

Nubia Ferreira Rocha

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL EM EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L.

Salvador
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
DEPARTAMENTO DE BIOFUNÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

NUBIA FERREIRA ROCHA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL EM EXTRATOS DE
Jatropha curcas L.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção da titulação de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez
Co-orientador: Prof. Dr. Diego Silva Menezes

SALVADOR

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

NUBIA FERREIRA ROCHA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL EM EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L.

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez

Doutora em Bioquímica- Biologia Molecular Estrutural – UPC, Espanha.

Universidade Federal da Bahia - UFBA

Profº. Drº. Marcondes Viana da Silva

Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFV, Minas Gerais.

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Profa. Dra. Renata Silva-Mann

Doutora em Agronomia – UFLA, Minas Gerais.

Universidade Federal de Sergipe - UFS

Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram comigo durante estes dois anos Muito obrigada pelos conselhos, por me ouvirem, por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir o ingresso nesta nova etapa da minha vida, me fortalecendo e guardando por todos os momentos. Embora esta seja a etapa mais difícil Ele me iluminou e colocou nos meus caminhos pessoas preciosas, profissionais admiráveis que com todo carinho estenderam as mãos e me ajudaram até este último momento. Obrigada Pai!

Serei eternamente grata à minha mãe, que nos meus momentos de angústia, quando pensei em deixar o meu sonho de lado, esteve presente ao meu lado, me incentivando a prosseguir e a honrar os meus compromissos, sendo um exemplo de mulher. Te amo!

Ao meu irmão e eterno amigo Leandro, por ser meu confidente, conselheiro, meu braço direito, obrigada por me apoiar, valeu meu querido!

Ao colegiado do Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, através do coordenador Prof. Dr. Roberto Paulo Araújo, pela oportunidade concedida.

À Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez, ou simplesmente Luzi, pela oportunidade que a senhora me proporcionou e tem me proporcionado, pela paciência, dedicação e compreensão por estes anos de trabalho. Agradeço pelo exemplo de pessoa e profissional que és. Gosto e admiro muito a senhora, mil beijos!

Ao professor Dr. Diego Menezes, por acreditar em mim e no meu trabalho, pela sua orientação ao longo desta jornada, enfim te agradeço por tudo. Muito obrigada!

Aos secretários da Pós-Graduação Célia e Marcelo por serem sempre solícitos e amigáveis ao longo destes anos.

À Comissão Examinadora, Prof. Dr. Marcondes Viana, Profa. Dra. Lourdes Neta, Profa. Dra. Renata Mann, por terem aceitado o convite e por contribuírem de forma enriquecedora neste trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos, em especial à Ivana, Cimille, Marta Loureiro, Daniele Takahashi, por proporcionarem um agradável ambiente de trabalho, uma harmonia sem igual, é muito bom trabalhar

ao lado de vocês.

A todos do Núcleo de Bioprospecção e Biotecnologia destacando a Profa. Alene Vanessa, á André Conrado e aos técnicos Evandro, Samuel e Marizete por sempre estarem disposto a me auxiliar, com competência e muito carinho.

Aos meus ICs queridos Katharine Hodel e Thiago Fauerhamel, por estarem sempre comigo, aprendendo, auxiliando e realizando experimentos juntos, sendo os meus braços direito e esquerdo nesta jornada.

À Paulo Ribeiro, por estar sempre disposto a me auxiliar com as análises estatísticas. Obrigada!

Às minhas companheiras de “guerra”, Bianca Mota, Janaína Trench, Márcia de Miguel, Mariana Cedraz e Renata Almeida, pela amizade e por tornarem esta jornada ainda mais agradável.

Agradeço a todos meus amigos que torceram, oraram e estiveram comigo nesta jornada além dos momentos inesquecíveis que vivemos juntos. Obrigada!

À Universidade Federal da Bahia, por proporcionar estrutura física adequada para a realização do curso.

À FAPESB, Petrobrás, CAPES/PNPD pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e apoiaram, tornando possível a execução e realização deste trabalho.

