAJ *et al.*, 2004). O extrato cru de uma cianobactéria (*Hapalosiphon* sp.) induziu o estresse oxidativo em plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61) e cebola (*Allium cepa* L. cv. Raputa II), fato que foi atribuído ao aumento da atividade da NADPH oxidase, pois com a utilização de inibidores dessa enzima, difenileneiodo (DPI) e imidazole (IM), houve significativa redução (até 70%) da peroxidação das membranas celulares após 48h de experimento, sugerindo assim que alguns aleloquímicos estimulam a produção da NADPH oxidase, devido ao aumento da produção de EROs (SANEVAS *et al.*, 2007). Em plantas superiores, a presença desses inibidores pode determinar a produção de EROs (MAKSYMIEC; KRUPA, 2006).

Os radicais superóxido podem sofrer uma série de transformações através de processos enzimáticos e se tornarem mais reativos, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroxil ( $OH^\cdot$ ) ou hidroperoxil ( $HO_2^\cdot$ ) (HAMMOND-KOSAK; JONES, 1996). Conseqüentemente, estes radicais podem afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares, causando danos ao DNA e às proteínas.

Assim, foi avaliada a influência dos extratos brutos e frações das cascas e folhas de *Jatropha multifida* L. no teor de proteínas, atividade da superóxido dismutase,

atividade da protease, catalase,  $\alpha$ -amilase, teor de clorofila e respiração nas plântulas de *Lactuca sativa*.

#### 4.6.2.1 Preparo do material vegetal

As soluções utilizadas nos bioensaios de atividade enzimática e para análise do índice mitótico foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN *et al.*, 2000) em concentrações de 1000, 500 e 250 mg.ml<sup>-1</sup>, tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10mM e o pH ajustado para 6,0 (MACIAS, *et al.*, 2000) com solução de KOH 0,1N, utilizando-se pHmetro. Para o controle foi realizado procedimento similar, porém, com ausência de extratos e frações.

A metodologia proposta por Macias (2000) foi utilizada para os testes de atividade enzimática, pelo fato de que plântulas submetidas a PH muito ácido podem alterar a atividade das enzimas envolvidas no processo oxidativo.

Para o preparo do extrato enzimático foram pesados 2,0 g de material fresco (plântulas submetidas aos Extratos brutos e frações) os quais foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e ácido ascórbico 5 mM. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES; XAVIER FILHO, 1991). Os extratos foram acondicionados a -18°C no Laboratório de farmacotécnica da UFPR, até o momento da análise.

#### 4.6.2.2 Proteínas Totais

O tratamento de plantas com agentes eliciadores, aos quais podem-se incluir extratos de plantas medicinais, ativam mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas. O conteúdo de proteínas no tecido vegetal desafiado com um patógeno ou tratado com eliciador indica a ativação dos mecanismos de defesa da planta (VIECELLI *et al.*, 2010).

A quantificação de proteínas totais foi feita pelo método descrito por Bradford (1976), pelo preparo do reagente em laboratório. A concentração de proteína dos extratos foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), por espectrofotometria, a 594 nm de absorbância.

#### 4.6.2.3 Atividade Superóxido dismutase (SOD)

Um dos diversos efeitos dos aleloquímicos nas plantas é o controle da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que se concentram nas células em resposta ao aleloquímico, sendo desta forma, responsáveis por danos celulares. Uma das espécies reativas de oxigênio formada durante o estresse oxidativo é o superóxido ( $O_2^-$ ). A eliminação do radical ( $O_2^-$ ) é realizada por enzimas como a SOD que catalisa a transformação do  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais (ALMEIDA *et al.*, 2008).

A atividade da SOD foi determinada segundo método utilizado por Gupta *et al.*, (1993), com modificações.

A mistura de reação consistiu de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 9,9 mM, azul de nitrotetrazolium 57  $\mu$ M (NBT), riboflavina 44 mM, sendo retirados e 20  $\mu$ l de sobrenadante para 1 ml de volume final. A riboflavina foi adicionada por último no tubo contendo o meio de reação. Os tubos de vidro foram expostos dentro de uma câmara com luz fluorescente de 15 Watts por 10 minutos a 10 centímetros da luz. No ensaio, uma unidade SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do azul de nitrotetrazolium.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi expressa em Unidade SOD. g<sup>-1</sup> MF.

#### 4.6.2.4 Atividade da Peroxidase

Mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (VIECELLI *et al.*, 2010).

As peroxidases estão envolvidas na formação de lignina, um polímero de fenilpropanóides altamente ramificado (VIECELLI *et al.*, 2010, TAIZ; ZEIGER, 2009). A lignina desempenha funções protetoras importantes nos vegetais, como resistência física, bloqueio de crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente á infecção ou lesão (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A atividade da Peroxidase foi determinada segundo Pütter (1974). O sistema de reação continha 0,96 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), 20 µl de pirogalol 0,1 M como substrato e 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 M. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em 470 nm. A atividade específica (atividade peroxidásica/µg proteína) foi expressa em unidades de atividade enzimática (UAE), onde uma unidade corresponde, arbitrariamente, a uma diferença de 0,001 de absorbância/minuto/µg de proteína (GRAY *et al.*, 1996).

#### 4.6.2.5 Atividade da Catalase (CAT)

A CAT é umas das enzimas que atuam transformando espécies reativas de oxigênio intermediárias em água (ALMEIDA *et al.*, 2008). Ela é a enzima envolvida diretamente na remoção do peróxido de hidrogênio (RIEDLE-BAUER, 2000).

O ensaio para a determinação da CAT consistiu na adição de 60  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1M em uma mistura de reação contendo 3 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 100  $\mu\text{l}$  do extrato enzimático. O decréscimo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi monitorado pela absorbância a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância ( $\Delta A_{240}$  nm), obtida através de regressão linear, foi dividida pelo o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MF.

#### 4.6.2.6 Atividade da $\alpha$ -amilase

A germinação de cereais depende da atividade das  $\alpha$ -amilases, que regulam a degradação de amido necessária para o suprimento do metabolismo (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Para a determinação da alfa amilase, o extrato foi colocado em banho-maria a  $70^\circ\text{C}$  durante 20 minutos, adicionando-se 0,1 ml da amostra por tubo completando o volume de 1 ml com tampão e 1 ml de solução de amido, permanecendo incubado a  $30^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Após, foi adicionado 1 ml de lugol e 9 ml de água, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1965). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de amido hidrolizado  $\text{min}^{-1}$  g de sementes  $^{-1}$ .

#### 4.6.2.7 Teor de Clorofila e Respiração

Os teores de clorofila foram obtidos após a maceração das partes aéreas das plântulas em almofariz e extração com DMSO (CAYON *et al.*, 1990, com modificações). As absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares das plântulas de alface foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifênil tetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas e em seguida transferidas para tubos de ensaio de 17×120 mm, onde foram adicionados 3 ml de cloridrato de trifênil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaio foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 horas.

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez em água destilada. Os tubos de ensaio contendo as raízes foram novamente transferidos para o banho-maria com água fervente ( $\pm 100$  °C), sendo então adicionados 7 ml de etanol 95% (V/V). Decorridos 10 min, as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 ml de etanol 95% (V/V). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (STEPONKUS; LANPHEAR, 1967)

Para cada extrato e frações avaliados, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado envolvendo nove ensaios simples com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg.l<sup>-1</sup>), em quatro repetições. A unidade experimental constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra foi identificada no Museu Botânico da cidade de Curitiba, Paraná, pelo biólogo Osmar dos Santos Ribas e a excicata está depositada sob o número 226619.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA

Tomou-se uma amostra de 0,5g do material vegetal triturado e seco. Este foi colocado em cadinhos previamente dessecados por 30 min e pesados. A amostra foi levada á estufa a 105°C até ser verificado peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata. O teor de umidade é calculado pela diferença de peso da amostra úmida e da amostra seca e expressa em porcentagem, conforme resultados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 02 – TEOR DE UMIDADE DA CASCA DE *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso Amostra Úmida (g)	Peso Amostra Seca (g)	Umidade (%)	MÉDIA (%)
1	0,5021	0,4511	10,16	10,07
2	0,5024	0,4521	10,01	
3	0,5015	0,4511	10,05	

TABELA 03 – TEOR DE UMIDADE DA FOLHA DE *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso Amostra Úmida (g)	Peso Amostra Seca (g)	Umidade (%)	MÉDIA (%)
1	0,5010	0,4670	6,79	6,84
2	0,5023	0,4669	7,05	
3	0,5027	0,4691	6,68	

## 5.2 DETERMINAÇÃO DAS CINZAS TOTAIS

O resultado é expresso em porcentagem e em gramas conforme as Tabelas 4 e 5.

TABELA 04 – CINZAS TOTAIS DA CASCA DE *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso Amostra Úmida (g)	Peso Cinzas (g)	Cinzas Totais (%)	MÉDIA (%)
1	0,5021	0,0317	6,31	6,53
2	0,5024	0,0331	6,59	
3	0,5015	0,0336	6,70	

TABELA 05 – CINZAS TOTAIS DE FOLHAS DE *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso Amostra Úmida (g)	Peso Cinzas (g)	Cinzas Totais (%)	MÉDIA (%)
1	0,5010	0,0402	8,02	8,05
2	0,5023	0,0406	8,08	
3	0,5027	0,0404	8,04	

## 5.3 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO EXTRATO

Pesou-se a planta triturada e seca, esta passou pela extração em Soxhlet e foram obtidos os extratos brutos etanólicos. Os extratos foram concentrados até apresentarem um terço do volume inicial e foram pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem conforme as Tabelas 6 e 7.

TABELA 06 – RENDIMENTO DO EXTRATO DA CASCA DE *Jatropha multifida* L.

Planta Seca (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento planta seca (%)
429	116,11	27,07

TABELA 07 – RENDIMENTO DO EXTRATO DA FOLHA DE *Jatropha multifida* L.

Planta Seca (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento planta seca (%)
979	223,17	22,80

O extrato bruto das folhas foi filtrado e constatou-se a presença de resíduo clorofiliano, sendo este uma possível fonte rica em esteróides. O resíduo foi filtrado, pesado e armazenado sob refrigeração para testes posteriores. O rendimento do resíduo está expresso na Tabela 8.

TABELA 08 – RENDIMENTO DO RESÍDUO CLOROFILIANO DAS FOLHAS DE *Jatropha multifida* L.

Planta Seca (g)	Resíduo (g)	Rendimento resíduo (%)
979	319,12	32,60

#### 5.4 CÁLCULO DO TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO BRUTO

Tomou-se 10 ml do extrato bruto e este foi colocado em placa de petri previamente dessecada por 30 minutos em estufa a 105°C e pesada. A amostra foi levada á estufa a 105°C até apresentar peso constante. O sólido remanescente foi pesado. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados são expressos em mg/ml.

TABELA 09 – TEOR DE SÓLIDOS EXTRATO BRUTO CASCA *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso da placa (g)	Peso Sólido+Placa (g)	Teor de sólido (g/10ml)	MÉDIA	TEOR SÓLIDO (mg/ml)
1	37,8655	37,1342	0,7313	0,7313	73,13
2	49,6744	48,9486	0,7258		
3	33,1153	32,8784	0,7369		

TABELA 10 – TEOR DE SÓLIDOS EXTRATO BRUTO FOLHA *Jatropha multifida* L.

Amostra	Peso da placa (g)	Peso Sólido+Placa (g)	Teor de sólido (g/ml)	MÉDIA	TEOR SÓLIDO (mg/ml)
1	45,0294	45,2340	0,2046	0,2043	204,3
2	31,8356	32,0424	0,2068		
3	43,6700	43,8716	0,2016		

O teor de sólidos do extrato bruto das folhas de *Jatropha multifida* L. foi realizado utilizando 1 ml do extrato uma vez que também gera resultados confiáveis e reserva mais material para demais ensaios.

## 5.5 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os ensaios da análise fitoquímica foram realizados para ambas as partes da planta *Jatropha multifida* L. Os resultados estão expressos no Quadro 5.

PESQUISA	EXTRATO ALCOÓLICO		EXTRATO AQUOSO	
	C	F	C	F
ALCALÓIDES	-	-		
FENÓIS	-	+		
FLAVONÓIDES	-	+		
CUMARINAS	+	+		
ANTRAQUINONAS	-	+		
ESTERÓIDES E TRITERPENOS	+	+		
HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS			+	+
HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS			-	-
HETEROSÍDEOS CIANOGENÉTICOS			-	-

GOMAS, TANINOS E MUCILAGENS			+	+
TANINOS			+	+
AMINOGRUPOS			+	+
ÁCIDOS VOLÁTEIS			-	-

C: Casca *Jatropha multifida* L. / F: Folha *Jatropha multifida* L.

QUADRO 05 – RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO DA ANÁLISE EM FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DAS CASCAS E FOLHAS DE *Jatropha multifida* L.

Os resultados positivos para flavonoides, triterpenos e taninos do extrato das folhas de confirmam dados encontrados em literatura. O cheiro adocicado constatado nas características organolépticas dos extratos tanto na casca quanto nas folhas sugere resultado positivo para Cumarinas (LAKE, 1999).

Os resultados positivos para flavonoides, cumarinas, terpenos e taninos são dados animadores no sentido de isolar substâncias e estas apresentarem atividades biológicas.

## 5.6 PARTIÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES

Os extratos brutos das folhas e das cascas de *Jatropha multifida* L. foram submetidos ao particionamento líquido-líquido em aparelho Soxhlet com solventes de polaridade crescente gerando as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Os solventes das frações foram evaporados em banho-maria. O rendimento das frações foi calculado em relação ao peso total das frações obtidas e ao peso da planta seca e triturada utilizada para a obtenção dos extratos brutos particionados. Os resultados estão expressos nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA CASCA *Jatropha multifida* L.

FRAÇÕES	PESO FRAÇÕES (g)	RENDIMENTO TOTAL (%)	PLANTA SECA (g)	RENDIMENTO EXTRATO BRUTO (%)
HEXANO	1,78	10,81	281,2	0,63
CLOROFÓRMIO	2,78	16,88		1,00
ACETATO ETILA	0,365	2,22		0,13
HIDROALCOÓLICA	11,54	70,09		4,10

TABELA 12 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA *Jatropha multifida* L.

FRAÇÕES	PESO FRAÇÕES (g)	RENDIMENTO TOTAL (%)	PLANTA SECA (g)	RENDIMENTO EXTRATO BRUTO (%)
HEXANO	57,62	75,78	728,8	7,9
CLOROFÓRMIO	2,95	3,89		0,4
ACETATO ETILA	2,055	2,70		0,28
HIDROALCOÓLICA	13,41	17,64		1,84

## 5.7 ISOLAMENTO

### 5.7.1 Precipitação de composto da fração acetato de etila das folhas de *Jatropha multifida* L.

Após a evaporação lenta do solvente em temperatura ambiente da fração acetato de etila das folhas de *Jatropha multifida* L. precipitou um composto de cor amarela, amorfo, o qual foi denominado AEF-1 (Figura 9)



FIGURA 09 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO PRECIPITADO AEF-1

FONTE: A AUTORA, 2010.

A fração foi filtrada à vácuo e o composto recolhido e pesado sendo obtido 331mg. Foi realizada a cromatografia em camada delgada com cromatoplaças de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> Merck® deste composto. A placa foi visualizada com lâmpadas de UV em comprimento de onda de 360nm e constatou-se a presença de uma substância em quantidade majoritária e resquícios de outra substância.

Foi realizada uma varredura no UV do AEF-1 em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601. O espectro obtido está demonstrado a seguir.

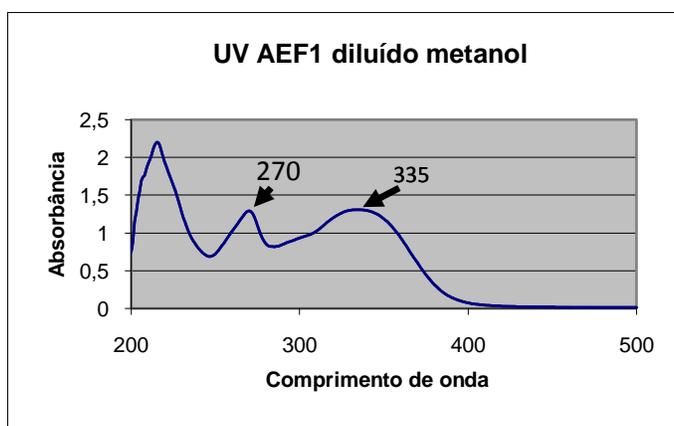


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO EM UV DO COMPOSTO AEF-1

O composto AEF-1 apresentou picos de absorção em 270 e 335 nm. indicativo de flavonoides conforme apontou a análise fitoquímica do extratos das folhas. Os Flavonoides apresentam absorção entre 200 e 400nm, característico desta classe de substância (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Estas informações sugerem que o composto AEF-1 seja um flavonóide e para a confirmação destas foram realizadas outras técnicas de identificação.

Foi realizada uma análise do extrato bruto das folhas em CLAE. Como é observado na Figura 11, existem dois compostos majoritários em concentrações semelhantes.

### Fitoquímica UFPR

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Jatropha multiflora\Method\Jatropha  
 1.met  
 Data: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Jatropha multiflora\Data\extrato  
 bruto5-25 metanol mais metanol 20-07-10.dat 08/16/2010 9:58:15 AM  
 Beatriz

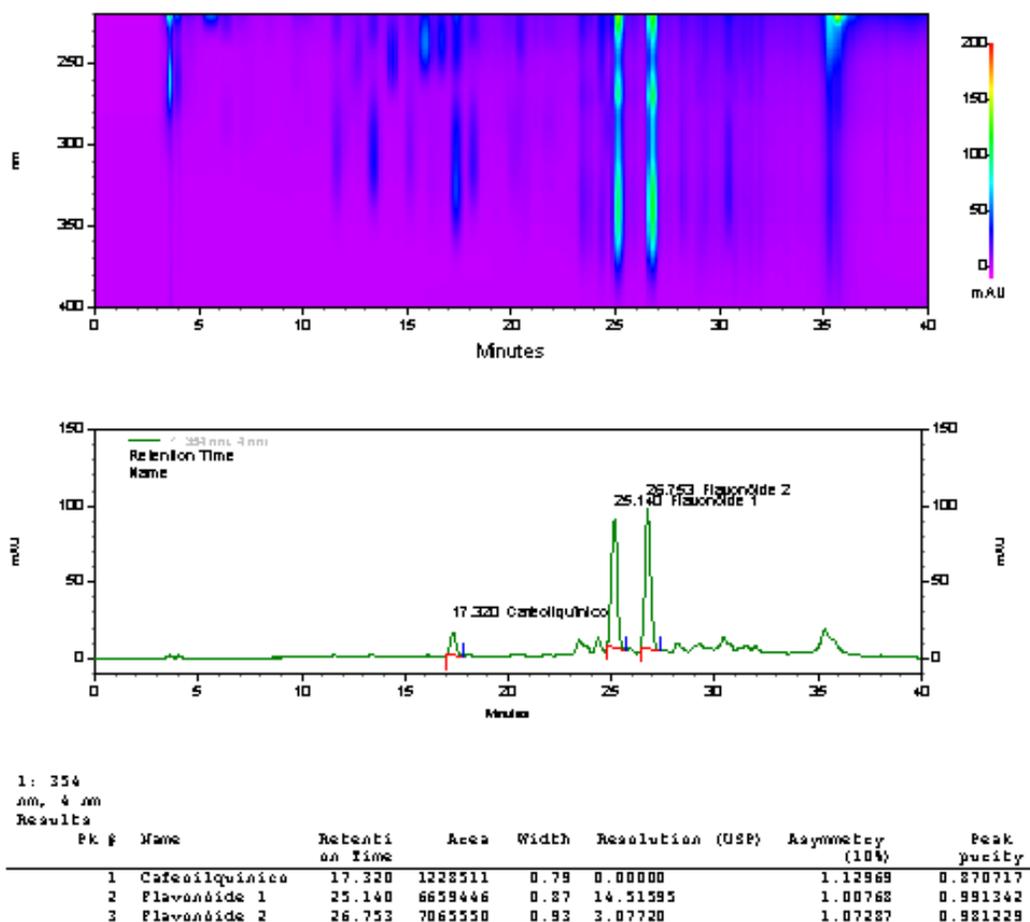
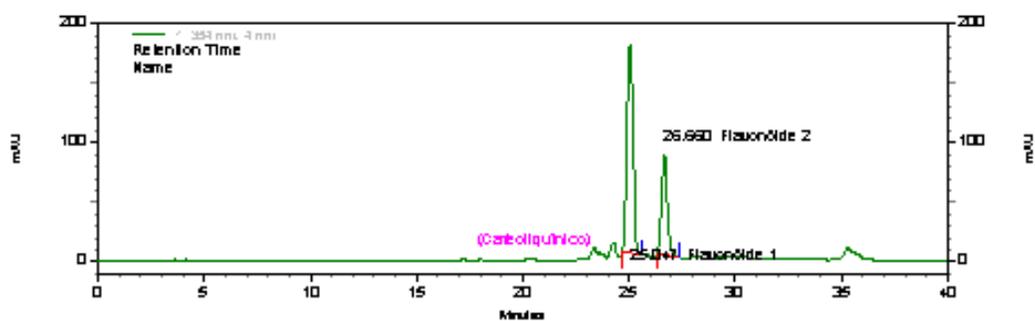
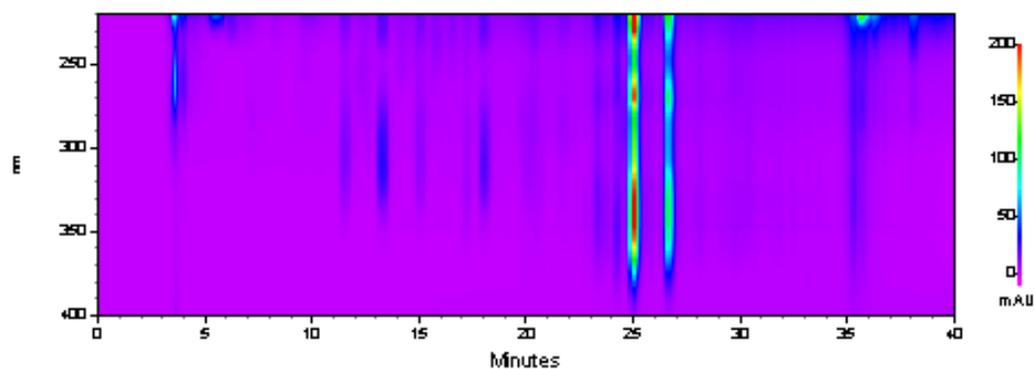


FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS EM CLAE EM 354nm.

A fim de verificar se uma destas bandas corresponde ao AEF-1 realizou-se a análise do extrato bruto mais o AEF-1 diluído em metanol. Pela soma das concentrações espera-se um aumento da intensidade do pico, o que pode ser observado claramente na Figura 12.

### Fitoquímica UFPR

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Jatropha multifita\Method\Jatropha  
 1.met  
 Data: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Jatropha multifita\Data\extrato  
 bruto5-25 metanol mais isolado 30-07-10.dat 08/16/2010 10:02:28 AM  
 Beatriz



1: 354  
 nm, 4 nm  
 Results

PK #	Name	Retention Time	Area	Width	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	Peak purity
Catecolquínico							
1	Flavonóide 1	25.047	1382512	0.94	0.00000	1.00035	0.997709
2	Flavonóide 2	26.660	6544957	1.06	3.08052	1.07211	0.990411

FIGURA 12 – CROMATOGRAMA APÓS A ADIÇÃO DO COMPOSTO AEF-1 AO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS EM 354nm

Foi utilizado para ambos os experimentos coluna  $C_{18}$  de fase reversa e  $5\mu m$ . A fase móvel foi composta por uma fase ácida ( $H_2PO_4$  0,2%,  $H_2SO_4$  0,02N) – solvente A - e acetonitrila – solvente B. A análise foi iniciada com 100% fase ácida, passou para

47% aos 30 min, dos 31 aos 35min estabeleceu em 20% e aos 36 min voltou a 100%. A velocidade de eluição foi de 1ml/min.

### **5.7.2 Cromatografia Líquida em Coluna da fração acetato de etila das folhas de *Jatropha multifida* L.**

Foi realizada a cromatografia em coluna da fração acetato de etila folhas para obter os componentes do AEF-1 puros. O peso da fração foi de 2,055g, foi utilizado 12,4g de Sílica-gel 60 Merck® - Art 7734 – com tamanho de partícula 0,063 – 0,2mm, 70 a 230 mesh ASTM para formação da pastilha. Esta foi submetida á cromatografia líquida em coluna. Utilizou-se a proporção de 5 partes de sílica-gel para 1 parte de pastilha. Foram eluídos 100ml de uma mistura de hexano e acetato de etila 50% (v/v). Esta mistura seguiu concentrações crescentes na ordem de 5% até chegar a 100% de acetato de etila. Depois utilizou-se concentrações crescentes de polaridade na ordem de 5% com acetato de etila e metanol até 100% de metanol. Foram então recolhidas 35 alíquotas com a primeira mistura e 85 alíquotas com a segunda de aproximadamente 10ml cada.

As alíquotas foram reunidas por similaridade de composição visualizada em CCD resultando nas alíquotas 42, 47, 52, 57, 62, 67, e 72.

