



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAFAEL FERNANDES DE QUEIROZ NETO

**PINHÃO-BRAVO (*Jatropha mollissima* Pohl Baill.): CARACTERIZAÇÃO
FITOQUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO LÁTEX E DOS SEUS
EXTRATOS**

MOSSORÓ-RN

2018

RAFAEL FERNANDES DE QUEIROZ NETO

**PINHÃO-BRAVO (*Jatropha mollissima* Pohl Baill.): CARACTERIZAÇÃO
FITOQUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO LÁTEX E DOS SEUS
EXTRATOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista -
UFERSA

MOSSORÓ-RN
2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

FQ3p Fernandes de Queiroz Neto, Rafael.
 PINHÃO-BRAVO (*Jatropha mollissima* Pohl
 Baill.): CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES
 FARMACOLÓGICAS DO LÁTEX E DOS SEUS EXTRATOS /
 Rafael Fernandes de Queiroz Neto. - 2018.
 55 f. : il.

 Orientador: Jael Soares Batista.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
 Ciência Animal, 2018.

 1. atividades biológicas. 2. plantas
 medicinais. 3. euphorbiaceae. 4. Semi-árido
 brasileiro. I. Soares Batista, Jael , orient.
 II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

RAFAEL FERNANDES DE QUEIROZ NETO

**PINHÃO-BRAVO (*Jatropha mollissima* Pohl Baill.): CARACTERIZAÇÃO
FITOQUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO LÁTEX E DOS SEUS
EXTRATOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido, como requisito
para obtenção do título de Mestre.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

APROVADA EM: 23/02/2018

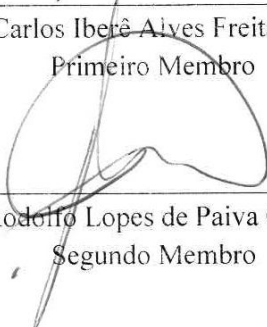
BANCA EXAMINADORA



Prof.^o Dr. Jael Soares Batista - UFERSA
Presidente



Prof.^o Dr. Carlos Ibetê Alves Freitas - UFERSA
Primeiro Membro



Prof.^o Dr. José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti - UERN
Segundo Membro

*Ao meu avô Rafael Fernandes de Queiroz, um
mestre sem diploma. (In memorian)*

*A minha querida esposa Rachel pelo companheirismo e dedicação à família;
A minha filha Maria Tereza por existir e tornar a jornada menos cansativa;
Aos meus pais pelo encorajamento e exemplos de retidão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades do dia a dia.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr Jael Batista pela atenção dispensada, e pela dedicação e profissionalismo com que conduziu nossa pesquisa.

Agradeço em igual medida ao Prof. Dr Carlos Iberê pela orientação e apoio incondicional desde os primeiros passos desse trabalho.

Agradeço aos colegas José Gustavo, Prof. Taffarel Torres, Kizzy Milenn, Rociene Abrantes, Hélio Noberto Jr, Prof. Dr Leonardo Alcântara, Francisco Alexandre, Profa. Jocileide Maria, Paulo Fernandes das Chagas, Juliana Maria e André do Vale por terem ajudado a pavimentar meu caminho em busca desses resultados.

Agradeço ainda aos professores e colegas do Mestrado em Ciência Animal pelas experiências compartilhadas e os saberes adquiridos.

“ Tente
E não diga que a vitória está perdida
Se é de batalhas que se vive a vida
Tente outra vez! ”

Raul Seixas

RESUMO

O pinhão-bravo (*Jatropha mollissima* Pohl Baill.) é um arbusto autóctone da vegetação de caatinga, encontrada em grande parte do semiárido do Nordeste brasileiro, utilizado na cultura popular com fins terapêuticos. O látex do pinhão-bravo e os extratos dele derivados foram avaliados quanto à composição fitoquímica, identificando os principais metabólitos secundários a partir de métodos qualitativos e quantitativo, e quanto as suas atividades farmacológicas. Foram pesquisadas toxicidade, através da dose tóxica aguda em ratos Wistar, ação antioxidante, de acordo com o método fotolorimétrico do radical livre DPPH, e ação antibacteriana, através da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima. Foram detectados fenóis, taninos, flavonoides e saponinas no látex e demais extratos pesquisados. Tanto o látex quanto o extrato etanólico apresentaram moderada atividade antioxidante, como também evidenciaram atividade antibacteriana contra as cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*), em várias diluições, juntamente com o extrato hidroalcoólico. O látex do pinhão apresentou ainda baixa toxicidade aguda em ratos. Logo, os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram o uso popular da *J. mollissima* e seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: atividades biológicas; plantas medicinais; Euphorbiaceae; Semi-árido brasileiro.

ABSTRACT

Jatropha (*Jatropha mollissima* Pohl Baill) is an autochthonous shrub native to caatinga vegetation, found in much of the semi-arid region of the Brazilian Northeast, used in popular culture for therapeutic purposes. The latex of *Jatropha* and extracts derived from it were evaluated for phytochemical composition, identifying the main secondary metabolites from qualitative and quantitative methods, and their pharmacological activities. Toxicity was investigated, through the acute toxic dose in Wistar rats, antioxidant action, according to the photolorimetric method of free radical DPPH, and antibacterial action, through minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. Phenols, tannins, flavonoids and saponins were detected in latex and other extracts. Both latex and ethanolic extract presented moderate antioxidant activity, as well as anti-bacterial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative strains (*Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*) in various dilutions along with the hydroalcoholic extract. *Jatropha*'s latex also showed low acute toxicity in rats. Therefore, the results obtained in this research corroborate the popular use of *J. mollissima* and its therapeutic potential.

Keywords: biological activities; medicinal plants; Euphorbiaceae; Brazilian Semi-arid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Exsicata da <i>Jatropha mollissima</i> coletada pelo autor, nº de tombamento: 14891. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	20
Figura 2	–	Em A, tem-se a imagem do exemplar de <i>J. mollissima</i> no qual realizou-se a coleta do látex; Em B, tem-se a representação da coleta de material para a realização da pesquisa. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	25
Figura 3	–	Punção de veia porta de rato Wistar para coleta de sangue venoso. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	30
Figura 4	–	Da esquerda para a direita, tubos de ensaio contendo látex, seguido pelo EA, EHA e EE. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	34
Figura 5	–	Detecção de compostos fenólicos pela adição do reagente Folin-Ciocalteu. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	34
Figura 6	–	Teste para fenóis e taninos pela adição de Cloreto Férrico 2%. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	35
Figura 7	–	Teste de Shinoda. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	35
Figura 8	–	Detecção de saponinas pela adição de clorofórmio e agitação da mistura. Arquivo pessoal, ANO 2017.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Curva padrão de ácido gálico (20 a 200 mg/L). $R^2 = 0,9991$	29
Gráfico2	–	Média da massa corporal dos ratos durante o experimento de 14 dias. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de <i>student</i> ($p \leq 0,05$).....	40
Gráfico3	–	Média da massa dos dois rins dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de <i>student</i> ($p \leq 0,05$).....	40
Gráfico4	–	Média da massa do coração dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de <i>student</i> ($p \leq 0,05$).....	41
Gráfico5	–	Média da massa fígado dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de <i>student</i> ($p \leq 0,05$).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Categoria Toxicológica (Globally Harmonised System).....	22
Tabela 2	–	Rendimento dos extratos aquoso, extrato hidroalcoólico e extrato etanólico...	33
Tabela 3	–	Resultados da análise qualitativa de metabólitos secundários em <i>J. mollissima</i>	36
Tabela 4	–	Resultados da análise dos Fenólicos totais. Dados representados como média ± desvio padrão. Diferença estatística calculada aplicando uma ANOVA associada ao teste T de Tukey ($p \leq 0,05$), letras diferentes indicam diferença estatística.....	37
Tabela 5	–	Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos tratados com o látex da <i>Jatropha mollissima</i> . Representação dada em Média ± Desvio Padrão. Letras indicam diferença significativa entre os grupos, calculada aplicando o teste t de Student ($p \leq 0,05$). * Diferença calculada pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).....	38
Tabela 6	–	Resultado do teste antioxidante. Dados representados como média ± desvio padrão. Diferença estatística calculada aplicando uma ANOVA associada ao teste T de Tukey ($p \leq 0,05$), letras diferentes indicam diferença estatística.....	43
Tabela 7	–	Determinação da concentração inibitória mínima em ensaio com resazurina 0,01%.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	A família Euphorbiaceae	18
3.2	O gênero <i>Jatropha</i>	19
3.3	A espécie <i>Jatropha molíssima</i>	19
3.4	Testes fitoquímicos	20
3.5	Teste toxicológico	21
3.6	Teste antioxidante	22
3.7	Teste antibacteriano	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	COLETA, IDENTIFICAÇÃO, CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS	25
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS	26
4.2.1	Extrato aquoso	26
4.2.2	Extrato hidroalcoólico.....	26
4.2.3	Extrato alcoólico	26
4.2.4	Látex	26
4.3	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E BIOÉTICA.....	26
4.4	TESTES FITOQUÍMICOS	27
4.4.1	Teste para fenóis e taninos	27
4.4.2	Teste para flavonoides	27
4.4.3	Teste para saponinas	28
4.4.4	Teste para esteroides e triterpenoides.....	28
4.4.5	Teste para antocianinas	28
4.4.6	Teste para fenólicos totais	28
4.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	29
4.5.1	Teste de toxicidade aguda em ratos Wistar	29
4.6	AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	30
4.6.1	Avaliação da atividade antioxidante	30

4.6.1.1	Método do DPPH.....	30
4.6.2	Avaliação da atividade antibacteriana.....	31
4.6.2.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	31
4.6.2.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	33
5.2	TESTES FITOQUÍMICOS	33
5.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE.....	38
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	ANEXO A.....	54

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática milenar e que se perpetua devido a sua reprodução na cultura popular. São oriundos das experiências do cotidiano que tiveram alguma aplicabilidade no tratamento das mais diversas moléstias em homens ou animais e foram assim transmitidas através das gerações (ARAÚJO; LEMOS, 2015; SILVA, 2017).

Muitos dos preparos, obtidos a partir das plantas ou parte delas, sequer dispõem de evidências científicas que atestem sua eficácia, tampouco foram submetidos a qualquer teste de toxicidade antes da sua administração, sendo o uso baseado estritamente no empirismo. Entretanto, apresentam vasta empregabilidade na atenção primária a saúde dos países em desenvolvimento, em especial no interior deles, onde os acessos aos meios de saúde são escassos (ARAÚJO; LEMOS, 2015; BRAQUEHAIS et al., 2016).

Algumas dessas plantas despertam interesse progressivo por parte da comunidade científica, sobretudo na área médica, devido às atividades farmacológicas presentes em seus compostos orgânicos. Neles são encontradas substâncias com potencial terapêutico, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, lignanas, entre outros, objetos de incessantes estudos, que procuram comprovar suas ações farmacológicas, sugerindo aplicações em diversas situações que comprometem o estado de saúde (ARAÚJO et al., 2008; ZHANG et al., 2009; PIMENTEL et al., 2012).

Esses compostos bioativos têm sido empregados em pesquisas que buscam avaliar o potencial antioxidante, a capacidade de inibição e destruição de células tumorais, suas ações antimicrobianas ou anti-inflamatórias e cicatrizantes, partindo do extrato bruto dos vegetais que os contém (ARAÚJO et al., 2008; DEVAPPA; MAKAR; BECKER, 2010; SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Um desses vegetais é o pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*), um arbusto muito encontrado na região Nordeste, endêmico da vegetação de caatinga, que pertence à família Euphorbiaceae e ao gênero *Jatropha*. Este possui muitas espécies com uma série de utilidades que vão desde a produção de combustíveis, ornamentação, até para fins medicinais (LEAL; AGRA, 2005; MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Na medicina popular são atribuídas diversas propriedades terapêuticas as plantas desse gênero, com aplicações em sangramentos, úlceras, reumatismo, doenças venéreas e purgativos, sendo a *Jatropha gossypifolia* ou pinhão-roxo, como é mais conhecido, das mais estudadas. Mesmo assim, conhece-se pouco ainda o verdadeiro potencial terapêutico desse gênero

(ODUOLA et al., 2005; ROCHA; DANTAS, 2009; SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Quando lesionado, o pinhão-bravo produz uma seiva de aspecto leitoso (látex) que é usado *in natura* pela população sobre os ferimentos com o propósito de controlar sangramentos, evitar infecções, minimizar o processo inflamatório e assim favorecer a cicatrização. Todavia, esse procedimento não dispõe de qualquer valor científico, já que a literatura carece de estudos robustos a respeito do potencial terapêutico da *Jatropha mollissima*, no que tange o uso como agente hemostático, antimicrobiano, anti-inflamatório e cicatrizante apregoadas pelo sertanejo, bem como potencial efeito tóxico (PIMENTEL et al., 2012).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a composição química e as atividades farmacológicas de extratos do látex do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*), em busca de comprovar o uso popular como planta medicinal, associando seus efeitos aos metabólitos secundários prospectados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a composição fitoquímica e as atividades farmacológicas do látex e dos extratos etanólico, hidroalcoólico e aquoso do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*).

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar os principais metabólitos secundários, obtidos a partir dos extratos preparados, através de testes fitoquímicos qualitativos, e quantificar os fenóis totais, caracterizando as famílias de compostos da planta em estudo.
- Avaliar a toxicidade aguda, em ratos Wistar (*Rattus norvergicus*), do látex do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*).
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos do látex do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*) *in vitro*.
- Avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* dos extratos do látex do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae possui cerca de 300 gêneros e aproximadamente 6.000 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano e africano. No Brasil são cerca de 70 gêneros e de 1.000 espécies catalogadas, difundidas em todos os tipos de vegetação (SOUZA; LORENZI, 2008).

Representa uma das famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas, tendo como exemplos a seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécie nativa da Amazônia utilizada na produção da borracha, a mandioca (*Manihot esculenta*), utilizada na alimentação humana e animal, e a mamona (*Ricinus communis*), com sementes ricas em óleo, útil na indústria e na medicina (SOUZA; LORENZI, 2008).

Como plantas medicinais, algumas dessas espécies apresentam uso reconhecido na medicina popular por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antineoplásicas e antiinflamatórias, entre outras (ROCHA; DANTAS, 2009; ZHANG et al., 2009; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014). O próprio nome *Euphorbia* provém de Euphorbus, médico grego do rei Juba II da Numídia, que descobriu propriedades terapêuticas do látex de uma espécie laticífera não especificada, supostamente a *Euphorbia resinífera*, para o tratamento dos males do povo em seu reino.

São também conhecidas pelo grande número de espécies tóxicas. Dentre elas podem ser citadas: a *Euphorbia pulcherrima* Willd (bico-de-papagaio), *Euphorbia milii* L. (coroa-de-cristo), *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz) e a *Jatropha curcas* (pinhão-mansão). O princípio tóxico desta família ainda não é totalmente conhecido, podendo ser uma toxoalbumina, capaz de provocar náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreias intensas após ingestão (SOUZA; LORENZI, 2008; PIMENTEL et al., 2012).

Apesar de esta família ser amplamente distribuída no Brasil, algumas de suas espécies foram pouco ou nunca estudadas quanto à sua utilização, fenologia e tampouco composição fitoquímica. Além disso, morfologicamente muitas espécies medicinais não estão classificadas, o que torna uma família com potencial na busca de produtos bioativos com benefícios à saúde humana e animal (LEAL; AGRA, 2005).

3.2 O GÊNERO *Jatropha*

O gênero *Jatropha* L. (Euphorbiaceae), pertencente à subfamília Crotonoideae, tribo Jatropheae (WEBSTER, 1994), encontra-se representado por 165 a 175 espécies, distribuídas nas regiões semiáridas tropicais da África e das Américas. O nome do gênero deriva do latim *iatrós* que significa “doutor” e *trophé* “comida”, implicando as suas propriedades medicinais (SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014).

De acordo com Leal e Agra (2005) *Jatropha* é um grupo de grande importância econômica, principalmente pela presença de várias espécies como a *J. gossypifolia* L., *J. curcas* L. e *J. multifida* L. utilizadas na indústria, ornamentação e medicina popular. Nesta área, alguns trabalhos científicos descrevem diferentes compostos biologicamente ativos já isolados desse gênero, principalmente a presença de terpenos, que apresentam comprovada atividade antineoplásica (ZHANG et al., 2009; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010).

3.3 A ESPÉCIE *Jatropha mollissima*

A *Jatropha molíssima* Pohl Baill. é um arbusto endêmico da Caatinga popularmente conhecida como pinhão-bravo. Largamente empregado na medicina popular, seu látex, na forma *in natura*, é utilizado como antiofídico (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010; GOMES, 2016), como antiverrucoso (CORDEIRO; FÉLIX, 2014), como agente hemostático (FREITAS et al., 2015) e, as sementes comercializadas para extração dos óleos fixos, empregados como purgativo para uso veterinário (LEAL; AGRA, 2005). Outros trabalhos como o de Rocha; Dantas (2009) e Melo et al. (2010) atribuíram propriedades antibacteriana e antioxidante ao látex, respectivamente.



Figura 1: Exsicata da *Jatropha mollissima* coletada pelo autor, n° de tombamento: 14891.

3.4 TESTES FITOQUÍMICOS

Algumas plantas despertam interesse, sobretudo na área médica, devido às atividades biológicas presentes em seus compostos orgânicos. Uma das etapas iniciais realizadas na busca por esses compostos é a triagem fitoquímica de metabólitos secundários, que possui o objetivo de conhecer os constituintes químicos naturais, com possíveis propriedades bioativas, contidos nas espécies vegetais em estudo. Logo, quando não se dispõe de estudos fitoquímicos sobre a espécie de interesse, a análise preliminar qualitativa pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes à pesquisa. (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010)

Substâncias com potencial terapêutico, tais como fenóis, flavonoides, antocianinas, terpenos, taninos, saponinas, entre outros, compõem esse grupo de moléculas bioativas. A elas são atribuídas ações capazes de melhorar a resposta imunológica, combater infecções e modular positivamente o processo inflamatório (ARAÚJO et al., 2008; SILVA et al., 2014).