“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que se não veem.”
Hebreus 11:1

ROCHA, Nubia Ferreira. Atividade antioxidante e antitumoral em extratos de *Jatropha curcas* L.. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO- O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta versátil que ultimamente tem sido utilizada como opção em diversas áreas e na medicina popular. Estudos demonstram seu potencial para o tratamento de constipação, doenças parasitárias, como antimicrobiano, antifúngico, antiinflamatório, analgésico, antipirético, antiviral, antioxidante e atividade contra algumas linhagens tumorais. Dentre os diversos fatores extrínsecos e intrínsecos apontados como responsáveis para o surgimento do câncer, um dos mais discutidos atualmente têm sido os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas instáveis, quimicamente reativos produzidos ao longo do metabolismo celular normal, no entanto, podem causar estresse oxidativo que tem sido descrito como um dos principais precursores de doenças como aterosclerose, catarata, doenças neurodegenerativas em especial o câncer. Antioxidantes são moléculas que têm como propriedade o bloqueio, a inibição ou o retardo da deterioração oxidativa, reduzindo ação de radicais livres. O arsenal terapêutico antineoplásico atualmente disponível não são específicos levando à morte de células cancerígenas, como de células normais desencadeando o aparecimento dos efeitos colaterais. Assim, novos compostos que apresentem seletividade são requeridos e recentemente foram introduzidos quimioterápicos de origem natural no tratamento do câncer, o que valida à busca de novos alvos farmacológicos a partir de produtos naturais, principalmente, direcionado às plantas usadas na medicina popular. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar o perfil fitoquímico, a atividade antioxidante e a ação antitumoral de extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L., sob linhagem tumoral *in vitro*. Para tanto, foram preparados extratos frescos e secos de raiz, caule, folha e sementes por dois métodos de extração (maceração e uso de Soxhlet), foi então realizada a identificação dos grupos fitoquímicos e a triagem destes extratos através do efeito antiproliferativo sob a linhagem HepG2. Para avaliação da atividade antioxidante foram realizadas análises através dos métodos de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e sequestro do radical livre 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Os extratos de forma geral apresentaram a presença de flavonoides, taninos catéquicos e fenóis simples. Os rendimentos dos extratos obtidos por ambas as metodologias de extração mostraram diferenças significativas em termos de percentual. O rendimento dos extratos obtidos pelo método de soxhlet apresentou de forma geral menor percentual em relação ao rendimento dos extratos obtidos por maceração, variando entre 1,24 a 24,96 %, e não tendo relação direta com a atividade antioxidante do extrato. Verificou-se que o extrato preparado com soxhlet de amostras secas de folha de *J. curcas* apresentou melhor atividade antioxidante atingindo o percentual superior a 80%, quando avaliado pelo método do DPPH enquanto que os extratos obtidos por maceração de sementes frescas (98,54%) e por soxhlet de sementes secas (97,69%) apresentaram melhor capacidade antioxidante usando o método do ABTS. O extrato de folhas secas obtido por soxhlet apresentou atividade antioxidante pelo método do DPPH de 83,1% / EC₅₀ - 47,46 µg/mL, enquanto que o extrato obtido por maceração de folhas frescas foi de 68,1% / EC₅₀ - 52,88 µg/mL, correspondendo aos menores valores de EC₅₀ dos extratos brutos avaliados pelo método do DPPH. Os extratos etanólicos secos de raiz, caule e folhas obtidos por soxhlet, apresentaram melhor efeito antitumoral sobre as células tumorais da linhagem HepG2 e não foram citotóxicos quando avaliados em macrófagos peritoneais. Conclui-se que extratos etanólicos brutos de folhas de *Jatropha curcas* L. possui atividade antioxidante e extratos etanólicos de raiz e caule promovem efeito antiproliferativo em células tumorais da linhagem HepG2. Conclui-se que a atividade antitumoral sob linhagem HepG2 e antioxidante dos extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L. avaliada através do método de sequestro do radical DPPH e do ensaio ABTS varia em função do método de preparo do extrato, das amostras utilizadas (peso úmido e peso seco) e das partes botânicas analisadas. Este trabalho confirma o potencial antioxidante e antitumoral de extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L..

Palavras-chave: Compostos bioativos, compostos fenólicos, pinhão manso, radicais livres, planta medicinal, DPPH, ABTS, HepG2.

ROCHA, Nubia Ferreira. Antitumor and antioxidant activity in extracts of *Jatropha curcas* L.. Master's Dissertation - Graduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems , Institute of Health Sciences , Federal University of Bahia , Salvador , 2013 .