### **5.7.3 Isolamento de segundo composto da fração acetato de etila das folhas (I4)**

As alíquotas 42, 47, 52, 57, 62, 67, e 72 foram submetidas á CCD a fim de detectar outros compostos majoritários visualizado em CLAE conforme a Figura 11. Tomou-se a alíquota 52 e purificou-se com álcool metílico, gerando a alíquota 52MeOH. Foi feita novamente a CCD desta alíquota purificada e constatou-se ser um composto diferente do AEF-1, o que gerou o composto I4. Foram isolados 138mg do composto I4, um sólido de cor caramelo e cristais amorfos (Figura 13).



FIGURA 13 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO I4

FONTE: A AUTORA, 2010.

#### **5.7.4 Isolamento de composto (FHF-1) da fração hexano das folhas**

Realizou-se a cromatografia em coluna da fração hexano das folhas para obtenção de mais compostos visto que esta fração apresentou o maior rendimento no processo de partição líquido-líquido. O peso da fração foi de 26g, utilizou-se 113,4g de Sílica-gel 60 Macherey-Nagel – com tamanho de partícula 0,063 – 0,2mm, 70 a 230 mesh ASTM para formação da pastilha. Esta foi submetida à cromatografia em coluna. Utilizou-se a proporção de 5 partes de sílica-gel para 1 parte de pastilha. Foram eluídos 100ml de hexano e então à fase móvel foi acrescentada acetato de etila 5% (v/v). Esta mistura seguiu concentrações crescentes na ordem de 5% até chegar a 100% de acetato de etila. Foram então recolhidas 110 alíquotas de aproximadamente 10ml cada.

Após a evaporação do solvente constatou-se a presença de cristais nas alíquotas 17 e 18. Estas alíquotas foram sonicadas com éter de petróleo e após a retirada do solvente restaram cristais brancos em forma de agulhas conforme apresenta a figura 14. Este composto foi denominado FHF-1 e a quantidade rendida foi de 39,6mg.



FIGURA 14 – FOTO ILUSTRATIVA DO COMPOSTO FHF-1

FONTE: A AUTORA, 2010.

## 5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

### 5.8.1 Identificação do composto FHF-1

O composto FHF-1 foi isolado da fração hexano das folhas como um sólido branco em forma de agulhas. O composto foi submetido à análise espectroscópica de UV, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

No espectro de IV (Figura 15) em pastilhas de KBr podemos observar uma pequena banda na região de  $3331\text{ cm}^{-1}$ , característico de deformação axial O-H. A absorção na região de  $2944\text{ cm}^{-1}$  caracteriza estiramento simétrico de CH,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  dos grupamentos alquila. A banda em  $1457\text{ cm}^{-1}$  indica deformação angular assimétrica de grupos  $\text{CH}_3$ , e a banda em  $879\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular fora do plano das ligações  $=\text{C-H}$  (BARBOSA, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

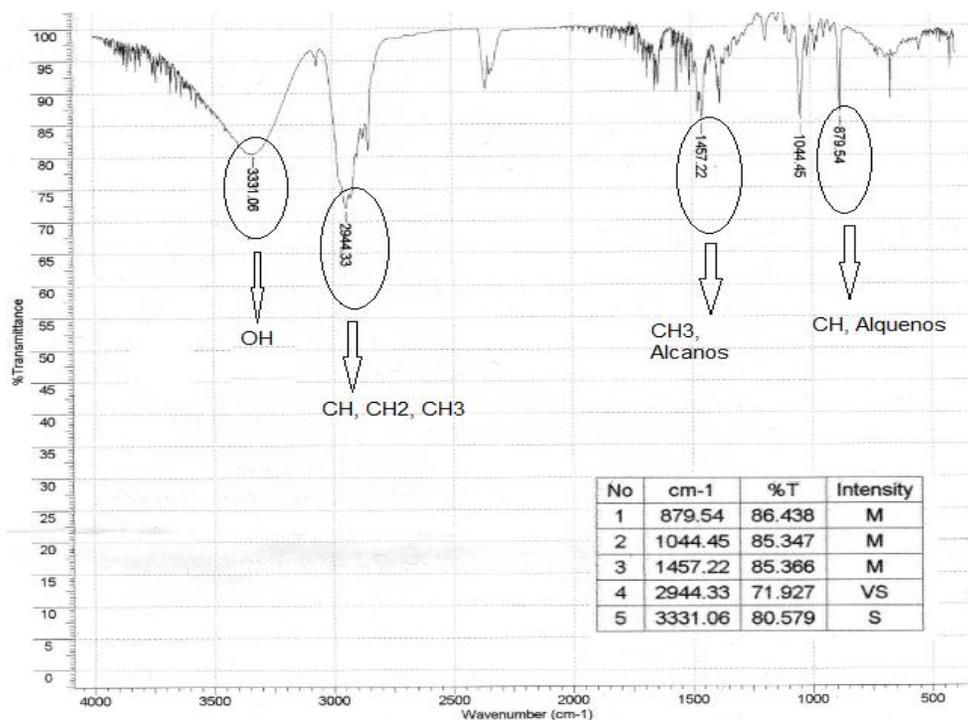


FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA FHF-1.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $135^\circ$  (Figuras 16 e 17) possibilitou a identificação um total de trinta carbonos, dos quais 7 são  $\text{CH}_3$ , 11 são  $\text{CH}_2$ , 6 são  $\text{CH}$  e 6 são quaternários. A presença da dupla exocíclica pode ser confirmada através da presença do par de carbonos  $\text{sp}^2$  em  $\delta 109$  ( $\text{CH}_2$ ) e  $\delta 151$  ( $\text{C}_q$ ).

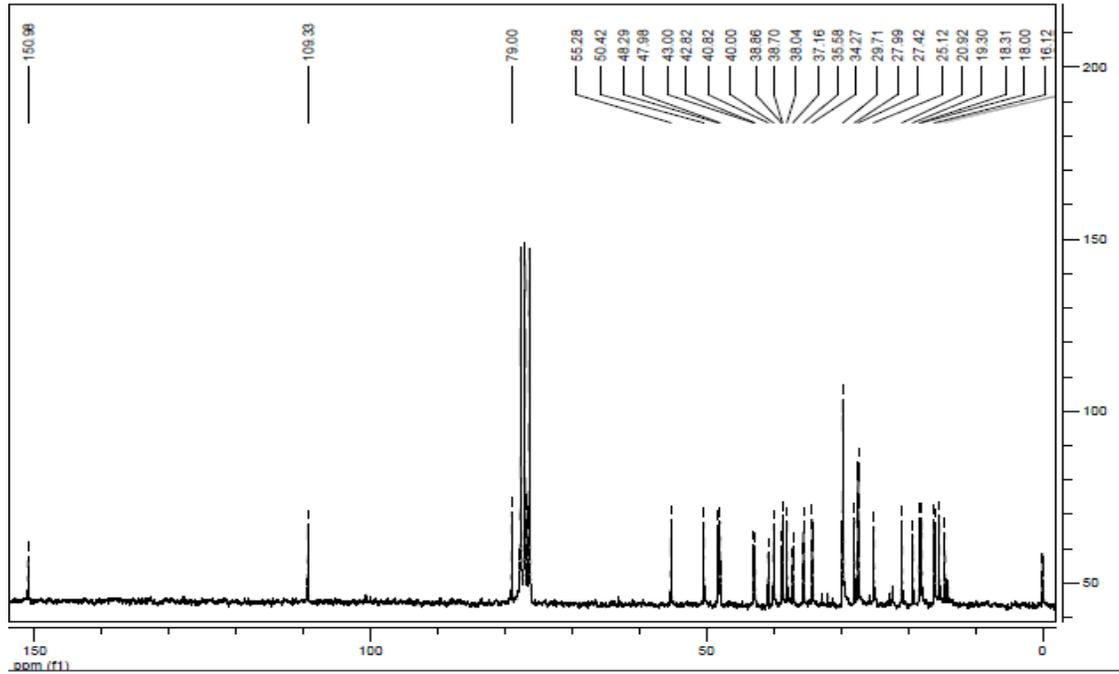


FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DA SUBSTÂNCIA FHF-1

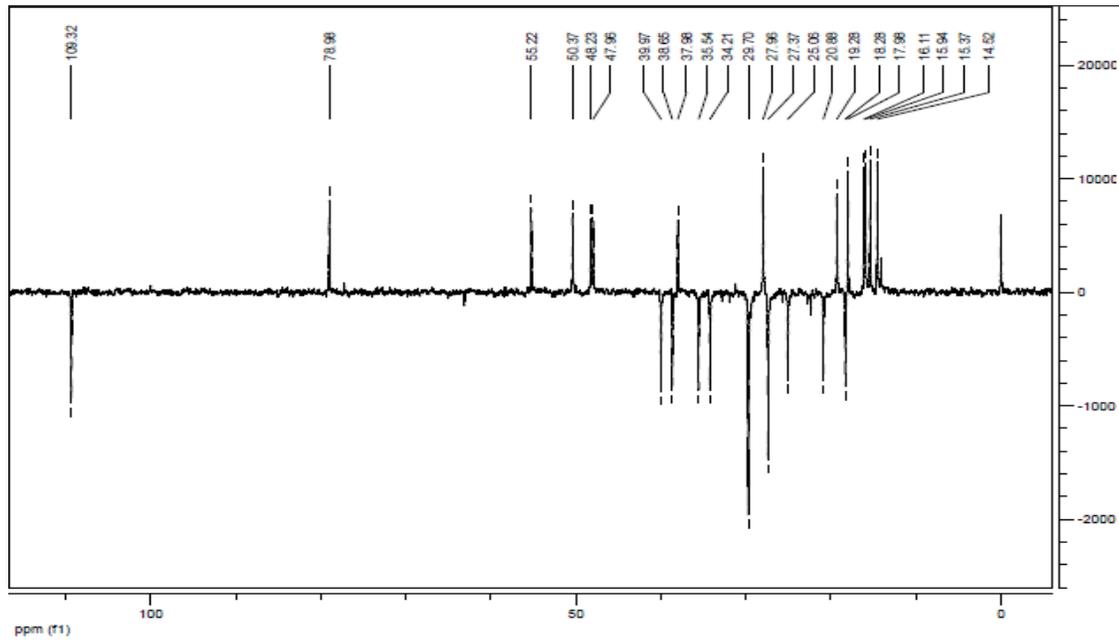


FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA FHF-1

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18) observamos uma grande quantidade de sinais na região até 2ppm, características de H mais protegidos, ou seja, presença de hidrogênio ligado à C  $\text{sp}^3$ . Dois singletos em  $\delta$ 4,68 e  $\delta$ 4,56 integrando para 1H cada, que correspondem respectivamente os hidrogênios 29a e 29b. Um duplo dubleto em  $\delta$ 3,15 ( $J=5,3$  e  $10,2\text{Hz}$ ) característico de H ligado a carbono carbinólico na posição 3 e os 7 simpletos em  $\delta$ 1,25,  $\delta$ 1,03,  $\delta$ 0,97,  $\delta$ 0,94,  $\delta$ 0,83,  $\delta$ 0,79 e  $\delta$ 0,76 correspondente aos hidrogênios das metilas 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 30. As integrações dos picos estão demonstradas na Figura 19.

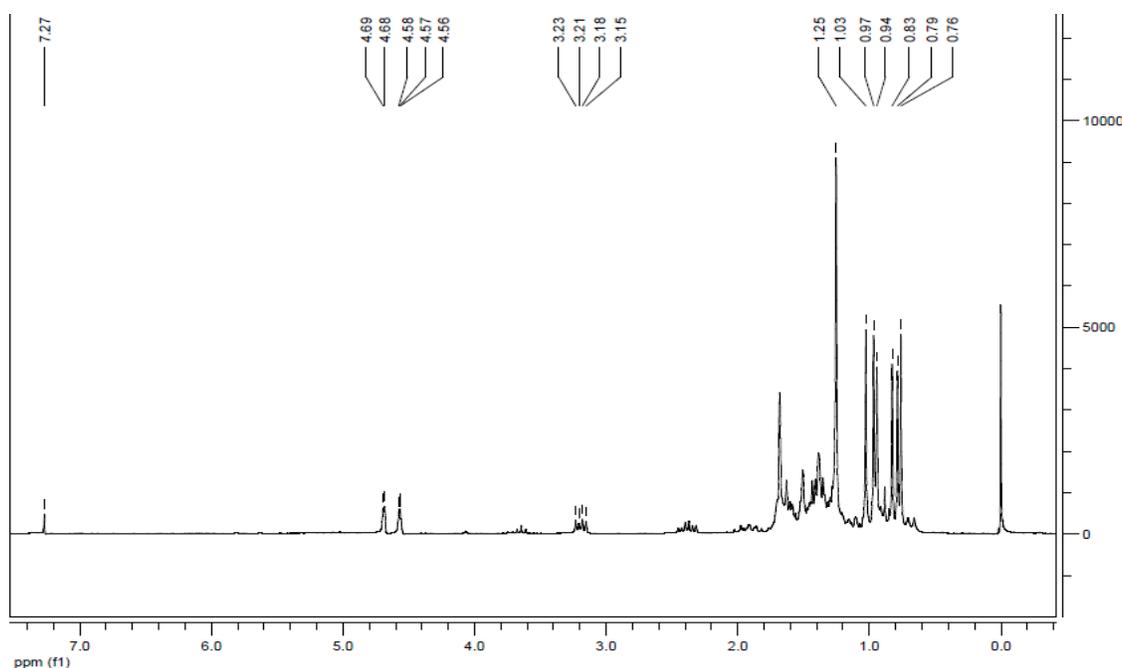


FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FHF-1

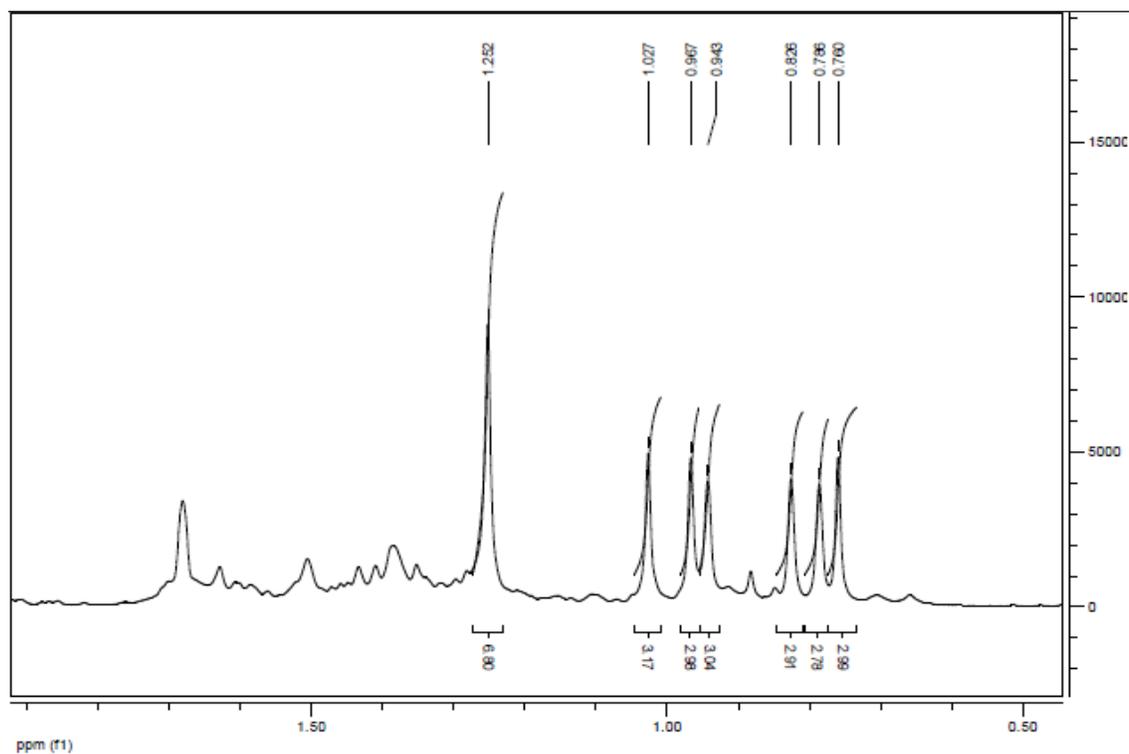


FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DAS METILAS DA SUBSTÂNCIA FHF-1

Comparando com dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994, JAMAL; YAACOB; DIN, 2008 e GALLO; SARACHINE, 2009), o composto foi identificado como o triterpeno Lupeol (Figura 20).

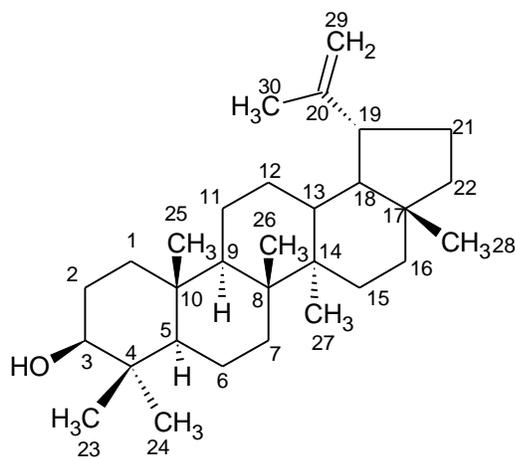


FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LUPEOL

FONTE: JAMAL, YAACOB; DIN (2008).

A Tabela 13 apresenta dos dados espectrais experimental e os dados de literatura.

TABELA 13 – VALORES DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO FHF-1

POSIÇÃO	$\text{C}^{13}$ experimental	Jamal, Yaacob, Din, (2008)	$\text{H}^1$ experimental	Jamal, Yaacob, Din, (2008)
1	38.69	38.2		
2	25.11	25.3		
3	79.00	79.1	3.15 (dd, J=5.3, 10.2Hz)	3.16 (1H, dd, J=4.76, 11Hz)
4	38.86	38.9	3.68	
5	55.27	55.5	3.64	
6	18.30	18.5	3.61	
7	34.26	34.5	3.23	
8	40.81	41.0	3.20	
9	50.41	50.6	3.18	
10	37.15	37.3		
11	20.91	21.1	2.45	
12	27.40	27.5	2.42	
13	38.03	39.0	2.40	
14	42.81	43.0	2.37	
15	27.40	27.6	2.34	
16	35.56	35.8	2.31	
17	42.99	43.2	1.68	
18	48.28	48.5		
19	47.97	48.1		
20	150.98	151.1		
21	29.82	30.0		
22	39.99	40.2		
23	27.97	28.2	0.76	0.75 (3H)
24	15.36	15.6	0.79	0.78 (3H)
25	16.11	16.3	0.83	0.82 (3H)
26	15.96	16.2	0.94	0.93 (3H)
27	14.53	14.7	0.97	0.95 (3H)
28	17.99	18.2	1.03	1.02 (3H)
29	109.33	109.5	4.67 (d, J=2.37), 4.57 (d, J=1.98)	4.68;4.56 (2H, s, H- 29 <sup>a</sup> , 29 <sup>b</sup> )
30	19.29	19.5	1.25	1.25 (3H)

O lupeol é um constituinte comum em uvas, avelãs, óleo de oliva, polpa de manga, repolho branco e uma variedade de plantas terapêuticas. Este triterpeno pentacíclico exibe um amplo espectro de atividades biológicas, desde quimiopreventivo até antiinflamatório e antitumoral (GALLO; SARACHINE, 2009).

### 5.8.2 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO AEF-1

O composto AEF-1 foi isolado por precipitação espontânea da fração Acetato de etila das folhas, é um sólido amorfo de coloração amarela. O espectro de absorção no infravermelho (Figura 21) apresentou uma banda larga na região de  $3382,17\text{ cm}^{-1}$  característico de deformação axial O-H em ligação de hidrogênio intermolecular assimétrica e em  $3245,23\text{ cm}^{-1}$ , simétrica. A presença de grupo carbonila está evidenciada pela presença da banda de deformação axial C=O em  $1610,58\text{ cm}^{-1}$ . O pico em  $1652,99\text{ cm}^{-1}$  característico da deformação axial de C=C (*cis*) de alquenos cíclicos. As bandas intensas entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento da ligação C-O confirmam a presença de grupos OH de álcool, enquanto o pico em  $833,25\text{ cm}^{-1}$  indica a deformação angular fora do plano de C-H aromático (BARBOSA, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

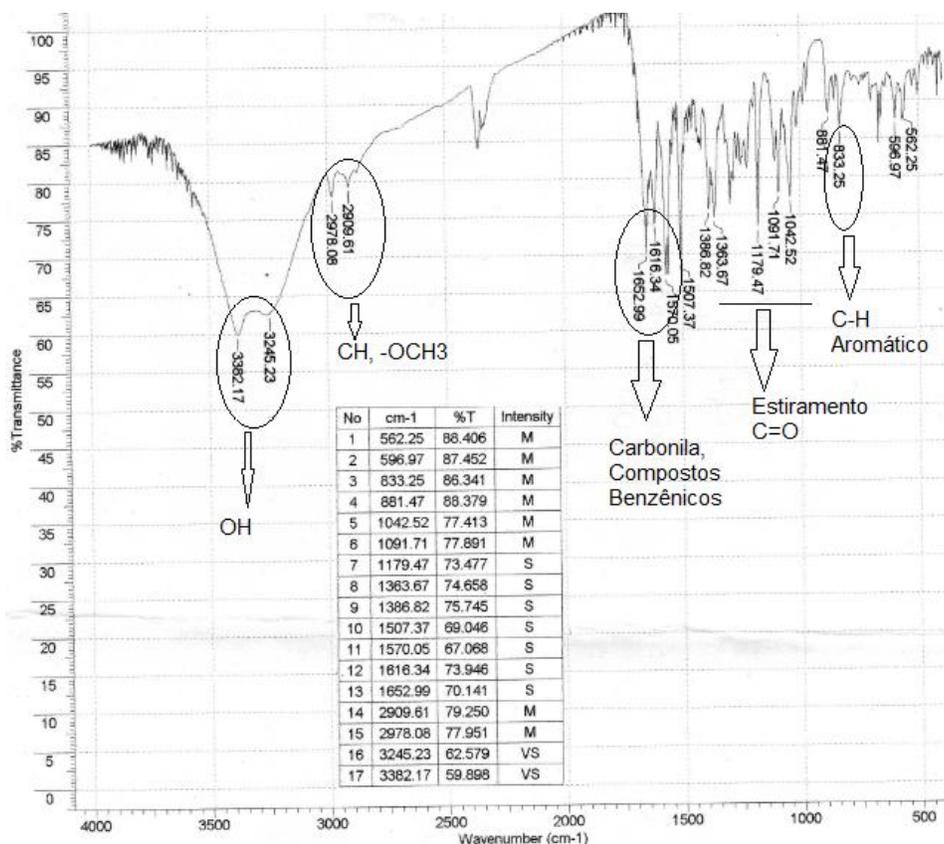


FIGURA 21 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA AEF-1

O composto AEF-1 foi submetido a análise no UV, os comprimentos de onda onde este composto absorveu estão compilados na Tabela 14. Os dados para a interpretação dos espectros de UV foram consultados em Mabry, Markham e Thomas, (1970).

TABELA 14 - DADOS DO ESPECTRO EM ULTRAVIOLETA, AEF-1.

COMPOSTO	DADOS ESPECTRO UV <sub>Max</sub> (nm)					
	METOH	NaOH	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> +HCl	NaOAc	NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
AEF-1	270	280	277	278	281	272
	300sh	329	305	304	299	328sh
	336	394	348	344	385	344
			385	381		

O espectro em metanol do composto AEF-1 mostra a posição da banda I em 336, ou seja, entre 304 e 350, característica do grupo das flavonas. O fato de se tratar de flavonoides sugere o uso de agentes de deslocamento, pois esse tipo de estudo trás uma série de informações importantes quanto a estrutura dos mesmos.

A adição de hidróxido de sódio produziu um efeito batocrômico na absorção das duas bandas. Um grande efeito batocrômico na banda I, de 336 para 394 nm, sem decréscimo de intensidade, evidencia presença de grupo hidroxila 4' livre. (Gráfico 1).

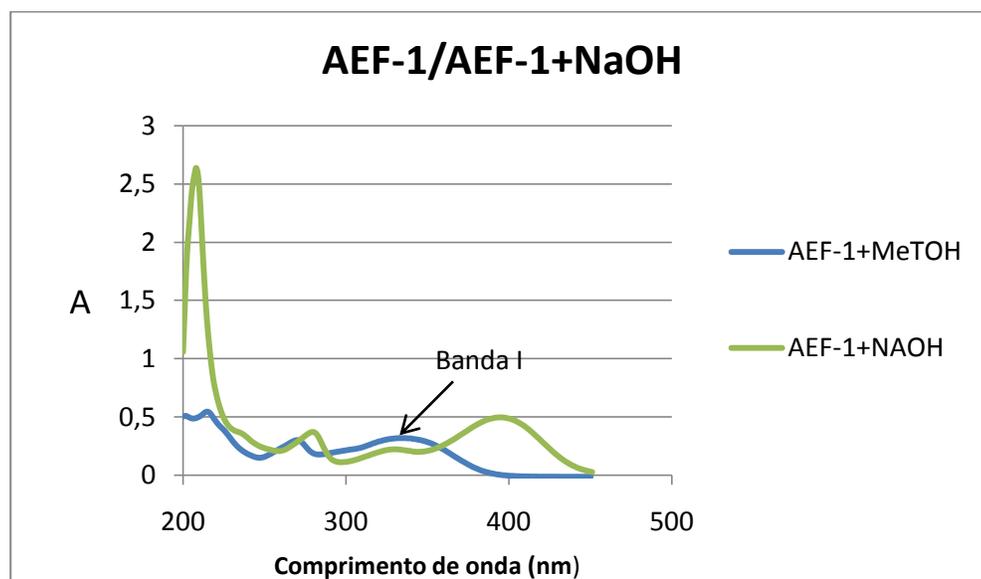


GRÁFICO 01 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM NaOH.

O espectro de UV de flavonas que contém grupos hidroxila na posição 7 livres, com poucas exceções, é diagnosticado através de um efeito batocrômico de 5-20 nm na banda II na presença de NaOAc. Este efeito foi observado no composto AEF-1 que apresentou efeito batocrômico na banda II de 270 para 281 nm em presença de NaOAc (Gráfico 2).

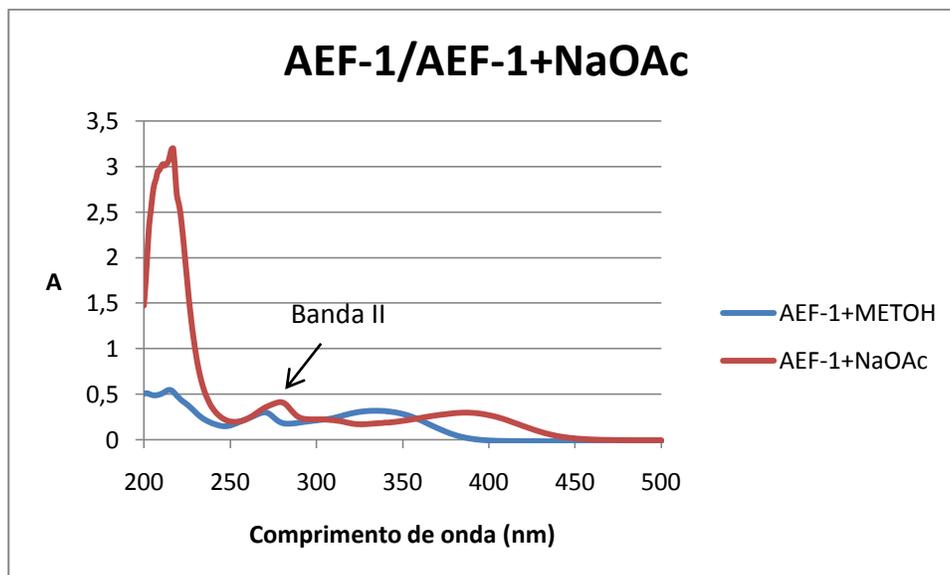


GRÁFICO 02 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM NaOAc.

A adição de  $H_3BO_3$  à solução do composto AEF-1+NaOAc não provocou deslocamento no espectro comparado ao espectro em metanol, o que caracteriza ausência de grupos orto-diidroxila, como revela o gráfico 3.

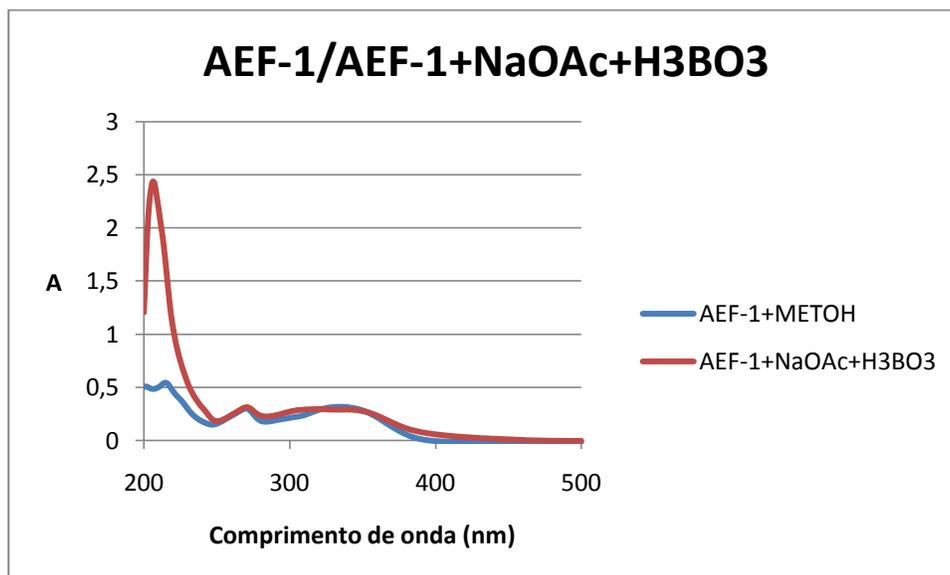


GRÁFICO 03 – ESPECTRO UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E AEF-1+NaOAc+  $H_3BO_3$ .

O espectro de  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  das 5-hidróxilflavonas consiste em quatro picos de absorção, bandas Ia, Ib, IIa, IIb, todas com efeito batocrômico relativo aos picos de absorção em metanol. Este efeito foi observado na amostra AEF-1 adicionada de  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ , como demonstrado no gráfico 4.

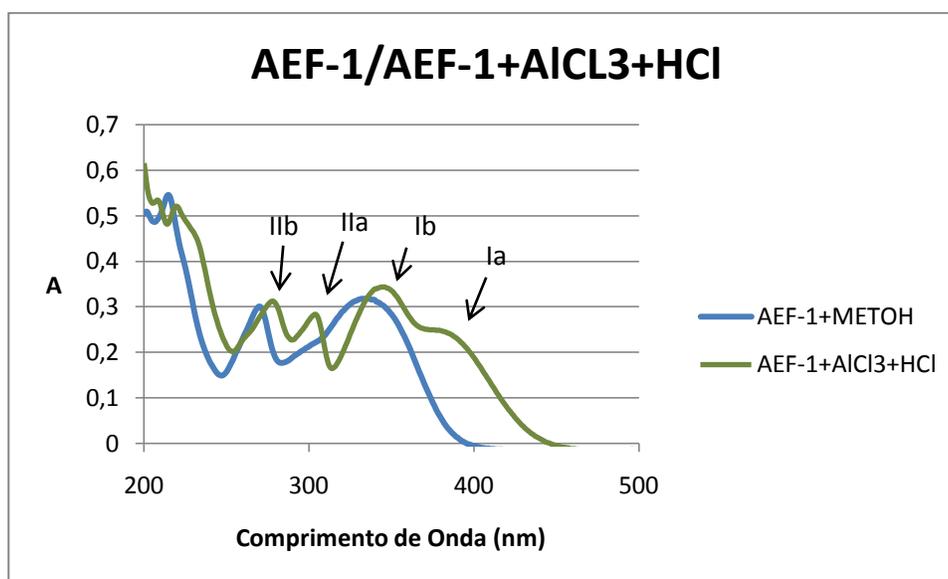


GRÁFICO 04 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO AEF-1 EM METANOL E COM  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ .

O efeito batocrômico da banda I (em metanol) para a banda Ia (em  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ ) no espectro de 5-hidróxilflavonas, com poucas exceções, é de 35-55nm. O deslocamento observado no espectro do composto AEF-1 foi de 336 para 381, ou seja, 45nm.

Podemos concluir a partir das observações através dos espectros no UV associados ao IV que o composto AEF-1 é muito provavelmente uma flavona 4',5,7 tri-hidroxilada.

O composto AEF-1 foi então submetido à análise em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, o solvente utilizado foi DMSO à 200MHz.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais para 20 carbonos, 14 carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides na região entre 90 e 180ppm e mais seis carbonos na faixa de 60 a 80ppm, região característica de açúcar, neste caso, uma

hexose (Figura 22). Um carbono com sinal em  $\delta 102$  foi visualizado somente no DEPT  $135^\circ$  (Figura 23), assim a estrutura básica do composto possui 21 carbonos, o que permite confirmar a hipótese do composto AEF-1 ser uma flavona, porém, glicosilada.

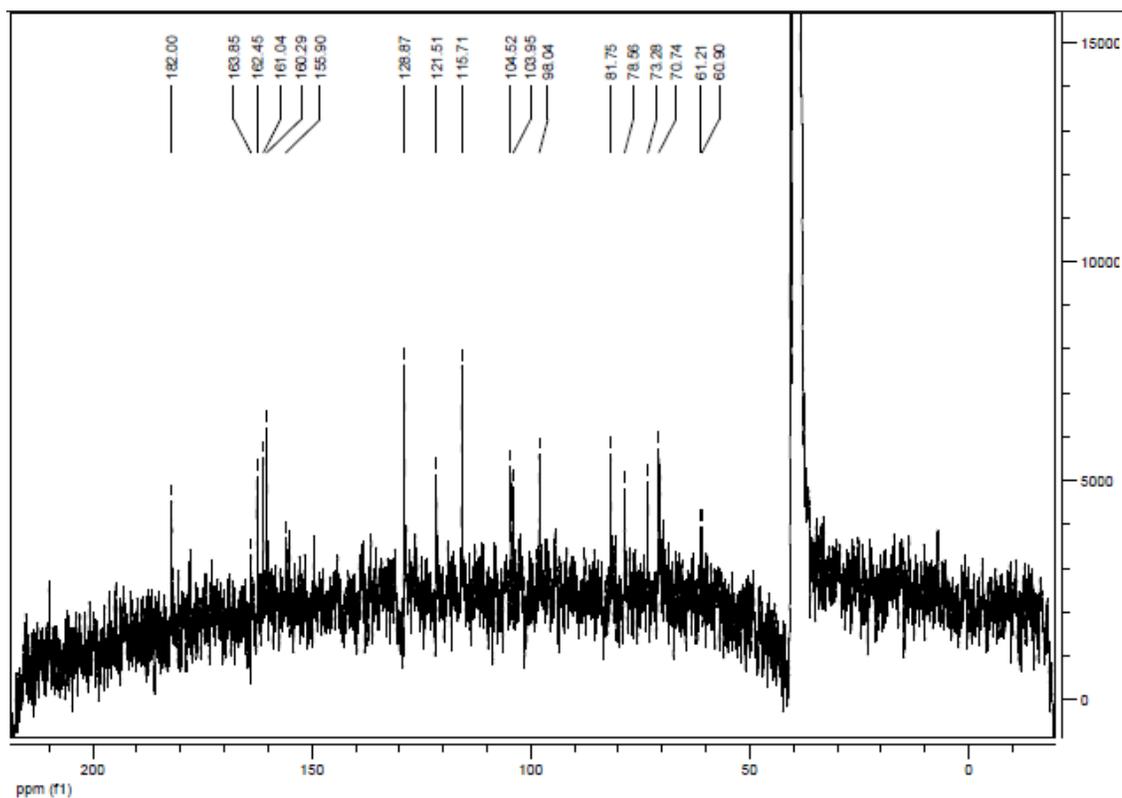


FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO COMPOSTO AEF-1

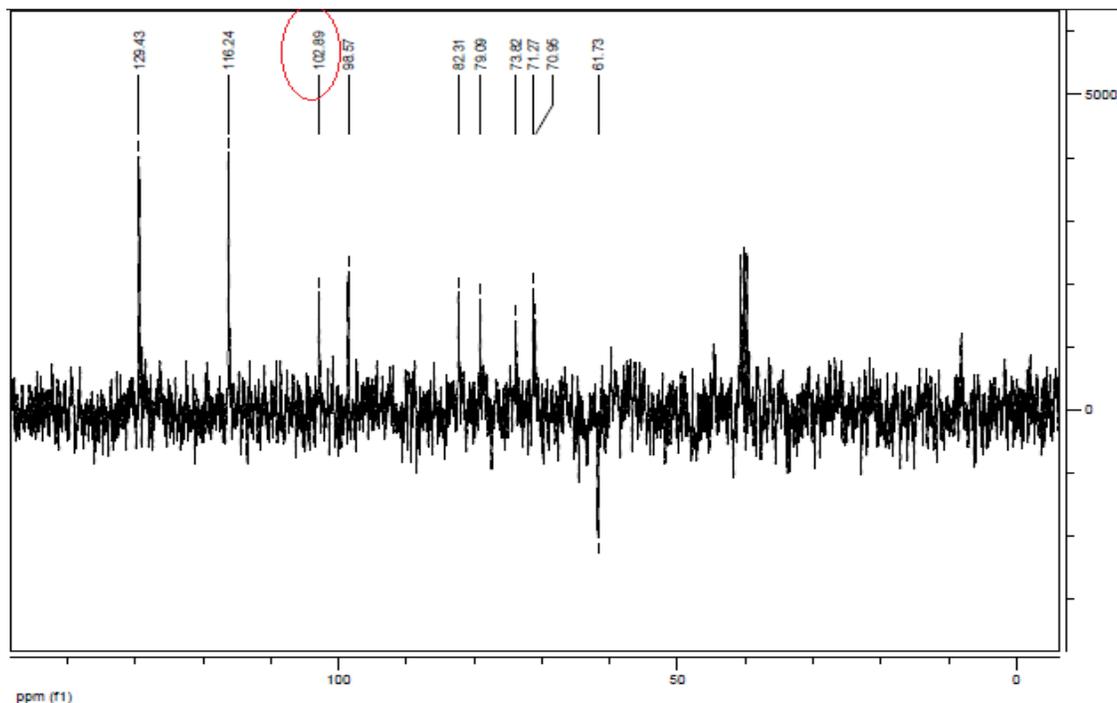


FIGURA 23 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DEPT 135° DO COMPOSTO AEF-1

O espectro de  $^1\text{H}$  apresentou deslocamentos químicos na região de H ligado a  $\text{C sp}^2$ . Neste caso podemos observar os singletos em  $\delta 6,8$  e  $\delta 6,28$  os quais integram para 1H cada. O singlete em  $\delta 13,18$ , mais desprotegido, integra também para 1H permitindo concluir que é um H de hidroxila em ligação de hidrogênio com o grupo cetona da posição 4.

Os dubletos em  $\delta 8,6$  e  $\delta 6,9$  integram para dois H cada, com  $J = 8,8\text{Hz}$  característico dos hidrogênios  $2'/6'$  e  $3'/5'$  de um anel aromático dissubstituído em *para*. O dubleto em  $\delta 4,68$  com  $J = 9,9\text{Hz}$  integra para 1H e acopla com o C em 79 ppm. Deslocamentos nesta faixa são característicos de H de açúcar, o J de 9,9Hz corresponde à constante de acoplamento de H em posição axial. Dos H de açúcar este é o mais desprotegido, concluímos então que o sinal em  $\delta 4,68$  é o H anomérico do açúcar (Figura 24).

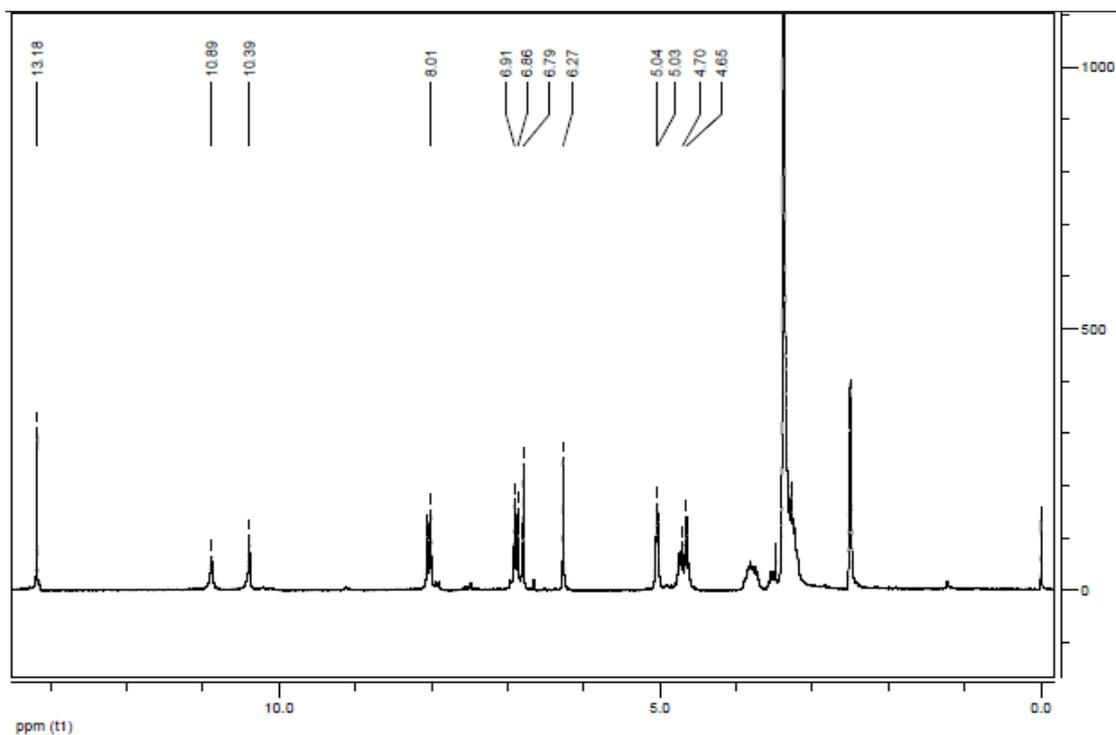


FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO COMPOSTO AEF-1

Para determinar a posição do açúcar, recorreu-se ao ensaio de RMN (2-D). A correlação entre os sinais de H e C permitiu as observações a seguir. Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os dados de correlação estão compilados na Tabela 15. Pela comparação com os dados espectrais o glicosídeo ligado à flavona foi identificado como uma glicose.

TABELA 15 – DESLOCAMNETOS QUÍMICOS (ppm) DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO AEF-1 E DADOS DE LITERATURA.

Posição	$^1\text{H}$ Experimental DMSO	$^1\text{H}$ PENG (2008)	$^{13}\text{C}$ Experimental DMSO	$^{13}\text{C}$ PENG (2008)	$^1\text{H}$ Blidimensional DMSO	$^{13}\text{C}$ Bidimensional DMSO
<b>2</b>			164,4	164,3		
<b>3</b>	6,8 (s)	6,76 (s)	102,0	102,5	6,78 (s)	105, 163, 182, 120
<b>4</b>			182,0	182,16		
<b>5</b>	13,18 (s)	13,15 (s)	160,8	160,4	12,2 (s)	160, 103, 98
<b>6</b>	6,28 (s)	6,27 (s)	98,0	98,23	6,27 (s)	105, 160
<b>7</b>			163,0	162,71		
<b>8</b>			104,5	104,10		
<b>9</b>			156,0	156,9		
<b>10</b>			105,0	104,7		
<b>1'</b>			122,0	121,69		
<b>2'6'</b>	8,6 <i>d</i> (8,7Hz)	8,01 <i>d</i> (8,7Hz)	129,4	129,03	8,03 <i>d</i> (8,8Hz)	128, 162, 165
<b>3'5'</b>	6,9 <i>d</i> (8,7Hz)	6,88 <i>d</i> (8,7Hz)	116,2	115,89	6,89 <i>d</i> (8,8Hz)	116, 121, 160
<b>4'</b>			161,6	161,22		
<b>1''</b>	4,66 <i>m</i>	4,69 <i>d</i> (9,8Hz)	79,0	78,74	4,68 <i>d</i> (9,9Hz)	80,158, 160, 105, 82, 74
<b>2''</b>		3,85-3,22 6H, <i>m</i>	73,0	73,46	3,25	70,6; 77,8; 81,7
<b>3''</b>			71,3	70,93	3,38 (s)	70,6; 77,8; 81,7
<b>4''</b>			71,0	70,62	3,83 <i>t</i> (9,5Hz)	70,8; 78,7
<b>5''</b>			82,0	81,69	3,53 <i>m</i> (5,6Hz)	82,0; 61,3
<b>6''</b>			61,5	61,73	3,77 <i>dd</i> (5,5; 11,2 Hz)	61,2

Nota: *s*=singleto, *d*=dubleto, *dd*=duplo dubleto, *m*=multipleteo, *t*= tripleteo,

Através dos experimentos de HSQC e HMBC foi possível posicionar a unidade glicosídica na posição 8 e ainda confirmar que trata-se de um flavonoide-C-glicosilado pois o H anomérico está correlacionado ao C  $\delta$ 79,0, deslocamento característico de C hemiacetal. As correlações estão representadas na Figura 25.

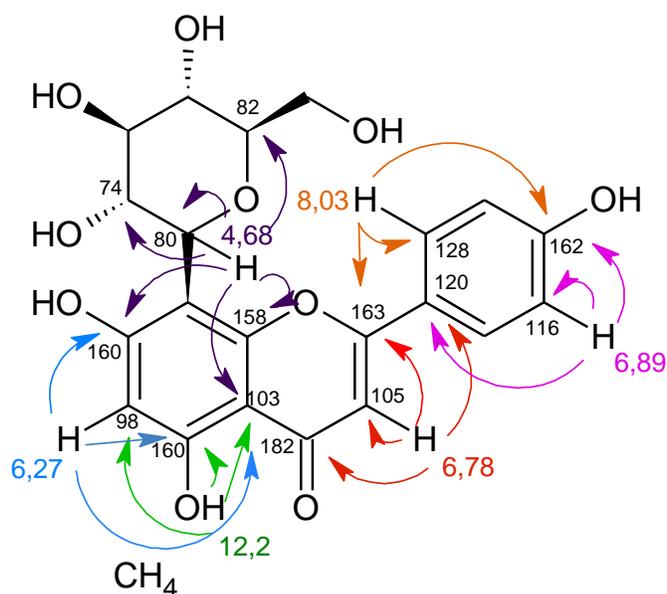


FIGURA 25 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO AEF-1 CONTENDO AS CORRELAÇÕES DE HIDROGÊNIOS E CARBONOS.

Considerando os dados dos espectros de IV, UV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e 2-D, propõe-se que o composto AEF-1 seja o Vitexina (Figura 26). A presença deste composto já foi relatada na espécie *Jatropha multifida* L (MOHARRAM *et al.*, 2007).

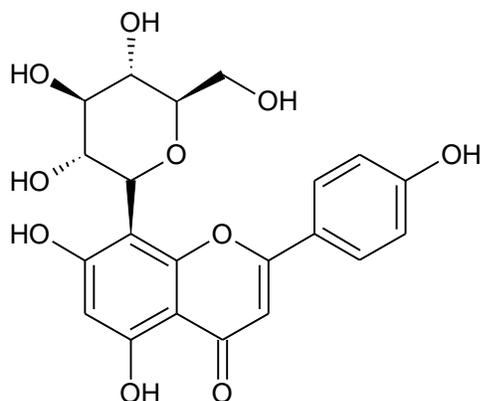


FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITEXINA

FONTE: PENG *et al.*, (2008).

A vitexina, também conhecida como apigenin-8-glucosídeo, possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (AFIFI; SHERVINGTON; DARWISH, 1997). Outras atividades biológicas foram relatadas deste composto, como potente hipotensivo, antiinflamatório e antiespasmódico (PRABHAKAR *et al.*, 1981). A Vitexina mostrou-se também um potente seqüestrador de radicais livres, e foi indicada na prevenção de reações adversas da pele induzidas por radiação UV (KIM *et al.*, 2005). Seis semanas de tratamento com Vitexina (400mg/dia) melhoraram a saúde geral de pacientes com câncer de mama durante o tratamento de radioterapia com cobalto-60, com restauração de células sanguíneas periféricas assim como as funções dos linfócitos. Os autores atribuíram este efeito ao poder antioxidante da Vitexina (HIEN *et al.*, 2002).

### 5.8.3 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO I4

O composto I4 foi isolado das alíquotas da coluna da fração acetato de etila das folhas. Apresenta-se como um sólido amorfo de cor caramelo. O espectro de absorção no infravermelho (Figura 27) apresentou uma banda larga na região de  $3397,6\text{ cm}^{-1}$  o que caracteriza deformação axial O-H em ligação de hidrogênio intermolecular. A presença de grupo carbonila está evidenciada pela presença de picos de absorção em  $1610,56\text{ cm}^{-1}$ , devido a deformação axial de C=O. O pico em  $1652,99\text{ cm}^{-1}$  característico da banda de deformação axial de C=C de alquenos cíclicos. As bandas intensas entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento da ligação C-O, confirmam a presença de grupos OH de álcool, enquanto o pico em  $832,28\text{ cm}^{-1}$  indica deformação angular fora do plano de C-H aromático (BARBOSA, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

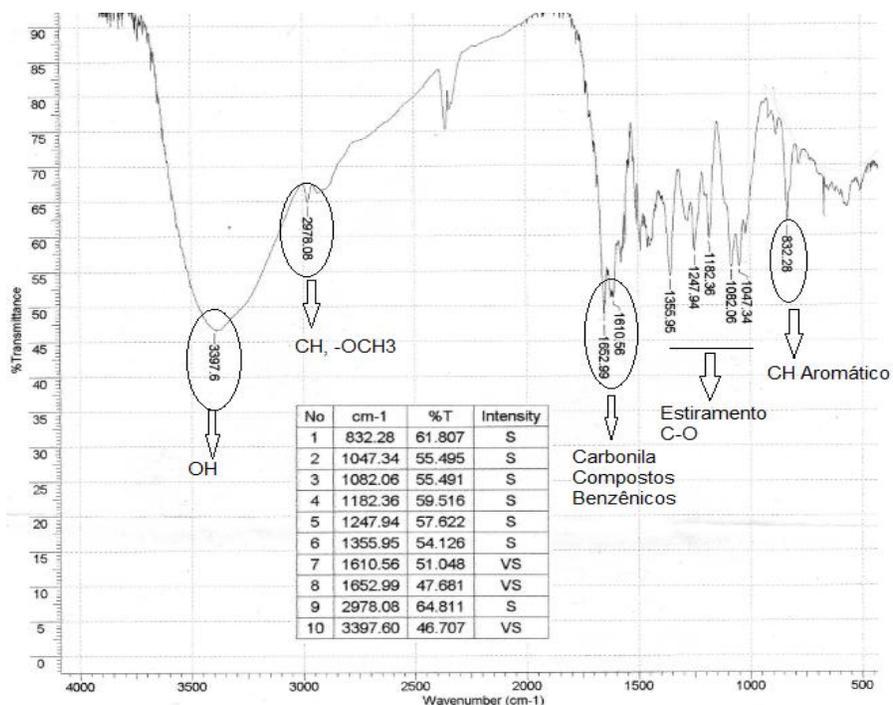


FIGURA 27 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA I4

O composto I4 também apresentou picos de absorção no UV cujos resultados estão compilados na Tabela 16. De acordo com os resultados obtidos podemos supor que o composto I4 também seja um flavonoide. Foi então realizado o tratamento com os reagentes diagnósticos para flavonoides de Mabry e colaboradores (1970).

TABELA 16 - DADOS DO ESPECTRO EM ULTRAVIOLETA DO COMPOSTO I4

COMPOSTO	DADOS ESPECTRO UV, Max(nm)					
	METOH	NaOH	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> +HCl	NaOAc	NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
I4	272	279	279	280	279	273
	335	331	303	303	298	340
		399	348	346	384	
			382	257sh		
			254sh	379		

O espectro no UV do composto I4 em metanol apresentou picos de absorção nos valores de 272 e 335 nm. A banda I apresentou absorção característica do grupo das flavonas. Na presença de NaOH, a banda I sofreu um efeito batocrômico sem decréscimo de intensidade, de 335 para 399, caracterizando presença de grupo hidroxila na posição 4' (Gráfico 5).

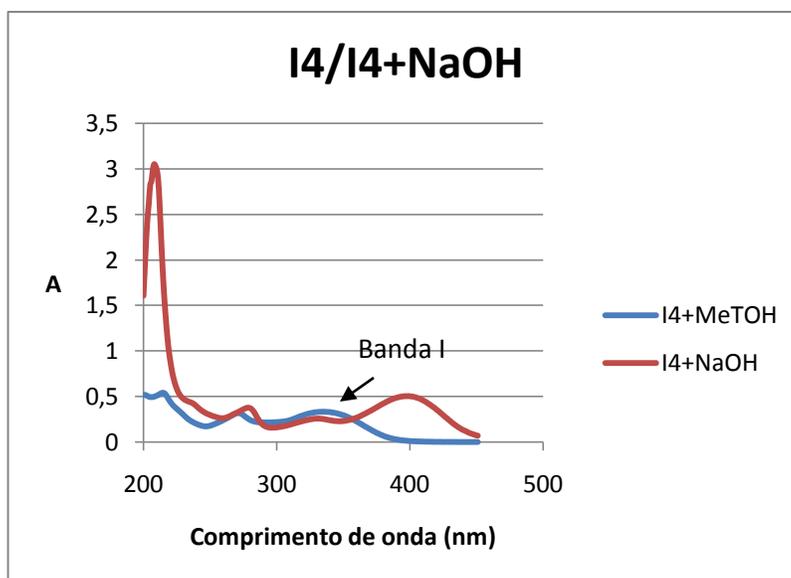


GRÁFICO 05 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOH.

O efeito batocrômico na banda II depois da adição de NaOAc, de 272 para 279, ou seja, 7nm, evidenciou a presença de grupos hidroxila livres na posição 7 (Gráfico 6)

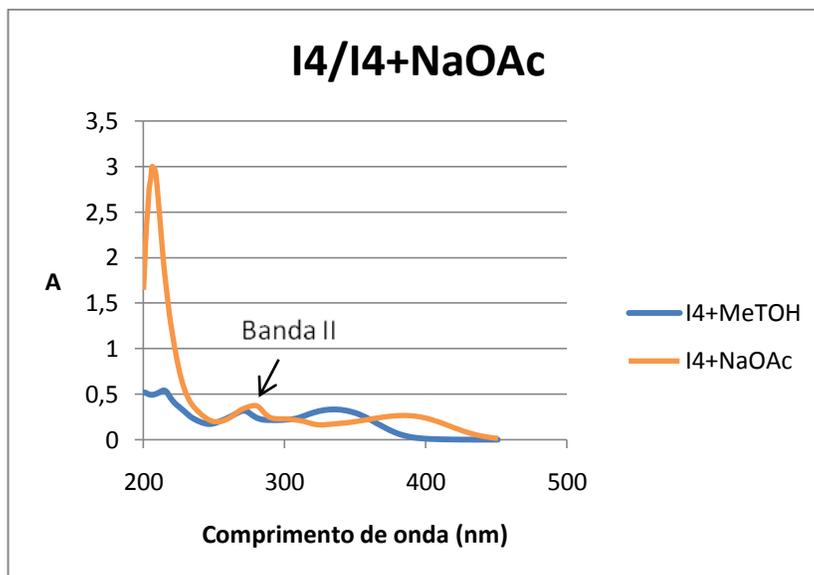


GRÁFICO 06 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOAc.

A adição de  $H_3BO_3$  à solução do composto I4+NaOAc não provocou deslocamento em nenhuma das bandas (I e II) no espectro comparado ao espectro em metanol, o que também sugeriu ausência de grupos orto-diidroxila, como revela o gráfico 7.

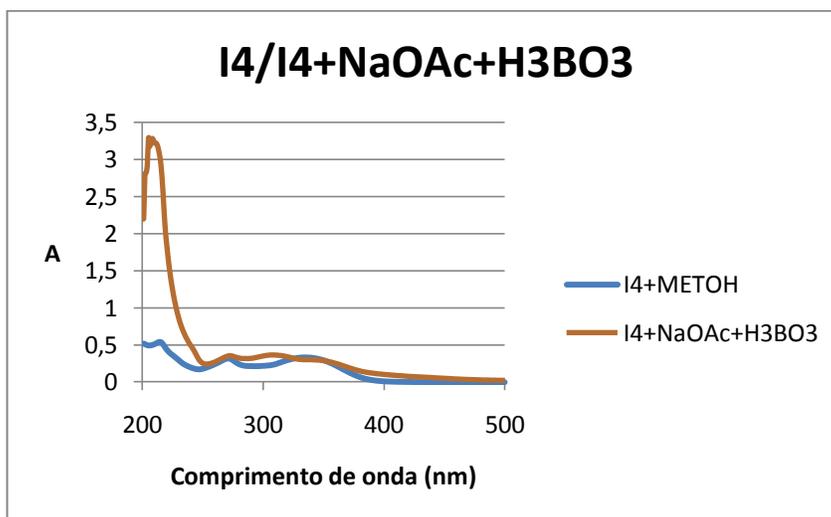


GRÁFICO 07 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+NaOAc.

O espectro do composto I4 adicionado de  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  também apresentou quatro picos de absorção, bandas Ia, Ib, IIa, IIb, todas com efeito batocrômico relativo aos picos de absorção em metanol. Assim, esta amostra tem características de uma 5-hidróxiflavona (Gráfico 8).

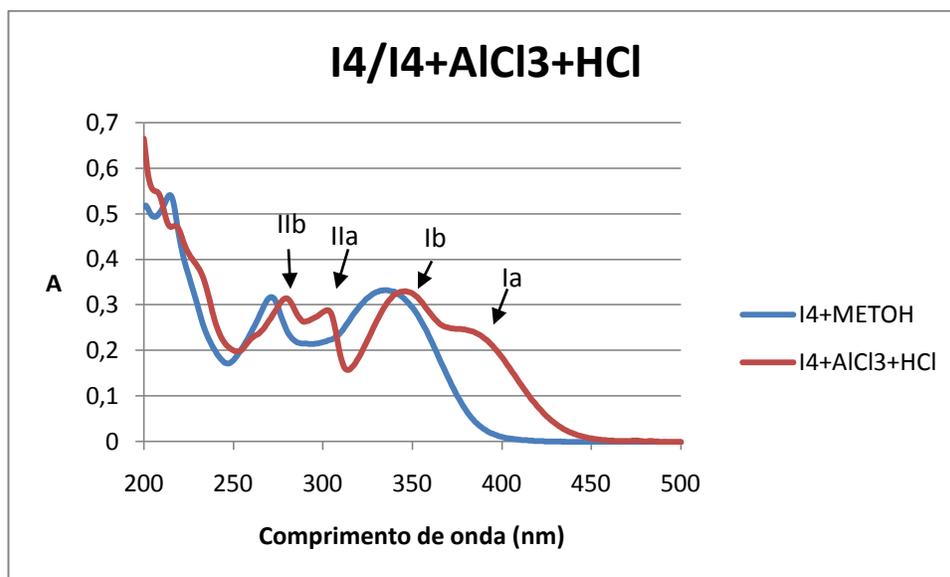


GRÁFICO 08 – ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO I4 E I4+ $\text{AlCl}_3$ +HCl..

O deslocamento batocrômico da banda I (em metanol) para a banda Ia (em  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ ) do composto I4 foi de 44nm (de 335 para 379), entre 35-55nm, o esperado para 5-hidróxiflavonas.

Os resultados apresentados pelo UV pelo tratamento com os reagentes diagnósticos também sugerem que I4 também seja um flavona 4',5,7 tri-hidroxilada.

Embora tenha sido realizada a CCD dos compostos AEF-1 e I4 resultando em compostos diferentes, os espectros de UV dos dois compostos são muito parecidos. Para assegurar que tratava-se de dois compostos diferentes, foi realizada uma análise dos isolados AEF-1 e I4 em CLAE. Ambos foram diluídos em metanol em concentrações iguais, injetados separadamente e depois co-injetados, no mesmo dia com o mesmo operador. Os resultados estão representados nas Figuras 28, 29 e 30. Foi utilizado para ambos os experimentos coluna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa e 5 $\mu\text{m}$ . A fase

móvel foi composta por uma fase ácida ( $\text{H}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N) – solvente A - e acetonitrila – solvente B. A análise foi iniciada com 100% fase ácida, passou para 47% aos 30 min, dos 31 aos 35min estabeleceu em 20% e aos 36 min voltou a 100%. A velocidade de eluição foi de 1ml/min.

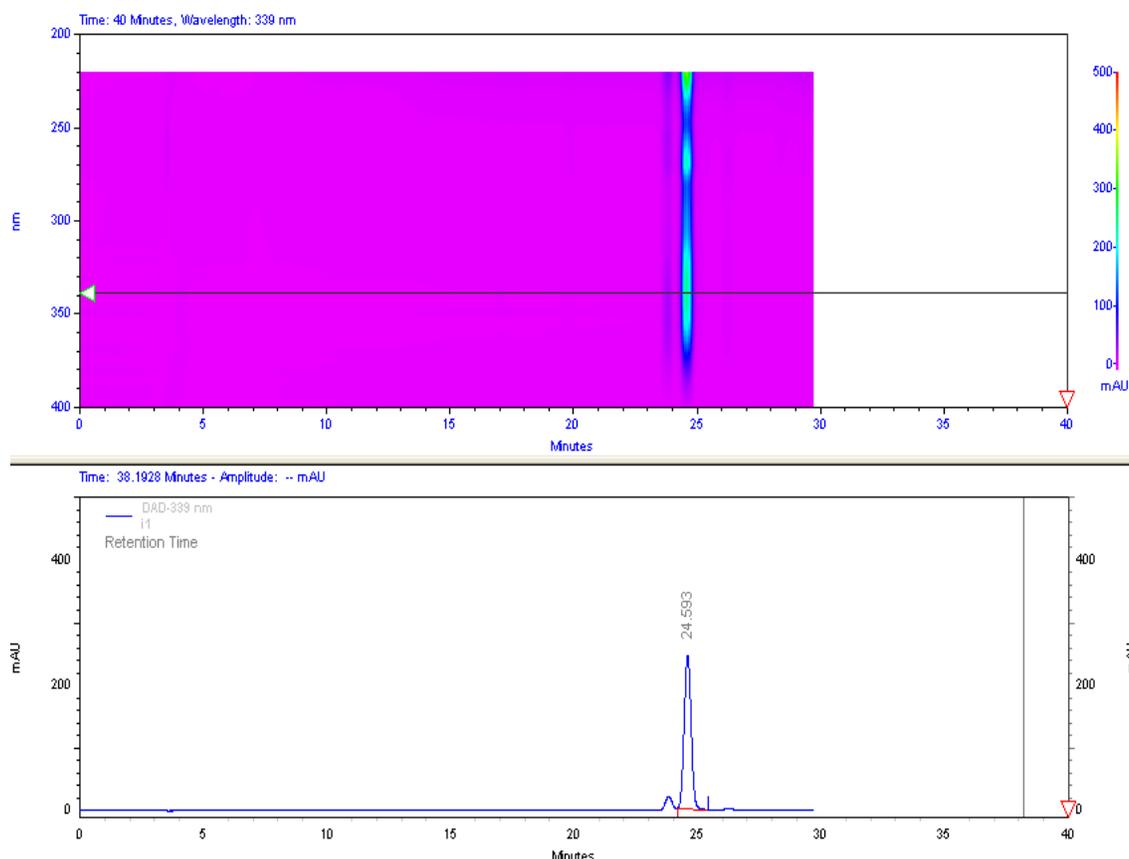


FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO AEF-I1 EM METANOL.

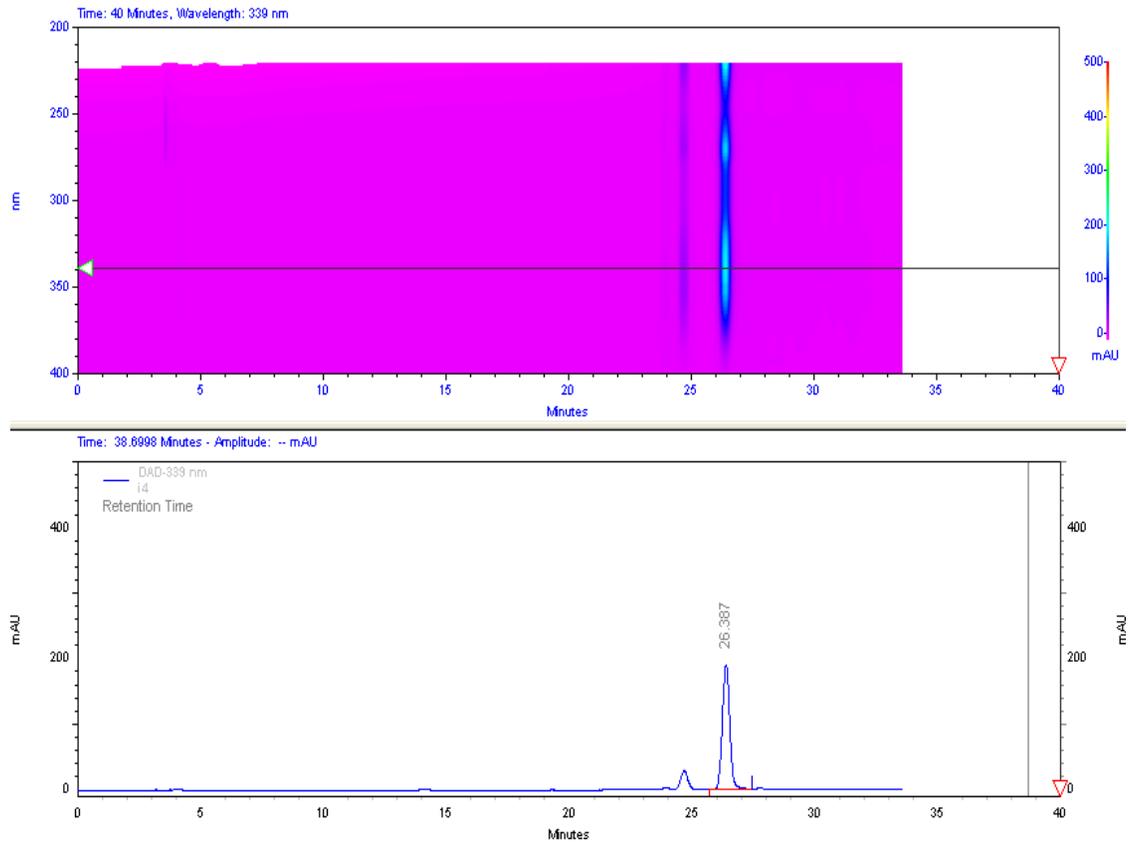


FIGURA 29 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO I4 EM METANOL.

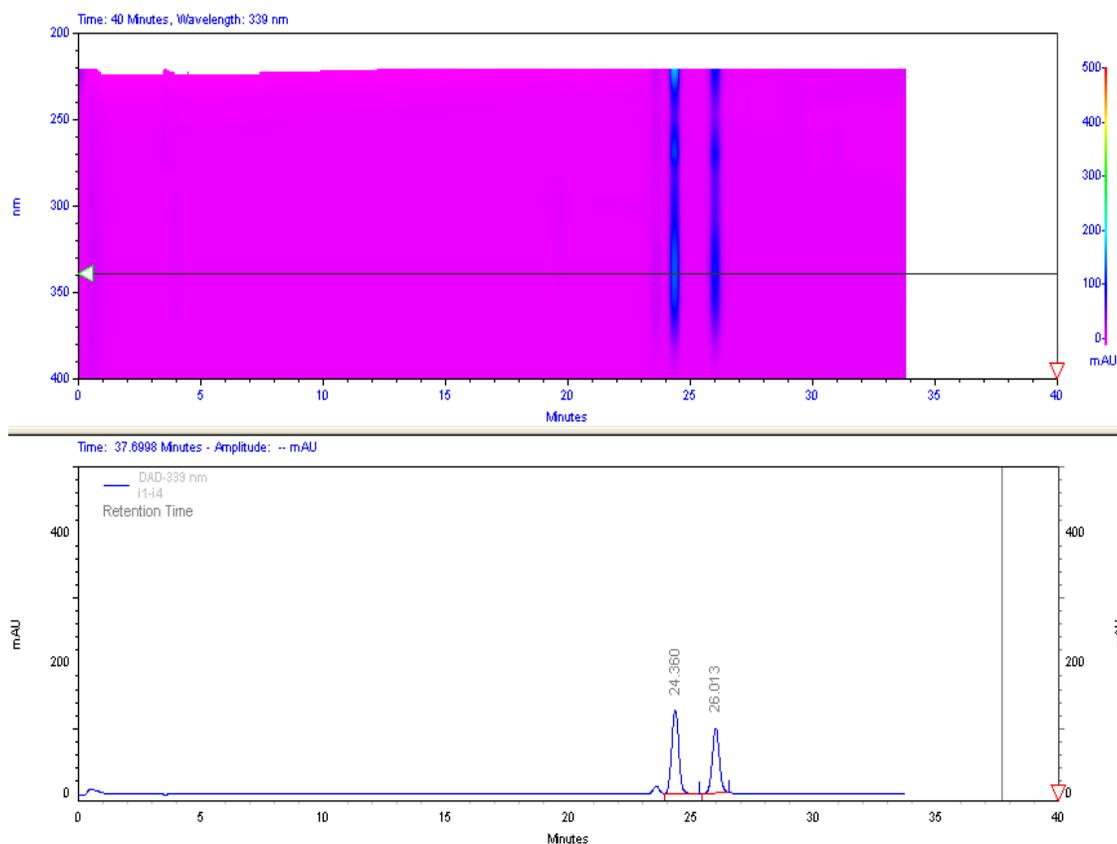


FIGURA 30 – CROMATOGRAMA DO ISOLADO AEF-11 CO-INJETADO COM ISOLADO I4 EM METANOL.

O composto AEF-1 (ou Vitexina) possui um tempo de retenção diferente do composto I4, caracterizando que realmente são dois compostos diferentes. Entretanto, são muito parecidos químicamente e espectroscopicamente.

O composto I4 foi submetido à análise em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , o solvente utilizado foi DMSO à 200MHz.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais para 21 carbonos, 15 carbonos característicos da estrutura básica dos flavonoides na região entre 90 e 180ppm e mais seis carbonos na faixa de 60 a 80ppm, região característica de açúcar, também neste caso, uma hexose (Figura 31).

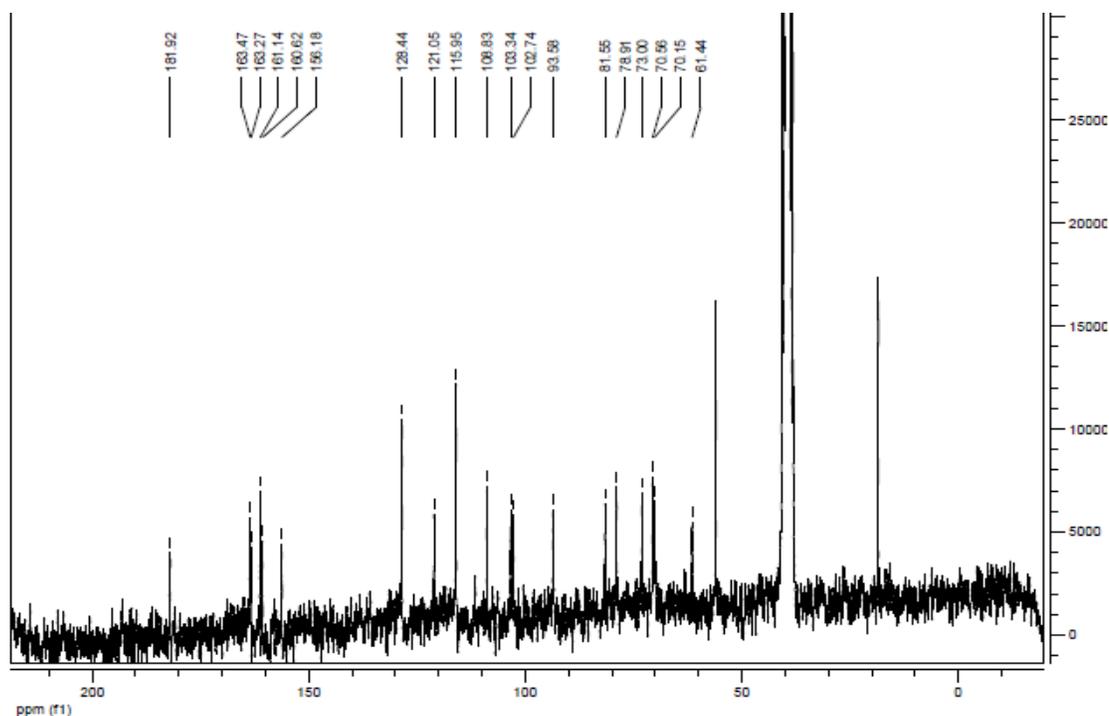


FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA 14

O espectro de  $^1\text{H}$  apresentou deslocamentos químicos na região de H ligado a C  $\text{sp}^2$ . Neste caso podemos observar os singletos em  $\delta$ 6,8 e 6,52 com integração para 1H cada. O singlete em  $\delta$ 13,17 mais desprotegido integrou para 1H permitindo concluir tratar-se de um H de hidroxila em ligação de hidrogênio com o grupo cetona da posição 4.

Dois dubletos centrados em  $\delta$ 8,02 e  $\delta$ 6,88 integrando para dois H cada, com  $J=8,6\text{Hz}$ , sendo característico dos hidrogênios 2'/6' e 3'/5' de um anel aromático dissubstituído em *para*. O dubleto centrado em  $\delta$ 4,68 com  $J=9,5\text{ Hz}$  integra para 1H e acopla com o C em 78 ppm. Deslocamentos nesta faixa são característicos de H de açúcar, o  $J$  de 9,5Hz corresponde à constante de acoplamento de H em posição axial. Dos H de açúcar este é o mais desprotegido, concluímos então que o sinal em  $\delta$ 4,68 é o H anomérico do açúcar (Figura 32).

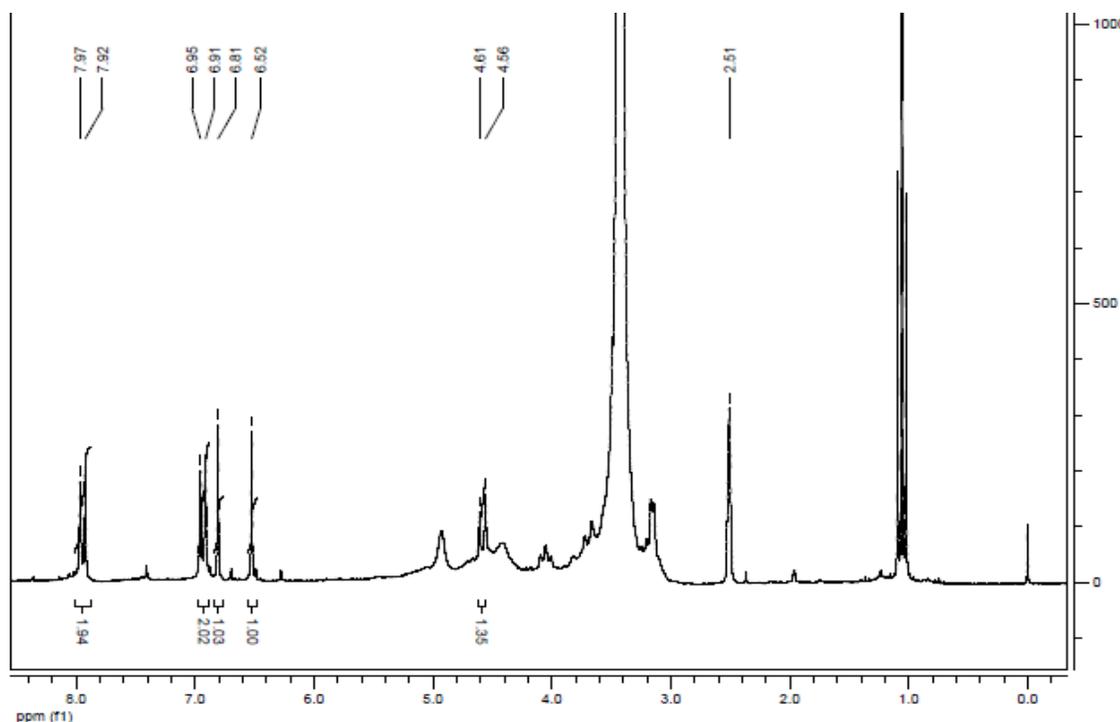


FIGURA 32 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA I4, COM INTEGRAÇÃO

Pela análise dos espectros de IV, UV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  do composto I4 e os dados de correlação do composto AEF-1, concluímos que o composto I4 é o isômero de posição do Vitexina, o Isovitecina (Figura 33).

A diferenciação entre o Vitexina e o Isovitecina foi possível através do RMN 2D do Vitexina. O hidrogênio em  $\delta 6,52$  do Isovitecina é característico de posição 8, permitindo concluir que o glicosídeo não se encontra nesta posição.

Enquanto no Vitexina, o hidrogênio  $\delta 6,27$  está correlacionado aos carbonos  $\delta 105$  e  $\delta 160$ , ou seja, na posição 6, no Isovitecina este dado não existe, evidenciando a presença de ligação ao glicosídeo nesta posição. Os dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto I4 e dados em literatura estão compilados na Tabela 17.

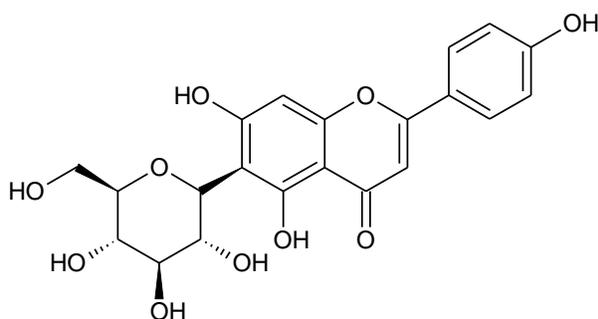


FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ISOVITEXINA

FONTE: PENG *et al.* (2008).TABELA 17 – DESLOCAMNETOS QUÍMICOS (ppm) DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO I4 E DADOS DE LITERATURA.

Posição	$\text{H}^1$ Experimental DMSO	$\text{H}^1$ PENG <i>et al.</i> , (2008)	$\text{C}^{13}$ Experimental DMSO	$\text{C}^{13}$ PENG <i>et al.</i> , (2008)
2			163,5	163,54
3	6,81 (s)	6,78 (s)	102,7	102,81
4			182,0	181,98
5	13,56 (s)	13,55 (s)	160,6	156,24
6			108,8	108,89
7			163,3	163,26
8	6,52 (s)	6,51 (s)	93,5	93,64
9			156,2	161,19
10			103,3	103,44
1'			121,0	121,12
2'6'	7,94 <i>d</i> (8,8Hz)	7,91 <i>d</i> (8,8Hz)	128,4	128,49
3'5'	6,94 <i>d</i> (8,8Hz)	6,91 <i>d</i> (8,8Hz)	116,0	116,0
4'			161,1	160,68
1''	4,59 <i>d</i> (9,8Hz)	4,58 <i>d</i> (9,8Hz)	78,9	78,95
2''			70,5	73,56
3''			72,9	71,23
4''			70,1	70,62
5''			81,5	81,59
6''			61,4	61,49

Nota: s=singleteo, *d*=dubleto,

A atividade antioxidante da isovitexina foi previamente relatada, este composto mostrou capacidade de proteger células de danos causados por espécies reativas de oxigênio (LIN *et al.*, 2002) e pelo método do tiocianato férrico demonstrou capacidade antioxidante comparada ao do  $\alpha$ -tocoferol (MASUOKA *et al.*, 2003).

A administração de Isoviteína em ratos normais alimentados com glucose apresentou acentuada atividade hipoglicemiante. Os autores constataram que o mecanismo de ação deste composto consiste no estímulo de secreção de insulina (FOLADOR *et al.*, 2010).

5.9 LETALIDADE FRENTE À *Artemia salina*TABELA 18 – RESULTADOS DE TOXICIDADE CASCA *Jatropha multifida* L.

TOXICIDADE	CASCA (Lc50 µg/ml)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
EXTRATO BRUTO	125,89	(83,89-190,06)
FRAÇÃO HEXANO	464,16	(295,83-728,28)
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	57,59	(33,17-99,97)
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	>1000	-
FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA	>1000	-
SULFATO DE QUINIDINA	50,1	(53,8 – 70,2)

TABELA 19 – RESULTADOS DE TOXICIDADE FOLHA *Jatropha multifida* L.

TOXICIDADE	FOLHA (Lc50 µg/ml)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
EXTRATO BRUTO	>1000	-
FRAÇÃO HEXANO	735,64	(356,53-1517,9)
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	252,96	(171,55-372,99)
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	>1000	-
FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA	>1000	-
VITEXINA	>1000	-
ISOVITEXINA	>1000	-

Como controle positivo foi utilizado o Sulfato de Quinidina o qual apresentou Lc50 50,1 com intervalo de confiança de 95% (53,8-70,2). O resultado positivo para o Extrato Bruto da casca, Frações Hexano e Clorofórmio da casca e das folhas é esperado pois foi relatado em literatura casos de intoxicação pelos frutos da *Jatropha multifida* L. (LEVIN, *et al.*, 2000). Este resultado confirma estes dados (Tabelas 18 e 19). O resultado positivo do extrato bruto das cascas e a maior toxicidade das suas frações (Tabela 18) indicam uma possível maior bioatividade dos extratos das cascas

se comparado com as folhas. Já existem patentes sobre a utilização do óleo das sementes de *Jatropha multifida* L. purificado em preparações cosméticas para a pele e cabelos devido á processos de separação de glicoproteínas tóxicas (KAZUMARO *et al.*,1997).

Os compostos isolados, Vitexina e Isovitexina não apresentaram toxicidade neste ensaio (Quadro 19).

## 5.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Foram testados para este ensaio os Extratos Brutos e frações das cascas e das folhas. As Figuras 34 e 35 mostram o resultado negativo para todas as amostras.

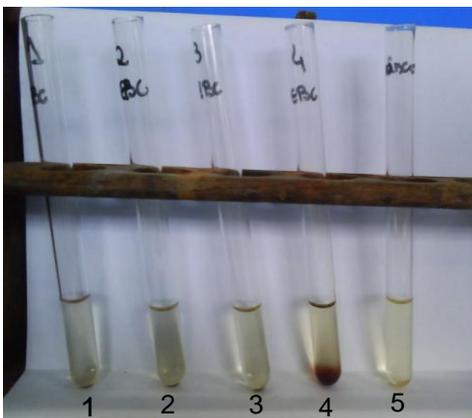


FIGURA 34 – FOTO ILUSTRATIVA DO RESULTADO NEGATIVO PARA HEMÓLISE

FONTE: A AUTORA, 2010.

NOTA: Tubo 1-4: Sangue submetido ao extrato bruto da casca de *Jatropha multifida* L. em concentrações crescentes. Tubo 5: Padrão Negativo

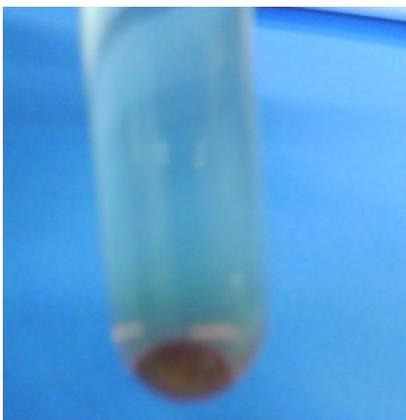


FIGURA 35 – FOTO ILUSTRATIVA DO DEPÓSITO DE ERITRÓCITOS NO FUNDO DO TUBO. RESULTADO NEGATIVO

FONTE: A AUTORA, 2010.

O resultado de hemólise negativo é interessante pois justifica mais pesquisas para o uso dos extratos, frações ou produtos isolados desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

#### 5.10.1 Atividade Hemolítica em Placas de Ágar-Sangue

Foi realizado o ensaio de atividade hemolítica com placas de Ágar-sangue para os extratos brutos e frações das cascas e folhas de *Jatropha multifida* L. Todos apresentaram resultado negativo, sem presença de halo de hemólise como mostra a Figura 36. Nesta figura está representada a foto da placa de Ágar-sangue, na qual foram colocados discos impregnados com a fração hidroalcoólica (à esquerda) e a fração acetato de etila (à direita) das cascas de *Jatropha multifida* L. O mesmo resultado foi observado em todas as amostras testadas.



FIGURA 36 – FOTO DA PLACA DE ÁGAR-SANGUE SEM HALO DE HEMÓLISE: RESULTADO NEGATIVO.

FONTE: A AUTORA, 2010.

NOTA: HA: Disco impregnado com fração hidroalcoólica das cascas de *Jatropha multifida* L. AcET: Disco impregnado com fração acetato de etila das cascas de *Jatropha multifida* L.

## 5.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.11.1 Ensaio pelo método de redução do complexo do fosfomolibdênio

Neste ensaio foram testados os extratos brutos e frações das folhas e cascas, os flavonoides vitexina e isovitexina isolados das folhas de *Jatropha multifida* L.

TABELA 20 – RESULTADOS DO ENSAIO PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOXFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VIT. C (%)	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO Á RUTINA (%)
EXTRATO BRUTO CASCA	19,2	98,21
FRAÇÃO HEXANO CASCA	6,39	40,13
F. CLOROFÓRMIO CASCA	13,61	85,53
F. ACETATO ETILA CASCA	13,68	86,18
F.HIDROALCOÓLICA CASCA	3,18	19,74
EXTRATO BRUTO FOLHA	11,94	61,31
F. HEXANO FOLHA	6,91	43,42
F. CLOROFÓRMIO FOLHA	16,44	103,29
F. ACETATO ETILA FOLHA	8,38	52,63
F.HIDROALCOÓLICA FOLHA	5,83	36,84
VITEXINA	1,69	5,45
ISOVITEXINA	2,95	9,55

No ensaio pela redução do complexo fosfomolibdênio a fração clorofórmio da folha apresentou atividade antioxidante superior a da Rutina, um flavonoide de reconhecida ação antioxidante (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). O extrato bruto, frações clorofórmio e acetato de etila da casca também apresentaram resultados satisfatórios em relação a Rutina. Traçando uma comparação entre os desempenhos antioxidantes das cascas e das folhas, podemos concluir que neste experimento as cascas apresentaram uma atividade antioxidante superior. As folhas podem ter apresentado números mais interessantes, mas isto ocorreu em apenas uma das frações o oposto das cascas que apresentaram resultados interessantes no extrato bruto e duas frações estudadas.

Os compostos vitexina e isovitexina não apresentaram efeito antioxidante frente á este ensaio.

### 5.11.2 Ensaio pelo método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O teste qualitativo foi realizado para os extratos brutos, frações, Vitexina e Isovitexina. Este ensaio permite uma visualização de possível atividade antioxidante. Os resultados das cromatografias são mostrados na Figura 37.

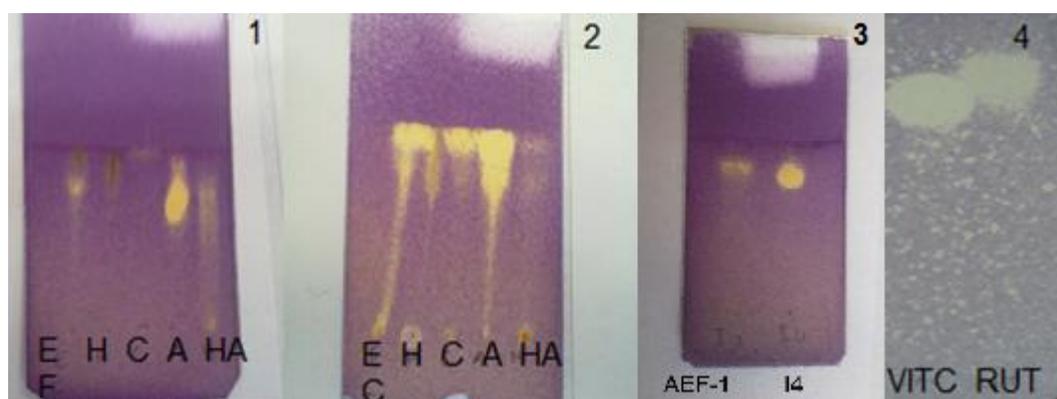


FIGURA 37 – CROMATOGRAFIA EM CCD, ENSAIO DPPH QUALITATIVO.

FONTE: A AUTORA, 2010.

NOTA: - 1- CCD dos extratos das folhas, F=folha, E=extrato bruto, H=fração hexano, C=fração clorofórmio, A= fração acetato de etila, HA=fração hidroalcoólica, 2 – CCD dos extratos das cascas, 3- CCD dos isolados, AEF-1=Vitexina, I4=Isovitexina, 4 – CCD dos padrões, VITC= Vitamina C, RUT= Rutina.

Podemos observar pela cromatoplaca 1 que a fração acetato de etila das folhas reagiu com o DPPH formando uma coloração amarela, resultado positivo para potencial antioxidante. As outras frações como o extrato bruto e fração hidroalcoólica apresentaram menor intensidade de reação.

Na cromatoplaca 2, constatamos que o extrato bruto, fração clorofórmio e fração acetato de etila das cascas reagiram com o DPPH. Podemos concluir que as cascas mostraram maior potencial antioxidante que as folhas.

Os compostos isolados, Vitexina e Isovitexina também apresentaram potencial antioxidante, confirmando dados relatados em literatura (MASUOKA *et al.*, 2003; KIM *et*

al., 2005). Os resultados para o teste quantitativo foram expressos em IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da amostra capaz de exercer 50% de atividade antioxidante. O ensaio foi realizado em triplicata, para análise dos dados utilizou-se a regressão linear sendo assim possível calcular pela fórmula da reta o valor de IC<sub>50</sub>. Os gráficos 9 a 20 apresentam as retas das médias obtidas de cada teste.

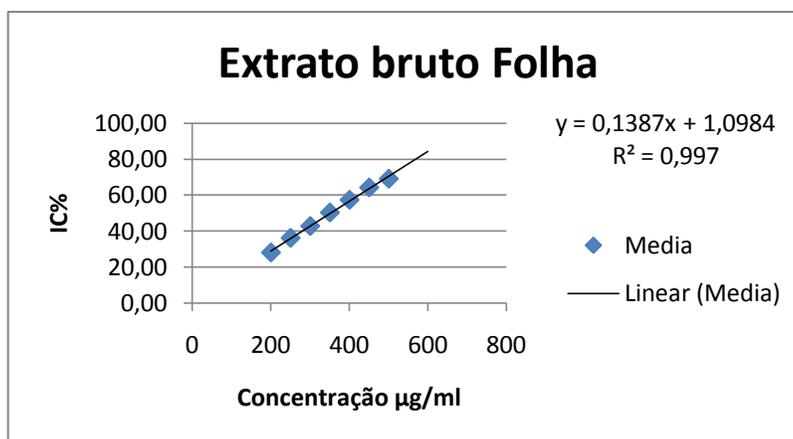


GRÁFICO 09 – RETA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS

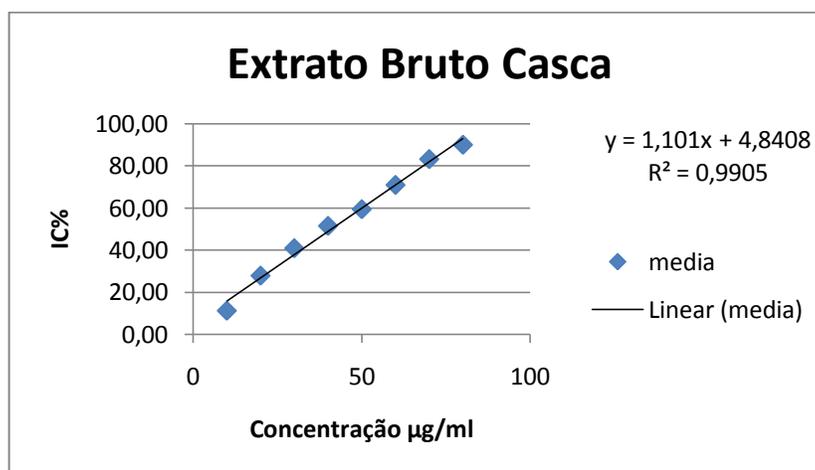


GRÁFICO 10 – RETA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS

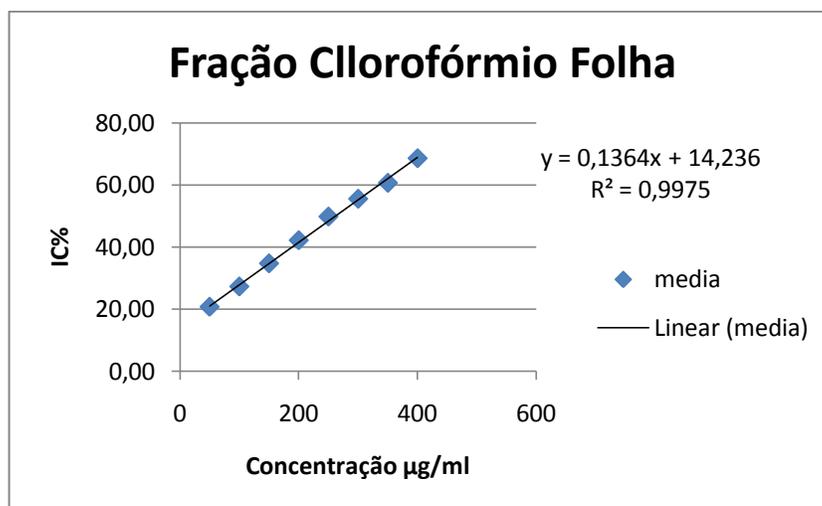


GRÁFICO 11 – RETA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS

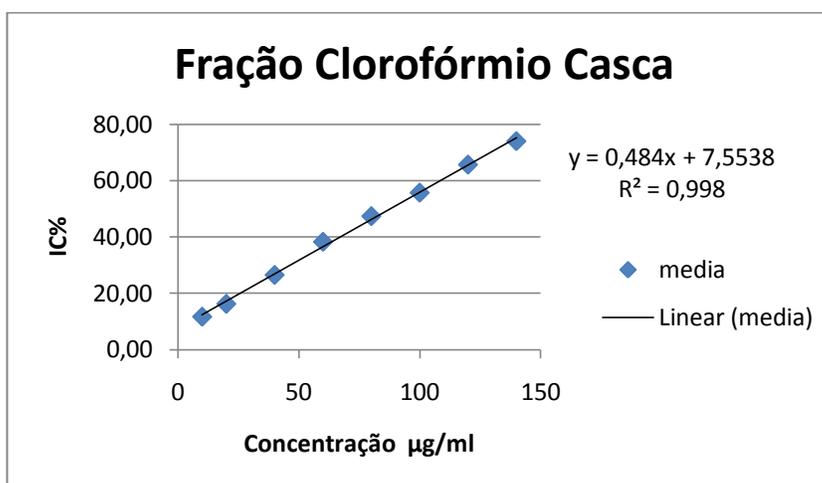


GRÁFICO 12 – RETA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS CASCAS

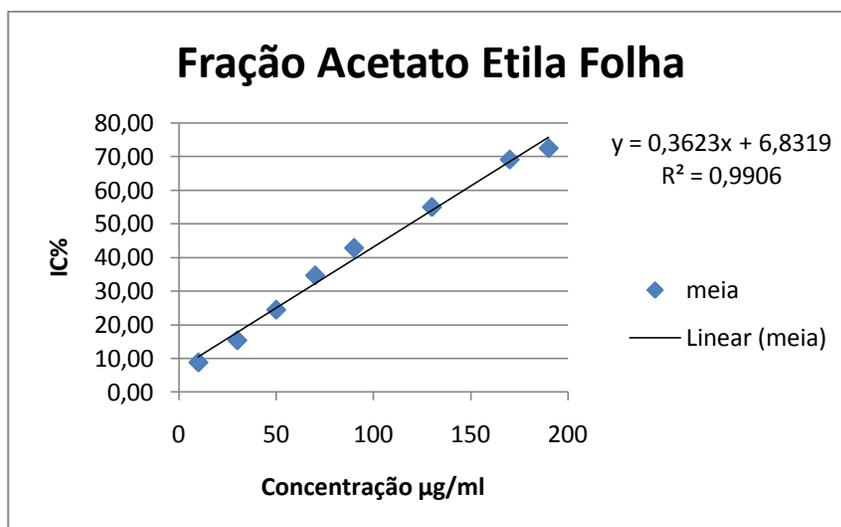


GRÁFICO 13 – RETA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS

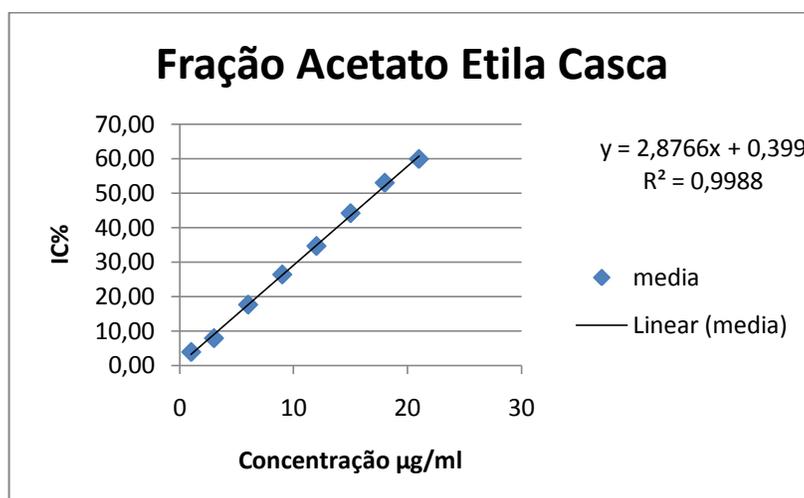


GRÁFICO 14 – RETA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS CASCAS

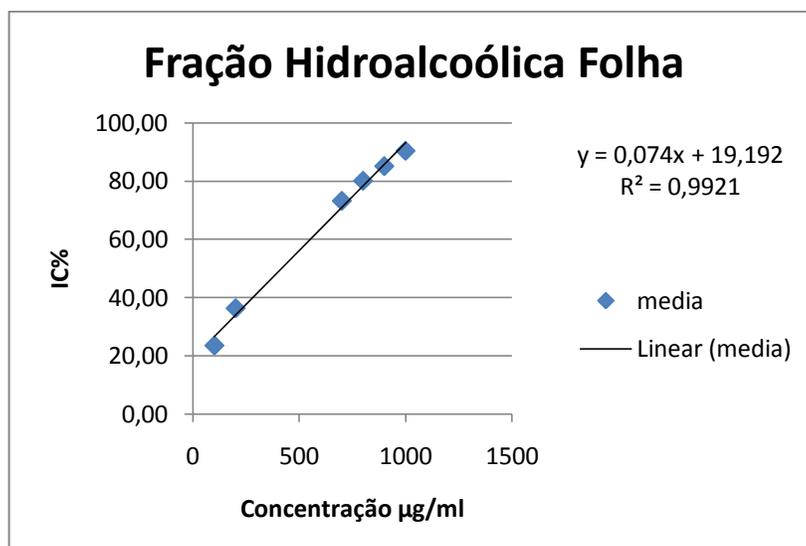


GRÁFICO 15 – RETA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS

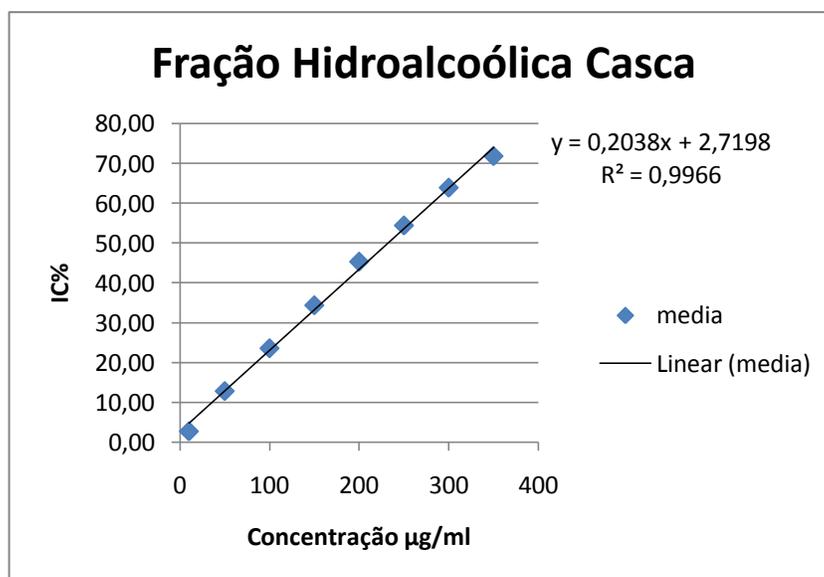


GRÁFICO 16 – RETA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS CASCAS

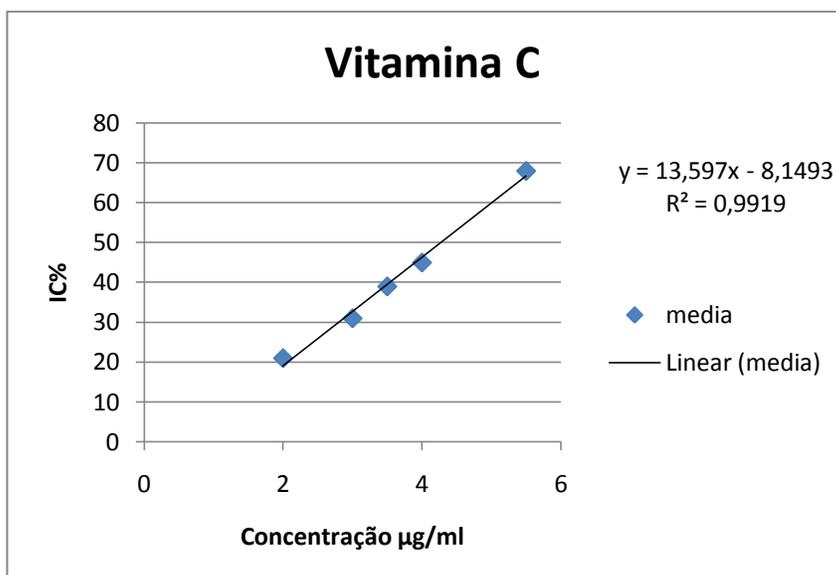


GRÁFICO 17 – RETA DA VITAMINA C

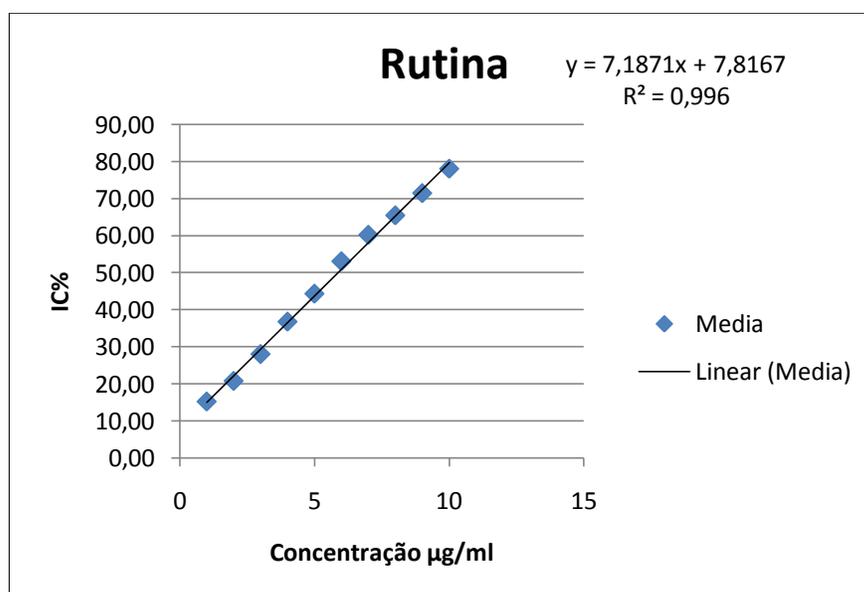


GRÁFICO 18 – RETA DA RUTINA

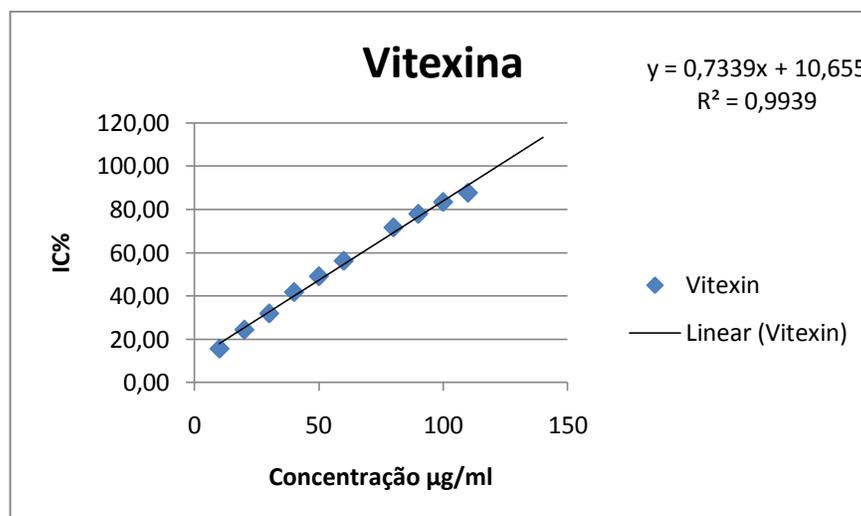


GRÁFICO 19 – RETA VITEXINA

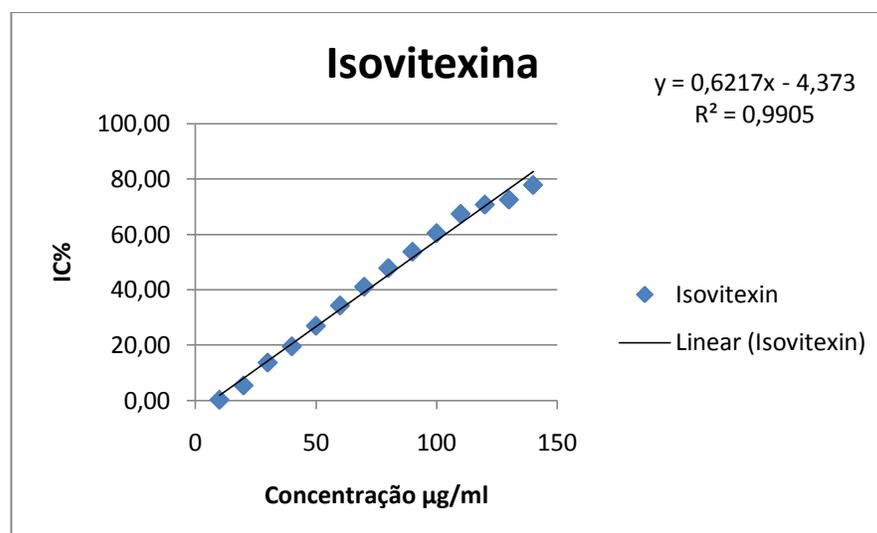


GRÁFICO 20 – RETA ISOVITEXINA

Neste ensaio foi possível constatar que a cascas apresentaram melhor atividade antioxidante do que as folhas. Os padrões utilizados foram novamente a Vitamina C e a Rutina (Gráficos 17 e 18), as quais apresentaram valores de IC<sub>50</sub> 4,3µg/ml e 5,83µg/ml respectivamente. O destaque é o valor de IC<sub>50</sub> de 17,23µg/ml da fração acetato de etila das cascas, o mais próximo dos padrões. Os compostos vitexina

e isovitexina apresentaram IC<sub>50</sub> de 54,34 e 87,27 µg/ml respectivamente. O vitexina tem maior poder antioxidante que o isovitexina.

Os resultados de IC<sub>50</sub> estão compilados na Tabela 21, os valores expressos são as médias da triplicata e o desvio padrão. Para verificar se houve diferença estatística entre as amostras aplicou-se o teste Anova e para a localização das diferenças o teste Tukey (p<0,05).

TABELA 21 – RESULTADOS DE IC<sub>50</sub> E TESTE TUKEY PARA A REDUÇÃO DO DPPH

AMOSTRA	IC <sub>50</sub> (µg) ±SD	Teste Tukey*
Vitamina C	4,30 ± 0,03	a1
Rutina	5,83 ± 0,3	a1
Fração Acetato Etila Casca	17,23 ± 0,4	a1 a2
Extrato bruto Casca	40,57 ± 4,12	a2 a3
Vitexina	54,37 ± 4,45	a3
Isovitexina	87,27 ± 3,68	a4
Fração Clorofórmio Casca	87,63 ± 1,21	a4
Fração Acetato Etila Folha	115,13 ± 6,31	a4
Fração Hidroalcoólica Casca	240,43 ± 13,7	a5
Fração Clorofórmio Folha	262,20 ± 10,01	a5
Extrato Bruto Folha	352,47 ± 14,46	a6
Fração Hidroalcoólica Folha	399,80 ± 27,72	a7

\*Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

De acordo com a análise estatística dos dados, constatamos que a fração acetato de etila das cascas apresentou atividade antioxidante semelhante aos padrões, Vitamina C e Rutina, e também ao extrato bruto da casca, pois não houve diferença estatística significativa entre estas amostras. Porém, como o extrato bruto da casca pertence a um segundo grupo na análise estatística (a2), podemos concluir que a atividade antioxidante da fração acetato de etila é semelhante a dos padrões e maior

que do extrato bruto. O valor do IC<sub>50</sub> foi de 17,23 µg/ml ± 0,4, e foi considerado diferente estatisticamente das demais amostras.

A atividade antioxidante do Vitexina é maior e estatisticamente diferente do seu isômero Isovitexina.

O Isovitexina, fração clorofórmio da casca e fração acetato etila da folha não apresentaram diferença estatística significativa, o que podemos concluir que possuem atividade antioxidante equivalente.

A fração clorofórmio, extrato bruto e hidroalcoólica das folhas são as menos ativas em atividade antioxidante. As frações hexano folha e casca não apresentaram atividade antioxidante neste ensaio. Estes resultados confirmam os dados do ensaio qualitativo.

## 5.12 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 5.12.1 Avaliação da Germinação

Para avaliar a influência dos extratos e frações das cascas e folhas de *Jatropha multifida* L. na germinação utilizou-se o cálculo do índice de Velocidade de Germinação (IVG). Os resultados foram submetidos ao teste estatístico Scott-Knott e estão compilados na Tabela 22.

TABELA 22 – TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÕES				CONTROLE	CONTROLE
	0,1mg	0,2mg	0,4mg	0,8mg	ÁGUA	SOLVENTE
EXTRATO BRUTO	4,00 a2	4,50 a3	2,44 a1	2,24 a1	4,75 a3	4,75 a3
FRAÇÃO HEXANO	2,75 a1	3,00 a1	3,28 a1	3,13 a1	3,50 a1	3,63 a1

	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	4,90 a1	4,90 a1	4,60 a1	4,80 a1	5,00 a1	4,90 a1
	FRAÇÃO ACETATO ETILA	4,85 a2	3,38 a1	2,88 a1	3,63 a1	4,88 a2	4,25 a2
	FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA	4,63 a1	4,88 a1	4,45 a1	4,70 a1	4,28 a1	4,88 a1
CASCA	EXTRATO BRUTO	2,50 a1	2,50 a1	3,20 a2	3,00 a2	4,75 a3	4,75 a3
	FRAÇÃO HEXANO	3,38 a1	3,20 a1	3,75 a1	3,00 a1	3,50 a1	3,63 a1
	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	4,50 a1	4,90 a1	5,00 a1	4,80 a1	5,00 a1	4,90 a1
	FRAÇÃO ACETATO ETILA	3,38 a1	3,88 a2	3,13 a1	3,00 a1	4,88 a2	4,25 a2
	FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA	4,63 a1	4,63 a1	4,08 a1	4,30 a1	4,28 a1	4,88 a1

\*Amostras seguidas de numeração diferente diferem estatisticamente.

Podemos observar pelos resultados de IVG e pela análise estatística, que houve influência na velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* por parte dos extratos brutos e fração acetato de etila das folhas e cascas. Todos os resultados foram de diminuição na velocidade de germinação em relação aos padrões.

O extrato bruto das folhas exerceu atividade nas concentrações 0,1, 0,4 e 0,8mg, sendo que as concentrações mais altas inibiram a germinação com mais intensidade (até 53% de inibição). A fração acetato de etila das folhas apresentou uma relação contrária concentração/atividade. As concentrações que apresentaram influência sobre a germinação foram 0,2, 0,4 e 0,8mg. Com 0,4mg observamos 41% de inibição. O aumento da concentração não acarretou em aumento da inibição neste caso.

O extrato bruto da casca diminuiu a velocidade de germinação em todas as concentrações testadas, as concentrações 0,1 e 0,2mg mostraram maior inibição (até 47%) que 0,4 e 0,8mg (até 32%). Com a fração acetato etila das cascas houve maior diminuição da velocidade de germinação quando foi utilizada maior concentração. Esta fração exerceu influência neste teste nas concentrações 0,1, 0,4 e 0,8mg e a inibição mensurada foi de 30 a 35%.

As alterações no padrão de germinação podem resultar de diversos efeitos causados em nível primário. Entre elas Ferreira e Aquila (2000) destacam alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração devido ao seqüestro de oxigênio, na

conformação de enzimas e receptores ou ainda pela combinação destes fatores (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006).

### 5.12.2 Avaliação do Crescimento

A análise do crescimento foi realizada com auxílio do método estatístico Scott-Knott, no qual foram calculadas as médias de crescimento da radícula e do hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa* submetida aos extratos e frações das cascas e folhas de *J. multifida*. Para o controle negativo foi feito um branco utilizando-se somente água e um controle para o solvente utilizado. Os dados estão expressos nas Tabelas 23 e 24.

TABELA 23 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Jatropha multifida* L..

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA (média mm)					HIPOCÓTILO (média mm)				
		EBF	FHF	FCF	FAEF	FHAF	EBF	FHF	FCF	FAEF	FHAF
0,1mg	1	34.2	34.5	36.4	36.3	35.3	29.6	33.5	34.0	32.5	24.0
		a	a	b	a	a	a	a	b	a	b
	2	36.0	35.8	35.5	37.0	42.5	31.8	37.5	34.3	35.0	22.0
		a	a	b	a	a	B	a	b	a	a
	3	28,4	33.5	33.6	36.0	35.7	32.0	32.5	34.0	35.5	22.3
		a	a	b	a	a	b	a	b	a	a
	4	30.0	34.7	31.0	36.0	38.0	29.2	38.3	34.6	34.3	18.0
		a	a	a	a	a	a	a	b	a	a
0,2mg	1	32.8	37.5	37.0	39.3	29.3	<b>25.4</b>	34.8	36.3	34.7	<b>21.0</b>
		a	a	b	b	a	<b>a</b>	a	b	a	<b>a</b>
	2	34.0	38.5	36.5	33.3	36.5	<b>23.8</b>	30.4	37.0	31.7	<b>16.3</b>
		a	a	b	b	a	<b>a</b>	a	b	a	<b>a</b>
	3	35.8	34.6	35.5	39.0	37.0	<b>28.0</b>	36.5	36.3	35.5	<b>21.0</b>
		a	a	b	b	a	<b>a</b>	a	b	a	<b>a</b>
	4	32.8	35.2	36.8	41.5	39.0	<b>24.8</b>	36.3	33.6	35.4	<b>20.6</b>
		a	a	b	b	a	<b>a</b>	a	b	a	<b>a</b>
0,4mg	1	33.0	31.3	32.2	36.0	29.0	<b>28.6</b>	35.0	30.8	33.6	19.0
		a	a	a	a	a	<b>a</b>	a	a	a	a
	2	29.6	39.0	32.8	35.8	31.8	<b>28.5</b>	35.0	33.8	37.0	23.8
		a	a	a	a	a	<b>a</b>	a	b	a	b
	3	26.5	37.3	35.0	35.4	37.5	<b>26.0</b>	34.8	31.4	34.4	21.5
		a	a	b	a	a	<b>a</b>	a	a	a	a
	4	32.0	35.7	34.2	41.0	39.8	<b>29.4</b>	34.0	30.8	34.8	21.6
		a	a	b	b	a	<b>a</b>	a	a	a	a
0,8mg	1	28.5	36.5	34.8	36.2	34.6	25.5	31.6	28.8	35.6	26.4
		a	a	b	a	a	a	a	a	a	b
	2	28.6	31.4	33.8	36.0	44.5	31.4	31.2	34.8	37.5	29.0

	3	a 23.6	a 32.0	a 30.4	a 34.0	a 36.8	b 31.0	a 35.3	b 31.2	b 33.3	b 26.4
	4	a 28.0	a 32.8	a 28.6	a 37.3	a 36.5	b 27.0	a 34.5	a 29.8	a 36.0	b 26.0
<b>CONTROLE</b>	1	30.5	34.0	35.0	36.3	31.0	36.0	35.3	37.6	35.0	27.7
	2	37.8	27.5	35.8	35.0	36.5	34.4	30.0	35.8	34.8	23.5
	3	33.0	31.6	36.3	37.2	34.5	31.8	34.6	35.0	37.8	25.0
	4	35.0	35.8	37.3	39.0	40.2	33.8	32.5	34.7	33.2	24.8
<b>ÁGUA</b>	1	30.2	32.5	38.8	42.8	36.8	33.0	34.3	36.5	42.5	25.3
	2	30.2	35.0	37.8	39.5	34.0	30.8	33.1	37.0	40.8	25.3
	3	26.0	34.8	38.2	44.5	35.0	32.8	35.0	36.5	41.2	23.5
	4	33.6	38.5	37.2	41.0	34.5	32.0	35.2	33.6	40.0	25.8

Nota: EBF= Extrato Bruto Folha, FHF= Fração Hexano Folha, FCF= Fração Clorofórmio Folha, FAEF= Fração Acetato Etila Folha, FHAF= Fração Hidroalcoólica Folha.

TABELA 24 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS CASCAS DE *Jatropha multifida* L.

TRATAMENTO	REPETIÇÃO	RADÍCULA (média mm)					HIPOCÓTILO (média mm)				
		EBC	FHC	FCC	FAEC	FHAC	EBC	FHC	FCC	FAEC	FHAC
<b>0,1mg</b>	1	32.3	37.0	35.8	36.0	36.2	30.2	33.2	32.4	38.0	28.0
	2	37.0	37.8	37.0	34.5	30.4	29.6	33.8	33.8	38.5	16.5
	3	31.5	36.3	36.5	29.4	36.3	22.0	35.8	36.0	39.0	22.7
	4	33.0	36.4	39.0	35.6	41.0	30.8	33.0	29.4	38.0	24.5
<b>0,2mg</b>	1	30.5	36.5	32.8	35.8	34.8	30.6	37.3	31.8	38.8	19.3
	2	31.8	40.0	31.0	37.2	32.4	32.8	33.8	29.6	35.0	18.8
	3	30.8	36.3	30.5	36.6	29.6	27.8	31.2	27.2	36.3	14.2
	4	30.7	35.5	35.0	36.8	21.8	28.8	34.4	30.0	37.4	14.5
<b>0,4mg</b>	1	34.3	36.8	32.0	37.4	43.8	32.0	32.8	33.8	32.3	20.8
	2	29.2	38.3	35.5	37.5	33.7	27.0	31.0	34.3	34.0	14.5
	3	31.8	37.4	35.4	32.8	31.3	31.4	31.8	35.4	33.0	10.6
	4	34.0	35.0	36.2	33.2	26.3	29.5	31.3	34.4	31.8	19.0
<b>0,8mg</b>	1	33.0	34.8	34.8	38.0	36.8	30.5	35.8	21.4	33.3	24.5
	2	31.6	32.8	35.8	38.8	44.3	32.0	33.3	33.3	34.4	24.7

	3	22.4	33.0	33.7	35.2	42.3	29.0	27.8	28.5	34.8	25.5
	4	31.6	36.5	36.8	36.3	47.3	29.2	35.3	37.3	27.3	29.3
<b>CONTROLE</b>	1	30.5	34.0	38.8	36.3	31.0	36.0	33.0	36.0	35.0	27.7
	2	37.8	32.7	36.4	35.0	36.5	34.4	27.3	35.6	35.3	23.5
	3	33.0	31.6	35.8	37.2	34.5	31.8	34.6	35.3	37.8	25.0
	4	35.0	35.8	37.5	39.0	37.0	33.8	31.2	37.5	33.2	24.8
			a	a	a	b	a	c	a	b	b
<b>ÁGUA</b>	1	32.5	32.5	38.8	42.8	36.8	33.0	34.3	36.5	42.5	25.3
	2	32.8	35.0	37.8	39.5	35.3	30.8	33.2	37.0	40.8	25.3
	3	26.0	34.8	38.2	44.5	34.8	32.2	35.0	36.5	41.2	24.0
	4	33.6	38.5	37.2	41.8	37.4	32.0	35.2	33.6	40.0	25.8
			a	a	a	b	a	c	a	b	c

Nota: EBC= Extrato Bruto Casca, FHC= Fração Hexano Casca, FCC= Fração Clorofórmio Casca, FAEC= Fração Acetato Etila Casca, FHAC= Fração Hidroalcoólica Casca.

Analisando os resultados obtidos do teste que utilizou extratos e frações das folhas, observamos um efeito inibitório do crescimento do hipocótilo quando submetido ao Extrato bruto nas concentrações de 0,2 e 0,4mg (inibição de 12,5 a 20,7%), e à fração hidroalcoólica a 0,2mg (inibição de 21%) nas quatro repetições realizadas. Não houve efeito detectado no crescimento da radícula.

Quanto aos resultados do teste com extratos e frações das cascas, foi constatado efeito inibitório no crescimento do hipocótilo quando submetido a fração clorofórmio na concentração de 0,2mg (17%) e a fração hidroalcoólica a 0,2mg (33%) nas quatro repetições realizadas.

Os valores encontrados são menores que os padrões, o que indica que nestas concentrações ocorreu inibição do crescimento. Geralmente os efeitos dos aleloquímicos tendem a ser mais acentuados em concentrações mais altas, entretanto, os feitos alelopáticos podem escapar deste padrão uma vez que os efeitos observados resultam de um somatório de uma série de alterações moleculares (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006).

Os dados referentes às frações Acetato Etila, tanto das cascas quanto das folhas não devem ser considerados pois houve influência do solvente. Recomenda-se a repetição do teste destas frações em trabalhos posteriores.

### **5.12.3 Índice mitótico**

Os dados dos bioensaios de divisão celular foram submetidos ao teste-t Student. Os resultados estão representados nos gráficos em porcentagem em relação ao controle, sendo que o zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e valores negativos representam inibição (MACIAS *et al.*, 2000).

Podemos observar na Figura 38 a influência dos extratos brutos e frações das cascas de *Jatropha multifida* L. no índice mitótico.

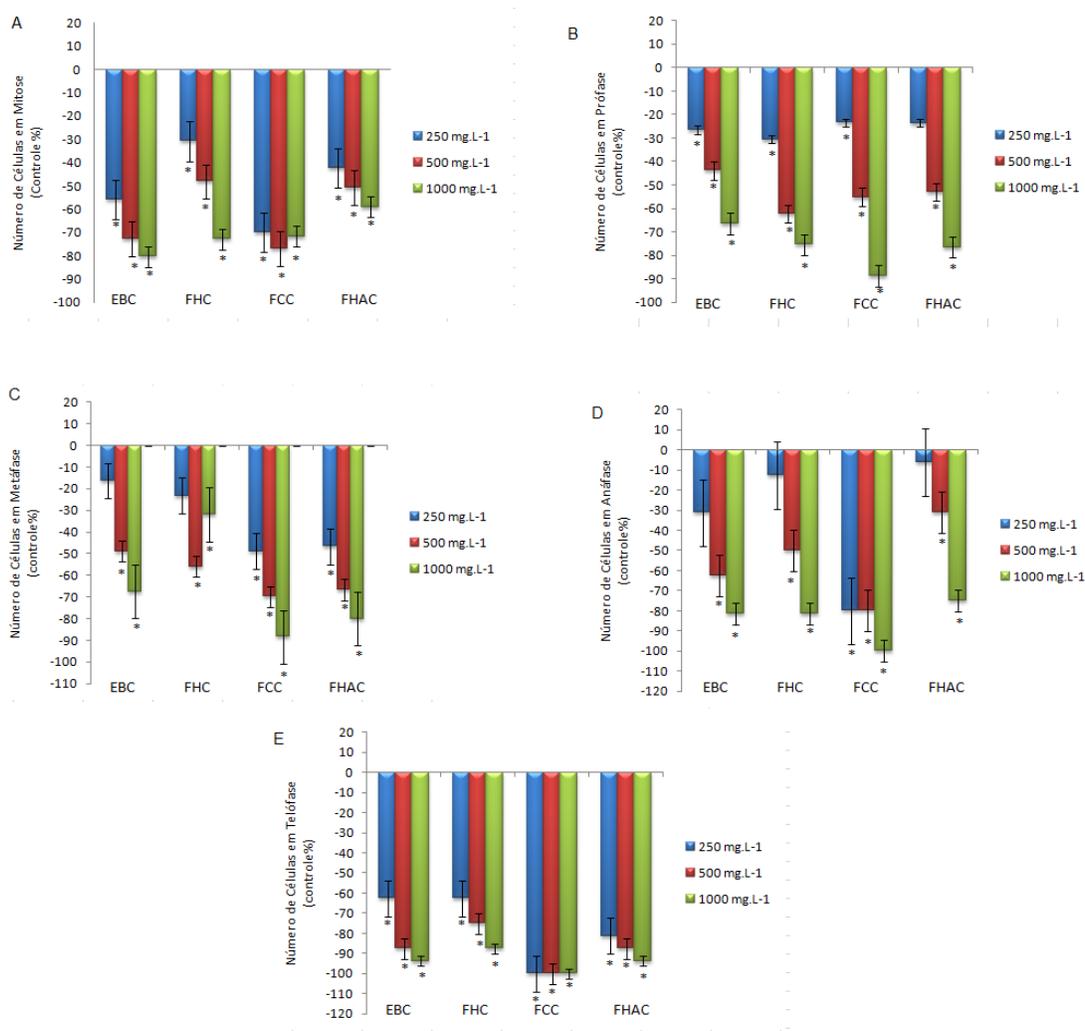


FIGURA 38 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (INFLUÊNCIA EXTRATOS CASCA).

Porcentagem de células meristemáticas de raízes das plântulas de alfaca (A – número total de células em mitose; B – prófase, C- metáfase, D- anáfase, D-telófase) desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EBC), fração hexânica (FHC), fração clorofórmio (FCC) e fração hidroalcoólica (FHAC) das cascas de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em percentual em relação ao controle. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste-t Student.

Todas as amostras, extrato bruto e frações das cascas causaram inibição significativa da divisão celular em todas suas fases (prófase, anáfase, metáfase, telófase), conseqüentemente o mesmo ocorreu para o número total de células em

mitose, em quase todas as concentrações. Embora todas as amostras tenham reduzido significativamente o índice mitótico na concentração de 500 e 1000mg.ml<sup>-1</sup>, as que tiveram maior desempenho foram o extrato bruto e a fração clorofórmio.

A fração clorofórmio inibiu 100% o número de células em telófase em todas as concentrações testadas. Esta ação pode ser atribuída ao fato de a fração clorofórmio possuir uma polaridade intermediária e, portanto, possuir a tendência de carrear substâncias como flavonoides metoxilados, lignanas, triterpenos, lactonas e cumarias (NIERO *et al.*, 2003). Flavonoides, cumarinas e terpenos são tipos de compostos que já foram identificados como aleloquímicos (ALMEIDA *et al.*, 2008). Devido á polaridade do clorofórmio é possível que estas substâncias estejam em maior quantidade nesta fração colaborando para o maior desempenho dos efeitos observados.

Não houve uniformidade entre aumento de concentração e conseqüente aumento de inibição. Novamente podemos constatar que nem sempre os efeitos dos aleloquímicos obedecem a este padrão.

A Figura 39 mostra os resultados da influência do extrato e frações das folhas de *Jatropha multifida* L. sobre o índice mitótico.

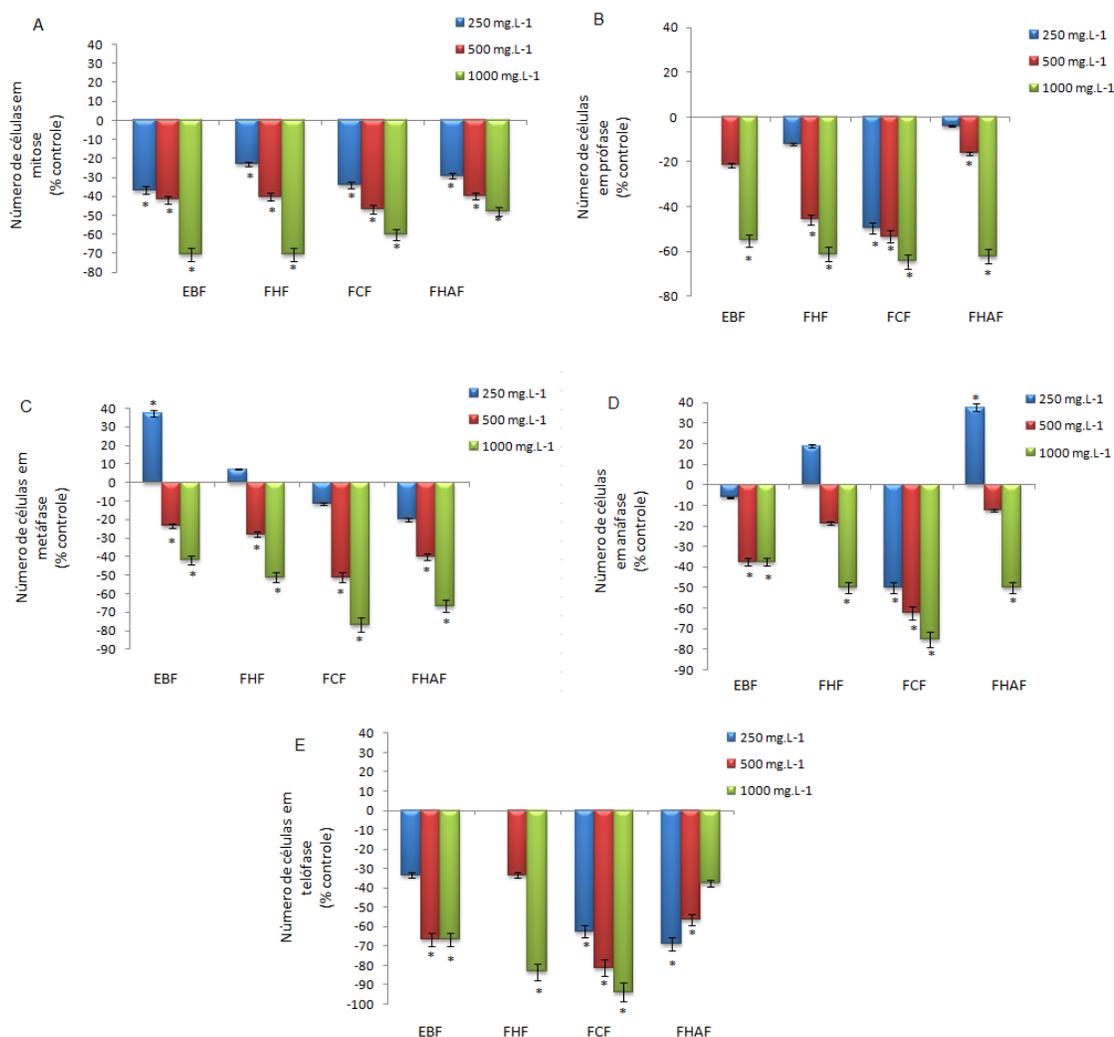


FIGURA 39 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (INFLUÊNCIA EXTRATOS FOLHA).

Porcentagem de células meristemáticas de raízes das plântulas de alface (A – número total de células em mitose; B – prófase, C- metáfase, D- anáfase, D-telófase) desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EBF), fração hexânica (FHF), fração clorofórmio (FCF) e fração hidroalcoólica (FHAF) das folhas de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em percentual em relação ao controle. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste-t Student.

Observamos pelo gráfico A, o qual expressa o número total de células em mitose, que novamente houve inibição do índice mitótico de forma significativa por parte de todas as amostras testadas nas três concentrações.

Entretanto, pela análise do gráfico da metáfase (C) e anáfase (D), constatamos que houve estímulo de células nestas fases. O extrato bruto em  $250 \text{ mg.ml}^{-1}$  estimulou em 37,21% a metáfase (C), enquanto que na concentração de  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$  houve uma inibição da mesma magnitude (41,83%).

A Fração hidroalcoólica estimulou as células em anáfase (D) em 37,5% na concentração de  $250 \text{ mg.ml}^{-1}$ , quadro que também foi revertido na concentração de  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$ , com inibição de 50% de células em anáfase.

Novamente a fração clorofórmica apresentou efeito inibitório estatisticamente significativo em todas as fases da mitose nas concentrações de  $500 \text{ mg.ml}^{-1}$  e  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

### 5.13 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram submetidos à atividade enzimática os extratos brutos, fração hexânica, clorofórmio e fração hidroalcoólica das cascas e folhas de *Jatropha multifida* L.

#### 5.13.1 Proteínas Totais

A Figura 40 apresenta os resultados para Proteínas Totais mensuradas após o tratamento com extratos brutos e frações de folhas e cascas de *Jatropha multifida* L. Os resultados estão expressos em mg de proteínas por MF.

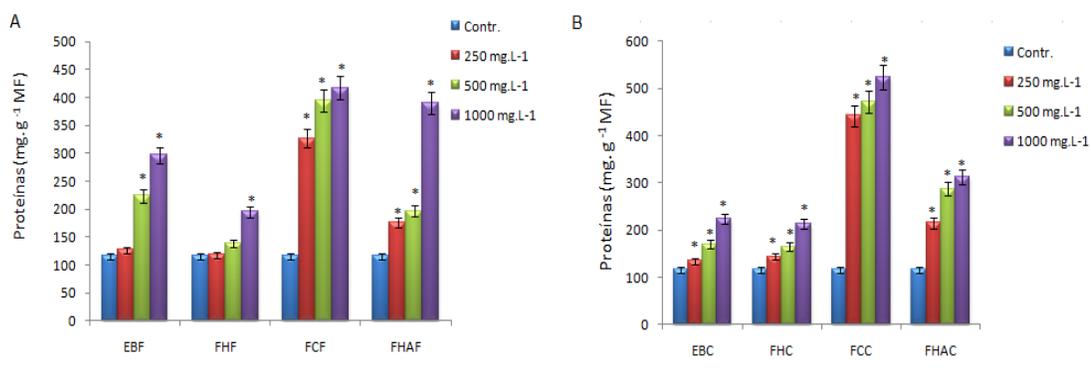


FIGURA 40 – PROTEÍNAS TOTAIS

Proteínas totais de raízes das plântulas de alface desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de (A – folhas; B – cascas) de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em  $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$ . \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

O teor de proteínas foi significativamente alterado na presença dos extratos brutos e frações tanto das folhas quanto das cascas na concentração de  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$ . A fração clorofórmio das folhas e da casca apresentou os resultados mais efetivos uma vez que provocou alteração significativa com  $250 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

O aumento no teor de proteínas corresponde à ativação de mecanismos de defesa da planta. A ativação de síntese protéica leva a uma fase de resistência (VIECELLI, 2010).

### 5.13.2 Atividade Superóxidodismutase (SOD)

A atividade da SOD foi alterada de forma significativa pelas frações e extrato bruto das cascas nas três concentrações testadas ( $250 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg.ml}^{-1}$  e  $1000$

mg.ml<sup>-1</sup>). O mesmo ocorreu para as frações clorofórmio e hidroalcoólica das folhas. A fração hexânica das folhas não alterou a atividade da SOD.

O aumento da atividade da SOD pode estar ligada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, consequência da ação de aleloquímicos (ALMEIDA, 2008). Assim sendo, o extrato e frações das cascas provocaram um aumento mais acentuado da atividade enzimática (Figura 41).

Com o aumento da concentração das amostras aumentou a atividade da SOD.

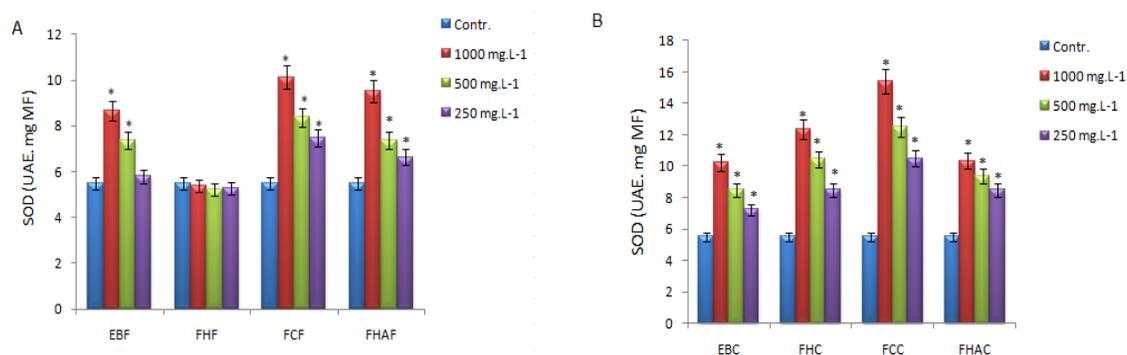


FIGURA 41 – ATIVIDADE SOD

Atividade da SOD de raízes das plântulas de alface desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de (A – folhas; B - cascas) de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em UAE.mgMF. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

### 5.13.3 Atividade da Peroxidase

A atividade da Peroxidase mostrou-se alterada nas plântulas tratadas com o extrato bruto e as frações de folhas e cascas de *Jatropha multifida* L. Em todas as concentrações testadas a influência foi significativa em relação ao controle. O aumento da concentração também provocou aumento na atividade desta enzima. Os resultados estão demonstrados na Figura 42.

As peroxidases estão relacionadas com os processos de crescimento e diferenciação celular, e mudanças morfogênicas em respostas aos estresses físico, químico e biológico. O aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas a estas condições pode ser fator determinante da capacidade de adaptação dessas plantas, podendo esta atividade ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (PIZA *et al.*, 2003).

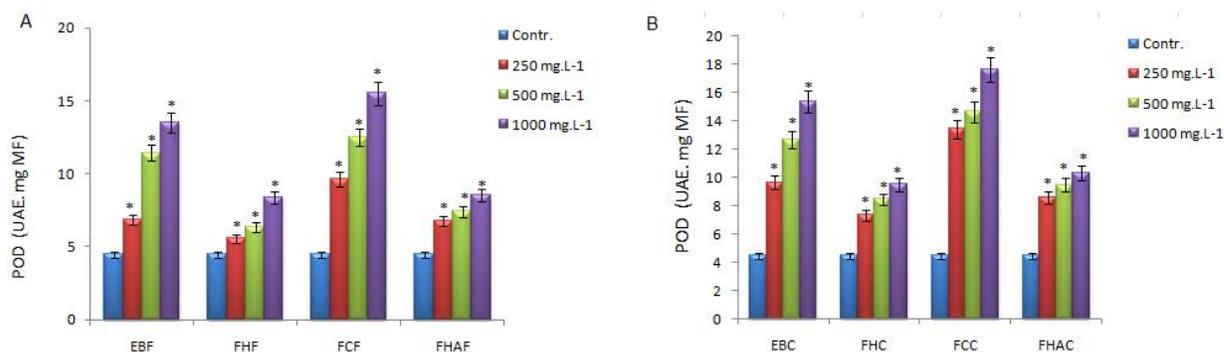


FIGURA 42 – ATIVIDADE DA PEROXIDASE

Atividade da Peroxidase de raízes das plântulas de alface desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de (A – folhas; B - cascas) de *Jatropha multifida*. Dados expressos em UAE.mgMF. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

#### 5.13.4 Atividade da Catalase

Os extratos e frações testados, das cascas e das folhas, provocaram alterações na atividade da catalase em relação ao controle. A fração clorofórmio apresentou os resultados mais expressivos pois na concentração de  $250 \text{ mg.ml}^{-1}$  teve maior ou igual influência que as outras amostras a  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$  (Figura 43).

Com o aumento de espécies reativas de oxigênio, as plantas aumentam a produção de enzimas como a catalase como mecanismo de defesa (ALMEIDA, 2008).

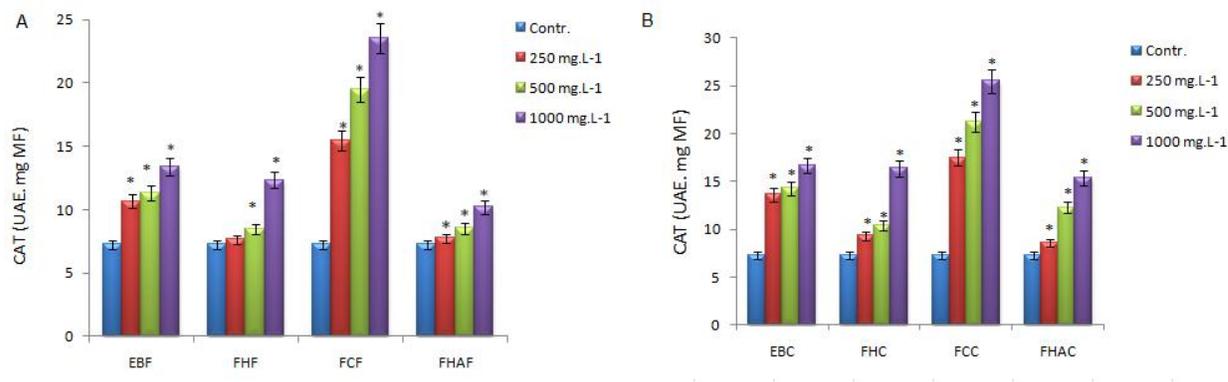


FIGURA 43 – ATIVIDADE DA CALATASE

Atividade da Catalase de raízes das plântulas de alface desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de (A – folhas; B - cascas) de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em UAE.mg.MF. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

### 5.13.5 Atividade da $\alpha$ -Amilase

Foi observado um aumento significativo da atividade desta enzima na presença do extrato bruto e frações da casca em todas as concentrações testadas. A fração hexânica da folha não provocou alteração enquanto que o Extrato bruto e a fração hidroalcoólica apresentaram influência com significância nas concentrações acima de  $500 \text{ mg.ml}^{-1}$ . As frações clorofórmio da casca e da folha apresentaram maior influência que as outras amostras (Figura 44).

A hidrólise do amido nas sementes de cereais ocorre por ação da  $\alpha$ -amilase e de outras hidrolases, e os açúcares são transportados para o embrião em crescimento (TAIS; ZEIGER, 2009). O aumento na atividade desta enzima está relacionado a um aumento de gasto energético por parte das células.

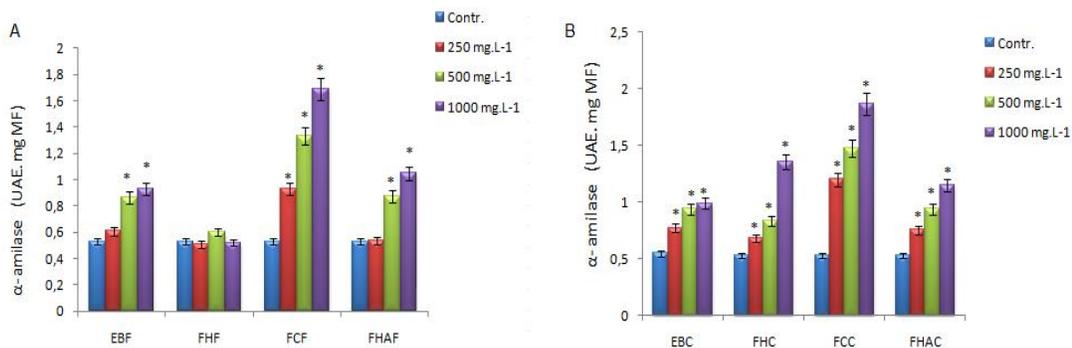


FIGURA 44 – ATIVIDADE DA  $\alpha$ -AMILASE

Atividade da  $\alpha$ -amilase de raízes das plântulas de alface desenvolvidas sob diferentes concentrações do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de (A – folhas; B - cascas) de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em UAE.mgMF. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

### 5.13.6 Teor de Clorofila e Respiração

Houve uma diminuição do teor de clorofila e atividade respiratória na presença de todas as amostras testadas. O extrato bruto e frações das cascas desempenharam maior influência que os extratos e frações das folhas. A fração clorofórmio da casca apresentou as maiores porcentagens de inibição, na respiração foi detectada inibição de 79% e no teor de clorofila diminuição de 64%.na concentração de  $1000 \text{ mg.ml}^{-1}$  (Figura 45).

As moléculas de clorofila constituem um sistema de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante (VIECELLI, 2010). Vários autores têm reportado que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (EINHELLIG; KUAN 1971; EINHELLIG; RASMUSSEN 1979; BLUM; REBBECK 1989; BAZIRAMAKENGA *et al.*, 1994; CHOU, 1999). A aparência clorótica das plantas seria um sintoma da degradação

das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (DUKE 1985; CAYON *et al.*, 1990).

A respiração celular também pode ser fortemente afetada na presença de aleloquímicos (RICE, 1984).

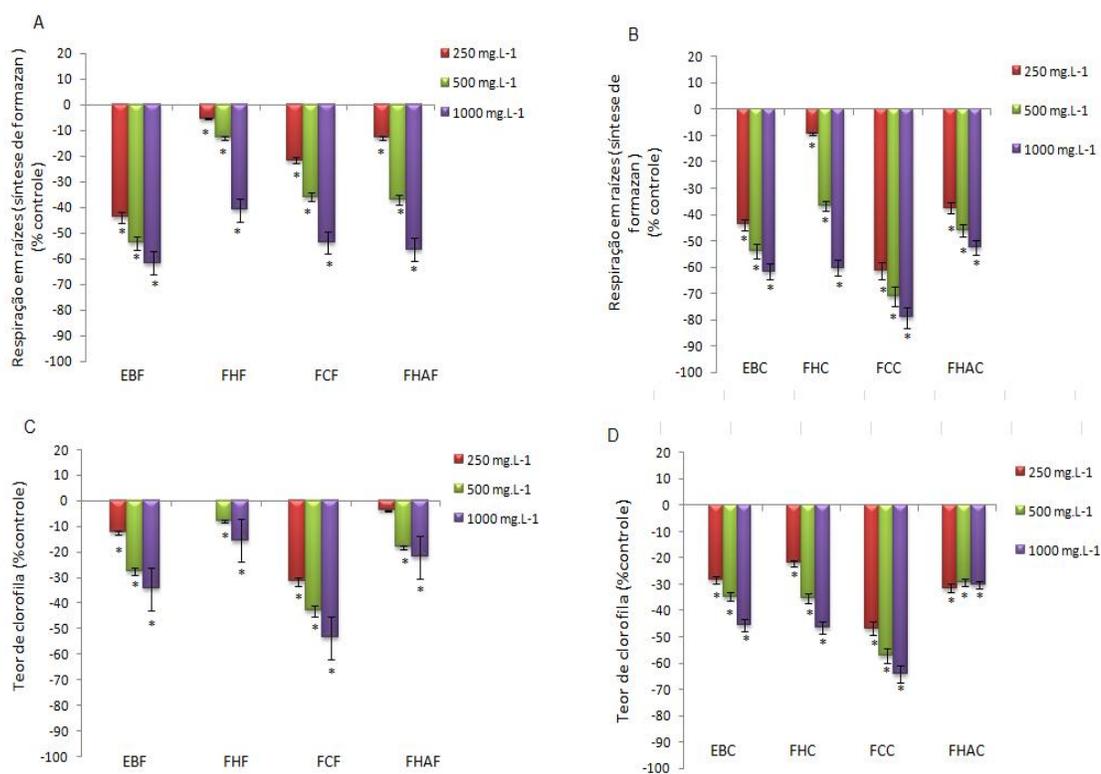


FIGURA 45 – ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E TEOR DE CLOROFILA

Atividade respiratória (A – folha, B – casca) e teor de clorofila (C – folha, D – casca) em função das concentrações de extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmio (FC) e fração hidroalcoólica (FHA) de *Jatropha multifida* L. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle. \* A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste Tukey.

Alterações morfológicas na raiz apical e na zona pilífera das raízes das plântulas foram detectadas. Os extratos brutos e frações das duas partes, folhas e cascas, exerceram influência sobre a morfologia das plântulas. O aumento da concentração acarretou em alterações morfológicas mais evidentes.

Podemos observar pelas fotos C, D, e E (Figura 46) a evolução dos efeitos, caracterizados pelo escurecimento gradativo da raiz apical submetida às diferentes concentrações de extrato bruto casca. A redução de pêlos na zona pilífera pode ser constatada claramente pelas fotos O e P, as quais mostram as plântulas submetidas a fração hidroalcoólica casca (Figura 46) e fração hidroalcoólica folha (Figura 47) nas concentrações de 250 e 1000 mg.ml<sup>-1</sup>.

Autores afirmam que muitas fitotoxinas são capazes de afetar a morfologia e anatomia de plântulas, o que pode ser evidenciado pelo endurecimento e escurecimento dos ápices radiculares, fragilidade e aumento de ramificações (PELLISSIER 1993; INDERJIT 1996; CRUZ-ORTEGA *et al.*, 1998). De acordo com Miró *et al.* (1998), plântulas de milho tratadas com extratos de frutos de *Ilex paraguariensis* apresentaram redução no tamanho das raízes, além de menor número de pêlos absorventes.

Observamos que todos os extratos testados, com o aumento da concentração, acarretaram em escurecimento da região apical e redução de pêlos na região pilífera.

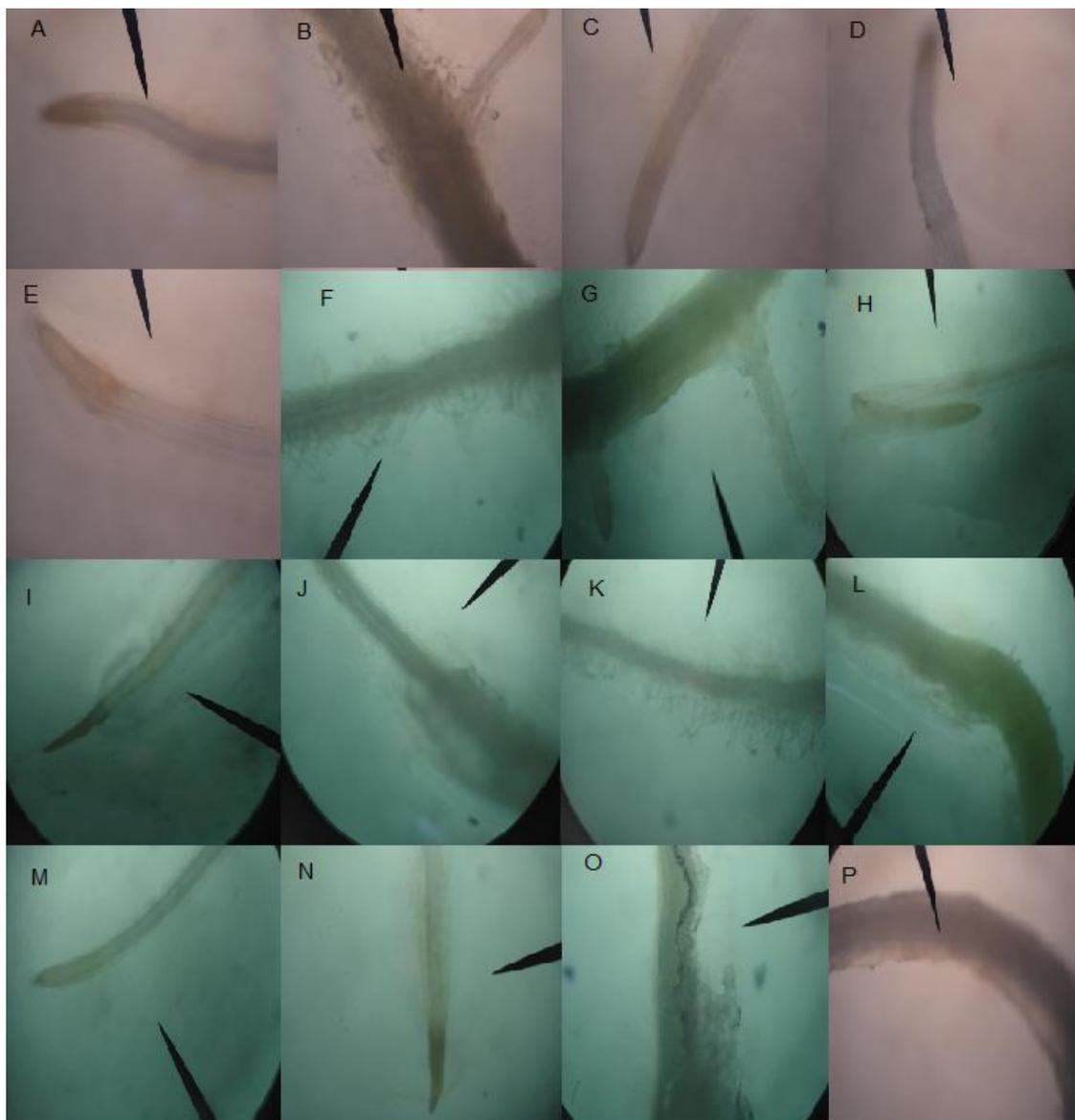


FIGURA 46 – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA (AUMENTO 1000x) DA MORFOLOGIA DA REGIÃO APICAL E ZONA PILÍFERA DE ALFACE SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DAS CASCAS.

NOTA: FOTOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE A-P, SENDO A - CONTROLE REGIÃO APICAL (RA); B - CONTROLE ZONA PILÍFERA (ZP); EXTRATO BRUTO CASCAS (RA) C - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; D-500 mg.ml<sup>-1</sup>; E - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HEXANO (ZP) F - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; G - 500 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (RA) H - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; I - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO CLOROFÓRMIO CASCA (ZP) J - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; K - 500 mg.ml<sup>-1</sup>; L - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA (RA) M - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; N - 500 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA (ZP) O - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; P - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>.

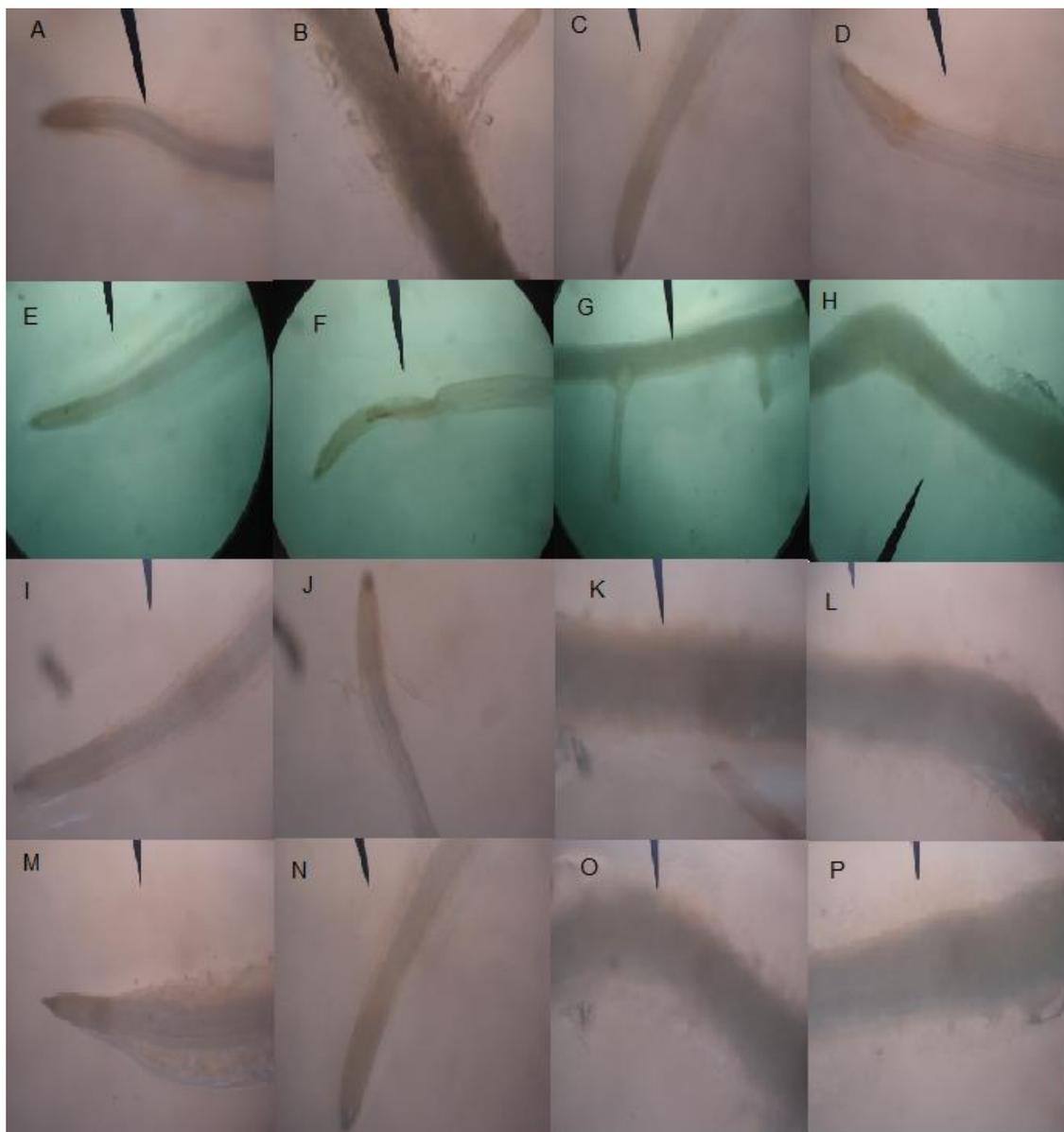


FIGURA 47 – FOTOMICROGRAFIA ÓPTICA (AUMNETO 1000X) DA MORFOLOGIA DA REGIÃO APICAL E ZONA PILÍFERA DE ALFACE SUBETIDAS AOS EXTRATOS DAS FOLHAS

NOTA: FOTOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE A-P, SENDO A - CONTROLE REGIÃO APICAL (RA); B - CONTROLE ZONA PILÍFERA (ZP); EXTRATO BRUTO FOLHAS (RA) C - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; D- 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HEXANO (RA) E - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; F - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HEXANO (ZP) G - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; H - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (RA) I - 500 mg.ml<sup>-1</sup>; J- 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO CLOROFÓRMIO (ZP) K - 500 mg.ml<sup>-1</sup>; L - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA (RA) M - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; N - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>; FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA (ZP) O - 250 mg.ml<sup>-1</sup>; P - 1000 mg.ml<sup>-1</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

Os objetivos propostos no início do trabalho, de estudo da composição fitoquímica e avaliação da letalidade frente à *Artemia salina*, atividade hemolítica, antioxidante e alelopática, foram cumpridos e os resultados permitem que façamos as conclusões que seguem.

Em relação ao ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*, os extratos das cascas mostraram níveis de toxicidade mais expressivos que as folhas. Em contrapartida, também revelaram melhor desempenho nos ensaios antioxidante e atividade alelopática neste trabalho. Os produtos isolados não apresentaram toxicidade.

Os extratos e frações testados não apresentaram atividade hemolítica. Este resultado demonstra o potencial desta planta para futuros estudos de purificação de outros compostos e de determinação de outras atividades biológicas.

Apesar dos resultados promissores das folhas na atividade antioxidante, dentro de um panorama geral, as cascas apresentaram maior poder antioxidante em ambos ensaios empregados.

Os flavonóides isolados Vitexina e Isovitexina mostraram atividade no teste do DPPH mas não no teste do fosfomolibdênio. Podemos pensar que o possível mecanismo de ação destes compostos seria por seqüestro de radicais livres através de reação de transferência de elétrons. Entretanto, são necessários estudos envolvendo a caracterização de reações envolvidas e dos produtos intermediários para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

Quanto à atividade alelopática, a germinação foi afetada de forma significativa perante os extratos brutos e fração acetato de etila de cascas e folhas. O crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa* foi inibido na presença de quatro amostras (extrato bruto e fração hidroalcoólica das folhas, fração clorofórmio e fração hidroalcoólica das cascas) também de maneira significativa.

Em relação ao índice mitótico e ao teor de clorofila e respiração, os extratos testados têm ação inibitória sobre o metabolismo de *Lactuca sativa* pois inibiu a divisão

celular, diminuiu o teor de clorofila interferindo assim na captação de energia, e na liberação dessa energia por interferir na respiração celular.

Considerando as evidências de alterações morfológicas e de atividade enzimática, é possível concluir que o metabolismo das plântulas em questão foi alterado de forma nociva, uma vez que os processos metabólicos avaliados são de extrema importância para o estabelecimento de uma planta. A conclusão definitiva de que esta espécie seja alelopática em condições naturais exige uma investigação mais ampla, que inclua principalmente testes a campo.

À luz destes resultados revelam-se novas perspectivas de pesquisa de outros compostos bioativos e de atividades biológicas pertinentes ao desenvolvimento de novos medicamentos e novos herbicidas.

**REFERÊNCIAS**

- ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, R.; MUYS, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1063-1084, 2008.
- ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant Phorbol Derivatives From Four *Jatropha* species. **Phytochemistry**. v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984.
- AFIFI, F. U.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. **Acta technologiae et Legis Medicamenti**. v. 8, n. 2, p.105-111, 1997.
- AHMAD, M. U.; ISLAM, M. R.; MIRZA, A. H.; CHOWDHURY, B. H.; NAHAR, N. Alkaloids of *Jatropha gossypifolia* Linn. **Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**. v. 31, n.1, p. 67-69, 1992.
- AIYELAAGBE, O. O.; Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, v. 72, p. 544-546, 2000.
- AIYELAAGBE, O. O.; FATUNSIN, O. F.; OGUNTUASE, B. J.; ADENIYI, C. B. A.; GIBBONS, S. Antimicrobial activity of *Jatropha curcas* L. and *Jatropha multifida* L. against bacteria and fungi s.t.d. organisms. **Planta Médica**, v. 74, 2008.
- ALMEIDA, G. D.de; ZUCOLOTO, M.; ZETUM, N. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín**, v. 61, n.1, p. 4237-4247, 2008.
- ANDRADE, J. R. C.; SUASSUNA, I. Atividades Citotóxica e Hemolítica em *Escherichia coli* Uropatogênicas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, n.2, p. 193-199, 1988.
- ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**, Brasília, 2003, p. 23.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, **Official methods of analysis**. 10. ed. Washington: Editorial Board, p.909, 1965.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, 1949.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa. UFV, 2008, p. 48-90.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 2821-2833, 1994.

BAWM, S.; TIWANANTHAGORN, S.; LIN, K. S.; HIROTA, J.; IRIE, T.; HTUN, L., *et al.* Evaluation of Myanmar medicinal plant extracts for antitrypanosomal and cytotoxic activities. **Journal of Veterinary Macidal Science**, v.71, n. 4, p. 525-528, 2010.

BHOWMIC, P. C.; INDERJIT. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. **Crop Protection**, v. 22, p. 661-671, 2003.

BITTNER, M.; ALARCÓN, J.; AQUEVEQUE, P.; BECERRA, J.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; SILVA, M. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 46, n. 4, 2001.

BLUM, U., REBBECK, J. Inhibition and recover of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 917-928, 1989.

BRASKARWAR, B. Eyaluation of antimicrobial activity of medicinal plant *Jatropha podagrica* (Hook). **Romanian Biotechnological Letters**. v. 13, n. 5, p. 3873-3877, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BUCH, D. R.; ARANTES, A. B.; CAMPELO, P. M. S. Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 2, p. 142-145, 2008.

CAPOBIANGO, R. A.; VESTENA, S.; BITTENCOURT, A. H. C. Alelopatia de *Joanesia princeps* Vell. e *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 924-930, 2009.

CARMO, F. M. DA S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botânica Brasília**, v. 21, n. 3, 2007.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR.**, Brassicaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CAYON, D.G.; LOPES, N.L.; OLIVA, M.A., SILVA, J.F. Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 33-40, 1990.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H.J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CHOU, C.H.; KUO, Y.L. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.). **Journal of Chemical Ecology**, v.12, n.1, p.1434-1448, 1986.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, p. 609-636, 1999.

CONFORTI, F.; STATTI G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 749,783, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and Classification of Flowering Plants**, ed. 2, New York Botanical Garden, 1988.

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyios deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* e *Curcubita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology** , v. 24, n. 12, p. 2039-2057, 1998.

DAS, B.; RAVIKANTH, B.; REDDY, K. R.; THIRUPATHI, P.; RAJU, T. V.; SRIDHAR, B. Diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2639-2641, 2008.

DAS, B.; RAVIKANTH, B.; LAXMINARAYANA, K.; RAMARAO B.; RAJU, T. V. New Macrocyclic Diterpenoids from *Jatropha multifida*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 57, n. 3, p. 318-320, 2009.

DAS, B.; REDDY, K. R.; RAVIKANTH, B.; RAJU, T. V.; SRIDHAR, B.; KHAN, P. U.; RAO J.V. Multifidone: A novel cytotoxic lathyrane-type diterpene ahvins an unusual six-membered A ring from *Jatropha multifida*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, p. 77-79, 2009.

DAS, B.; LAXMINARAYANA, K.; KRISHNAIAH, M.; SRINIVAS Y.; RAJU, T. V. Multidione, a novel diterpenoid from *Jatropha multifida*. **Tetrahedron Letters**, 2009.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2079-2093, 2000.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: Review. **J Agric Food Chem**. v. 58, n. 11, p. 6543-6555, 2010.

DIAS, J. F. G, **Estudo Alelopático Aplicado de *Aster lenceolatus*, Willd.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientales* leaves. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1005-1010, 1996.

DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; LERNER, C.; MOTHE, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.1, p. 16-22, 2005.

DUKE, S.O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. In: DUKE S.O (ed.) **Weed Physiology**. Vol. II. Boca Raton, CRC Press, 1985, p.91-112.

DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, p. 583-589, 2000.

EBUEHI, O. A.; OKORIE, N. A. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. **Nig Q J Hosp Med**. v.19, n. 4, p. 200-5, 2009.

EINHELLIG, F.A.; KUANG, L.. Effects of scopolin on growth, CO<sub>2</sub> exchange rates, and concentration of scopolin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 98, p.155-162, 1971.

EINHELLIG, F.A., RASMUSSEN, J.A. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v.5, p. 815-24, 1979.

EINHELLIG, F.A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A.R., TANG, C.H.-S. (eds.). **The Science of Allelopathy**. Nova York, John Wiley and Sons, 1986, p. 171-188.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4ª Ed. São Paulo. Atheneu, 1988.

- FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.
- FERREIRA, A.G., AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p. 175-204, 2000.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p.291-296, 2005.
- FOLADOR,P.; CAZAROLLI, L. H.; GAZOLA, A.C.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; SILVA, F. R. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1180-7, 2010.
- FOREMAN, J., V. DEMIDCHIK, J.H.F. BOTHWELL, P. MYLONA, H. MIEDEMA, M.A.TORRES, P. LINSTAD, S. COSTA, C. BROWNLEE, J.D.G. JONES, J.M. DAVIES and L. DOLAN. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**. v. 422(6930), p. 442-445, 2003
- FREUDENBERG, K.; WEINGES, K. Catechine, andere Hydroxy-flavane und Hydroxy-flavene. **Fortschritte der Chemie organischen Naturstoffe**. v. 16, p. 1-25, 1958.
- FREUDENBERG, K.; WEINGES, K. Systematik und Nomenklatur der Flavonoide. **Tetrahedron**. v. 8, p. 336-349, 1960.
- GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J.; Biological activities of Lupeol. **Int. J. Bio Phar Sci.**, v. 3, special issue 1, p. 46-66, 2009.
- GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products. In COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products. Determination, Isolation, and structural determination**. CRC Press, NW, 2 ed.,2008, p. 13-15.
- GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology. Plant**. v. 27, n.3, p. 395-407, 2005.
- GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no Pinhão Manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio. **Circular Técnica EMBRAPA Agroenergia** , pp. 1-5, 2009.
- GOSSLAU, A.; CHEN, K. Y. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. **Nutricion**, v. 20, n. 1, p. 95-102, 2004.
- GRAY, T. M., ARNOYS, E. J., BLANKESPOOR, S. Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91

to proline. **Protein Science**, Camb. Uni. Press. Printed in the USA, v.5, 1996, p. 742-751.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In SIMÕES *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p.13-20.

GUPTA, A. S.; WEBB, R. P.; HOLADAY, A. S.; ALLEN, R. D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1067-1073, 1993

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I.; **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 35, p. 7, 1995.

HAMMOND-KOSACK, K.E; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell** v. 8, n. 10, p. 1773-1791, 1996.

HAMZA, O. J. M.; VAN DEN BOUT-VAN DEN BEUKEL, C. J. P.; MATEE, M. I. N.; MOSHI, M. J.; MIKX, F. H. M.; SELEMANI, H. O.; MBWAMBO, Z. H.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 124-132, 2006.

HIEN, T. V.; HUONG, N. B.; HUNG, P. M.; DUC, N. B. Radioprotective effects of vitexina for breast cancer patients undergoing radiotherapy with cobalt-60. **Integrative cancer therapies**, v. 1, n.1, p. 38-43, 2002.

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, n. 2, p. 186-202, 1996.

JAMAL, A. K.; YAACOB, W. A.; DIN, L. B. A chemical study of *Phyllanthus reticulatus*. **Journal of Physical Science**, v. 19, n. 2, p. 45-50, 2008.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, W. H. Freeman & Co., 1962.

JOLY, A.B. Botânica: **Introdução à taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985.

JOLY, A. B. Botânica: **Introdução à taxonomia vegetal**. 13. Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

KAZUMARO, F.; TAKAO, M.; KAZUMI, T.; TERUHIRO, I. **Seed oil extracted from *Jatropha multifida* Linne as Euphorbiaceae plant, preparation of this seed oil, and**

cosmetic preparation comprising this seed oil as effective component. JP 9059668, (A), 1997-03-04. Disponível em: <http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=JP&NR=9059668&KC=&FT=E>, acesso em 03/04/2010.

KIM, J. H.; LEE, B. C.; KIM, J. H.; SIM, G. S.; LEE, D. H.; LEE, K. E.; YUN, Y. P.; PYO, H. B. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. **Arch Pharm Res**, v. 28, n. 2.; p. 195-202, 2005.

KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W. G.; BOELEN, R.; HART, L. A.; LABADIE, R. P. Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae). **FEBS Letters**, v. 256, n. 1,2, p. 91-96, 1989.

KRISHNAN, P. R., & PARAMATHMA., M. Potentials and *Jatropha* species wealth of India. **Scientific Correspondence**. v. 97, n. 7, p.1000-1004, 2009.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 210.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington D. C.: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. p. 170.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and chemical toxicology**. v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

LEVIN, Y.; SHERER, Y.; BIBI, H.; SCHLESINGER, M.; HAY, E. Rare *Jatropha multifida* Intoxication in Two Children. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 2, p. 173-175, 2000.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUZA, B. D.; MORAIS S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LIN, C. M.; CHEN, C. T.; LEE, H.H.; LIN, J. K. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. **Planta Medica**, v. 68, n. 4; p. 365-367, 2002.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, 1970.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.

MAKSYMIEC, W.; KRUPA Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. **Env. Exp. Bot.** v. 57, n. 1-2, p. 187-194, 2006.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta bot Brás**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochem.** v. 30, n. 5, p. 1431-1433, 1991.

MASUOKA, C.; ONO, M.; ITO, Y.; NOHARA, T. Antioxidative, antihyaluronidase and antityrosinase activity of some constituents from the aerial part of *Piper elongatum* Vahl. **Food Sci Technol Res**, v. 9, n. 2, p. 197-201, 2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe. Editorial, 1999. p.11-17.

MIRÓ, C.P.; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 33, n. 8, p. 1261-1270, 1998.

MOHARRAM, F. A.; MARZOUK, M. S.; HAGGAG, E. G.; EL-BATRAN, S.; IBRAHIM, R. R. Biological examination and novel biflavone di-C-glycosides from *Jatropha multifida* L. leaves. **Planta Médica**, v. 73, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v.26, n.3, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M.; BUITRAGO, D. C.; NIÑO, J. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 631-634, 2007.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; FERREIRA, A. L.; BRITO, A. R. M. S.; LIMA, C. A. H.; BARBOSA, J. M. F.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.

MUSCHIETTI, L. V., MARTINO, V. S. Atividades Biológicas dos Flavonoides Naturais. In YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2009. p. 189 – 218.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V.. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO; V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Univali, Itajaí, 2003, p.11-30.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. EC.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN P. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, p. 418-25, 2001.

NOGUEIRA, J. B.; MACHADO, R. D. W. **Glossário de Plantas Oleaginosas e Ceríferas II Euforbiáceas**. v. 2,1957. p. 51-52.

OLIVEIRA, V.R.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; PIRES, N.M. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**. v. 18, p. 537-544, 1996.

OMS, **Quality Control Methods For Medicinal Plant Material**. 1998, p. 41.

PEITZ,C. **Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* Andr. (Willd)**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

PELLISSIER, F. Allelopathic inhibition of spruce germination. **Acta Oecologica**, v. 14, n. 2, p. 211-218, 1993.

PENG, X.; ZHENG, Z.; CHENG, K. W.; SHAN, F.; REN, G. X.; CHEN, F.; MINGFU, W. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. **Food Chemistry**, v. 106, p. 475-481, 2008.

PICCHI, D. G. **Peptídeos cíclicos de *Jatropha multifida* L. e *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): prospecção, isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica.** Araraquara, 2007. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PINTO, T. L.; FILHO, J. M.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação da viabilidade de sementes de Pinhão Manso pelos testes de tetrazólio e raio x. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 31, n.2, p. 195-201, 2009.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de Peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxieiro micropropagadas em meio salino. **Ver Bras Agrocência**, v. 9, n. 4, p. 361-336, 2003.

PRABHAKAR, M. C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M. A.; KHAN, S. Y. Pharmacological Investigation on Vitexin. **Planta Medica**, v. 43, n. 12, p. 396 – 403, 1981.

PRATES, H.T.; PAES, J.M.V.; PIRES, N.M.; PEREIRA, I.A.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.909-914, 2001.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamina E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUTTER, J., Peroxidase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**, Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinhan, 1974, p: 685-690.

QUEENSLAND GOVERNMENT. Plants and mushrooms. Disponível em: <[http://www.health.qld.gov.au/poisonsinformaioncentre/plants\\_fungi/coralplant.asp](http://www.health.qld.gov.au/poisonsinformaioncentre/plants_fungi/coralplant.asp)> acesso em 17. ago. 2009.

RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press,1984. p. 2-3; 267-291.

RIEDLE-BAUER, M. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. **J. Phytopathol.**, v.148, p. 297-302, 2000.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de Fatores de Virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 1, p.11-33, 2007.

SAMAJ, J., F. BALUSKA; MENZEL, D. New signalling molecules regulating root hair tip growth. **Trends Plant Sci.** v. 9, n. 5, p. 217-20, 2004.

SANEVAS, N., Y.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Characterization of reactive oxygen species-involved oxidative damage in *Hapalosiphon* species crude extract-treated wheat and onion roots. **Weed Biol. Manag.** v. 7, n. 3, p. 172–177, 2007.

SANTOS, S. C. da; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In SIMÕES *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 615-638.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007, p. 70-237.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 579-716.

SIMON, J. J. Phytochemicals and câncer. **Journal of Chiropractic Medicine**. v 1, n. 3, p 91 – 96, 2002.

SOUZA, S.A.M.; STEIN, V.C.; CATTELAN, L.V.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.5, n.1, p.3-9, 2005.

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Editora WMF Martins Fontes Ltda, 2009, p.25-352.

TEIXEIRA, J. P. **Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp.** Campinas: Bragantina, 1987.

TESTA, B.. **The metabolism of drugs and other xenobiotics.** Academic Press, New York. 1995, p.475.

TREVISAN, R. R. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanae* (Jacq.) Sargent ULMACEAE.** Curitiba, 2010. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Citações e Notas de Rodapé.** Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 3).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências.** Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e Editoração.** Editora: UFPR, 2007. (normas para apresentação de documentos científicos, 9).

UTYAMA, I. K. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** Ribeirão Preto, 2003, p.148. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

VAN DEN BERG, A. J., HORSTEN, S. F., VAN DEN BOSCH, J. J., & BEUKELMAN, C. J. Podacycline A and B, two cyclic peptides in the latex of *Jatropha podagrica*. **Phytochemistry.** v.42, n. 1, p. 129-133, 1996.

VEIGA, da A; A. S. **Flavonoides e atividades preliminares Antioxidante e microbiologia de *Jatropha gossypifolia* L.** Belém, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará.

VICTORIA FILHO, R. Tipos de Herbicidas para uso em florestas. **Série Técnica IPEF,** v.4, n.12, p.36 – 44, 1987.

VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T. Destino de Aleloquímicos no Solo. **Ciência Rural,** v. 27, n. 2, 1997.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathol.,** v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WEIR, T.L.; PARK, S. M.; VIVANCO, J. M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 7, n. 4, p.472-479, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In SIMÓES *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 577-607.