Essas moléculas têm sido empregadas em pesquisas que buscam avaliar o potencial antioxidante, a capacidade de inibição e destruição de células tumorais, suas ações antimicrobianas ou anti-inflamatórias e cicatrizantes, partindo do extrato bruto dos vegetais que as contém (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; SABANDAR et al., 2013).

3.5 TESTE TOXICOLÓGICO

Ensaio de atividade biológica são de fundamental importância para triagem no estudo de um vegetal. Esses ensaios são complementados com testes toxicológicos onde são empregados fungos, bactérias, algas, crustáceos, cultivos celulares e de tecidos, entre outros, que têm por finalidade substituir os ensaios com animais, ou de poderem servir como prévia de um estudo toxicológico *in vivo*, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade de estudos com animais, respeitando, desta forma, os princípios éticos de experimentação animal (ROSA, 2016).

Contudo, em algumas situações ocasionadas por dificuldades metodológicas, faz-se necessário a realização de estudos toxicológicos *in vivo*. Esses ensaios de toxicidade podem fornecer dados sobre as alterações orgânicas agudas, subcrônicas e/ou crônicas a depender do tempo de experimentação.

Na toxicidade aguda, são utilizados grupos de animais com diferentes doses podendo chegar a 5.000 mg/Kg. A dose é administrada uma única vez por via oral e o animal é observado

por um curto período de tempo na busca de efeitos tóxicos ou até mesmo óbito. Essa dose é definida como dose letal média (DL₅₀) que é a quantidade necessária para matar 50% de uma população de animais submetidos à administração da substância teste. A tabela abaixo permite classificar as substâncias de 1 a 5, sendo a Categoria 1 substâncias muito tóxicas, já que em doses baixas apresenta letalidade elevada à categoria 5 que são substância com baixa toxicidade segundo a Globally Harmonised System (GHS) (OECD, 2001).

Tabela 1: Categoria Toxicológica (Globally Harmonised System)

Categoria Toxicológica	Dose letal média (DL ₅₀)
1	> 0 - 5 mg/kg
2	> 5 - 50 mg/kg
3	> 50 - 300 mg/kg
4	> 300 - 2000 mg/kg
5	> 2000 mg/kg

Nos testes de toxicidade subcrônica e crônica o período de exposição à substância teste é maior e, ao contrário da toxicidade aguda onde o objetivo é verificar se uma dose alta provoca efeitos tóxicos, na toxicidade subcrônica e crônica o objetivo é avaliar se esses efeitos surgem quando a substância é administrada por um longo período (BEDNARCZUK et al., 2010).

3.6 TESTE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos nocivos dos radicais livres em reações que podem causar danos ao DNA e a oxidação de lipídeos e proteínas, provocando aumento da fluidez e comprometimento da integridade da membrana celular. Podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da alimentação como o tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (BROINIZI et al., 2007; ANDRADE et al., 2007; BIRBEN et al., 2012).

Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo responsáveis, segundo as evidências, pelo processo de envelhecimento e as doenças crônico-degenerativas. Nesse contexto, muitos estudos têm

buscado avaliar o papel das substâncias antioxidantes na prevenção dessas doenças, proporcionando o desenvolvimento de métodos para determinação da capacidade antioxidante (ALMEIDA et al., 2006; BIRBEN et al., 2012).

O método do radical livre DPPH consiste em avaliar a atividade sequestradora desse radical livre (2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH), de coloração púrpura que absorve luz a 517 nm. Por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (KEDARE; SINGH, 2011).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (ALMEIDA et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; KEDARE; SINGH, 2011).

3.7 TESTE ANTIBACTERIANO

As plantas e seus derivados há muito tempo têm sido utilizados no tratamento de diversas afecções que acometem homens e animais. Muitas destas, causadas por bactérias como: *Staphylococcus aureus*, encontradas na pele e mucosas de pessoas saudáveis, mas que podem provocar infecções que vão desde uma simples foliculite até infecções mais graves como pneumonia e endocardite, e.g.; *Escherichia coli*, encontradas constituindo parte da flora intestinal normal, sendo, algumas cepas, responsáveis por graves intoxicações alimentares nos seres humanos; *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de causar graves infecções hospitalares, especialmente por possuírem resistência natural a um grande número de antibióticos; *Klebsiella pneumoniae* que pode causar pneumonia e infecção do trato urinário, estando associada muitas vezes a infecções hospitalares, em particular no paciente imunologicamente deprimido; *Streptococcus agalactiae* conhecido como importante causa de sepse, pneumonia e meningite em crianças recém-nascidas; *Streptococcus pyogenes* que coloniza o trato respiratório superior e a pele, sendo causas de faringite, infecções de pele e de tecidos moles, febre reumática e glomerulonefrite; *Streptococcus mutans*, presente na cavidade oral e envolvido na gênese da cárie dentária; *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*, como causadoras de gastroenterites a partir de

alimentos contaminados; *Enterococcus faecalis*, uma comensal do sistema digestivo humano e de outros mamíferos, amplamente encontrada no ambiente, especialmente em ambientes hospitalares, causando infecção urinária, em feridas e endocardite (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

As pesquisas de extratos vegetais na busca de compostos bioativos com ação antimicrobiana têm sido impulsionadas pela procura de alternativas terapêuticas aos antimicrobianos sintéticos que, devido ao uso indiscriminado, provocam aumento significativo da resistência bacteriana a múltiplas drogas e selecionam cepas de elevada patogenicidade (ALEIXO et al., 2013).

Desta forma, o potencial farmacológico das plantas representa um vasto campo para a prospecção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana, estimulando a formulação de novas terapias, principalmente focando em linhagens refratárias aos antibióticos atualmente disponíveis (BRAQUEHAIS et al., 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

O espécime estudado foi selecionado na Fazenda Ingá, município de Encanto, situado na mesorregião do Oeste Potiguar e na microrregião Serra de São Miguel, com clima semiárido quente, e identificado, de acordo com sua classificação taxonômica, a partir de suas folhas e flores, no *Herbarium* Dárdano de Andrade Lima da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pelo professor Leandro de Oliveira Furtado de Sousa, número de tombamento da exsicata: 14891. Após a seleção do espécime e sua correta identificação botânica (Figura 2A), foram coletados cerca de 50 mL de látex, utilizando-se para tanto a poda dos galhos. O material foi recolhido em tubos de ensaio (Figura 2B) com tampa rosqueável estéreis, identificados por etiqueta contendo: nome da espécie, data da coleta e nome do coletor. Os tubos contendo as amostras de látex devidamente identificados foram envolvidos em papel alumínio e encaminhados ao Laboratório de Pós-colheita da UFERSA – Campus Mossoró, onde foram mantidos sob refrigeração a 4 °C e protegidos da luz até o momento da sua utilização nos experimentos, obedecendo ao prazo máximo de 48 horas para o início dos experimentos.



Figura 2: Em A, tem-se a imagem do exemplar de *J. mollissima* no qual realizou-se a coleta do látex; Em B, tem-se a representação da coleta de material para a realização da pesquisa. Arquivo pessoal, ANO 2017.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Extrato aquoso (EA)

O EA foi preparado pela adição de 10 mL do látex em 40 mL de água bidestilada sob agitação por um período de 24 horas. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel filtro qualitativo, sob vácuo, para separação do material insolúvel em água e obtenção do extrato aquoso bruto.

4.2.2 Extrato hidroalcoólico (EHA)

O EHA foi preparado pela adição de 10 mL do látex a 40 mL de uma solução de água bidestilada e álcool etílico absoluto 50% (v/v) sob agitação por um período de 24 horas. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel filtro qualitativo, sob vácuo, para separação do material insolúvel em solução e obtenção do extrato hidroalcoólico bruto.

4.2.3 Extrato etanólico (EE)

O EE foi preparado pela adição de 10 mL do látex a 40 mL de álcool etílico absoluto sob agitação por um período de 24 horas. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel filtro qualitativo, sob vácuo, para separação do material insolúvel em etanol e obtenção do extrato etanólico bruto.

4.2.4 Látex

Os dez mililitros do látex restante foram utilizados in natura na realização dos experimentos.

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, fêmeas, pesando inicialmente entre 180 g e 230 g, provenientes do biotério da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), local onde foram mantidos durante o período de experimentação. Eles foram pesados e alojados em

gaiolas de polipropileno (40 x 50 x 20 cm), mantidas em sala com temperatura entre (23 a 26 °C), umidade relativa do ar controlada, e com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Experimental Animal (CEEA) da UERN, número de protocolo 012/17 (Anexo A), sendo conduzido conforme as normas de bem-estar animal vigentes de acordo com o CONCEA e com as normas de experimentação animal Lei 11.794.

4.4 TESTES FITOQUÍMICOS

Os testes fitoquímicos qualitativos foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009), enquanto que a quantificação dos fenólicos totais seguiu a metodologia de Hatami et al. (2014) conforme descritos a seguir:

4.4.1 Teste para fenóis e taninos

Foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de Cloreto férrico (FeCl_3) 1% a 2 mL dos extratos em tubos de ensaio para teste. Os mesmos foram agitados a fim de avaliar variações na cor e a formação do precipitado, sendo observada a presença ou ausência da coloração azul ou verde característica. A tonalidade azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis, e verde, a presença de taninos condensados. Coloração variável entre o azul e o vermelho indicou a presença de fenóis.