ABSTRACT - The physic-nut (*Jatropha curcas* L.) is a versatile plant that has lately been an option in several areas and in folk medicine. Studies have demonstrated their potential for the treatment of constipation, parasitic diseases such as antimicrobial, antifungal, antiinflammatory, analgesic, antipyretic, antiviral and antioxidant activity against some tumor cell lines. Among the various extrinsic and intrinsic factors identified as responsible for the emergence of cancer, one of the most discussed have been currently free radicals or reactive oxygen species (ROS), chemically reactive unstable molecules produced during normal cellular metabolism, however can cause oxidative stress has been described as a major precursor of diseases such as atherosclerosis, cataracts, neurodegenerative diseases and in particular cancer. Antioxidants are molecules which have the property blocking, inhibition or delay the oxidative deterioration by reducing action of free radicals. The anticancer therapeutic options are currently available non-specific leading to the death of cancer cells, as normal cells triggers the onset of side effects. Thus, new compounds that exhibit selectivity are required chemotherapy and recently of natural origin have been introduced in the treatment of cancer, which validates the search for new pharmacological targets from natural products mainly directed to plants used in folk medicine. In this context, this study aimed to evaluate the phytochemical profile, antioxidant activity and antitumor action of ethanol extracts of *Jatropha curcas* L., in tumor cell line in vitro. For that were prepared fresh and dried extracts of root, stem, leaf and seeds of two extraction methods (maceration and use of Soxhlet) was then performed to identify groups of phytochemicals and extracts of these screening through antiproliferative effect under the strain HepG2. To evaluate the antioxidant activity analyzes Azino - bis ' (3 - ethylbenzthiazoline - sulfonic acid 6 were performed by the methods of kidnapping free radical 2,2- diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH) free radical sequestration and 2.2) (ABTS) . The extracts generally showed the presence of flavonoids, catechin tannins and simple phenolics. The yields of extracts obtained by both extraction methods showed significant differences in terms of percentage. The yield of extracts obtained by Soxhlet method showed generally lower percentage compared to the yield of extracts obtained by maceration , ranging from 1.24 to 24 , 96 % , and having no direct relationship with the antioxidant activity of the extract . It was found that the extract prepared with soxhlet dried swatches *J. curcas* showed better antioxidant activity reaching more than 80 % percent when evaluated by the DPPH method while the extracts obtained by maceration of fresh seeds (98.54 %) and soxhlet dry seed (97.69 %) showed better ability antioxidant using the ABTS method . The extract of dried leaves obtained by soxhlet showed antioxidant activity by DPPH method of 83.1% / EC₅₀ – 47,46 mg / mL, while the extract obtained by maceration of fresh leaves was 68.1 % / EC₅₀ - 52,88 mg / mL, corresponding to the lower EC₅₀ values of extracts evaluated by the DPPH method. The dried ethanol extracts of root, stem and leaves obtained by soxhlet , showed better antitumor effect on tumor cells HepG2 strain and not lining cytotoxic when evaluated peritoneias macrophages. It was concluded that crude ethanol extracts of leaves of *Jatropha curcas* L. Have antioxidantee ethanol extracts of root activity and promote stem antiproliferative effect on tumor cells HepG2 lineage. We conclude that the activity under antitumoral HEPG2 lineage and antioxidant of ethanol extracts of *Jatropha curcas* L. evaluated by the method of sequestration DPPH and ABTS assay varies depending on the method of preparation of the extract, the samples used (wet weight , dry weight) and botanical parts analyzed . This study confirms the antioxidant and antitumor potential of ethanol extracts of *Jatropha curcas* L..

Keywords: Bioactive compounds, phenolic, jatropha, free radicals, medicinal plant, DPPH, ABTS, HEPG2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de radicais livres na mitocôndria.	19
Figura 2. Geração de radicais livres a partir de outras organelas, mecanismos antioxidante biológicos e lesões ocasionadas pelos radicais livres.	20
Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio com formação subsequente de novos radicais livres.	21
Figura 4. Ação neutralizante de uma molécula antioxidante.	22
Figura 5. Esquema representativo da classificação dos antioxidantes.	23
Figura 6. Reação de Fenton	23
Figura 7. Origem e eventos moleculares de progressão do câncer.	25
Figura 8. Esquema de desenvolvimento do estudo.	32
Figura 9. Amostras de (A) Caule; (B) Folhas; (C) Raiz; (D) Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. coletadas na estação experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA.	33
Figura 10. Estação experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA.	34
Figura 11. Preparo de extratos etanólicos de amostras de <i>Jatropha curcas</i> L.. (A) Método de Maceração e (B) Método de Soxhlet.	
Figura 12. Estruturas moleculares da morfina (A); taxol (B) e reserpina (C).	35
Figura 13. Molécula estrutural de sapogenina esteroidal (A) e sapogenina triptertênica (B).	39
Figura 14. Sapogeninas esteroidais (A) Diogenina precursora de progesterona; (B) Hecogenina precursora de cortisona.	41
Figura 15. Estrutura básica dos glicosídeos cardíacos digitoxina (R=H) e digoxina (R=OH).	42
Figura 16. Estrutura molecular do isopreno.	42
Figura 17. Estrutura básica de um esteróide denominada ciclopentanoperhifofenantreno.	43
Figura 18. Estrutura básica de um esteroide anabolizante.	43
Figura 19. Estruturas de corticosteróides cortisol e aldosterona.	44
Figura 20. Estrutura dos esteroides estradiol e progesterona.	44
Figura 21. Estrutura molecular do fitoesterol β – Sitosterol.	44
Figura 22. Estrutura básica das cumarinas.	45
Figura 23. Estrutura molecular da (A) Chalcona; (B) Flavonona; (C) antocianidina, (D) flavona; (E) flavanol e (F) isoflavonóide	46
Figura 24. Estrutura molecular de taninos.	47
Figura 25. Arbusto de <i>Jatropha curcas</i> L. Estação Experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, Bahia, 2012.	54
Figura 26. Estabilização do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil).	57

Figura 27. Estabilização do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	59
Figura 28. Curvas analíticas lineares (A) Padrão Ácido Gálico e (B) Radical DPPH.	63
Figura 29. Atividade Antioxidante através do ensaio DPPH dos extratos de raiz, caule, semente e folhas (250 µg/mL) de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos por soxhlet e por maceração.	66
Figura 30. Curvas analíticas (A) Radical ABTS, (B) Padrão Ácido Gálico e (C) Equivalente a Vitamina E (Trolox).	69
Figura 31. Percentual de Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos de raiz, caule, semente e folhas (1000 µg/mL) de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos por Soxhlet e por Maceração através do ensaio ABTS.	70
Figura 32. Atividade antioxidante equivalente ao trolox (A) e ao ácido gálico (B) pelo método do ABTS dos extratos de sementes, caule, raízes e folhas de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos por soxhlet e por maceração.	71
Figura 33. Curva analítica linear do padrão Ácido Gálico utilizado para determinação de Compostos Fenólicos Totais.	73
Figura 34. Compostos Fenólicos Totais dos extratos etanólicos de raiz, caule, folha e sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos por soxhlet e por maceração.	74
Figura 35. (A e B) Correlação dos teores de compostos fenólicos em relação a atividade antioxidante pelo método ABTS; (C) Correlação dos teores de compostos fenólicos em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH.	75
Figura 36. Fatores de risco e eventos moleculares desencadeadores do carcinoma hepatocelular.	81
Figura 37. (A) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por Maceração, sob a linhagem HEPG-2 por 24 horas. (B) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por Maceração, sob a linhagem HEPG-2 por 48 horas.	88
Figura 30. (A) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por Soxhlet, sob a linhagem HEPG-2 por 24 horas. (B) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por Soxhlet, sob a linhagem HEPG-2 por 48 horas.	89
Figura 39. Avaliação da citotoxicidade dos extratos promissores obtidos por Soxhlet após incubação de 48 horas.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação estrutural dos alcaloides.	39
Tabela 2. Classificação dos terpenóides de acordo com o número de isopreno.	42
Tabela 3. Avaliação colorimétrica como indicativo da presença de diferentes grupos químicos em ensaio ácido-alcalino.	48
Tabela 4. Cores utilizadas como indicativo da presença de diferentes grupos químicos em ensaio ácido-alcalino complementar.	49
Tabela 5. Prospecção fitoquímica de classes químicas em extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por maceração.	50
Tabela 6. Prospecção fitoquímica de classes químicas em extratos de <i>J. curcas</i> obtidos por soxhlet.	50
Tabela 7. Porcentagem de Peso Seco e Umidade dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raiz de <i>Jatropha curcas</i> L..	61
Tabela 8. