



**Universidade Federal do Pará**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

ANDREX AUGUSTO SILVA DA VEIGA

**ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ABORDAGEM  
DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Jatropha  
gossypifolia* L.**

Belém – PA

2008

ANDREX AUGUSTO SILVA DA VEIGA

**ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ABORDAGEM  
DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Jatropha  
gossypiifolia* L.**

Dissertação apresenta por Andrex Augusto Silva da Veiga ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, visando obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Belém – PA

2008

**ANDREX AUGUSTO SILVA DA VEIGA**

ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E ABORDAGEM DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Jatropha gossypifolia* L.

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará.

---

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa - UFPA  
ORIENTADOR

---

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira  
COORDENADOR DO CURSO

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez – UFPA

---

Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges – UFPA

---

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa – UFPA

Belém – PA  
2008

## **AGRADECIMENTOS**

Deus obrigado por mostra-me todos os caminhos: das realizações como também dos obstáculos sendo este para que percebesse como posso superá-los e transformá-los em realizações. Obrigado.

Aos meus pais Luiz Veiga e Maria Veiga, e minha irmã Andréa Veiga por ter me amparado com carinho e compreensão em variadas situações.

Ao professor Wagner Barbosa pela orientação, dedicação, paciência, confiança, amizade e ajuda também fora da universidade.

Ao Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira por colaborar na atividade microbiológica – Laboratório de Microbiologia - UFPA

Ao Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges por colaborar na atividade antioxidante – Laboratório de Química Farmacêutica - UFPA

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Melo e ao Mestre Cláudio R. Novello pela orientação no processo de separação de substâncias por CLMP – Universidade Estadual de Maringá e pela ajuda fora da universidade.

Ao Prof. Dr. Frank Petereit do Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica da Universidade de Münster, Alemanha, pela realização das análises por Ressonância Magnética Nuclear das substâncias.

Aos professores da graduação e pós-graduação pelo aprendizado acadêmico.

Ao Sr. Paulo Barros, responsável técnico do horto de plantas medicinais na EMBRAPA – PA, pela ajuda na coleta do material vegetal.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Fitoquímica da UFPA, do Programa de Pós-graduação em Ciência farmacêutica e aos novos amigos da UEM.

À Universidade Federal do Pará, Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Fitoquímica pelo conhecimento e experiência adquirida.

À EMBRAPA-PA por conceder o material vegetal para realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AACSIM	Associação dos Agentes Comunitários de Saúde de Igarapé-Miri
AcOEt:	Acetato de etila
CCD:	Cromatografia em camada delgada
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
MeOH:	Metanol
CLMP:	Cromatografia líquida de média pressão
DPPH <sup>•</sup> :	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<i>fr</i> :	Fator de retenção
rpm:	rotações por minuto
<i>tr</i> :	Tempo de retenção
UV:	Ultravioleta
$\lambda$ :	Comprimento de onda

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Representação esquemática dos procedimentos adotados para preparação de extratos e frações.....	31
<b>Esquema 2:</b> Representação esquemática do fracionamento da Fração acetato de etila.....	32
<b>Esquema 3:</b> Representação esquemática do agrupamento das subfrações após novo fracionamento.....	38
<b>Esquema 4:</b> Rendimento em gramas e em percentagem da partição líquido-líquido.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exemplos de estrutura de lignanas e neolignana.....	22
<b>Figura 2:</b> Exemplos de estrutura de alolignanas e norlignanas.....	22
<b>Figura 3:</b> Exemplos de estrutura de oligolignóides e heterolignóides.....	23
<b>Figura 4:</b> Exemplos de taninos hidrolisáveis e de taninos condensados..	24
<b>Figura 5:</b> Fotografia da Exsicata de <i>Jatropha gossypifolia</i> .....	28
<b>Figura 6:</b> Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS-II) – (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água - 100:11:11:26); observado sob luz UV a 254nm.....	43
<b>Figura 7:</b> Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração Clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS –II) – (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água - 100:11:11:26); revelado com FeCl <sub>3</sub> a 1%.....	44
<b>Figura 8:</b> Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração Clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS-II) – (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água - 100:11:11:26); revelado com solução metanólica de DPPH* e observado sob luz UV a 365nm.....	44
<b>Figura 9:</b> Cromatograma de CLAE do EEB registrado a 280 nm, observa-se tempo de retenção médio <i>tr</i> 13,24 min; 15,02 min e 16,00 min. Espectros correspondentes para todos os <i>tr</i> 13,24min (a), 15,02min (b) e 16,00min (c).....	46

<b>Figura 10:</b>	Cromatograma de CLAE do FA-I registrado a 280 nm, observa-se tempo de retenção médio <i>tr</i> 13,36min, 15,05min e 16,08min. Espectros correspondentes para todos os <i>tr</i> 13,36min (a), 15,05min (b) e 16,08min (c).....	47
<b>Figura 11:</b>	Cromatograma de CLAE do Jg 1 registrado a 280 nm, observa-se o primeiro pico a <i>tr</i> 13,36 min ( $\lambda$ : 218,6nm; 266,6nm; 349nm).....	48
<b>Figura 12:</b>	Cromatograma de CLAE do Jg 2 registrado a 280 nm, observa-se o primeiro pico a <i>tr</i> 16,09 min. ( $\lambda$ :214,8; 268,8; 336,1).....	49
<b>Figura 13:</b>	Linearidade do método para Jg1.....	49
<b>Figura 14:</b>	Linearidade do método para Jg2.....	50
<b>Figura 15:</b>	Curva de calibração para Jg1.....	52
<b>Figura 16:</b>	Curva de calibração para Jg2.....	53
<b>Figura 17:</b>	Avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB): 125 $\mu$ g/mL (–□–), 62.5 $\mu$ g/mL (–x–), 31.25 $\mu$ g/mL (–+–), e 15.625 $\mu$ g/mL (–◇–), 7,8125 $\mu$ g/mL (–●–). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e tempo em minutos nas abscissas.....	55
<b>Figura 18:</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da fração hexânica (FH): 125 $\mu$ g/mL (–□–), 62.5 $\mu$ g/mL (–x–), 31.25 $\mu$ g/mL (–+–), e 15.625 $\mu$ g/mL (–◇–), 7,8125 $\mu$ g/mL (–●–). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e tempo em minutos nas abscissas.....	56
<b>Figura 19:</b>	Avaliação da capacidade antioxidante da fração clorofórmica (FC): 250 $\mu$ g/mL (–○–), 125 $\mu$ g/mL (–□–), 62.5 $\mu$ g/mL (–x–), 31.25 $\mu$ g/mL (–+–), e 15.625 $\mu$ g/mL (–◇–), 7,8125 $\mu$ g/mL (–●–). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e tempo em minutos nas abscissas.....	56



- Figura 20:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração acetato de etila: 250µg/mL (—○—), 125µg/mL (—□—), 62.5µg/mL (—x—), 31.25µg/mL (—+—), e 15.625µg/mL (—◇—), 7,8125µg/mL (—●—). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e tempo em minutos nas abscissas..... 57
- Figura 21:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração residual: 250µg/mL (—○—), 125µg/mL (—□—), 62.5 µg/mL (—x—), 31.25 µg/mL (—+—), e 15.625 µg/mL (—◇—). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e tempo em minutos nas abscissas..... 57
- Figura 22:** Comparação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações de *J. gossypifolia* na concentração de 125 µg/mL: FH (—△—), FC (—○—), EEB (—●—), FA (—□—) e FR (—◇—). Os valores estão mostrados em inibição da atividade do DPPH<sup>•</sup> no eixo das ordenadas e concentração em µg/mL nas abscissas..... 58
- Figura 23:** Avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações: FH (—△—), FC (—○—), EEB (—●—), FA (—□—) e FR (—◇—). Os valores estão mostrados em inibição da atividade do DPPH<sup>•</sup> no eixo das ordenadas e concentração em µg/mL nas abscissas..... 59

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Parâmetros cromatográficos utilizados para análise das amostras de <i>Jatropha gossypifolia</i> .....	34
<b>Tabela 2:</b>	Programação da fase móvel utilizada na análise cromatográfica por CLAE.....	34
<b>Tabela 3:</b>	Composição da fase móvel utilizada na cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de fração acetona (FAct – II).....	37
<b>Tabela 4:</b>	Composição da fase móvel utilizada na cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fr Ac10 – II.....	37
<b>Tabela 5:</b>	Resultados da abordagem fitoquímica.....	42
<b>Tabela 6:</b>	Média das áreas dos picos cromatográficos usadas na construção da reta de linearidade do método para Jg1.....	50
<b>Tabela 7:</b>	Média das áreas dos picos cromatográficos usadas na construção da reta de linearidade do método para Jg2.....	51
<b>Tabela 8:</b>	Concentrações utilizadas e áreas obtidas para realização da curva de calibração para Jg1.....	51
<b>Tabela 9:</b>	Concentrações utilizadas e áreas obtidas para realização da curva de calibração para Jg2.....	52
<b>Tabela 10:</b>	Massas das frações obtidas na cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fr Act - II.....	54
<b>Tabela 11:</b>	Massas das frações obtidas na cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fr Act10 - II.....	54
<b>Tabela 12:</b>	Antibiograma do extrato etanólico bruto e das frações (FH-I, FC-I, FA-I e FR-I).....	60

## RESUMO

*Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae), conhecida no Pará como pião-roxo, é utilizada no tratamento de hemorróidas, queimaduras, dores estomacais, entre outras doenças. Diante da importância do vegetal na região torna-se necessária a sua investigação visando contribuir para o seu aproveitamento no desenvolvimento de fitoterápicos. Para tanto, buscou-se determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB), por cromatografia de camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o teor de flavonóides totais e dos flavonóides isolados no extrato. Foram realizados também ensaios de atividade antimicrobiana com o EEB e as frações obtidas a partir dele (frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e residual). A atividade antioxidante do extrato e suas frações também foi caracterizada. O material vegetal foi coletado no horto de plantas medicinais da EMBRAPA – Amazônia oriental e com ele preparou-se, por percolação, o EEB; utilizando um evaporador rotativo a baixa pressão, obteve-se o extrato seco que, posteriormente, foi fracionado por partição líquido-líquido sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações obtidas foram também concentradas a baixa pressão. A fração acetato de etila foi novamente fracionada fornecendo uma fração acetona (FAct-II), uma nova acetato de etila (FA-II), metanólica (FM-II) e resíduo sólido (RS-II). FAct-II foi submetida a cromatografia líquida a média pressão obtendo-se as subfrações Fr SAc1-II e Fr SAc3-II denominadas de Jg1 e Jg2, respectivamente. A prospecção química no extrato e nas frações dos metabólitos foi realizada em triplicata, sendo evidenciada a presença dos seguintes polifenóis: taninos catéquicos e flavonóides. A análise por CCD foi realizada utilizando-se o eluente acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:26), sobre gel de sílica de fase normal, sendo observadas zonas com fator de retenção 0,65, 0,72 e 0,77, reativas à solução de FeCl<sub>3</sub>. O cromatograma por CLAE do EEB apresentou três picos significativos (valores médios de *tr*: 13,24 min, 15,02 min e 16,00 min) cujos espectros são característicos de flavonóides. No cálculo do teor de flavonóides, aplicando-se a média das leituras de absorvância (A: 0,874), chegou-se ao teor de 2,04%. A concentração encontrada para cada substância isolada foi de 340 µg para Jg1 e 406 µg para Jg2 por mililitro da solução de extrato. Quanto às atividades biológicas testadas, FA-I e FR-I inibiram o crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* como também apresentaram maior potencial antioxidante. Os resultados fornecem parâmetros acerca de polifenóis adequados para o controle de qualidade como marcadores químicos, e teor de destes possíveis marcadores.

**Palavras-chave:** *Jatropha gossypifolia*, flavonóides, polifenóis.

## ABSTRACT

*Jatropha gossypifolia* L. (Euphobeaceae), known in Pará as “Pião roxo” is used for treatment of hemorrhoids, burns, stomach pains among other diseases, the importance of this plant to this region has led to its research in order to improve its phytotherapeutic development. During the analysis, the chromatographic profiles of its Crude Ethanolic Extract (CEE) was determined using Thin Layer chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods. The total and isolated flavonoids quantities were determined. Antimicrobial activity essays of the crude ethanolic extract were also conducted and the fractions obtained (hexanic, chloroform, ethyl acetate and residual fractions). The antioxidant activities of the extract and the fractions were also characterized. The plant materials were collected from EMBRAPA medicinal plants garden in the east Amazon and then extracted through percolation to obtain crude ethanolic extract. The dry extract was obtained using low pressure rotative evaporator followed by liquid-liquid partition with hexane, chloroform and ethyl acetate successively. The fractions obtained were also concentrated at low pressure, The ethyl acetate fractions were re-fractioned, giving rise to acetone fraction (ActF-II), a new ethyl acetate (AF-II), methanolic fraction (MF-II) and a solid residue (SR-II). ActF-II was submitted to liquid chromatography at average pressure, resulting in sub-fractions like Fr ActS-II and Fr ActS3-II called Jg1 and Jg2, respectively. Chemical prospection of the Extract and the metabolite fractions were conducted in triplicates, leading to the observation of the presence of the following polyphenols: Catechines, Tannins and flavonoids. The analysis by thin Layer Chromatography (TLC) was conducted using eluent of ethyl acetate/formic acid/glacial acetic acid/water at (100:11:11:26) on a normal phase silica gel, showing the retention factors in the following zones: 0.65, 0.72, and 0.77 in reaction to FeCl<sub>3</sub> solution. The HPLC chromatogram of ethanolic crude extract presented three significant peaks with average values of RT: 13.2 min, 15.02 min, and 16.00 min whose spectra are characteristics of flavonoids. On calculating the flavonoid quantity using the average absorbance reading (A=0.874), 2.02% flavonoid was found. The concentrations for each isolated substances was 340ug for Jg1 and 406 ug for Jg2 per milliliter of extract solution. Regarding the biological activity tested AF-1 and Fr-1 inhibited growths of *S. aureus* and *C. albicans* and also manifested a great antioxidant potential. These results provide adequate polyphenol parameters for quality control serving as chemical markers and their possible quantities.

Keywords: *Jatropha gossypifolia*, flavonoids, polyphenols.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	17
2.1.1 Família Euphorbiaceae .....	18
2.1.2 Principais Substâncias Isoladas de <i>Jatropha gossypifolia</i> . .....	18
2.2 Compostos Fenólicos .....	21
<i>Lignóides</i> .....	21
<i>Taninos</i> .....	23
<i>Flavonóides</i> .....	24
2.3 Capacidade Antioxidante.....	25
3. OBJETIVOS .....	27
3.1 Geral .....	27
3.2 Específico .....	27
4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	28
4.1 Material Vegetal .....	28
4.2 Material Químico .....	29
4.3 Equipamentos .....	29
5. MÉTODOS .....	30
5.1 Preparação da Droga vegetal.....	30
5.2 Preparações do Extrato e das Frações .....	30
5.3 Controle de Qualidade da Droga e do extrato .....	32
5.3.1 Teor de Cinzas Totais da droga .....	32
5.3.2 Análise Granulométrica.....	32
5.3.3 Doseamento de Flavonóides Totais.....	32
5.3.4 Análise quantitativa das substâncias isoladas no extrato etanólico bruto (EEB) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/UV-DAD).....	33
5.4 Análise Fitoquímica do Extrato e das Frações .....	35
5.5 Análise Cromatográfica do Extrato e das Frações .....	35
5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	35
5.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	36
5.5.3 Cromatografia líquida a média pressão (CLMP) .....	36
5.6 Avaliação da capacidade Antioxidante .....	38
5.7 Avaliação microbiológica .....	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 Rendimentos .....	40
6.2 Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade de material vegetal e extrato.....	41
6.2.1 Teor de Cinzas Totais .....	41
6.2.2 Análise Granulométrica.....	41
6.2.3 Abordagem Fitoquímica .....	41
6.2.4 Análise Cromatografia por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato e das frações .....	42
6.2.5 Análise Cromatografia por Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato e das frações.....	45
6.2.6 Doseamento de Flavonóides Totais.....	47

6.2.7 Análise quantitativa das substâncias isoladas no extrato etanólico bruto por cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
6.3 Isolamento de Jg1 e Jg2 .....	53
6.4 Avaliação da capacidade antioxidante .....	55
6.5 Avaliação microbiológica .....	59
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2000, a Associação dos Agentes Comunitários de Saúde de Igarapé-Miri (Pará - Brasil) - AACSIM e a Pastoral da Saúde iniciaram uma tentativa de ampliar e sistematizar o trabalho com plantas medicinais, conferindo a produção, até então realizada em caráter informal e associativo, visando maior eficiência destes como recursos terapêuticos de fácil acesso.

A AACSIM solicitou a Universidade Federal do Pará (UFPA) através da Faculdade de Farmácia auxílio para orientar a produção de remédios de origem vegetal, aperfeiçoar técnicas e capacitar às pessoas envolvidas.

O resultado desta solicitação de apoio foi a realização do projeto "Natureza, Saúde e Cidadania" que teve financiamento do Ministério do Meio Ambiente. O objetivo deste projeto foi resgatar a experiência popular no uso de plantas medicinais, levantar a posologia local, selecionando espécies indicadas para tratar os agravos mais importantes, sistematizando os dados levantados.

Em 16 de março de 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – emitiu a Resolução RDC nº 48 que dispõe sobre o registro de fitoterápicos. Nesta resolução, a ANVISA acata o registro de insumos fitoterápicos tradicionais, desde que eles tenham estudo de validação da atividade, de segurança e de padronização da forma de uso (BRASIL 2004).

Entre os meios descritos nesta resolução para análise de insumos fitoterápicos estão os métodos cromatográficos, principalmente cromatografia líquida de alta eficiência, associados aos métodos espectroscópicos e espectrométricos. Estes últimos são fundamentais para a caracterização estrutural das substâncias isoladas e, conseqüentemente, a identificação de seus constituintes que poderão ser usados como marcadores na verificação de qualidade de matérias primas, insumos e produtos.

Essa verificação inclui a padronização de matéria-prima, intermediários e fitoterápicos através da determinação do teor de marcadores nas amostras. O doseamento de flavonóides totais também pode ser um parâmetro utilizado para o controle de qualidade do extrato de *Jatropha gossypifolia* L.

A promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais trouxe maior incentivo á pesquisa com vegetais de uso terapêutico, especialmente os da

flora que ocorre na região amazônica, pois isso favorece o estabelecimento de arranjos produtivos locais a partir dos resultados aplicados.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Jatropha gossypifolia* L.

A *Jatropha gossypifolia* L. Euphorbiaceae, é um arbusto de caule esverdeado ou arroxeadado nas partes novas (ALBUQUERQUE, 1980) podendo alcançar até 1,5 m (PRANCE *et al*, 1975), sendo piloso nas ramificações e pecíolos; com folhas alternas, palmadas, ou lobadas e glabras, margens ciliadas ou glandulíferas com 5-17 cm de comprimento. Apresenta flores roxas em cimeiras paniculadas (CORRÊA, 1978) e fruto do tipo cápsula, esverdeada, com três lóculos contendo três sementes oleaginosas (LORENZI e MATOS, 2002), escuras e rajadas (ALBUQUERQUE, 1980). A planta é conhecida popularmente como pião-roxo, batata-de-teú, erva-purgante, jalapão, mamoinha, raiz-de-teú (CORRÊA, 1978), peão-roxo, pinhão-roxo e jalapa (LORENZI e MATOS, 2002).

As folhas de *J. gossypifolia*, segundo a medicina popular, são utilizadas para combater diferentes agravos tais como a obstrução das vias abdominais (CORRÊA, 1978), mostra também ação hemostática, anti-reumática, anti-hipertensiva, cicatrizante (LORENZI e MATOS, 2002) e antimalárica (GBEASSOR, 1989).

O trabalho realizado por Bianco e Santos (2003) demonstrou a possibilidade de se obter flavonóides a partir do tratamento de um extrato de acetato de etila, com acetato em uma partição sólido-líquido com acetona.

Os métodos cromatográficos para o isolamento e a análise de polifenóis mais utilizados são principalmente: a cromatografia de contra corrente, a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia em coluna, ou ainda associações destas.

Kumar et al (2006) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato diclorometano/metanol (1:1) de 61 espécies de vegetais contra microorganismo gram-positivos e gram-negativos, e fungos. Observou-se que *J. gossypifolia* apresenta atividade contra 8 microorganismos (*Bacillus cereus* var. *mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* e *Candida albicans*). Com isso,

mostra-se viável utilizar a atividade antimicrobiana para direcionar o processo de fracionamento.

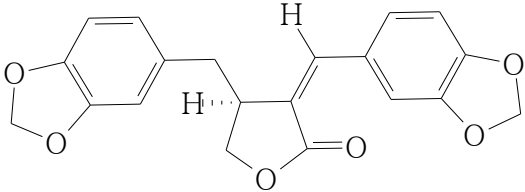
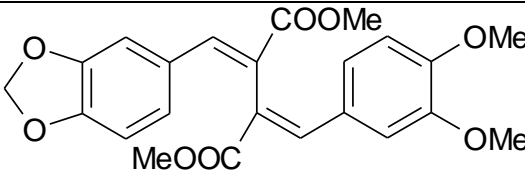
### 2.1.1 Família Euphorbiaceae

As Euforbiáceas estão entre as maiores e mais variadas famílias vegetais de dicotiledôneas, distribuídas em todo mundo, em particular nos trópicos e nos subtropicais, somando cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7500 espécies. Nas Américas, ocorrem 2500 espécies em 92 gêneros presentes tanto em áreas baixas como em montanhas (RIBEIRO *et al*, 1999).

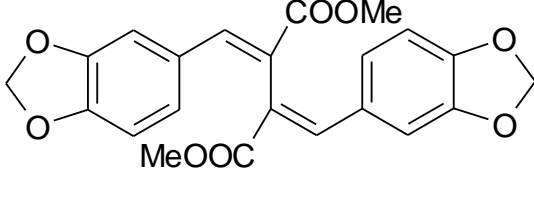
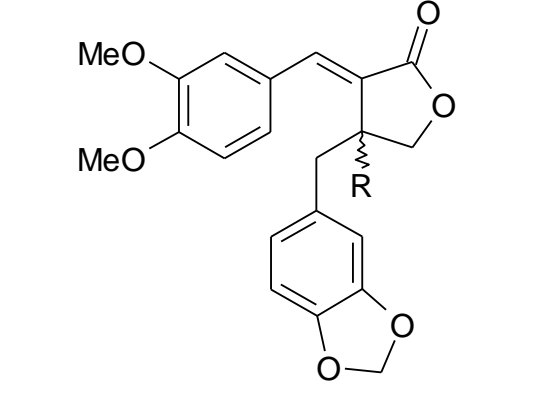
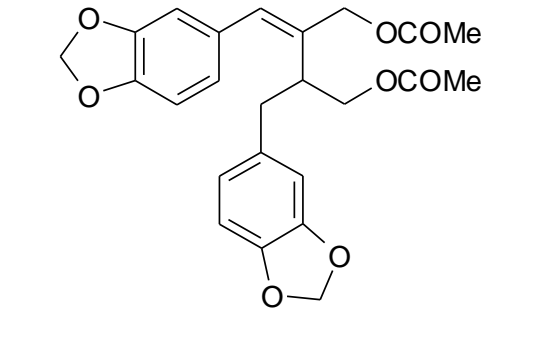
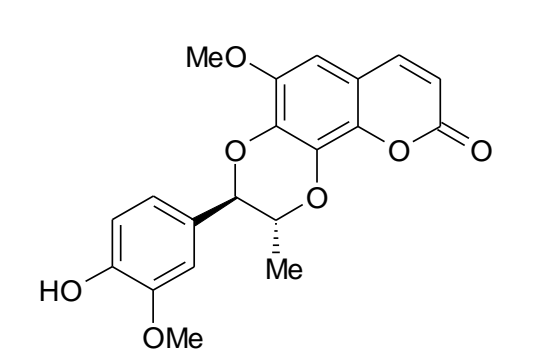
### 2.1.2 Principais Substâncias Isoladas de *Jatropha gossypifolia*.

As substâncias que já foram isoladas de *Jatropha gossypifolia* são apresentadas com suas estruturas no quadro 1.

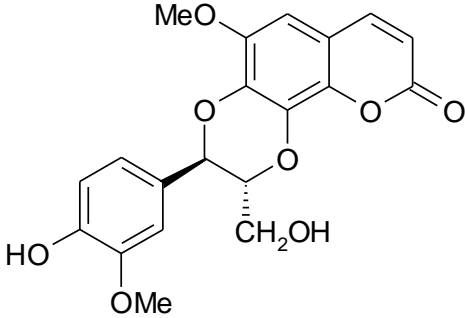
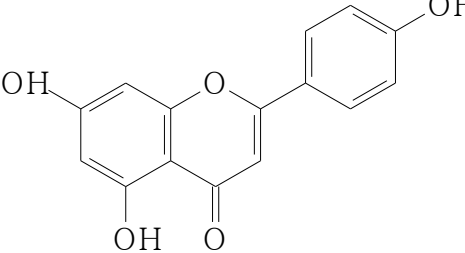
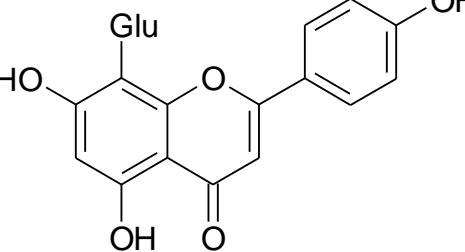
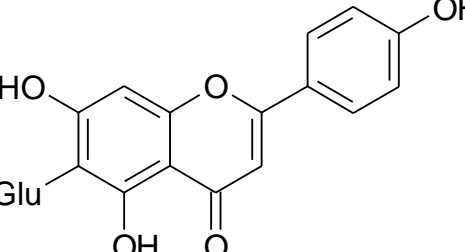
**Quadro 1:** Principais substâncias isoladas de *Jatropha gossypifolia*.

Metabólito / Referência bibliográfica	Descrição básica do processo extrativo	Estrutura química
Gadaina (lignana) /  BANERJI <i>et al</i> , 1984.	Extração exaustiva das sementes, raízes e caules com éter de petróleo.	
Jatrodieno (lignana) /  DAS <i>et al</i> , 1996.	Extração exaustiva dos talos com éter de petróleo.	

**Quadro 1:** Principais substâncias isoladas de *Jatropha gossypifolia*.  
(Continuação).

Metabólito / Referência bibliográfica	Descrição básica do processo extrativo	Estrutura química
Gossipidieno (lignana) /  DAS <i>et al</i> , 1999.	Extração exaustiva dos caules desidratados com hexano.	
Gossipifana (lignana) /  DAS <i>et al</i> , 1995.	Extração exaustiva das partes aéreas desidratadas com éter de petróleo.	
Gossipilina (lignana) /  DAS <i>et al</i> , 1998.	Extração exaustiva das partes aéreas desidratadas com solução diclorometano / metanol (1:1).	
Propacina (cumarino- lignóide) /  DAS <i>et al</i> , 2001.	Extração exaustiva de todas as partes vegetais desidratadas com diclorometano / metanol (1:1).	

**Quadro 1:** Principais substâncias isoladas de *Jatropha gossypifolia*.  
(Continuação).

Metabólito / Referência bibliográfica	Descrição básica do processo extrativo	Estrutura química
Cleomiscosina A (cumarino-lignóide) /  DAS <i>et al</i> , 2003.	Extração exaustiva seqüencial do caule do vegetal, primeiramente, com hexano e, posteriormente com Acetato de etila (extrato usado para obtenção da Cleomiscosina A).	
Apigenina (flavonóide) /  SUBRAMANIAN <i>et al</i> , 1971.	Extração das folhas do vegetal com etanol. Substância obtida a partir da fração éter etílica.	
Vitexina (flavonóide) /  SUBRAMANIAN <i>et al</i> , 1971.	Extração das folhas do vegetal com etanol. Substância obtida a partir da fração acetato de etila.	
Isovitexina (flavonóide) /  SUBRAMANIAN <i>et al</i> , 1971.	Extração das folhas do vegetal com etanol. Substância presente nas frações acetato de etila e metiletilcetona.	

## 2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos possuem grande distribuição entre os seres vivos tanto em vegetais quanto em microorganismos e estão entre as classes de compostos que apresentam ampla variedade de estruturas. O elemento estrutural que os caracteriza é um núcleo benzênico com, ao menos, um hidrogênio substituído por uma hidroxila, sendo encontrado na forma livre ou fazendo parte de outra função como, por exemplo: éter, éster, heterosídeos (BRUNETON, 2001; CARVALHO *et al*, 2007). Portanto apresentam solubilidade em água e em solventes orgânicos polares.

Estes compostos são capazes de formar pontes de hidrogênio tanto intramoleculares como intermoleculares. Esta característica é importante no estabelecimento de ligações com proteínas sendo utilizada em testes de identificação de taninos (BRUNETON, 2001; CARVALHO *et al*, 2007).

Estes também apresentam: propriedade para formar complexos com metais, de terem intensa absorção na região do UV devido serem compostos aromáticos, facilmente oxidáveis (BRUNETON, 2001; CARVALHO *et al*, 2007).

Características como sabor, odor e coloração de diversos vegetais são atribuídos aos compostos fenólicos sendo que estes têm utilização como flavorizante e corante em alimentos e bebidas. Têm sido relatadas as seguintes propriedades: antibacteriana, antiviral, expectorante, hepatoprotetor, analgésica, antioxidante entre outras (BRUNETON, 2001; CARVALHO *et al*, 2007).

### *Lignóides*

As ligninas são macromoléculas poliméricas formadas por unidades básicas C6 – C3, que são conhecidas como unidades fenilpropânicas que se encontram depositadas nas paredes das células vegetais. São conhecidos quatro grupos de ligninas, cuja formação implica na condensação de unidades de fenilpropanóides: lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignanas e heterolignanas (FILHO, 2007; BRUNETON, 2001).

As lignanas (Figura 1) são derivados fenilpropânicos formados a partir do acoplamento oxidativo de moléculas de álcool cinâmico entre si e destes com ácido cinâmico (ROBBERS, 1996; BRUNETON, 2001).

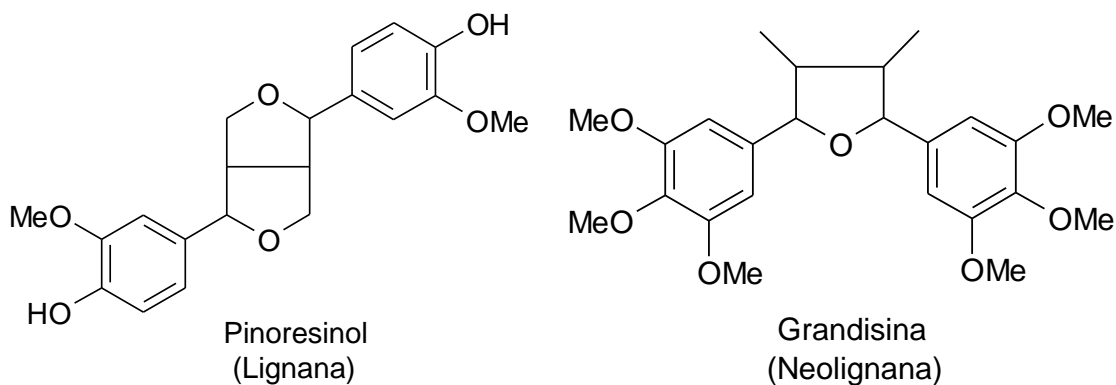
As neolignanas (Figura 1) são dímeros oxidados de alil fenóis e de propenil fenóis, entre si ou cruzados, em que a ligação carbono-carbono é assimétrica, e não apresentam carbono gama (C- $\gamma$ ) oxidado (ROBBERS, 1996; BRUNETON, 2001).

As alolignanas (Figura 2) são dímeros mistos de arilpropanóides, ou seja, um dos monômeros apresenta um carbono gama (C- $\gamma$ ) oxidado e o outro não.

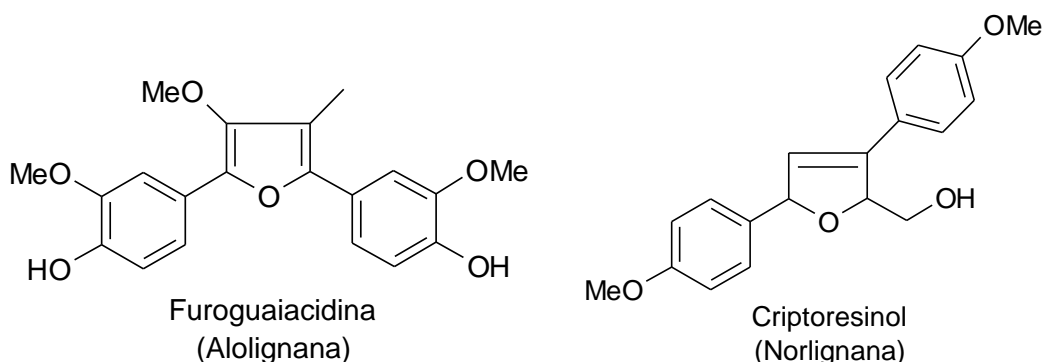
As norlignanas (Figura 2) são caracterizadas pela remoção de um átomo de carbono de um precursor primário.

Os oligolignóides (Figura 3) são oligômeros de lignóides, portanto são produtos resultados de uma condensação de três a cinco unidades fenilpropanoídicas.

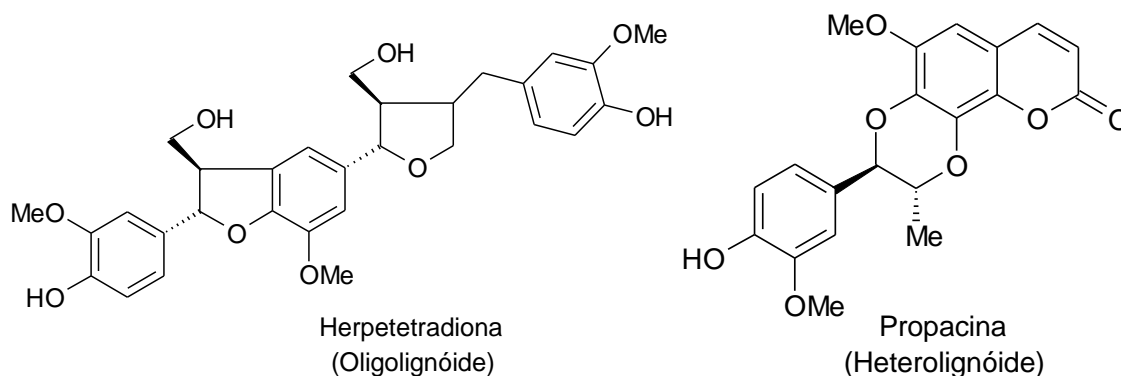
Os heterolignóides (Figura 3) são constituídos de moléculas de estruturas diversas (FILHO, 2007).



**Figura 1:** Exemplos de estruturas de lignanas, à esquerda, e neolignana, à direita (FILHO, 2007).



**Figura 2:** Exemplos de estruturas de alolignanas, à esquerda, e norlignanas, à direita (FILHO, 2007).

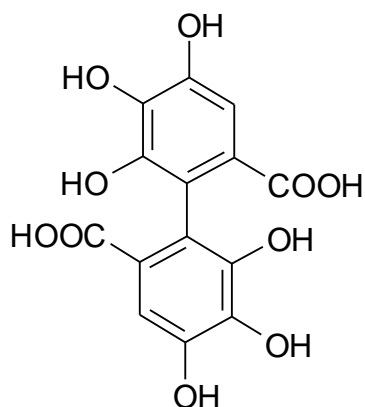


**Figura 3:** Exemplos de estruturas de oligolignóides, à esquerda, e heterolignóides, à direita (FILHO, 2007).

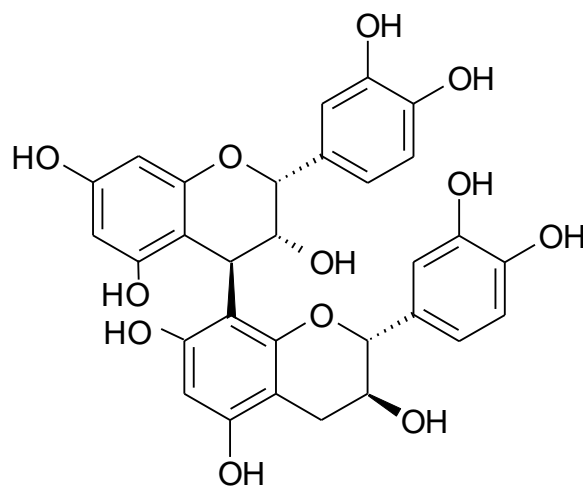
### *Taninos*

Os taninos são substâncias fenólicas de caráter adstringente e solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton que apresentam a capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides e proteínas em geral (MELO & SANTOS, 2007; BRUNETON, 2001). A ligação entre os agrupamentos fenólicos dos taninos e macromoléculas ocorre através de ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio (HARBONE, 1998).

Os taninos podem ser classificados segundo sua estrutura química como taninos hidrolisáveis ou taninos condensados. Taninos hidrolisáveis são caracterizados pela presença de um oligo- ou poliésteres de um açúcar (ou de um poliol relacionado) e de um número variável de moléculas de ácidos fenólicos. (BRUNETON, 2001), estes são limitados às plantas dicotiledôneas e relativamente encontrados em poucas famílias (HARBONE, 1998). Os taninos condensados, também denominados proantocianidina, são oligômeros e polímeros formados a partir de policondensações de duas ou mais unidades, em geral, de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (MELO & SANTOS, 2007) e que tem grande ocorrência entre as gimnospermas como também encontra difundida entre as angiospermas, especialmente em árvores lenhosas (HARBONE, 1998)



Ácido hexahidroxidifenólico



Procianidol B -1

**Figura 4:** Exemplos de taninos hidrolisáveis, à esquerda, e de taninos condensados, à direita (BRUNETON, 2001).

### *Flavonóides*

Os flavonóides são compostos fenólicos hidrossolúveis responsáveis pela coloração de flores, frutos e folhas de algumas espécies vegetais. Têm sua origem biossintética na via dos fenilpropanóides. Estruturalmente, são constituídos por unidades de  $C_{15}$ : dois anéis benzênicos A e B conectados por uma cadeia de três átomos de carbono. A ciclização desta cadeia carbônica leva a formação do anel C. Flavonóides naturais geralmente são oxidados e apresentam ocorrência de compostos glicosilados em algumas classes (STAFFORD, 2000; ZUANAZZI, 2007).

Um mesmo elemento estrutural básico para a maioria dos flavonóides está associado à mesma origem biossintética visto que parte de sua estrutura deriva da rota dos policetídeos e a outra parte deriva dos chiquimídeos. A divisão desta classe metabólica pode ser feita segundo o grau de oxidação do núcleo pirânico central (BRUNETON, 2001; MANN, 1999).

Flavonas e Flavonóis são derivados do 2-fenilcromano, sendo o anel A na maioria das vezes substituído por duas hidroxilas fenólicas em C-5 e C-7. Outras substituições possíveis são hidroxilas livres ou esterificadas no carbono C-6 e/ou C-8, isoprenilação no C-6 ou C-8 deste anel. No anel B, mono, di e trissubstituição por grupos -OH ou -OCH<sub>3</sub> podem ser observadas. Diferença



estrutural entre flavonas e flavonóis está na substituição de uma hidroxila na posição C-3 desta última (BRUNETON, 2001; ZUANAZZI, 2007).

Flavanonas e diidroflavonóis caracterizam-se pela ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3 como também pela presença de centro de assimetria. Os diidroflavonóis apresentam possibilidade de quatro isômeros (BRUNETON, 2001).

Biflavonóides são dímeros de flavonóides unidos uns aos outros sobretudo por seus carbonos. A maioria dos flavonóides naturais apresenta-se como dímeros de flavonas e flavanonas, em geral 5, 7, 4' – trissubstituídas (BRUNETON, 2001).

Chalconas são precursores da biossíntese dos demais flavonóides. Estruturalmente, são desprovidas do anel central, mantendo a cadeia de três carbonos, cetônica e  $\alpha,\beta$  insaturada (BRUNETON, 2001).

Auronas são compostos derivados de 2-benzilidenocumarona que apresentam isomeria geométrica devido às ligações olefínicas.

Os flavonóides possuem propriedade anticoagulante e anti-hepatóxica, muitos deles também possuem propriedades antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana e espasmolítica (CAPASSO, 2003). Estes também apresentam indicações para tratamento de doenças circulatórias como hipertensão (ZUANAZZI, 2007).

### **2.3 Capacidade Antioxidante**

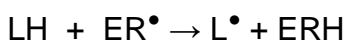
O metabolismo oxidativo é essencial para sobrevivência celular visto que os processos oxidativos têm importante influência no sistema de fluxo de elétrons e conseqüentemente na produção de energia na forma de ATP (ROBARDS *et al*, 2002).

O resultado deste metabolismo está na formação de radicais livres, espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados (MARCH, 1992), e outras formas reativas oxidadas que ocasionam alterações oxidativas. A formação excessiva de radicais livres pode levar à saturação das enzimas protetoras tais como superóxido desmutase, catalase e peroxidase isto levaria à destruição e morte celular (ROBARDS *et al*, 2002).

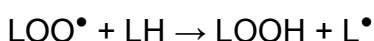
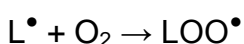
Os antioxidantes são substâncias que quando em pequena concentração, comparadas com aqueles do substrato oxidável, inibe ou retarda a oxidação deste substrato. Os antioxidantes podem ser divididos em primários ou interruptor de cadeia e secundários ou preventivos (ROBARDS *et al*, 2002).

Antioxidantes secundários são compostos que retardam a velocidade da oxidação. Os antioxidantes primários são compostos que podem atuar retardando ou inibindo a etapa inicial da cadeia ao reagir com radicais lipofílicos, ou inibindo a etapa de propagação ao reagir com radicais peroxila ou alcoxila (ROBARDS *et al*, 2002).

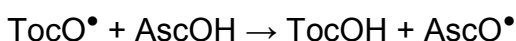
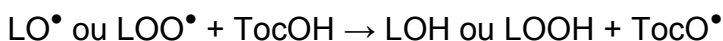
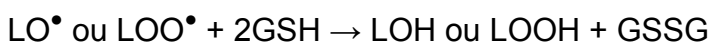
1) Fase de Iniciação:



2) Fase de Propagação:



3) Fase de Terminação:



Onde: ER<sup>•</sup>: Espécie Radicalar

L<sup>•</sup>: Radical alil

LOO<sup>•</sup>: Radical peroxila

LO<sup>•</sup>: Radical alcoxila

AH: Antioxidante primário

A<sup>•</sup>: Radical livre do antioxidante

GSH/GSSG: Glutaciona Reduzida/Oxidada

TocOH/TocO<sup>•</sup>: Tocoferol/Tocoferil radical

AscOH/AscO<sup>•</sup>: Ascórbico/Ascorbil radical

Entre compostos naturais que apresentam potencial antioxidante estão os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, que apresentam capacidade de capturar e neutralizar espécies oxidantes como superóxidos, hidroxila, peróxido.

Os flavonóides apresentam capacidade de se ligar a íons metálicos - formação de quelatos - como ferro, atividade seqüestradora de radicais livres, inibição enzimática das cicloxigenases, lipoxigenase, NADPH-oxigenase, xantina-oxigenase, e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como catalase e superóxido-dismutase (ZUANAZZI, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Contribuir para padronização de preparações farmacopéicas obtidas a partir de folhas da espécie vegetal *Jatropha gossypifolia* L. segundo a regulamentação brasileira vigente.

#### **3.2 Especifico**

Determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

Determinar o teor de flavonóides totais presentes no extrato etanólico bruto.

Isolar por meios cromatográficos e caracterizar por métodos espectroscópicos substâncias isoladas.

Quantificar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) os flavonóides isolados;

Avaliar o potencial antioxidante das frações.

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato, suas frações e das substâncias isoladas, por difusão em agar.

## 4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

### 4.1 Material Vegetal

Os arbustos de *J. gossypiifolia* utilizados neste trabalho estão no Horto de Plantas Medicinais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pará (EMBRAPA-PA) e apresentam altura entre 1,3 m a 1,8 m, deles foram coletados, em outubro de 2007, 1348 g de folhas frescas (variando de 6 a 21 cm de comprimento por 8 a 28 cm de largura). A caracterização botânica do material vegetal foi realizada no Laboratório de Botânica – Herbário da EMBRAPA-PA responsável pela confecção da exsicata e confirmação da classificação botânica da amostra como *J. gossypiifolia* L. Este documento encontra-se disponível naquele laboratório sob registro NID: 042 / 07 (Figura 5).



**Figura 5:** Fotografia da exsicata de folhas de *Jatropa gossypiifolia*.

## 4.2 Material Químico

Foram utilizados:

– Acetato de etila P.A. - QUIMEX, acetonitrila P.A. - Baker Analyzed® HPLC, ácido fórmico P.A. - QUIMEX, ácido acético glacial P.A. - QUIMEX, ácido clorídrico P.A. - QUIMEX, ácido sulfúrico P.A. - QUIMEX, água ultra pura tipo I LAFQ, anidrido acético P.A. - QUIMEX, clorofórmio P.A. - QUIMEX, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH\*) - SIGMA, etanol 92,8° GL, etanol PA 99,3% QUIMEX, éter etílico P.A. - QUIMEX, éter de petróleo P.A. - VETEC, n-hexano P.A. - NUCLEAR, metanol P.A. - QUIMEX, metanol Baker Analyzed® HPLC - J. T. Baker, metanol P.A. QUIMEX, peróxido de hidrogênio P.A. - VETEC, tolueno P.A. - NUCLEAR, tricloreto de antimônio P.A. - NUCLEAR.

– Reativos de Keede, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Pascová, Fehling A e B: preparados no Laboratório de Fitoquímica (BARBOSA et al, 2003).

– Solução de cloreto férrico 1% e 5%, lugol, ninhidrina a 1%, ácido clorídrico a 5%, hidróxido de amônio 6N e a 10%, ácido clorídrico a 6N, nitroprussiato de sódio a 5%, hidróxido de sódio 1N e 2N, vanilina a 1%, carbonato de sódio a 25%, formaldeído a 4%, o-dinitrobenzeno a 5%, cloridrato de hidroxilamina a 10%, solução metanólica de hidróxido de potássio a 10%, *p*-dimetilaminobenzaldeído: preparados no Laboratório de Fitoquímica (BARBOSA et al, 2003).

## 4.3 Equipamentos

– Foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Fitoquímica – UFPA: balança analítica Bioprecisa FA2104N; espectrofotômetro de UV-VIS - Spectrum SP 2000 UV; sistema para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Merck Hitachi LaChrom®D-7000; ultrason Quimis Modelo Q-335D;

– Foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Farmacotécnica - UFPA: agitador de peneiras para análise granulométrica eletromagnético-Bertel; balança analítica Gehaka BK 500.

– Foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Farmacognosia - UEM: bomba Water Associates Chromatography 01757; Centrífuga Excelsa 2. Modelo 205 N FANEN Ltda; Liofilizador CHRIST Alpha 1-4 LD.

– Foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Toxicologia - UFPA: Medidor de pH PHTEK. Modelo PHs-EB.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Preparação da Droga vegetal**

O material vegetal coletado foi selecionado e devidamente limpo, para eliminar eventuais contaminantes. Este material foi pesado em balança de precisão e posteriormente reduzido a fragmentos menores (dimensões variáveis entre 2 a 4 cm) com auxílio de uma tesoura. Em seguida, o material foi levado a uma estufa com circulação forçada de ar a 40°C, sendo que o período de secagem foi estabelecido com base no monitoramento do peso de uma amostra mantida nas dadas condições, por meio de repetidas pesagem. Concluída a secagem em 48 horas, todo o material foi novamente pesado.

A droga vegetal foi obtida por moagem em moinho de facas e houve uma nova pesagem para verificar a perda de material no processo. Após a secagem e trituração do material, a droga vegetal foi armazenada em um recipiente de vidro tarado, previamente esterilizado e mantido fechado.

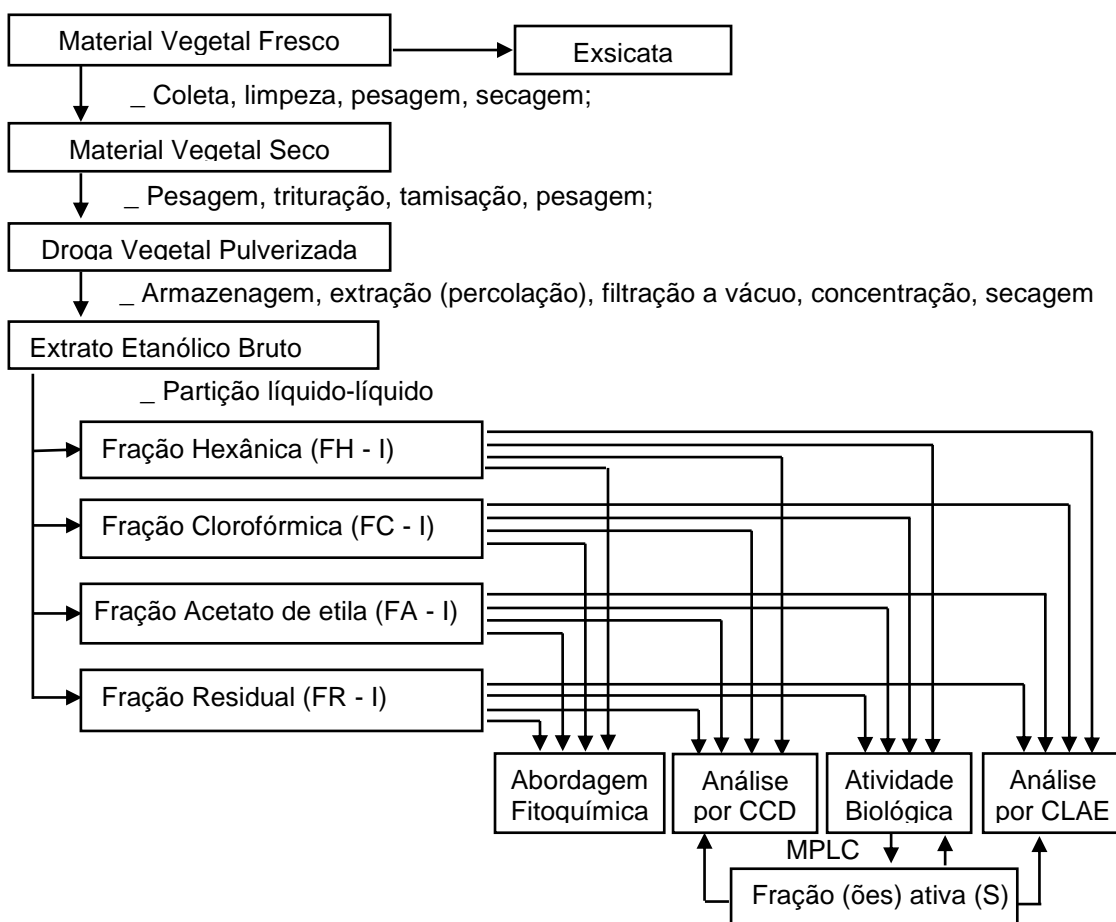
### **5.2 Preparações do Extrato e das Frações**

A obtenção do extrato etanólico bruto foi realizada por percolação segundo a Farmacopéia Brasileira I (SILVA, 1926) mediante fluxo contínuo de XXX gotas de etanol 92,8° GL por minuto.

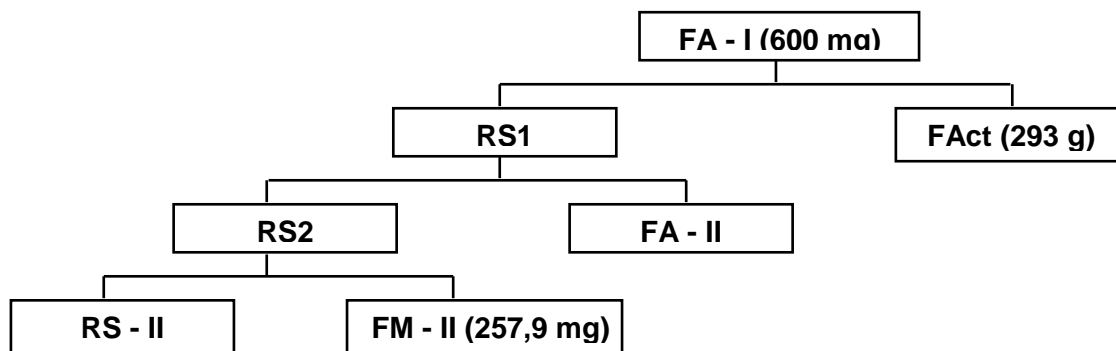
O período de percolação foi monitorado pela avaliação do resíduo seco. Este monitoramento foi baseado na Farmacopéia Portuguesa VII (2002) sendo as alíquotas recolhidas diariamente. O extrato em solução foi concentrado em evaporador rotativo a baixa pressão e mantido em estufa a 50°C até total secura.

As frações foram preparadas a partir de uma solução do extrato em metanol/água (1:1), transferida para um funil de decantação. Alíquotas de 100 mL de hexano, clorofórmio e acetato de etila foram utilizadas em seqüência para o fracionamento por partição líquido – líquido (I). Foram obtidas as seguintes frações: hexânica (FH - I), clorofórmica (FC - I), acetato de etila (FA - I) e fração residual (FR - I), ver esquema 1.

A fração acetato de etila (FA - I) seca foi então suspensa em acetona e esta suspensão foi centrifugada e filtrada a baixa pressão. Este procedimento foi repetido sucessivamente obtendo-se uma subfração acetona (FAct - II). O resíduo sólido formado foi submetido ao mesmo processo com acetato de etila e, posteriormente, metanol obtendo-se subfrações acetato de etila (FA – II) e metanólica (FM - II), respectivamente. O produto obtido ao final destas extrações foi um resíduo sólido amarelo (RS - II). Todas as frações e subfrações foram concentradas em evaporador rotativo a baixa pressão, ver esquema 2.



**Esquema 1:** Representação esquemática dos procedimentos adotados para preparação de extratos e frações.



**Esquema 2:** Representação esquemática do fracionamento da Fração acetato de etila.

### 5.3 Controle de Qualidade da Droga e do extrato

#### 5.3.1 Teor de Cinzas Totais da droga

A quantidade de substâncias residuais não-voláteis no processo de incineração é determinada pelo teor de cinzas. Utilizando-se os pesos da droga vegetal antes e depois da incineração obtém um valor que é utilizado para o cálculo da percentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar (Farmacopéia Brasileira IV,1988).

#### 5.3.2 Análise Granulométrica

A determinação granulométrica de pós de drogas vegetais é feita pela pesagem das massas de uma alíquota de droga após tamisação sucessiva sobre tamises de malhas decrescentes (2,00mm, 1,40mm, 710µm, 355µm, 250µm, 180µm, 125µm), sob uma intensidade de vibração correspondente ao nível 7 do equipamento utilizado, por um período de 30 minutos (Farmacopéia Brasileira IV, 1988).

#### 5.3.3 Doseamento de Flavonóides Totais

O procedimento usado está baseado na metodologia desenvolvida e validada por Silva (1999). Inicialmente uma alíquota de 500mg do EEB é extraída com metanol, grau HPLC, em banho-maria e sob refluxo por 30



minutos. A solução metanólica e, então, filtrada para um balão volumétrico de 50mL e completando-se o volume com o mesmo líquido extrator.

Uma alíquota de 10mL da solução metanólica é transferida para um tubo de centrifuga, ao qual se adiciona clorofórmio e água deionizada. Após a homogeneização, a mistura é centrifugada por 2 minutos a 3000 RPM para a completa separação das fases. Em seguida, retira-se uma alíquota da fase hidrometanólica, transferindo-a para um balão volumétrico de 25mL, ao qual se adicionam ácido acético glacial, solução de piridina/metanol (2:8) e solução metanólica de cloreto de alumínio, completa-se o volume com água deionizada.

A leitura da absorvância da solução é realizada a 420nm em espectrofotômetro, após 15 minutos de repouso, sendo o branco os mesmos solventes e nas mesmas concentrações utilizadas na preparação da amostra. A curva de calibração utilizada foi a relatada por Silva, 1999.

As análises em triplicata forneceram dados de concentrações calculadas pela equação:

$$C = \frac{A \times FD}{A_{1cm}^{1\%} \times m}$$

Onde: **C**: concentração de flavonóides totais expressos em gramas de rutina por 100 g de solução extrativa (g%); **A**: média das três leituras de absorvância; **FD**: fator de diluição igual a 200; **m**: massa da solução extrativa; **A<sup>1%</sup><sub>1cm</sub>**: absorvância específica do complexo rutina-cloreto de alumínio.

5.3.4 Análise quantitativa das substâncias isoladas no extrato etanólico bruto (EEB) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/UV-DAD).

A validação do método foi realizada com objetivo de garantir a confiabilidade e segurança dos resultados obtidos (ANVISA, 2003). As condições cromatográficas estão representadas nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Parâmetros cromatográficos utilizados para análise das amostras de *Jatropha gossypifolia*.

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Detecção	UV ( $\lambda = 280$ nm)
Fluxo	0,8mL/min.
Coluna	Agilent LiChrospher® 100, RP18 (5 $\mu$ m) e 250 x 3,0 mm.
Fase móvel	Ver tabela 3
Volume de injeção	20 $\mu$ L
Temperatura do forno	26 °C (+ ou - 1°C).

**Tabela 2:** Programação da fase móvel utilizada na análise cromatográfica por CLAE.

Tempo	Solventes	H <sub>2</sub> O	ACN	MeOH
0 mim		100	0	0
5 mim		85	15	0
25 mim		75	25	0
40 mim		75	25	0
47 mim		0	0	100

Nesta análise utilizaram-se soluções metanólicas do EEB na concentração de 6 mg/mL e das substâncias individualizadas 1000  $\mu$ g/mL (solução estoque), 800  $\mu$ g/mL, 750  $\mu$ g/mL, 600  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 400  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL e 200  $\mu$ g/mL. As soluções foram filtradas sobre membrana de Milipore® 0,45  $\mu$ m e o volume de injeção na coluna foi de 20  $\mu$ L.

Seletividade de um método analítico é a capacidade em detectar exatamente um dado composto na presença de outros componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A avaliação da seletividade do método é feita pela identificação das substâncias detectada no extrato por comparação dos tempos de retenção dos picos da substancia isoladas com aquele da mesma na matriz, comparação entre espectros da substância isolada com o espectro do composto na amostra instigada.

A linearidade do método é avaliada empregando-se cinco concentrações das substâncias isoladas. Cada concentração é analisada em quintuplicata no cromatógrafo, em volume de 20  $\mu$ L. As médias das áreas dos picos de cada uma das amostras (substâncias) foram lançadas no eixo das

ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta é obtida pelo método dos mínimos quadrados e expressa por  $y = a + bx$ , onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação de Pearson (r) (BRASIL, 2003).

#### **5.4 Análise Fitoquímica do Extrato e das Frações**

O extrato e as frações foram submetidos à abordagem fitoquímica com finalidade de investigar a composição química dessas amostras. Estes testes foram realizados em triplicata e obedeceram as condições estabelecidas no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (BARBOSA et al, 2003).

#### **5.5 Análise Cromatográfica do Extrato e das Frações**

##### **5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

O extrato e as frações obtidas foram analisados por CCD, inicialmente, sobre cromatoplasmas manufaturadas e, posteriormente, sobre placas padronizadas marca Merck® com dimensões de 10 cm x 10 cm, tendo como fase estacionária gel de sílica de fase normal, ativadas a 105°C por 30 minutos. As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg/mL para o extrato e suas frações, e 1mg/mL para substâncias isoladas sendo todas dissolvidas em metanol exceto FH e FC dissolvidos em clorofórmio.

O eluente acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:26), indicado para separação de flavonóides (WAGNER, 2001), foi utilizado na análise cromatográfica de extratos e frações. Após a eluição, os cromatogramas obtidos foram observados sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e, posteriormente, revelados com uma solução de cloreto férrico a 1% evidenciando os flavonóides presentes nas amostras.

Outros cromatogramas foram desenvolvidos com os mesmos sistemas cromatográficos e foram utilizados para bioautografia tendo como revelador uma solução metanólica de DPPH• a 0,01% (VUORELA, 2003; WANG, 2008).

#### 5.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para esta análise, o EEB foi preparado na concentração de 5 mg/mL e a FA, na concentração de 5 mg/mL, dissolvidos em metanol grau HPLC e posteriormente filtradas em filtro Millipore 0,45 µm.

Alíquotas de 20 µL do EEB e da FA foram manualmente injetadas, em análises distintas, no sistema cromatográfico a fim de definir os perfis da composição de cada amostra. O sistema cromatográfico era composto de coluna LiChrospher® 100 HPLC Cartridge 250-3 com gel de sílica RP-18 (5µm) como fase estacionária e a temperatura do forno foi estabilizada em 26°C, para detecção utilizou-se um arranjo de diodos modelo L-7455 Lachrom marca Merck Hitachi. O eluente bombeado por um dispositivo de duplo estágio dotado de quatro canais para solventes. A programação de eluentes utilizada nesta análise está expressa na tabela 2, ver 5.3.4. A análise quantitativa das substâncias isoladas do extrato etanólico bruto (EEB) foi realizada utilizando-se o mesmo sistema anteriormente descrito.

#### 5.5.3 Cromatografia líquida a média pressão (CLMP)

No processo de separação do EEB empregou-se cromatografia a média pressão em coluna de vidro 45 cm – 2 cm, preenchida com sílica RP-18 e submetida a um fluxo contínuo de 5mL/min. Amostras foram solubilizadas em metanol HPLC e injetadas manualmente com auxílio de seringas de vidro.

A fase móvel utilizada no tratamento das Fr Act - II e Fr Ac10 – II teve variações nas proporções dos componentes em ordem decrescentes de polaridade (ver tabelas 3 e 4).

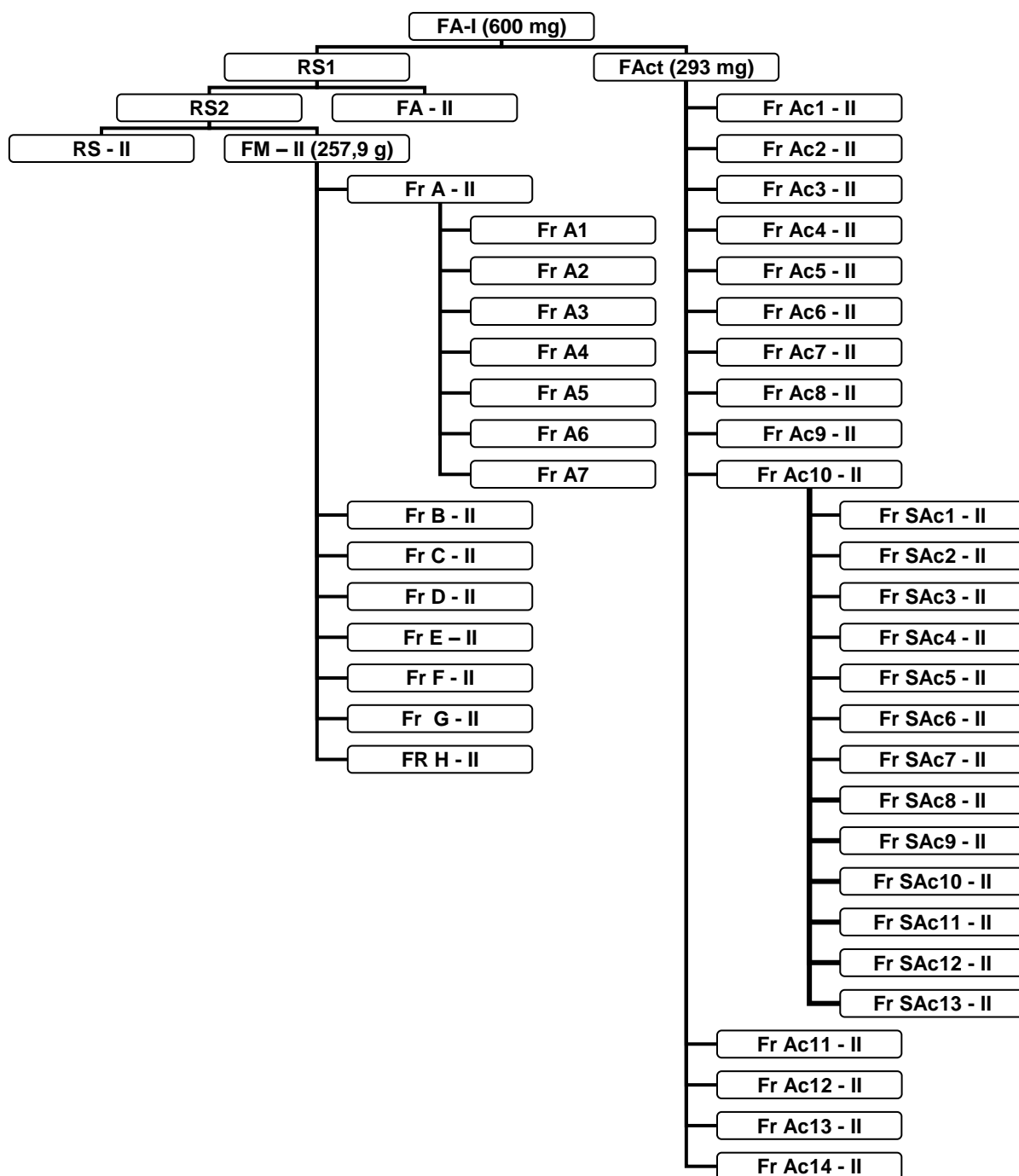
**Tabela 3:** Composição da fase móvel utilizada na Cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fração acetona - II (FAct – II).

H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	AcOEt	VOLUME DE ELUENTE (mL)
70	30	-	-	100
60	40	-	-	100
50	50	-	-	100
-	100	-	-	100
-	90	10	-	50
-	80	20	-	50
-	70	30	-	50
-	60	40	-	50
-	50	50	-	50
-	40	60	-	50
-	30	70	-	50
-	20	80	-	50
-	10	90	-	50
-	-	100	-	50
-	-	90	10	50
-	-	80	20	50
-	-	70	30	100
-	-	60	40	100
-	-	50	50	150

**Tabela 4:** Composição da fase móvel utilizada na Cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fr Ac10 – II.

H <sub>2</sub> O	MeOH	EtOH	VOLUME DE ELUENTE (mL)
60	40	-	100
50	50	-	100
-	100	-	100
-	90	10	100
-	80	20	100
-	70	30	50

O esquema 3 representa os fracionamentos realizados segundo o sistema cromatográfico descrito acima, como também a denominação das frações após agrupamento destas.



**Esquema 3:** Representação esquemática das frações agrupamentos após fracionamento.

## 5.6 Avaliação da capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada através da reação das frações, dissolvidas em metanol, com o radical livre DPPH<sup>•</sup>. A reação foi acompanhada pela mudança de cor e a atividade é avaliada pelo decréscimo da absorvância medida em 517 nm, em relação ao solvente (BLOIS, 1958).

## 5.7 Avaliação microbiológica

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia e as amostras biológicas de processos clínicos de pacientes atendidos no Hospital Bettina Ferro de Souza e, isolados e identificados em parceria com o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia - CCB - UFPA pela Prof.a Dr.a Antonia B. R. Vieira. Em resumo, os microrganismos apresentam as seguintes características:

\_ *Staphylococcus aureus*: Bactéria Gram-positiva, responsável por inúmeras e variadas infecções e síndromes em humanos e com resistência a vários tipos de antimicrobianos.

\_ *Escherichia coli*: Bactéria Gram-negativa, agente de infecções gastrintestinais e o principal responsável por infecções urinárias em mulheres. Apresenta facilidade na aquisição e transferência de plasmídeos de resistência a antimicrobianos.

\_ *Pseudomonas aeruginosa*: Bactéria Gram-negativa, importante agente de infecções nosocomiais, resistente a uma grande variedade de antimicrobianos.

\_ *Candida albicans*: Fungo leveduriforme, principal agente de infecções fúngicas oportunistas, principalmente no trato vaginal e oral.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em agar em disco (BAUER *et al* 1966; CLSI, 2002; KARTAL *et al* 2003) com o seguinte procedimento: foram preparados inóculos do microrganismo a testar, tomando-se 4 colônias do isolado, mantidos em agar Muller-Hinton e diluídas em solução salina a 0,85 % até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland correspondendo aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922 (CLSI, 2003).

De cada suspensão de microrganismo foram semeados em triplicata 100  $\mu\text{L}$  com auxílio de um alça de Digrafski descartável, em toda a superfície do meio agar Muller-Hinton contidos em placas de Petri. Em seguida, foram adicionados discos de papel filtro quantitativo, de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10  $\mu\text{L}$  do EEB e das frações obtidas (FH-I, FC-I, FA-I e FR-I) nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL e 62,5 mg/mL,

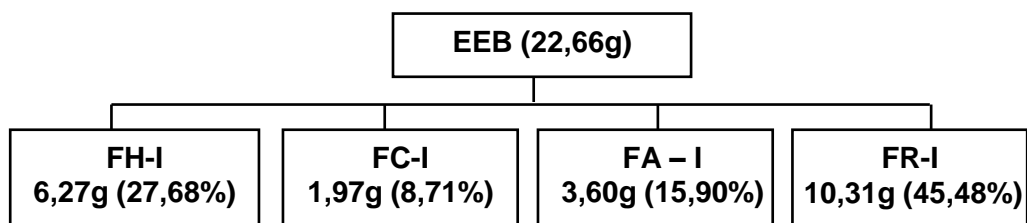
dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), discos estes previamente preparados e deixados na estufa por 24 horas a temperatura de 35 °C. Após este período de incubação das placas foi realizada a leitura dos resultados medindo-se, em milímetros, o halo formado ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas e como suscetível halo igual ou acima de 9 mm de diâmetro (medida do disco com extrato). O DMSO foi utilizado como controle negativo.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Rendimentos

O rendimento de uma extração ou de um fracionamento é calculado a partir da relação percentual entre a massa de material vegetal utilizada no processo e a massa do extraído seco, obtida após a secagem em estufa. Este cálculo pode ser realizado através de uma regra de três simples. Dessa forma, partindo-se de 195,25 g de droga vegetal, com teor de 78% de água evaporada do material vegetal fresco, foram obtidos 30,78g de EEB, rendimento de 15,76% em relação à droga vegetal.

O rendimento da partição líquido - líquido, partindo-se de 22,66g, de EEB, foi de 3,6g (15,90%) em FA-I e de 10,31g (45,48%) em FR-I conforme demonstrado no esquema 4 de onde se deduz que 61,38% da amostra do EEB são solúveis em solventes mais polares, indicando que grande parte dos constituintes presentes neste extrato apresenta maior polaridade conseqüentemente maior solubilidade nesse tipo de solvente. Neste fracionamento, 2,23 % de EEB foram perdidos no processo.



**Esquema 4:** Rendimento em grama e em percentagem da Partição líquido – líquido.



## **6.2 Determinação de Parâmetros para Controle de Qualidade de material vegetal e extrato.**

### 6.2.1 Teor de Cinzas Totais

Teste realizado segundo a Farmacopéia Brasileira IV, realizado em triplicata, em que o teor médio de cinzas totais obtido foi de 7,13%. Não existem dados referenciais para avaliar o teor de cinzas totais obtido para a espécie.

### 6.2.2 Análise Granulométrica

O Teste realizado segundo Farmacopéia Brasileira IV forneceu como resultado 95,5% da amostra retida pelo tamis de abertura de malha 1,70 mm, caracterizando a amostra como pó grosso.

### 6.2.3 Abordagem Fitoquímica

Na abordagem fitoquímica foi evidenciada a presença de sesquiterpenolactonas e outras lactonas, e depsídeos e depsidonas em todas as amostras analisadas.

Os flavonóides e taninos catéquicos estão presentes no EEB e em FC-I, FA-I e FR-I, a presença de flavonóides na fração clorofórmica pode ser devido à existência de flavonóides não glicosilados (agliconas). No mesmo sentido, compostos derivados de unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (aglicona), como os taninos, podem estar presentes em frações obtidas com solventes de menor polaridade.

Esteróides e triterpenóides encontrados no EEB e nas FH-I e FC-I. A característica lipofílica do álcool etílico confere a ele a capacidade de extrair compostos de menor polaridade.

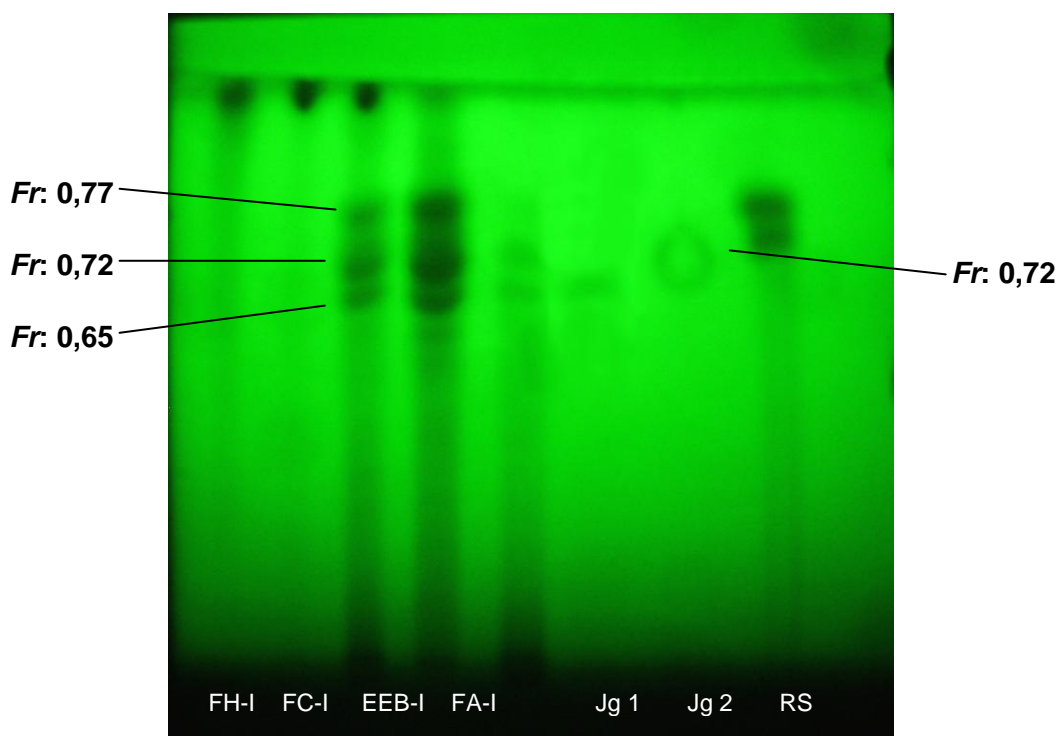
Açúcares redutores foram encontrados no EEB e na FR-I, a fração residual (hidrometanólica) foi obtida devido a baixa solubilidade de alguns compostos em solvente de menor polaridade logo esta fração esta constituída de substâncias como açúcares, glicosídeos, etc.



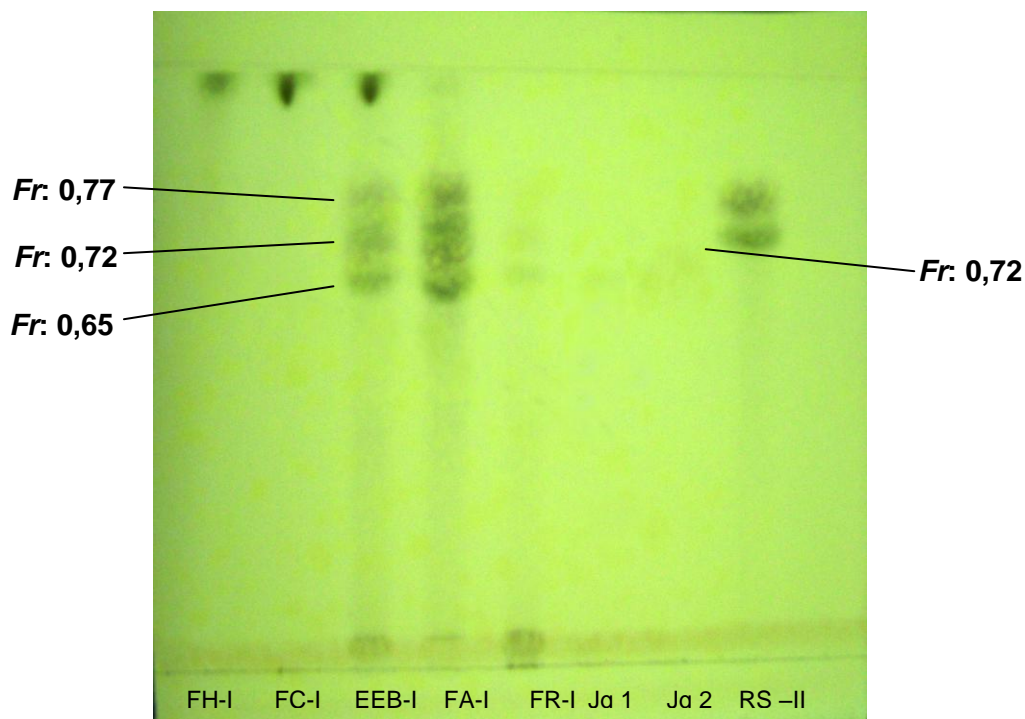
cromatográfico Jg1 e Jg2 apresentam *Fr* 0,65 e 0,72. Todas as zonas cromatográficas citadas apresentam sensibilidade a solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  (Figura 7).

Em outra cromatoplaça e com o mesmo sistema cromatográfico, foi aspergida solução metanólica de DPPH\* a 0,04%, e ao ser observado sob luz UV de comprimento de onda 365nm foi possível visualizar zonas cromatográficas de coloração laranja e *Fr*0,77 (Figura 8).

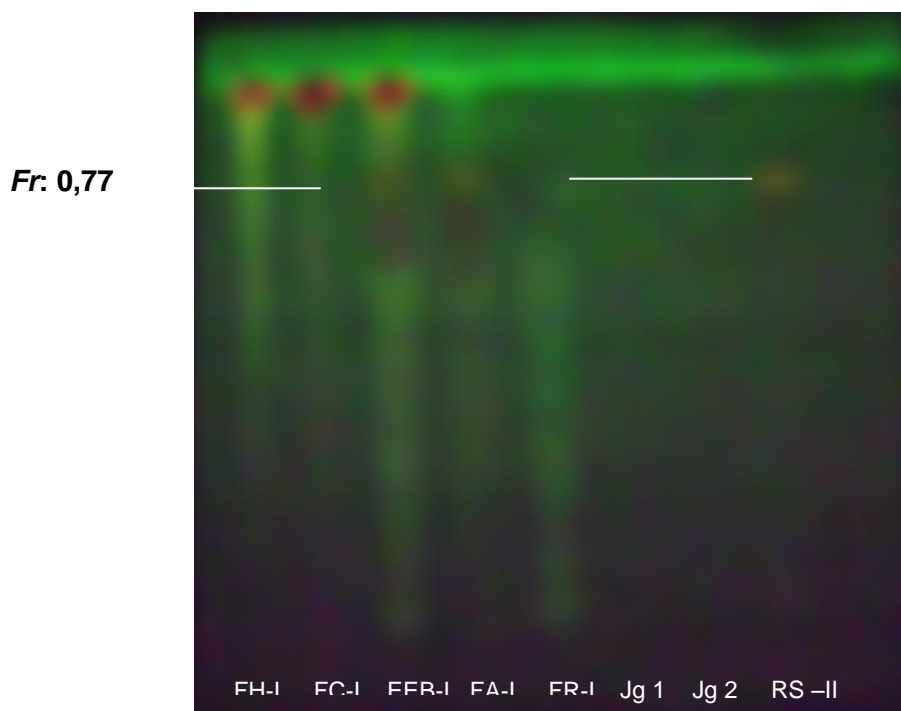
A separação cromatográfica diferenciada entre as frações indicou que a FA e FR estão desprovidas, em quantidade significativa, de substância de baixa polaridade demonstrando a eficiência do processo de partição líquido – líquido.



**Figura 6:** Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS –II) (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água - 100:11:11:26); observado sob luz UV a 254nm.



**Figura 7:** Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração Clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS -II) – (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água - 100:11:11:26; revelado com FeCL3 a 1%).

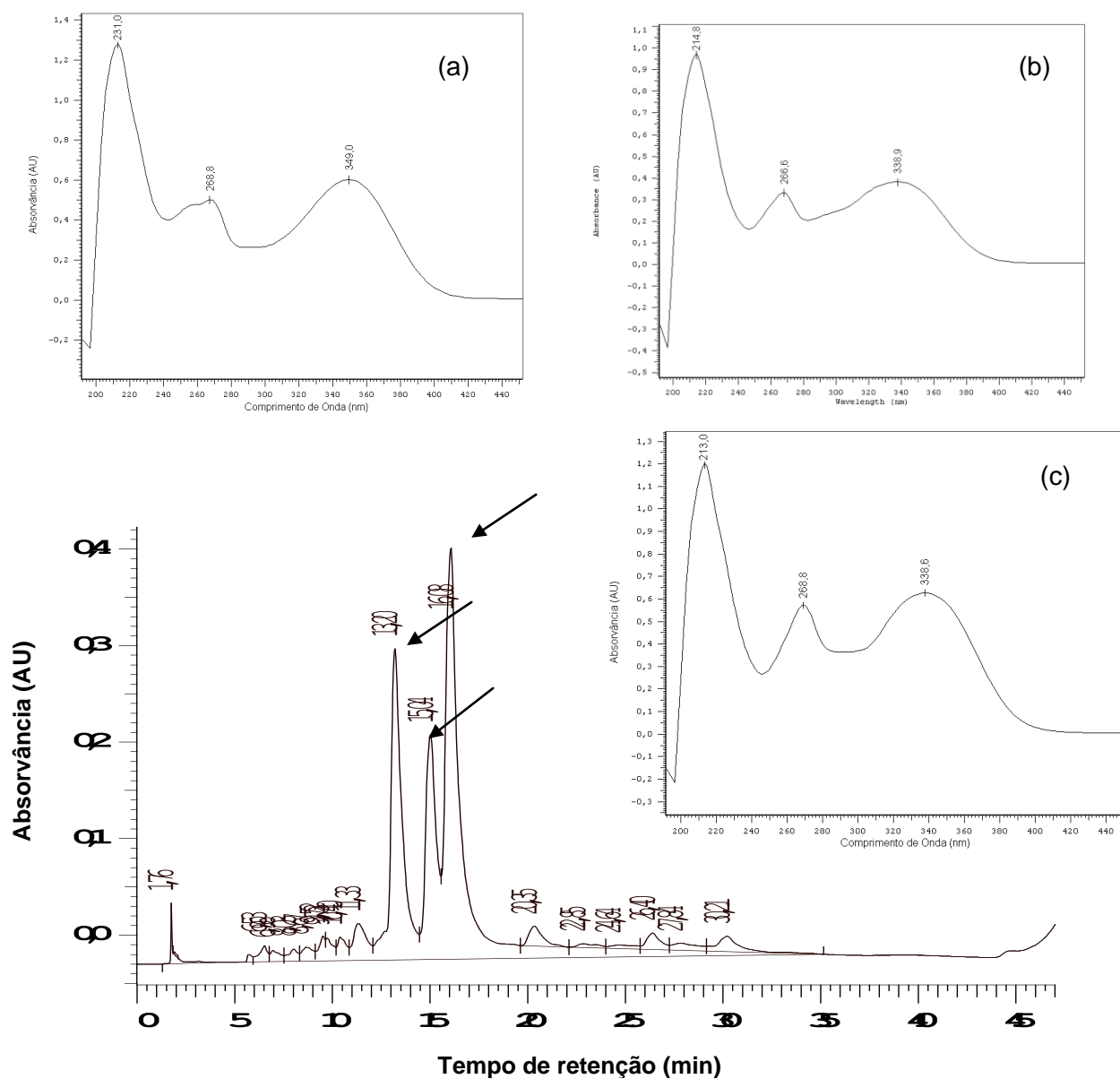


**Figura 8:** Cromatograma em fase normal das amostras fração hexânica (FH-I), fração Clorofórmica (FC-I), extrato etanólico bruto (EEB-I), fração acetato de etila (FA-I), fração residual (FR-I), Jg 1, Jg 2 e resíduo sólido (RS -II) – (acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:26), placa padronizada de fase normal, revelado com solução metanólica de DPPH• e observado sob luz UV a 365nm.

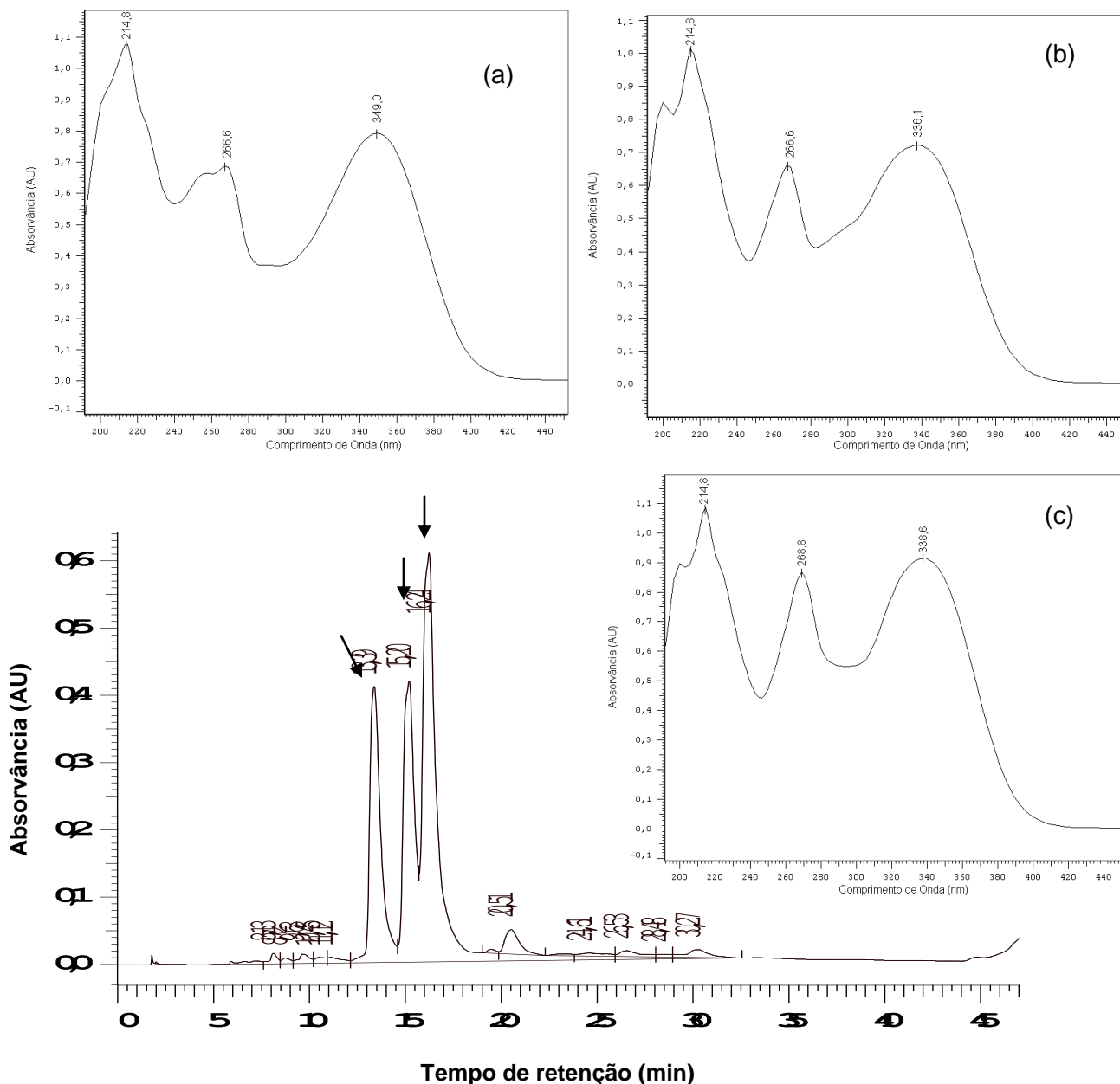
### 6.2.5 Análise Cromatografia por Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato e das frações

Análise do EEB e das frações FH-I, FC-I, FA-I e FR-I por CLAE segundo o sistema cromatográfico proposto, apresentou cromatograma para EEB com três picos significativos, com os seguintes valores médios de *tr*: 13,24 min, 15,02 min e 16,00 min (Figura 9). Esses picos apresentam espectros no ultravioleta característicos de flavonóides. No cromatograma de FA-I (Figura 10) tem-se como destaque os picos de *tr* 13,36min, 15,05min e 16,08min. Nos cromatogramas das FH-I e a FC-I foram registrados sinais em 13, 15 e 16 minutos porem de baixa intensidade. Todas as análises foram registradas a 280 nm.

Os valores médios de *tr* 13,24 min, 15,02 min e 16,00 min presente no cromatograma do EEB e os *tr* 13,36min, 15,05min e 16,08min da FA-I apresentam-se muito semelhantes tanto em função do tempo de retenção quanto aos espectros de UV.



**Figura 9:** Cromatograma de CLAE do EEB registrado a 280 nm, observa-se tempo de retenção médio  $t_r$  13,24 min; 15,02 min e 16,00 min. Espectros correspondentes para todos os  $t_r$  13,24min (a), 15,02min (b) e 16,00min (c).



**Figura 10:** Cromatograma de CLAE do FA-I registrado a 280 nm, observa-se tempo de retenção médio  $t_r$  13,36min, 15,05min e 16,08min. Espectros correspondentes para todos os  $t_r$  13,36min (a), 15,05min (b) e 16,08min (c).

### 6.2.6 Doseamento de Flavonóides Totais

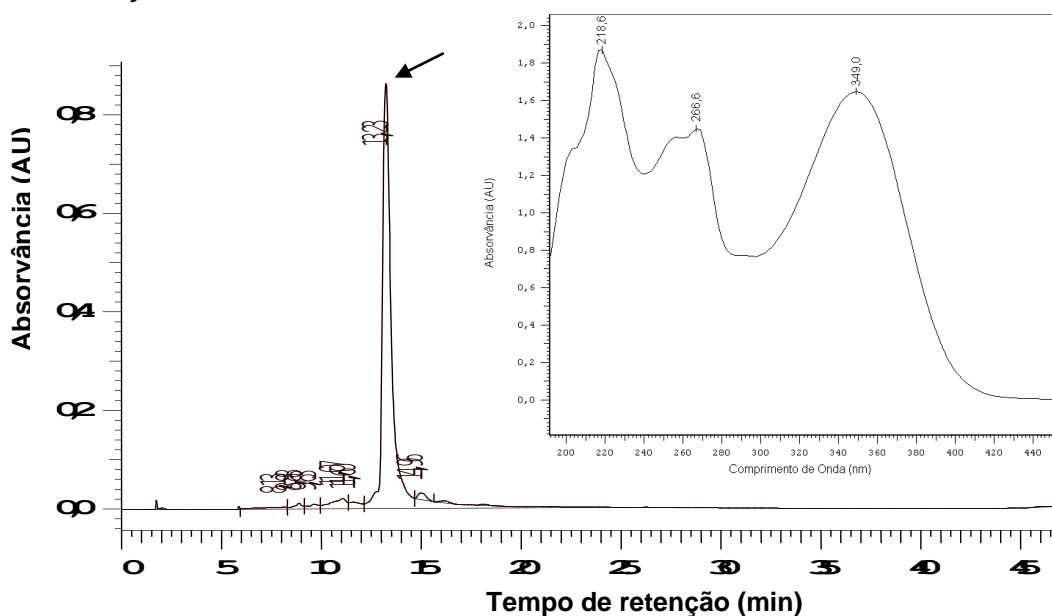
A análise espectrométrica do extrato, realizada a 420nm, em triplicata, forneceu em cada experimento os seguintes valores de absorvância: 0,867; 0,883 e 0,872; respectivamente. O valor médio das absorvâncias – A: 0,874 – foi utilizado para o cálculo da concentração de flavonóides totais, a qual deve ser expressa em gramas de rutina por 100 g de solução extrativa. O cálculo da

concentração de flavonóides totais presentes no extrato encontrado foi de 2,0363g / 100 g de solução extrativa. O teor encontrado a partir da amostra utilizada do EEB foi de 2,04%.

### 6.2.7 Análise quantitativa das substâncias isoladas no extrato etanólico bruto por cromatografia líquida de alta eficiência.

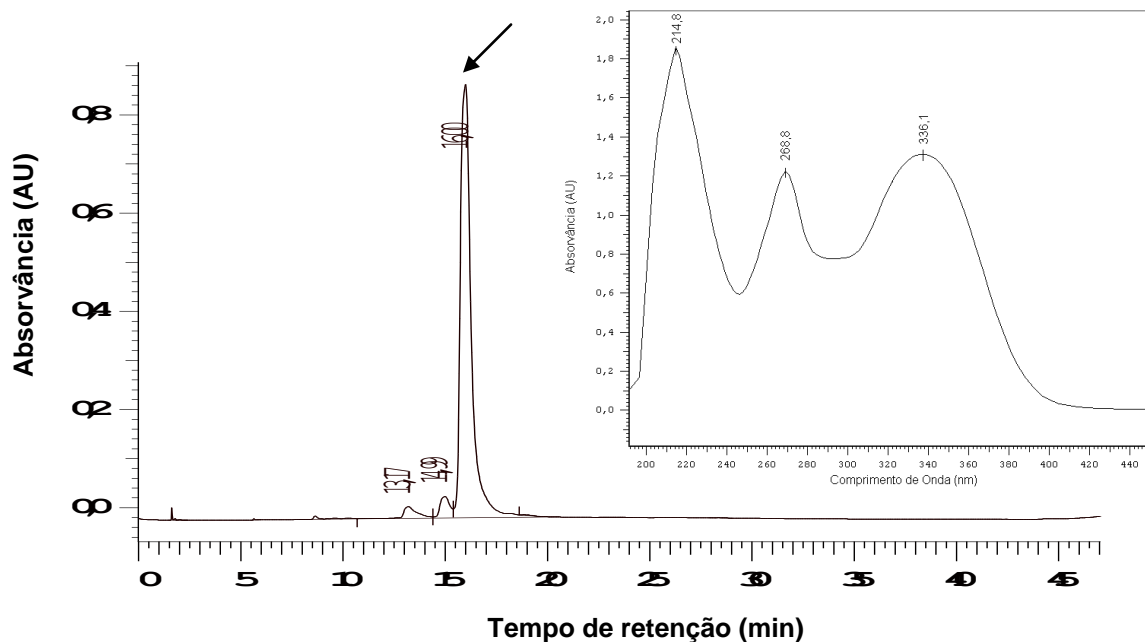
A seletividade do método está baseada no tempo de retenção médio e na correlação de espectro de UV. Os cromatogramas de Jg1 (Figura 11) e Jg2 (Figura 12) apresentam pico com  $t_r$  médio de 13,36 minutos e 16,00 minutos respectivamente, e para evidenciar a presença destes no EEB realizou-se correlação reversa de espectros armazenados na biblioteca do cromatógrafo (pesquisa o espectro de uma substância presente na amostra que apresente maior correlação com o espectro armazenado na biblioteca).

O espectro de Jg1 apresenta maior fator de correlação com o pico de  $t_r$  13,24 presente no cromatograma de EB, com valor de 0,9962; enquanto que o espectro relativo a Jg2 apresenta fator de correlação de 0,9915 com pico de  $t_r$  16,00. Consideram-se elevados fator de correlação valores acima de 0,9500. O tempo de retenção e espectros indicam presença de Jg1 e Jg2 no extrato e nesta fração.



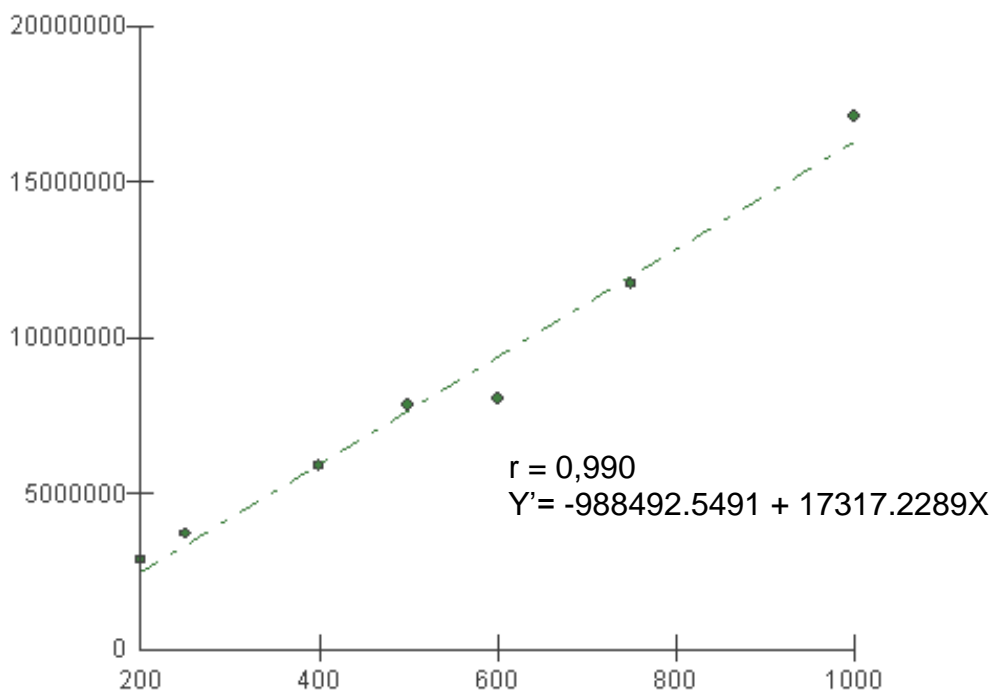
**Figura 11:** Cromatograma do Jg 1 registrado a 280 nm, observa-se o primeiro pico a  $t_r$  13,36 min ( $\lambda$ : 218,6nm; 266,6nm; 349nm).





**Figura 12:** Cromatograma do Jg 2 registrado a 280 nm, observa-se o primeiro pico a *tr* 16,09 min. ( $\lambda$ :214,8; 268,8; 336,1).

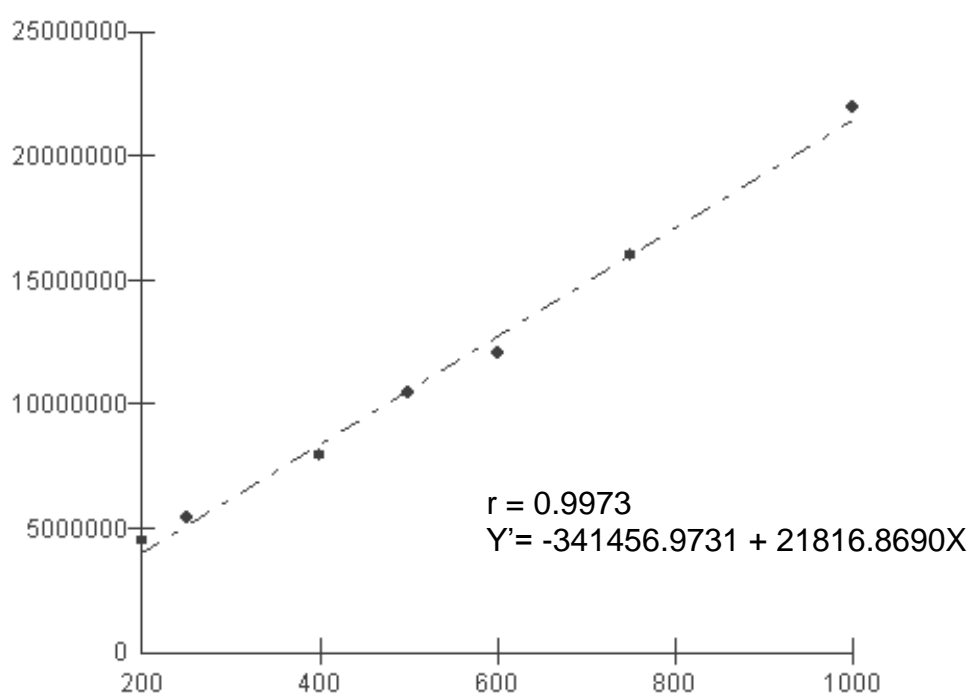
A linearidade do método representada pelas equações da reta e dos coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) para a Jg1 e Jg2 que estão expressos nas figuras 13 e 14, respectivamente. A medias das áreas obtidas frente às diversas concentrações estão apresentadas na tabela 6 e tabela 7.



**Figura 13:** Linearidade do método para Jg1.

**Tabela 6:** Média das áreas dos picos cromatográficos usadas na construção da reta de Linearidade do método para Jg1.

Concentrações de Jg1 (µg/mL)	n	Média das áreas
1000	5	17123341
750	5	11737694
600	5	8016241
500	5	7858502
400	5	5878518
250	5	3700291
200	5	2839710



**Figura 14:** Linearidade de Jg2.

**Tabela 7:** Média das áreas dos picos cromatográficos usadas na construção da reta de Linearidade do método para Jg2.

<b>Concentrações de Jg2 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>N</b>	<b>Média das áreas</b>
1000	5	21969746
750	5	16003317
600	5	12049366
500	5	10459738
400	5	7939523
250	5	5420959
200	5	4489566

n= número de determinações

As curvas analíticas, com as respectivas médias das áreas obtidas frente às diferentes concentrações das substâncias Jg1 e Jg2 estão apresentadas nas Tabelas 8 e 9. As áreas de Jg1 e Jg2 no EEB tiveram média, respectivamente, de 5.120.066 e 8.574.329,9 e o intervalo estabelecido foi de 200  $\mu\text{g/mL}$  a 600  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 8:** Concentrações utilizadas e áreas obtidas para realização da Curva de calibração para Jg1.

<b>Jg 1 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>N</b>	<b>Relação das áreas</b>
750	5	11737694
500	5	7858502
400	5	5878518
250	5	3700291
200	5	2839710

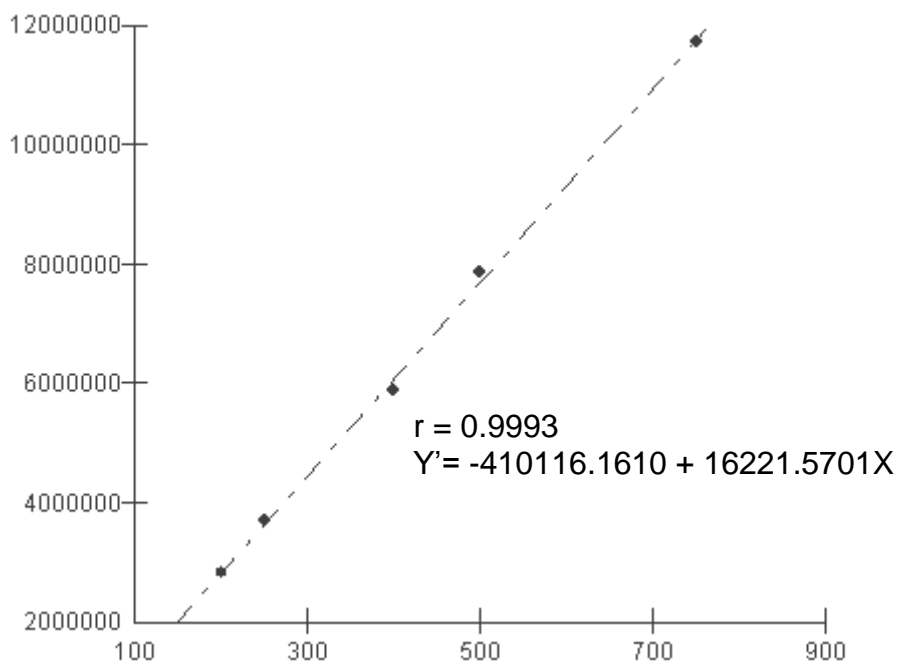
n= número de determinações

**Tabela 9:** Concentrações utilizadas e áreas obtidas para realização da Curva de calibração para Jg2.

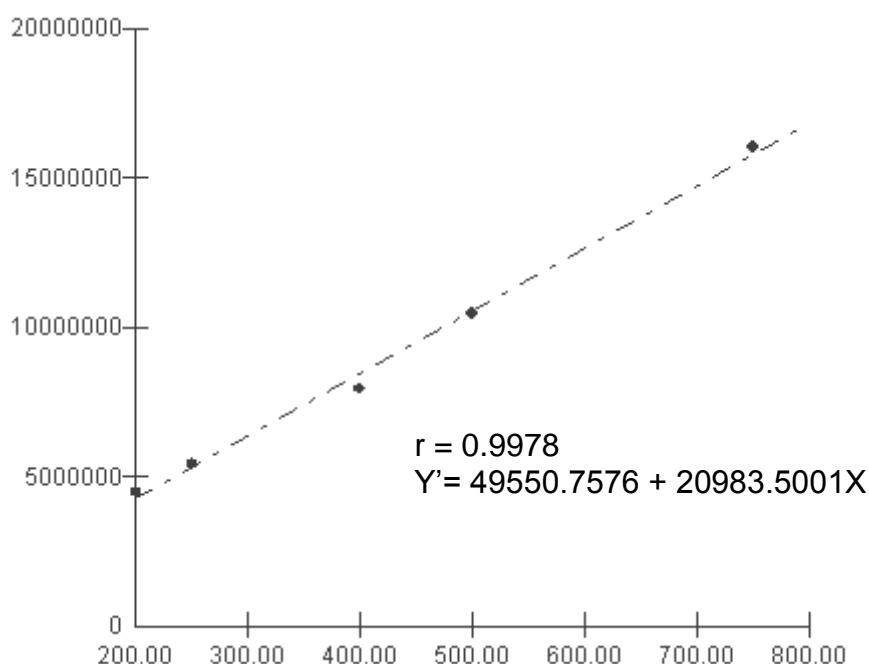
Jg 2 (µg/mL)	N	Relação das áreas
750	5	16003317
500	5	10459738
400	5	7939523
250	5	5420959
200	5	4489566

n= número de determinações

As equações da reta e o coeficientes de correlação de Pearson (r), para a Jg1 e Jg2 estão representadas nas Figura 15 e 16.



**Figura 15:** Curva de calibração para Jg1.



**Figura 16:** Curva de calibração para Jg2.

A estimativa das concentrações de Jg1 e de Jg2 foi calculada utilizando as respectivas equações de reta da curva de calibração e médias de suas áreas observadas na análise cromatográfica do EEB. O resultado encontrado foi de 340,91  $\mu\text{g/mL}$  para Jg1 e de 406,26  $\mu\text{g/mL}$  para Jg2.

### 6.3 Isolamento de Jg1 e Jg2

Para isolamento de Jg1 e Jg2 foi utilizada a cromatografia líquida de média pressão (CLMP). Uma alíquota de 200,1 mg da fração acetona - II (FAct - II) forneceu 270 subfrações, agrupadas segundo monitoramento por CCD em 14 frações mostradas na Tabela 10 com respectivas massas.

Em outro fracionamento por CLMP da fração Ac10 - II foram obtidas 110 subfrações, agrupadas segundo monitoramento por CCD em 13 frações. As subfrações SAc1-II e SAc3-II foram posteriormente denominadas de Jg1 e Jg2, respectivamente (Tabela 11).

**Tabela 10:** Massas obtidas na Cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fração acetona (Fr Act – II).

<b>Frações obtidas</b>	<b>Frações Reunidas</b>	<b>Massas obtidas</b>
1-2	Ac1 – II	2,8 mg
3-4	Ac2 – II	8,9 mg
5-6	Ac3 – II	1,0 mg
7-42	Ac4 – II	3,9 mg
43-80	Ac5 – II	6,9 mg
81-95	Ac6 – II	27,6 mg
96-101	Ac7 – II	5,7 mg
102-114	Ac8 – II	24,5 mg
115-119	Ac9 – II	18,4 mg
120-155	Ac10 – II	72,4 mg
156-172	Ac11 – II	2,1 mg
173-210	Ac12 – II	12,2 mg
211-230	Ac13 – II	1,2 mg
231-270	Ac14 – II	2,7 mg

**Tabela 11:** Massas obtidas na Cromatografia líquida a média pressão (CLMP) de Fr Ac10 – II.

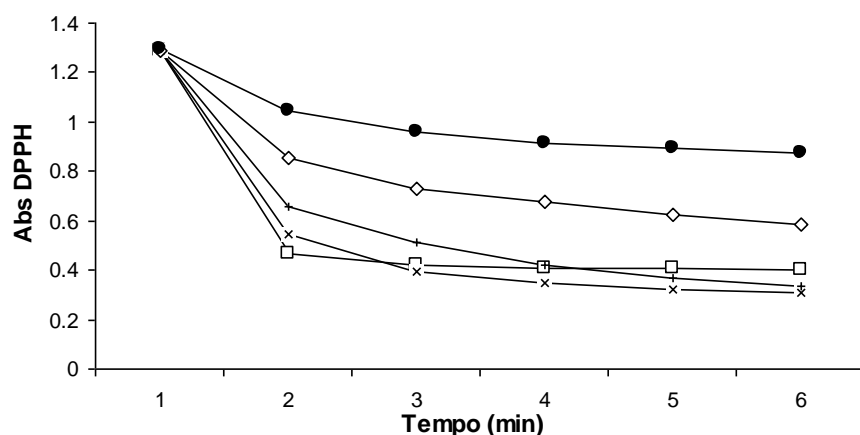
<b>Frações obtidas</b>	<b>Frações Reunidas</b>	<b>Massas obtidas</b>
1-14	SAc1 – II	6,8 mg
15-20	SAc2 – II	2,2 mg
21-24	SAc3 – II	2,9 mg
25-28	SAc4 – II	2,4 mg
29-32	SAc5 – II	1,2 mg
33-38	SAc6 – II	29,3 mg
39-44	SAc7 – II	7,6 mg
45-52	SAc8 – II	1,8 mg
53-64	SAc9 – II	4,7 mg
65-71	SAc10 - II	5,4 mg
72-74	SAc11 - II	1,3 mg
75-79	SAc12 - II	1,8 mg
80-110	SAc13 - II	3,4 mg

## 6.4 Avaliação da capacidade antioxidante

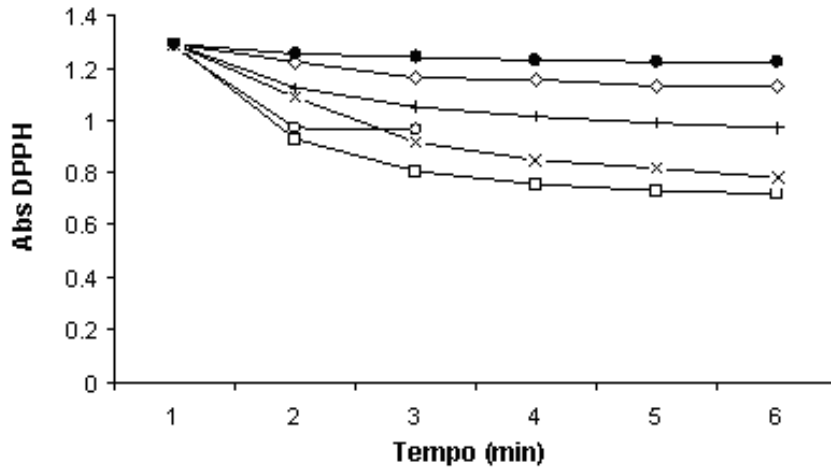
Dentre as substâncias utilizadas para determinar a atividade antioxidante tem-se a molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) caracterizada por ser um radical estável em virtude da deslocalização espacial do elétron livre por toda estrutura da molécula na molécula (MOLYNEUX, 2004).

Uma solução de DPPH<sup>•</sup> ao ser misturada com uma substância que possa ser doadora de átomos de hidrogênio promove o aumento da forma reduzida difenilpicrilhidrazina, de coloração amarela, sendo observada a descoloração da solução. O monitoramento desta reação mostra um decréscimo da absorvância da solução proporcional á atividade antioxidante da amostra adicionada. Este teste foi realizado em triplicata (MOLYNEUX, 2004).

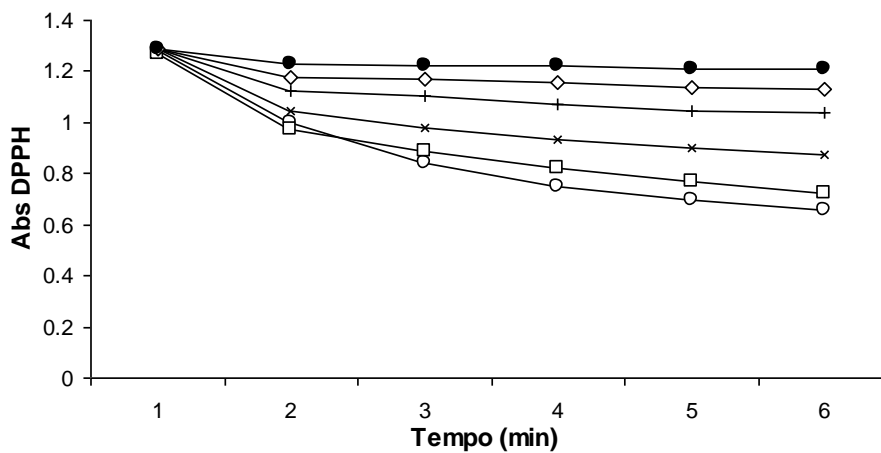
A avaliação da capacidade sequestradora dos agentes antioxidantes presente na amostra, frente ao DPPH<sup>•</sup>, foi realizada a temperatura ambiente. Os resultados expressam, através dos gráficos abaixo, as relações do decréscimo da absorvância em função do tempo e inibição da atividade do DPPH<sup>•</sup> em função da concentração (Figuras 17 a 23).



**Figura 17:** Avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB): 125µg/mL (□), 62.5 µg/mL (x), 31.25 µg/mL (+), e 15.625 µg/mL (◇), 7,8125µg/mL (●). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e Tempo em minutos nas abscissas.

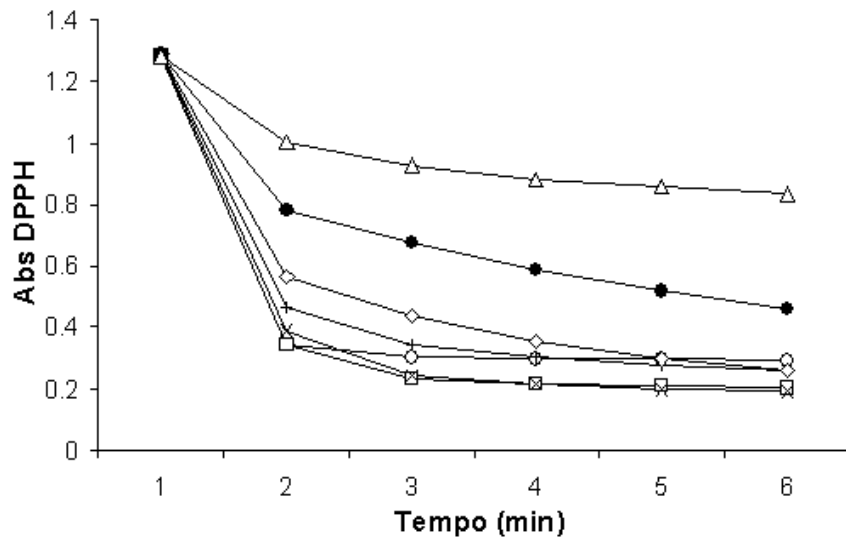


**Figura 18:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração hexânica (FH): 125µg/mL (-□-), 62.5 µg/mL (-x-), 31.25 µg/mL (-+-), e 15.625 µg/mL (-◇-), 7,8125µg/mL (-●-). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e Tempo em minutos nas abscissas.

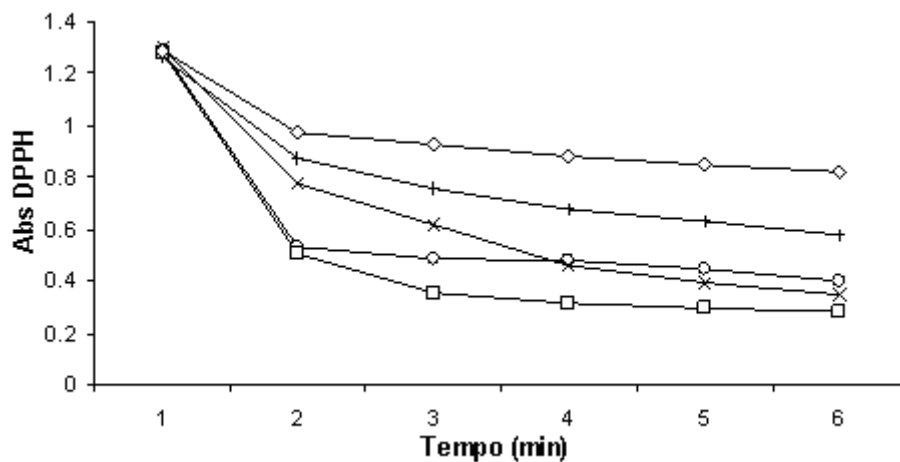


**Figura 19:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração clorofórmica (FC): 250µg/mL (-○-), 125µg/mL (-□-), 62.5 µg/mL (-x-), 31.25 µg/mL (-+-), e 15.625 µg/mL (-◇-), 7,8125µg/mL (-●-). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e Tempo em minutos nas abscissas.

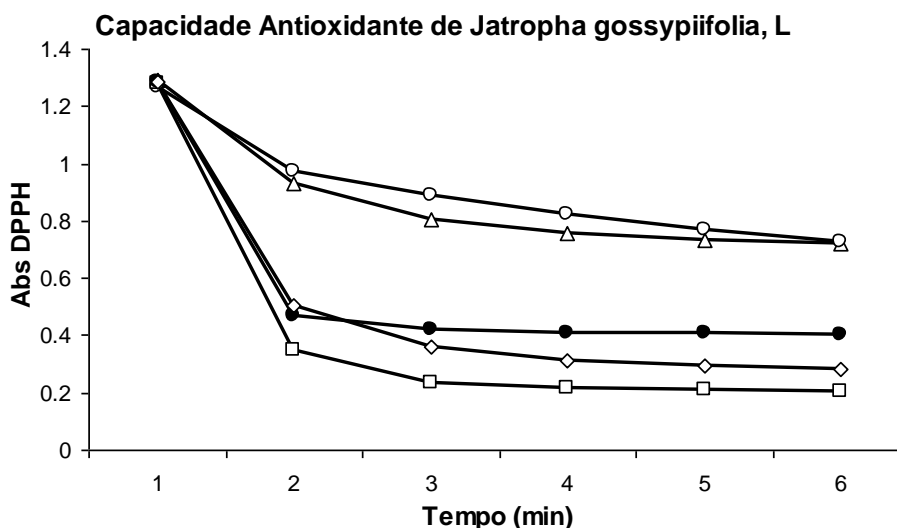




**Figura 20:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração acetato de etila: 250µg/mL (-○-), 125µg/mL (-□-), 62.5 µg/mL (-x-), 31.25 µg/mL (-+-), e 15.625 µg/mL (-◇-), 7,8125µg/mL (-●-). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e Tempo em minutos nas abscissas.

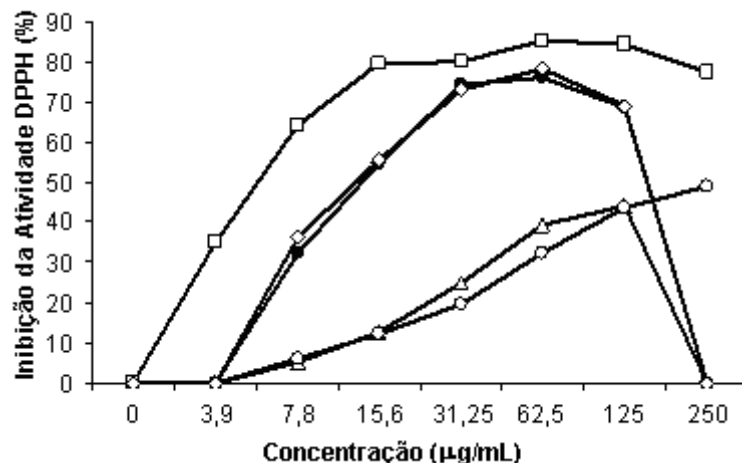


**Figura 21:** Avaliação da capacidade antioxidante da fração residual: 250µg/mL (-○-), 125µg/mL (-□-), 62.5 µg/mL (-x-), 31.25 µg/mL (-+-), e 15.625 µg/mL (-◇-). Os valores estão mostrados em absorvância de DPPH no eixo das ordenadas e Tempo em minutos nas abscissas.



**Figura 22:** Comparação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações de *J. gossypifolia* na concentração de 125µg/mL: FH (-Δ-), FC (-○-), EEB (-●-), FA (-□-) e FR (-◇-). Os valores estão mostrados em inibição da atividade do DPPH<sup>•</sup> no eixo das ordenadas e concentração em µg/mL nas abscissas.

As quatro frações testadas apresentaram diminuição da absorvância do DPPH tanto em função do tempo como também, e inversamente com as concentrações das amostras (Figuras 18, 19, 20 e 21). Após seis minutos, FA - I teve a menor leitura 0,193 seguida das FR - I (0,280), FC - I (0,658) e FH - I (0,719). É natural que frações obtidas de extrações com solvente de maior polaridade agrupe substâncias com esta característica, entre estas estão os compostos fenólicos, como os flavonóides. No caso destas frações, o cromatograma da FA-II apresentou sinais cujo espectro é característico de flavonóides, com maior intensidade do que estes vistos na FR-II. O mesmo é verificado por CCD, zonas cromatográficas reativas a solução etanólica de cloreto férrico detectáveis somente na fração acetato de etila.



**Figura 23:** Avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações: FH (-Δ-), FC (-○-), EEB (-●-), FA (-□-) e FR (-◇-). Os valores estão mostrados em inibição da atividade do DPPH<sup>•</sup> no eixo das ordenadas e concentração em µg/mL nas abscissas.

A menor concentração capaz de inibir 50% de DPPH<sup>•</sup> está presente na FA-II seguida FR-II, FC-II e FH-II. A FA-II foi a que apresentou maior potencial antioxidante dentre as frações testadas (Figura 23).

## 6.5 Avaliação microbiológica

Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas do halo de inibição e como resultado positivo, o surgimento de halo igual ou maior que 8 mm de diâmetro. O DMSO foi utilizado como controle negativo (Branco).

Nesta avaliação, *S. aureus* e *C. albicans* mostraram-se sensíveis à fração clorofórmica nas concentrações 500mg/mL e 250mg/mL, e se mostrou resistentes *P. aeruginosa* e *E. coli* frente todas as amostras em todas as concentrações (Tabela 12).

*Candida sp.* mostrou-se sensível à fração acetato de etila em todas as concentrações testadas enquanto *S. aureus* foi resistente nas mesmas condições (Tabela 12).

*S. aureus* mostrou-se sensível à fração residual nas concentrações de 500mg/mL e 250mg/mL enquanto *Candida sp.*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram resistentes em todas as concentrações testadas (Tabela 12).

Não foi evidenciada sensibilidade dos microorganismos testados a FH para todas as concentrações (Tabela 12).

**Tabela 12:** *Antibiograma (Halo de Inibição em milímetros):*

	<b>C (mg/mL)</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>C. albicans</i></b>
<b>EEB</b>	500	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	125	-	-	-	-
	62,5	-	-	-	-
<b>FH</b>	500	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	125	-	-	-	-
	62,5	-	-	-	-
<b>FC</b>	500	-	8 mm	-	9 mm
	250	-	7 mm	-	8 mm
	125	-	-	-	-
	62,5	-	-	-	-
<b>FA</b>	500	-	-	-	10 mm
	250	-	-	-	9 mm
	125	-	-	-	8 mm
	62,5	-	-	-	7 mm
<b>FR</b>	500	-	9 mm	-	-
	250	-	8 mm	-	-
	125	-	7 mm	-	-
	62,5	-	7 mm	-	-

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram detectados taninos catéquicos, pela primeira vez na espécie, o que pode estar relacionado com a atividade antimicrobiana detectada. A presença dos heterosídeos cianogénicos confirma a taxonomia do vegetal, como uma Euphorbiaceae.

As análises do EEB e da FA-I por CCD com sistema acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água na proporção (100:11:11:26) proporcionaram perfis semelhantes onde se observaram zonas coradas pela solução de cloreto férrico a 5%, indicando presença de compostos fenólicos, sendo possível aproveitamento destes como marcador de qualidade da amostra.

Foram isolados dois flavonóides e estes designados Jg1 e Jg2, a avaliação cromatográfica de Jg1 e Jg2 por CLAE, mostra espectros de UV que se levam a concluir que são derivados glicosilados de apigenina (espectro com máximo de absorvância em 266nm e 338nm).

As frações extraídas com solventes mais polares, fração acetato de etila e fração residual, apresentaram maior atividade microbiológica e melhor potencial antioxidante.

A análise quantitativa das substâncias isoladas presente no extrato etanólico bruto por cromatografia líquida de alta eficiência está condizente com as especificações a RDC nº 899 quanto á linearidade e especificidade do método.

Os resultados deverão contribuir com informações principalmente relacionadas a parâmetro de controle de qualidade, tais como estabelecimento de perfis de separação por CCD, utilização de polifenóis como marcadores de controle de qualidade, e teor de destes possíveis marcadores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J. M. Plantas Tóxicas no Jardim e no Campo. Belém: FCAP, Serviço de Documentação e Informação, p.120, 1980 ilustr.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M. SHERRIS, J. C. ; TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. American Journal of Clinical Pathology, v.45, p.493-496, 1966.

BANERJI, J.; DAS, B.; CHATTERJEE, A.; SHOOLERY, J. N. Gadain, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry. v. 23, p. 2323-27, 1984.

BARBOSA, W. L. R.; SANTOS, A. M.; PINTO, L. N.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA M. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais / [www.propesp.ufpa.br/revistaic/textos científicos. htm](http://www.propesp.ufpa.br/revistaic/textos_cientificos.htm). Belém: UFPA, 2003.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C.A.M. Substâncias isoladas de folhas de *Bauhinia micriostachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, n.2, p. 93-99, 2003.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. V. 181: 119901200, 1958.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Sobre Guia para validação de métodos analítico e bioanalíticos. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: [www.Anvisa.gov.br](http://www.Anvisa.gov.br) . Acesso: 28 de outubro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Política de Saúde. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Brasília, DF, 2001

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agencia Nacional

de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: [www.Anvisa.gov.br](http://www.Anvisa.gov.br) . Acesso: 14 de Março de 2007.

BRUNETON, J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales. Editora Acribia. 2º ed. Parte 2, p. 227-400 Espanha, 1993.

CAPASSO, F.; GAGINELLA, T. S.; GRANDOLINI, G.; IZZO, A. A. Phytotherapy. Ed. Springer. p. 35-36, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL. Farmacognosia da Planta ao medicamento. Ed. da UFSC. 3ª ed. p. 481-483. Santa Catarina, 2007.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. Norma M27-A2 do CLSI. 2002.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8. CLSI. 2003. Treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n.7, p.1027-1031, 2002.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 6, 1926-1978.

CHATTERJEE, A.; DAS, B.; CHAKRABARTI, R.; BOSE, P.; BANERJI, J.; et al. Prasanthaline: A New Lignan from *Jatropha gossypifolia* Linn., Indian Journal of Chemistry Section B. v. 27, p. 740-741, 1998.

DAS, B.; DAS R. Gossypifan. A lignan from *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry. v.40, issue 3, p. 931-932, 1995.

DAS, B.; DAS R.; KASHINATHAM, A. Gossypiline, a new lignan from *Jatropha gossypifolia*. Natural Product Sciences. v.4 (4), p. 238-240, 1998.

DAS B.; PADMA R. S.; SRINIVAS K. V. N. S.; DAS R. Jatrodien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*. v. 41, issue 3, p. 985-987, 1996.

DAS, B.; VENKATAIAH, B.; KASHINATHAM, A. A new coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Natural Product Letters*. v.13, issue 4, p. 293-297, 1999.

DAS, B.; ANJANI, G. Gossypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*. v. 51, p. 115-117, 1999.

DAS, B.; KASHINATHAM, A.; VENKATAIAH, B.; SRINIVAS, K.V.N.S.; MAHENDER, G.; REDDY, M.R. Cleomiscosin A, a coumarino- lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 31, p. 1189-1191, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira IV. Andrei Ed., 1988.

FARMACOPÉIA Portuguesa VII. p. 196, Lisboa, 2002.

FILHO, J. M. B. Farmacognosia da Planta ao medicamento. Ed. da UFSC. 3ª ed. p. 481-483. Santa Catarina, 2007.

GBEASSOR, M.; KOSSOU, Y.; AMEGBO, K.; DE SOUZA, C.; KOUMAGLO, K.; DENKE, A. Antimalarial effects of eight African medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*. v. 25, p. 115-118, 1989.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais. São Paulo: Graphicars. p. 176, 1971.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of própolis simples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, v.86, p. 69-73, 2003.



KUMAR, V. P., CHAUHAN, N. S., PADH, HARISH, RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 107, p. 182-188, 2006.

KUPCHAN, S. M.; SIGEL, C. W.; MATZ, M. J.; RENAULD, J. A. S.; HALTIWANGER, R. C.; BRYAN, R.F. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemistry Society*. v. 92, p. 4476, 1970.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. p. 213-214. São Paulo, 2002.

MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. e HARBONE, J. B. *Natural Products*. Ed. Longman Group UK Limited. Inglaterra, 1996.

MANN, J. *Chemical Aspects of Biosynthesis*. Oxford Chemistry Primers. United States, 1999.

MARCH, J. *Advanced Organic Chemistry*. Editora John Wiley & Sons. 4ª ed, p.186, United States, 1992.

MELO, J. C. P.; SANTOS, S. C. *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. Ed. da UFSC. 3ª ed. p. 527 - 542. Santa Catarina, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science and Technology*. v. 26 (2), p. 211-219, 2004

PEIXOTO, R. P. *Plantas Oleaginosas Arbóreas*. São Paulo: Nobel, p. 252-257, 1973.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. *Árvores de Manaus*. Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, p.107, 1975.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; CHANDRASEKHARAN, S.; CAMERON, A. F.; CONNOLLY, J. D.; LABBE, C.; MALTZ, A. AND RYCROFT, D.S. Jatropholone A and jatropholone B, new diterpenoids (Euphorbiaceae)- crystal structure analysis of jatropholone B. Tetrahedron Letters. v. 4, p. 979-980, 1979.

RAVINDRANATH, N.; VENKATAIAH, B.; RAMESH, C.; JAYAPRAKASH, P.; DAS, B. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. v. 51, p. 870-871, 2003.

RIBEIRO, J. E. L.S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINE, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMAN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora de Reserva Ducke. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Pg. 484. Amazonas, 1999.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Editora Williams & Wiilkins. p. 137- 141, Maryland – United States of America, 1996

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S. Methods for testing antioxidant activity. The Analyst. v.127, p. 183-198, 2002.

SENGUPTA, P. &; DAS, P.B. Chemical investigation of stem bark of *Jatropha gossypifolia*. Journal of the Indian Chemical Society. v. 41, p. 88, 1964.

SILVA, R. A. D. Farmacopéia Estados Unidos do Brasil. 1º ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, p. XXXV, 1929.

SILVA, W. B. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para matéria-prima vegetal e solução extrativa de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). UFRS, Porto Alegre, 1999.

STAFFORD, H. A. Flavonoid Metabolism. CRC Press. Florida - United States, 2000.

SUBRAMANIAN, S. S.; NAGARAJAN, S. AND SULOCHANA, N. Flavonoids of the leaves of *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry. v. 10, p. 1690, 1971.

VINCIERI, F. F.; MAZZI, G.; SALVINI, D.; BILIA, A. R. Characterization of Calendula Flower, Milk-Thistle Fruit, and Passion Flower Tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. Chromatographia v. 53, nº 3/4, 2001,

VUORELA, H., YRJÖNEN, T.; PEIWU, L.; SUMMANEN, J.; HOPIA, A. Free Radical-Scavenging Activity of Phenolics by Reversed- Phase TLC. Jaocs, v. 80, nº 1, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S. Farmacognosia da Planta ao medicamento. Ed. da UFSC. 3ª ed, p. 499 - 517, Santa Catarina, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis. Editora Springer, 2ª ed., p. 196, Alemanha, 2001.

WANG, Z.; GU, L.; WU, T. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. Food Science and Technology, nº 42, p. 131-136, 2008.