4.4.2 Teste para flavonoides

Foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e magnésio), onde adicionou-se a 2 mL dos extratos, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita com 2 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação deu-se pelo término de efervescência. O aparecimento de coloração variando de parda a vermelha, indicou presença de flavonoides nos extratos.

4.4.3 Teste para saponinas

Em 2 mL dos extratos foram adicionados 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada em tubos de ensaio. Em seguida as soluções foram agitadas permanentemente por 3 minutos, observando a formação de espuma persistente e abundante, o que indicou a presença de saponinas.

4.4.4 Teste para esteroides e triterpenoides

Esse teste se dá pela reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2 mL dos extratos e misturando-os a 2 mL de clorofórmio em tubo de ensaio. Em seguida, a solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. Em tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de anidrido acético que foi agitado e acrescido de três gotas de H_2SO_4 concentrado. Após nova agitação observa-se o desenvolvimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde indica a presença de triterpenoides/esteroides.

4.4.5 Teste para antocianinas

Foram utilizados 3 frascos, onde o primeiro tubo foi acidulado com HCl 1% até o pH 3, o segundo tubo alcalinizado com NaOH 5% até o pH 8,5 e o terceiro até o pH 11. A cor vermelha no primeiro tubo, lilás no segundo e azul-púrpura no terceiro, confirma a presença de antocianinas.

4.4.6 Teste para Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos do látex e dos extratos dele derivados foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (HATAMI et al., 2014) com algumas adaptações. Esse reagente, de coloração amarela, forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos. Para tanto, 1 mL de cada extração foi adicionada em seguida aferida em balão volumétrico de 100 mL. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, após 5 minutos foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3 , 75 g.L⁻¹). Após 2 horas, a absorbância

foi medida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 760 nm contra um branco (metanol/água 20%). Para os cálculos de fenólicos totais, foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico (20 a 200 mg.L⁻¹), os resultados foram expressos em mg de ácido gálico (AG)/100g de amostra.

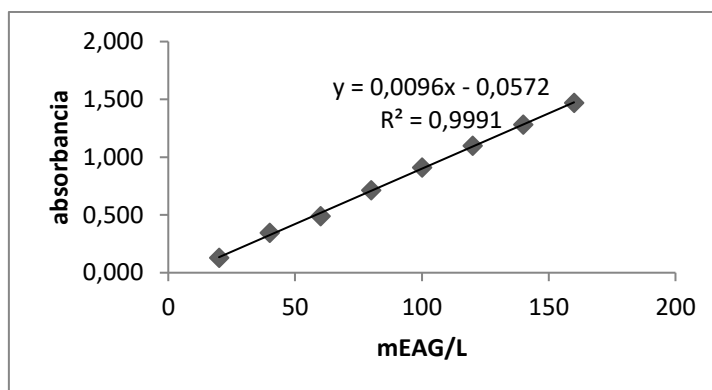


Gráfico1: Curva padrão de ácido gálico (20 a 200 mg.L⁻¹). R² = 0,9991.

4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

4.5.1 Teste de toxicidade aguda em ratos Wistar

Nos experimentos de toxicidade aguda foram utilizados oito ratos fêmea da linhagem Wistar, separados em dois grupos G1 e G2 de quatro animais cada. Os animais do G1 foram pesados e receberam uma dose única de látex via oral por gavagem, equivalendo a 2000 mg por quilo de massa corporal do animal (OECD, 2001). Após a administração, o grupo que recebeu o tratamento foi observado durante 4 horas seguidas e a cada 24 horas por um período de 14 dias, observando o surgimento de sinais tóxicos gerais baseada na metodologia proposta por Mariz et al. (2006) e adaptada, na qual avaliou-se, e.g, agitação psicomotora ou prostração, presença de contorções abdominais, aumento das evacuações, alterações da frequência respiratória e paralisias. Nesse período de observação ainda foram mensurados os seguintes parâmetros: evolução ponderal, consumo de água e de alimentos. Os consumos de água e ração foram avaliados diariamente e contabilizados por grupo, registrando-se os valores médios de cada um. Já a massa corporal foi verificada no início (d0), meio (d7) e ao final do experimento (d14). Ao término do experimento os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de xilazina 2% (10 mg.Kg⁻¹) e cloridrato de cetamina 10% (100 mg.Kg⁻¹), coletou-se o sangue através da veia porta para os exames hematológicos e bioquímicos e, em seguida, foram

eutanasiados por deslocamento cervical, conforme Neves, 2013. Realizou-se ainda a ressecção, pesagem e análise macroscópica do coração, fígado e rins. O G2 (controle) foi submetido ao mesmo processo, recebendo água destilada por via oral em substituição ao látex.



Figura 3: Punção de veia porta de rato Wistar para coleta de sangue venoso. Arquivo pessoal, ANO 2017.

4.6 AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante

4.6.1.1 Método do DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante do látex e dos extratos dele derivados foi utilizado o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) conforme descrito por Mensor et al. (2001). Amostras dos tipos de extratos aquoso, hidroalcoólico, etanólico e do látex bruto liofilizado foram diluídas nas concentrações de 1000, 750, 500 e 250 ppm. Em seguida 1 mL de cada amostra misturada com 1,5 mL com solução de DPPH (0,02 mg.mL⁻¹) diluído em metanol. As misturas foram mantidas durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as absorbâncias medidas em espectrofotômetro a 517 nm, e o controle a mistura de 1 mL de metanol com 1,5 mL da solução de DPPH. Os testes foram realizados em triplicata e o IC₅₀ foi obtido do gráfico da percentagem de inibição versus concentração, sendo IC₅₀ a concentração que inibiu em 50% do poder oxidante do DPPH.

4.6.2 Avaliação da atividade antibacteriana

As cepas bacterianas utilizadas foram provenientes de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC), devidamente caracterizadas morfolologicamente, fisiologicamente e bioquimicamente, sendo os ensaios realizados com bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Shigella flexneri* ATCC 12022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Inicialmente todas as cepas foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas para obter turvação equivalente ao padrão 0.5 da escala *Mac Farland* o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 1.5×10^8 UFC.mL⁻¹ (CLSI, 2015). Por meio de antibiograma realizado em triplicata através da técnica de difusão em ágar, constatou-se que a levofloxacina (5 µg) apresentava maior efeito quanto a inibição do crescimento bacteriano, para as cepas testadas, sendo utilizado como controle positivo; enquanto como controle negativo utilizou-se 40 µL de água destilada.

4.6.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da atividade bacteriana deu-se pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) que corresponde a menor concentração dos extratos e do látex da *J. mollissima* capazes de inibir as bactérias supracitadas. A CIM foi determinada através de testes de microdiluição em placa de 96 poços de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Em cada poço foram adicionados 20 µL do inóculo ajustado pela escala de McFarland, 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL do látex puro ou dos extratos dele derivados, nas diluições de 75%, 50% e 25% das amostras originárias. Nos poços de controle negativo foram adicionados o meio de cultura, inóculo do microrganismo e água destilada; enquanto para controle positivo adicionou-se o meio de cultura, inóculo do microrganismo e o antibiótico levofloxacina..

Após o período de incubação, de 24 horas a 37 °C foram acrescidos a cada um dos poços 10 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) a 1%, e as microplacas foram novamente incubadas a 37 °C por 2 horas (GONÇALVES et al., 2012).

Durante a leitura das placas, transcorrido o tempo de incubação, observou-se a mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante onde houve viabilidade bacteriana, e nos poços onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana e, conseqüentemente inibição dos microrganismos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.2.2 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM)

Nos poços da CIM em que não houve crescimento bacteriano foi feito o teste de concentração bactericida mínima (CBM) para avaliar se as concentrações do látex e dos extratos dele derivados eram bactericidas ou bacteriostáticas. Para isso, foi retirado 10 µL do poço onde não houve crescimento bacteriano visível, e semeou-se na superfície do ágar Mueller-Hinton. Após 48 horas de incubação a 37 °C, foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração do látex e de seus extratos em estudo, capaz de causar a morte dos microrganismos. (SANTÚRIO et al., 2007).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados fazendo uso de planilhas eletrônicas e aplicando técnicas de estatística descritiva, as representações foram realizadas em média e desvio padrão. Comparações entre os grupos foram avaliadas usando o teste t de *student* ou a análise de variância (ANOVA), seguidos de pós-teste de comparação múltipla por Tukey, quando os resultados foram considerados normais, e quando não normais por Kruskal-wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Foram pesados 10 mL de látex em balança analítica para avaliação de rendimento, sendo obtida a massa de 10,5 g, ou, 1,05 g.mL⁻¹, correspondente ao valor da sua densidade. Após evaporação do conteúdo líquido do látex foi obtido sua massa seca equivalente a 0,19 mg para cada mililitro, resultando em um rendimento de 18%. Os extratos derivados do látex também tiveram suas massas aferidas antes e após a evaporação dos solventes, permitindo calcular as seguintes concentrações: 0,016 g.mL⁻¹ de EA; 0,031 g.mL⁻¹ de EHA; 0,032 g.mL⁻¹ de EE. A partir desses valores foi possível calcular os rendimentos para os extratos conforme a tabela 2. Os testes foram realizados triplicata.

Tabela 2: Rendimento dos extratos aquoso, extrato hidroalcoólico e extrato etanólico.

Análises	Extratos		
	EA	EHA	EE
Matéria seca (mg.mL ⁻¹)	16.1	31.4	32.2
Rendimento (%)	8.6	16.8	17.2

As massas secas do látex e dos seus extratos não foram utilizadas nos experimentos a seguir em decorrência de suas baixas solubilidades, testada tanto em solventes polares quanto apolares, possivelmente resultantes do processo lento de resfriamento das amostras e da liofilização a que foram submetidas para retirada de água. Acredita-se que possa ter havido polimerização de moléculas contidas no látex, formando uma espécie de borracha de baixa solubilidade.

5.2 TESTES FITOQUÍMICOS

A prospecção dos compostos secundários presentes nos extratos de *J. mollissima* e em plantas do gênero já foram previamente descritos em alguns trabalhos (ARAÚJO et al., 2008; ZHANG et al., 2009; MELO et al., 2010; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; SABANDAR et al., 2013; SILVA et al., 2014; GOMES, 2016). Contudo, a extração desses constituintes está diretamente relacionada ao método, aos solventes e até às partes das plantas

empregadas na preparação dos extratos, permitindo variações em um mesmo exemplar, e justificando a avaliação destes nos extratos em estudo. No presente trabalho, a prospecção dos constituintes químicos dos extratos de *J. mollissima* apresentaram resultados positivos para compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, e saponinas, como pode ser visto nas figuras abaixo:



Figura 4: Da esquerda para a direita, tubos de ensaio contendo látex, seguido pelo EA, EHA e EE. Arquivo pessoal, ANO 2017.

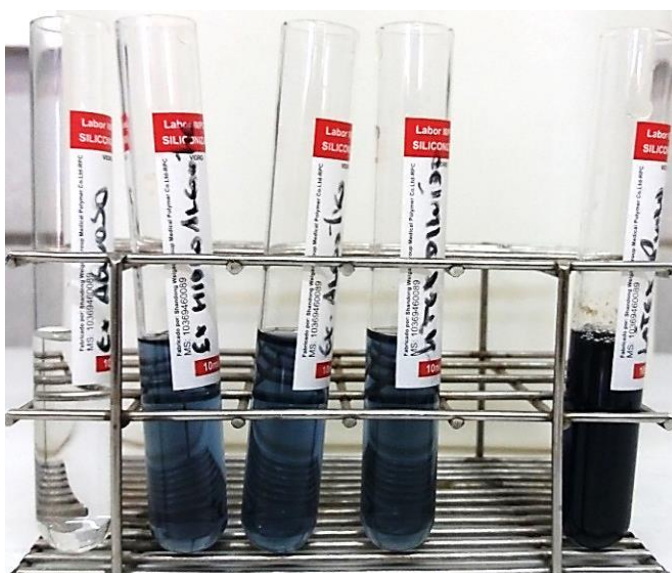


Figura 5: Detecção de compostos fenólicos pela adição do reagente Folin-Ciocalteu. Arquivo pessoal, ANO 2017.



Figura 6: Teste para fenóis e taninos pela adição de Cloreto Férrico 2%. Arquivo pessoal, ANO 2017.



Figura 7: Teste de Shinoda. Arquivo pessoal, ANO 2017.



Figura 8: Detecção de saponinas pela adição de clorofórmio e agitação da mistura. Arquivo pessoal, ANO 2017.

A figura 5 evidencia uma gradação da cor azul, do menos intenso ao mais intenso (da esquerda para direita), o que mostra maior concentração de compostos fenólicos no látex e a menor no extrato aquoso. A figura 6 evidencia uma coloração entre o verde claro no extrato aquoso e o azul escuro no extrato alcoólico, o que denota a presença de fenóis e taninos. A figura 7 apresenta-se positivo para flavonóides, pois revelou uma coloração avermelhada, mais evidente no extrato alcoólico. A figura 8 constatou a presença de saponinas através da presença de espuma, mais proeminente no látex e no extrato hidroalcoólico. Os testes qualitativos para terpenos e antocianinas não foram ilustrados por terem sido negativos. A tabela abaixo ilustra os compostos bioativos presentes (+) e ausentes (-) nos testes qualitativos.

Compostos bioativos	Látex	EA	EHA	EE
Fenóis	+++	+	++	+++
Taninos	+++	+	++	+++
Flavonóides	+++	+	++	+++
Saponinas	+++	+	++	+++
Esteróides	-	-	-	-
Triterpenóides	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-

Araújo et al. (2008) realizaram uma pesquisa na qual foram escolhidas 33 espécies de plantas da caatinga, com base na sabedoria popular, com supostos poderes de cura e efeito antiinflamatório. Eles Partiram do pressuposto que esses efeitos derivavam dos compostos fenólicos como taninos e flavonóides. Realizaram então testes quantitativos para determinação desses compostos e confirmaram suas presenças no látex da *J. mollissima*, dentre outras plantas. A análise estatística permitiu associar os efeitos antiinflamatórios dessas plantas ao tanino, contudo, essa relação não foi associada à presença dos flavonóides. Já Melo et al., em 2010, pesquisaram o conteúdo de taninos e as capacidades antioxidantes e antiproliferativas de

extratos de 14 plantas do semiárido, encontrando elevados níveis de taninos e poder antioxidante da *J. mollissima*, estando de acordo com os dados do presente estudo.

No trabalho de Gomes et al. (2016), utilizou-se o extrato aquoso das folhas de *J. mollissima* a fim de pesquisar seu efeito antiofídico. Através da análise de cromatografia em camada delgada permitiu-se concluir que predominam os compostos flavonóides e saponinas em sua constituição. Já Braquehais et al. (2016) realizaram a análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima* e verificaram a presença de cumarinas, taninos, flavonóides, alcalóides e esteróides, porém não detectaram a presença de triterpenóides, o que também está em consonância com os resultados dessa pesquisa.

Zhang et al. (2009), Devappa; Makkar; Becker (2010), Sabandar et al. (2013) e Silva et al. (2014) realizaram revisões de literatura a respeito das propriedades medicinais e fitoquímica de espécies do gênero *Jatropha*. As prospecções identificaram alcalóides, terpenos, flavonóides, peptídeos cíclicos, lignanas, compostos fenólicos, saponinas, esteroides, entre outros, em diversas partes das plantas como peptídeos cíclicos no látex e terpenos nas raízes e caules. Propriedades farmacológicas com ação citotóxica, antimicrobiana, anticoagulante, antiinflamatória, antioxidante e toxicidade também foram discutidas nessas revisões.

Foi ainda possível quantificar os fenóis totais presentes no látex e extratos através de uma curva de calibração com um padrão de equivalência ao ácido gálico. Desta forma, o látex e os extratos avaliados apresentaram baixos teores de compostos fenólicos, variando de 0,82 mgEAG/g do extrato aquoso a 58,07 mgEAG/g do látex (Tabela 4), quando comparados a outras plantas medicinais descritas na literatura. Souza et al. (2007), analisando extratos etanólicos de *Terminalia brasiliensis* Camb., *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc., *Copernicia cerifera* (Miller) H.E. Moore, *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire e *Qualea grandiflora* Mart obtiveram valores entre 250 e 763 mg EAG/g.

Tabela 4: Análise dos fenólicos totais, representados como média $\pm$ desvio padrão da média. Diferença estatística calculada aplicando ANOVA associada ao teste T de Tukey ($p \leq 0.05$).

Amostra	mgEAG.g ⁻¹ amostra
Extrato aquoso	0.82 $\pm$ 0.02 a
Extrato Hidroalcoólico	45.68 $\pm$ 0.43 b
Extrato alcoólico	50.00 $\pm$ 0.97 b
Látex in natura	58.07 $\pm$ 0.77 b

Letras diferentes indicam diferença estatística.

5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Não houve morte para as doses de 2000 mg.Kg⁻¹ de látex administradas oralmente nos ratos ou para o grupo controle, portanto não foi possível determinar DL₅₀, sugerindo baixa toxicidade e segurança em sua administração.

As alterações comportamentais observadas após administração do látex foram agitação inicial, seguida de letargia e taquipnéia. Esses efeitos desapareceram poucas horas após a administração. Não foram observadas ou tiveram pouca relevância as alterações motora e/ou sensitiva quando comparadas aos seus controles.

O consumo médio de água ao dia foi de 107 mL para grupo tratado com o látex e 120 mL para o controle. Em relação à ração houve um consumo médio de 47,4 g e 64,1 g ao dia para o grupo tratado e para o controle, respectivamente. Essas diferenças decorreram especialmente dos dois primeiros dias da pesquisa nos quais o grupo tratado com látex praticamente não consumiu água ou ração, equiparando o consumo ao grupo controle nos dias subsequentes.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos estão representados na tabela 4. Apenas os parâmetros Hemoglobina e a hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle. Contudo, as linhagens celulares (hemácias, leucócitos e plaquetas) não mostraram alterações significativas o que sugere ausência ou baixa toxicidade medular, na dose adotada. As provas de função e os marcadores de lesão hepática (AST, ALT, GGT e albumina), bem como a função renal (uréia e creatinina) não mostraram diferenças significativas frente ao G2 (controle), evidenciando a ausência ou baixas toxicidades hepática e renal. Esses resultados, exceto hemoglobina, contagem de leucócitos e de plaquetas, assemelham-se aos parâmetros provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe (MELO et al., 2012).

Tabela 5: Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos tratados com o látex G1 do pinhão bravo (*Jatropha mollissima*) e G2 (controle), representados pela média $\pm$ desvio padrão da média.

Parâmetros	G1	G2(controle)
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	$7,70 \pm 0,37$ a	$7,47 \pm 0,15$ a
Hemoglobina (g/dL)	$11,85 \pm 0,24$ a	$13,21 \pm 0,10$ b
Hematócrito (%)	$43,0 \pm 1,0$ a	$42,0 \pm 1,0$ a
VCM (f)	$54,75 \pm 2,22$ a	$55,67 \pm 0,58$ a
CHCM (g/dL)	$0,28 \pm 0,00$ a*	$0,32 \pm 0,00$ b*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$2,62 \pm 0,76$ a	$2,33 \pm 0,23$ a
Neutrófilos (%)	$22,0 \pm 9,0$ a	$25,0 \pm 11,0$ a
Linfócitos (%)	$74,0 \pm 11,0$ a	$69,0 \pm 9,0$ a
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$387,50 \pm 52,52$ a	$549,00 \pm 122,12$ a
TGO/AST (U/L)	$81,00 \pm 20,54$ a	$73,00 \pm 11,17$ a
TGP/ALT (U/L)	$51,50 \pm 17,23$ a	$67,00 \pm 5,42$ a
GGT (U/L)	$5,75 \pm 3,98$ a	$2,88 \pm 1,15$ a
Proteínas Totais (g/dL)	$6,25 \pm 0,38$ a	$6,05 \pm 0,50$ a
Albumina (g/dL)	$4,25 \pm 0,40$ a	$4,13 \pm 0,36$ a
Globulinas (g/dL)	$2,00 \pm 0,22$ a	$1,93 \pm 0,30$ a
Relação A/G	$1,98 \pm 0,60$ a	$1,87 \pm 0,41$ a
Uréia (mg/dL)	$49,00 \pm 3,56$ a	$53,00 \pm 5,89$ a
Creatinina (mg/dL)	$0,65 \pm 0,10$ a	$0,65 \pm 0,10$ a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, calculada aplicando o teste t de Student ($p \leq 0.05$). * Diferença calculada pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

As massas dos ratos sofreram pequena redução durante a primeira semana do experimento e apresentaram quase completa recuperação ao seu término. Já o grupo controle

apresentou um crescimento linear das massas ao final do teste, contudo essas alterações não foram significantes (Gráfico 2).

Os órgãos, fígado, rins e coração, não mostraram alterações macroscópicas, assim como suas respectivas massas não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (Gráficos 3, 4 e 5).

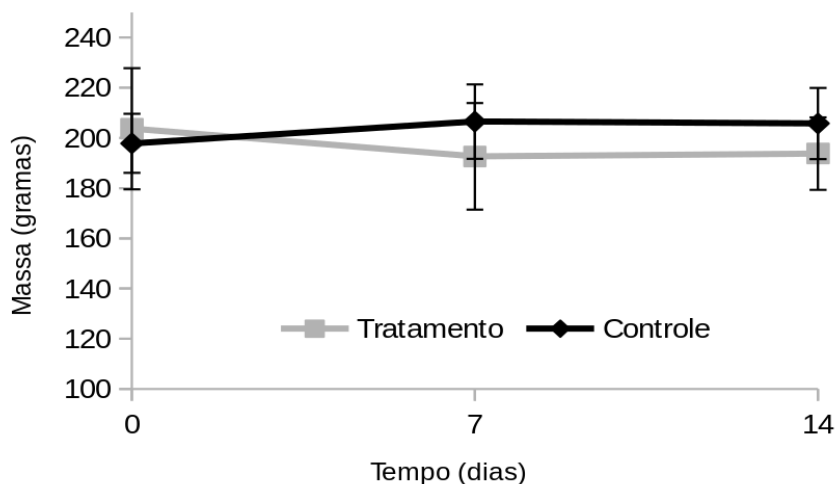


Gráfico 2: Média da massa corporal dos ratos durante o experimento de 14 dias. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de *student* ($p \leq 0,05$).

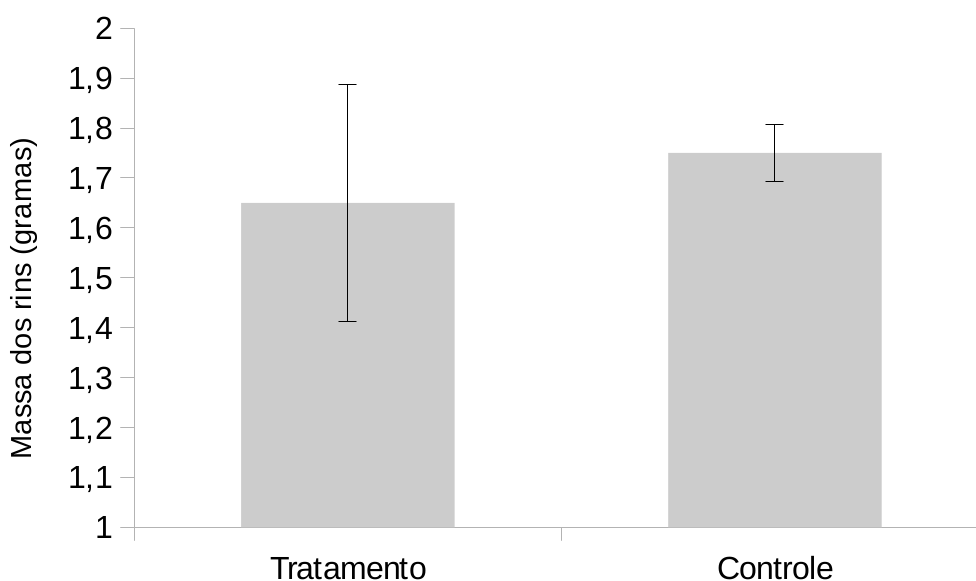


Gráfico 3: Média da massa dos dois rins dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de *student* ($p \leq 0,05$).

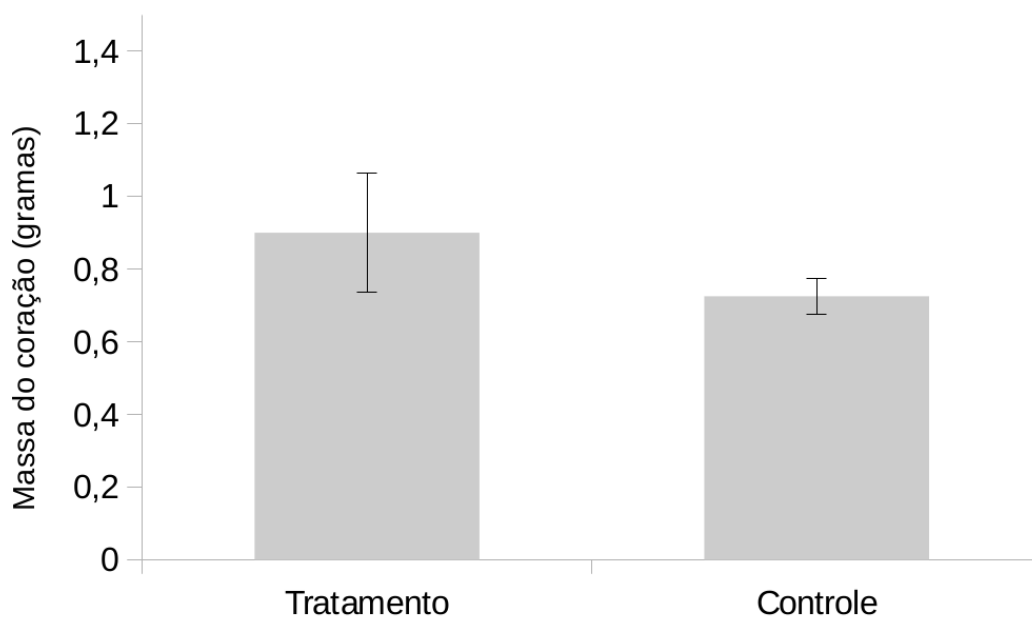


Gráfico 4: Média da massa do coração dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de *student* ($p \leq 0,05$).

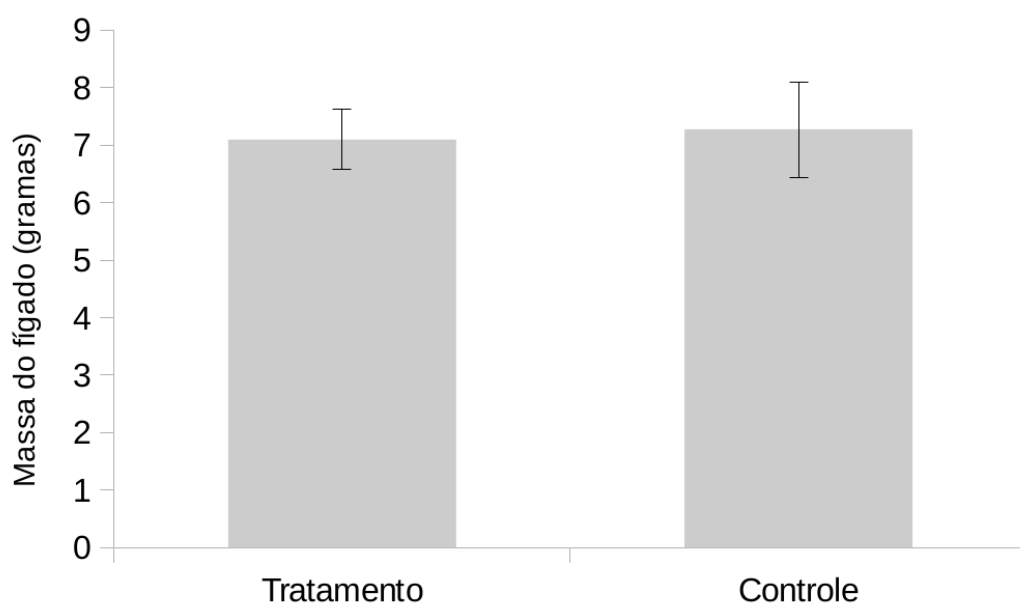


Gráfico 5: Média da massa fígado dos ratos após 14 dias de experimento. Barras acima dos gráficos indicam o desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Diferença calculada pelo teste t de *student* ($p \leq 0,05$).

Mariz et al. em 2006 obtiveram um extrato etanólico derivado de folhas e caule de *J. gossypifolia* e o testaram em ratos Wistar em doses até 5000 mg.Kg⁻¹. Esse teste mostrou baixa toxicidade aguda oral para doses inferiores à 2000 mg.Kg⁻¹ desses extratos e alterações histopatológicas pouco significativas nos animais tratados com a maior dose experimental (MARIZ et al., 2008), semelhante aos resultados obtidos nessa pesquisa.

Vários estudos têm demonstrado os efeitos terapêuticos dos extratos de plantas, todavia, tais produtos devem ser avaliados por meio de testes toxicológicos capazes de estabelecer intervalos de segurança no uso, bem como os efeitos colaterais e as reações adversas. Nesse estudo o valor da DL₅₀ para a administração oral do látex de *J. mollissima* foi superior a 2000 mg.Kg⁻¹, podendo ser enquadrada na Categoria 5 de toxicidade, segundo a GHS, sendo considerada de baixa toxicidade.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada pela determinação da captação do radical DPPH (IC₅₀) pelo Látex de *J. mollissima* e pelos extratos dele derivados. Quanto mais baixo for o valor da IC₅₀ maior é a potência antioxidante, haja vista que uma quantidade menor da substância será necessária para promover a redução de 50% do reagente. Nesse contexto, o Látex, mostrou-se mais efetivo quando comparado ao extrato etanólico que, por sua vez mostrou-se mais efetivo que o extrato hidroalcoólico, sendo ambos mais efetivos que o extrato aquoso, o que pode estar relacionado à elevada presença de compostos fenólicos (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade antioxidante representada como média ± desvio padrão. Diferença estatística calculada aplicando ANOVA, associada ao teste T de Tukey ($p \leq 0.05$).

Amostra	IC ₅₀ (ppm)
Extrato aquoso	17759,83 ± 3267,63 a
Extrato Hidroalcoólico	167,66 ± 7,04 b
Extrato alcoólico	127,30 ± 3,90 b
Látex in natura	124,27 ± 7,75 b

Letras diferentes indicam diferença estatística.

No trabalho de Melo *et al.* (2010) destacam-se a *Poincianella pyramidalis*, *Jatropha mollissima*, *Anadenanthera colubrina* e *Croton blanchetianus*, por mostrarem os menores IC₅₀. O controle utilizado neste ensaio foi o ácido ascórbico, que mostrou uma IC₅₀ de 21,74 ± 3,23 µg. Em geral, os valores de IC₅₀ das plantas analisadas variaram de 42,95 a 94,41 ± 2,67 µg.mL⁻¹, sendo o IC₅₀ da *J. mollissima* igual a 54,09 ± 4,36 µg.mL⁻¹.

Melo *et al.* (2010) classificaram a atividade antioxidante de seus extratos como: boa (IC₅₀ < 65 µg), moderada (65 µg < IC₅₀ < 152 µg) e baixa (IC₅₀ > 152 µg) atividade. Neste caso, conclui-se que a *J. mollissima* apresentou uma boa atividade antioxidante, destoando dos resultados da nossa pesquisa que evidenciou ação moderada para o látex e extrato etanólico, e baixa para os extratos hidroalcoólico e aquoso. Este fato pode estar associado ao método de extração, já que solventes diferentes foram empregados, ou pelas partes da planta usadas no preparo.

A atividade antioxidante está intimamente relacionada ao conteúdo de fenóis, uma vez que os compostos fenólicos estão incluídos na classificação de antioxidantes (MELO *et al.*, 2010). Assim podemos observar que essa relação foi provada para o látex de *J. mollissima*, uma vez que o mesmo apresentou uma melhor atividade antioxidante e também apresentou o maior teor de fenóis totais. Em oposição, o extrato aquoso apresentou o menor valor para os fenóis totais e a menor atividade antioxidante.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados obtidos, de acordo com variação das concentrações, estão apresentados na Tabela 7. Na leitura, a mudança da cor azul para rosa é simbolizada pelo (-), o que caracteriza a redução do corante resazurina nos poços onde houve viabilidade bacteriana, e nos poços onde a cor permaneceu azul, simbolizados pelo (+), não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana e, conseqüentemente inibição dos microrganismos. Verificou-se no teste da CBM, que não houve morte das bactérias, sendo os extratos analisados bacteriostáticos.

Tabela 7. Determinação da concentração inibitória mínima em ensaio com resazurina 0,01%

Amostras Cepas	Látex %				Extrato etanólico %				Extrato hidroalcoólico %				Extrato aquoso %			
	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. typhimurium</i>	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. flexneri</i>	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. pyogenes</i>	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. mutans</i>	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>S. aureus</i>	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

%; Concentração em percentagem

A atividade antibacteriana do látex e seus extratos pode estar relacionada à ação de compostos fenólicos, marcadamente taninos e flavonóides, presentes em suas composições. Esses metabólitos secundários podem agir provocando hidrólise de ligações ou formando complexos com proteínas das bactérias, promovendo a desagregação da membrana plasmática e parede celular da bactéria, culminando com sua destruição (BRAQUEHAIS et al., 2016).

Por se tratarem de moléculas grandes e de baixa polaridade, podem não terem sido extraídas na preparação do extrato aquoso, o que justificaria ter sido o único extrato sem efeito em qualquer das concentrações testadas. O contrário é verdadeiro, pois a presença do álcool, substância mais apolar, nos outros extratos, viabilizou a extração desses metabólitos, proporcionando maior efeito antibacteriano.

Camelo em 2015, estudando o látex da *J. mollissima* encontrou uma CIM maior que 8192 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *E. faecalis* e para as Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. Já Rocha; Dantas (2009), fizeram um estudo comparativo das CIM entre os látex de *J. mollissima* e *J. gossypifolia*, mostrando ambas as plantas com atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Silva (2017), estudando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos das folhas, galhos e caule da *J. gossypifolia* contra as cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* encontrou as menores CIM, isto é, maior potencial antibacteriano, nas folhas contra o *S. aureus* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), folhas e galhos contra a *P. aeruginosa* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), porém não verificou atividade contra a *E.*

coli, estando parcialmente em desacordo com os resultados de Camelo (2015) e com os nossos, que também mostraram atividade do látex e dos EE e EHA contra a *E. coli*.

Na avaliação *in vitro*, através do teste de difusão em ágar, da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* frente às cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, Braquehais et al. (2016) constataram somente a ação antibacteriana do extrato, na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contra essa última.

Objetivando delimitar o potencial antibacteriano de extratos derivados de plantas, determinou-se que valores de CIM inferior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresenta boa atividade antimicrobiana, entre 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ moderadamente ativa e entre 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pouco ativa, e CIM maior que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inativa (HOLETZ et al., 2002).

Embora nossa pesquisa tenha realizado um teste qualitativo, sugere-se que o látex de *J. mollissima* e os extratos etanólico e hidroalcoólico possam ser utilizados como agentes antibacterianos, uma vez que, mesmo muito diluídos, foram capazes de inibir as cepas testadas. Esses resultados confirmam o potencial antibacteriano do gênero *Jatropha* apresentado por outros autores (MARIZ et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O látex e o extrato etanólico da *J. mollissima* apresentaram quantidades expressivas de compostos bioativos, como taninos, flavonoides, e saponinas, além de moderada atividade antioxidante. O látex também apresentou, para a dose administrada, baixa toxicidade aguda em ratos Wistar, sendo necessários testes de toxicidade subcrônica e crônica para complementação da avaliação toxicológica.

Os ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* mostraram que o látex e os extratos, etanólico e hidroalcoólico, promoveram inibição de crescimento tanto das bactérias gram-positivas como das gram-negativas testadas, mesmo em baixas concentrações, para algumas cepas.

O estudo da *J. mollissima* mostrou resultados que corroboram seu uso como fitoterápico, porém carece de estudos mais aprofundados para elucidação de todo o seu potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEIXO, A. A.; HERRERA, K. M. S.; RIBEIRO, R. I. M. D. A.; LIMA, L. A. R. D. S.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres**, v. 60, n. 5, p. 731–734, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2013000500019>. Acesso em: dia mês. Ano.

ALMEIDA, J. M. D.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30196.pdf>>.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231–235, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n2/16.pdf>>.

ARAÚJO, J. L.; LEMOS, J. R. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho, Luís Correia, Piauí, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 28, n. 2, p. 125–136, 2015. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2015v28n2p125>.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43–50, 2010. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v11i2.21366>.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. Disponível em: <file:///C:/Users/Ufersa3BV/Desktop/Rafael/Birden,%202012.pdf>.

BRAQUEHAIS, I.; VASCONCELOS, F.; RIBEIRO, A.; SILVA, A. R. A.; FRANCA, M.; LIMA, D. R.; MAGALHÃES, F. Toxicological, antibacterial, and phytochemical preliminary study of the ethanolic extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (pinhão-bravo, Euphorbiaceae) leaves, collected in Tauá, Ceará, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, 582–587, 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_164.

BROINZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. D.; SILVA, A. M. D. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; MANCINI-FILHO, J. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 902–908, 2007.

CAMELO, S. B. Avaliação da atividade antimicrobiana do látex de *Jatropha mollissima* Pohl Baill e *Sapium glandulosum* (L.) Morong. 2015. 32p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015. Disponível em: < <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/12238>>.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25 (ISBN 1-56238-989-0. [Print]; ISBN 1-56238-990-4 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Botanical medical knowledge of native species of the Caatinga and spontaneous plants in the Agreste region of the state of Paraíba, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 685–692, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_077.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 3, p. 301–322, 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-010-1720-9>>.

FREITAS, A.; COELHO, M.; PEREIRA, Y.; FREITAS NETO, E. C.; AZEVEDO, R. Diversity and uses of medicinal plants in homegardens at the community São João da Varzea, Mossoró, RN. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 845–856, 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_080.

GOMES, J. A. S.; SILVA, J. F.; FERNANDES, J. M.; AMARAL, J. G.; LOPES, N. P.; EGITO, E. S. T.; PEDROSA, M. F. F. Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail decreases local effects induced by bothropic venom. **BioMed research international**, v. 2016, n. 2016, p. 1–13, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6101742>.

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M. A.; OLIVEIRA, F. F. M.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, C. B. M.; Cabral, P. B.; SANTIAGO, T. M.; SOUSA, J. S.; BARROS, E. B.; NASCIMENTO, R. F.; DIAS, A. T. N. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 11, p. 962–968, 2012.

HATAMI, T.; EMAMI, S. A.; MIRAGHAEI, S. S.; MOJARRAB, M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 551–559, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4157030>>.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.

LEAL, C. K. A.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. E *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 5–13, 2005. Disponível em: <www.latamjpharm.org/trabajos/24/1/LAJOP_24_1_1_1_6WQ842B4X2.pdf>.

MARIZ, S. R.; ARAÚJO, M. S.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; DINIZ, M. F.; MEDEIROS, I. A. Histopathological evaluation in rats after acute treatment with the ethanol extract from aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 213–216, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200012>.

MARIZ, S. R.; BORGES, A. C. R.; MELO-DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 346–357, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n3/13.pdf>>.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Acute toxicological studies of the ethanol extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 372–378, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300015>.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009. p. 47–54.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534–8542, 2010.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, A. A. G.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar)

provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4 (a), 2012.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. D.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.687>.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-971236>.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 888 p.

NEVES, S. M. P. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo : FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

ODUOLA, T. ADEOSUM, O. G.; ODUOLA, T. A.; AVWIRORO, O. G.; OYENIYI, M. A. Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent. **European Journal of Gen Medicines**, v. 2, n. 4, p. 140–143, 2005. Disponível em: <<http://www.ejgm.org/upload/sayi/1009/EJGM-00082.pdf>>.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PIMENTEL, L. A.; RIET-CORREA, B.; DANTAS, A. F.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Poysoning by *Jatropha ribifolia* in goats. **Toxicon**, v. 59, n. 5, p. 587–591, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.002>.

RIBEIRO, A.R.C.; ANDRADE, F. D.; MEDEIROS, M. C.; CAMBOIM, A. S.; PEREIRA JÚNIOR, F. A.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; Silva, W. W. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 1051–1055, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014001100002>.

ROCHA, F. A. G.; DANTAS, L. I. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, v. 4, n. 1, p. 3–11, 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/4815/481549228001>>.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginghas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31–42, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n1/v12n1a06>>.

ROSA, C.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Chemical composition and toxicity against *Aedes aegypti* L. and *Artemia salina* Leach of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 19–26, 2016. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_006.

SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M.; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, n. 1, p. 7–29, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.009>.

SANTÚRIO, J. M.; SANTÚRIO, D. F.; POZZATI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N. A família *Euphorbiaceae* nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilia**, v. 22, n. 1, p. 99–118, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v22n1/a13v22n1.pdf>>.

SILVA, J. F.; GIORDANI, R. B.; SILVA-JUNIOR, A. A. D.; ZUCOLOTTO, S. M.; PEDROSA, M. D. F. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2014, n. 2014, p. 1–32, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/369204>.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1–17, 2010.

SILVA, P. S. G. **Avaliação antimicrobiana e cicatrizante de extratos da *Jatropha gossypifolia* L.: estudo *in vitro***. 2017. 77 p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1753>>.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; CHAVES, M. H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008. 704 p.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 3–32, 1994. <http://dx.doi.org/10.2307/2399908>.

ZHANG, X. P.; ZHANG, M. L.; SU, H.; HUO, C. H.; GU, I. C.; SHI, Q. W. Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 12, p. 2166–2183, 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200700461>.

ANEXO A

Governo do Estado do Rio Grande do Norte

Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC UNIVERSIDADE DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO NORTE – UERN

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Rua Miguel Antônio da Silva Neto, s/n - Aeroporto – Fone: (84)3318-2596

Home page: <http://www.uern.br> - e-mail: ceua@uern.br – CEP: 59.607-360 - Mossoró –RN

PARECER CONSUBSTANCIADO CEEA/UERN N° 012/17

N° PROTOCOLO (CEP)	012/17
Título do Projeto	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DO LÁTEX DO PINHÃO-BRAVO (<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.
1 – RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(a) relator(a)	
A pesquisa é um projeto de mestrado onde o objetivo é avaliar a composição química, identificando os principais metabólitos secundários a partir de métodos qualitativos, e as atividades farmacológicas do látex do pinhão-bravo como toxicidade, através do teste de toxicidade aguda em ratos e ações antioxidante, de acordo com o método fotolorimétrico do radical livre DPPH, e antimicrobiana, através do método da difusão de discos e da concentração inibitória mínima. Nos experimentos de toxicidade aguda serão utilizados ratos fêmea da linhagem Wistar, separados em dois grupos de quatro animais cada. Os animais serão pesados individualmente a fim de se determinar as doses a serem administradas por via oral em dose única, equivalendo a 2000 mg de látex por quilo de massa corporal do animal. Após a administração, o grupo que receber o tratamento será observado durante 4 horas seguidas e a cada 24 horas por um período de 14 dias, observando o surgimento de sinais tóxicos gerais. Nesse período de observação ainda serão mensurados os seguintes parâmetros: evolução ponderal, consumo de água e de alimentos. Os consumos de água e ração serão avaliados diariamente e contabilizados por grupo, registrando-se os valores médios de cada um. Já a massa corporal será verificada no início (D0), meio (D7) e ao final do experimento (D14). Ao término do experimento os animais serão anestesiados com xilazina/cetamina, realizar-se-á a coleta de sangue para os exames hematológicos e bioquímicos e, em seguida, serão eutanasiados por deslocamento cervical. Será realizada ainda a ressecção, pesagem e análise macroscópica das vísceras (fígado, rins, coração). Um grupo controle com quatro fêmeas será submetido ao mesmo processo, contudo a substância administrada via oral será água destilada. Os animais serão alojados em gaiolas de polipropileno contendo no máximo 4 animais por gaiola, que serão mantidas em sala adequada com temperatura e umidade relativa do ar controlados, e com ciclo de luz claro/escuro de 12h. Água e ração serão oferecidas <i>ad libitum</i> durante todo o procedimento experimental. Cada gaiola será identificada com o grupo e data correspondente ao tipo de procedimento realizado.	

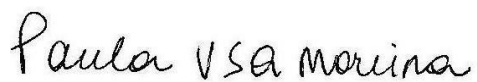
2 – ENTEDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O Presente projeto de pesquisa está em conformidade com as normas de experimentação animal. Lei

3- PARECER

O Protocolo de Pesquisa encontra-se APROVADO.

Mossoró, 21 de Dezembro de 2017



Paula Viviane Souza de Queiroz Moreira
Coordenadora CEEA/UERN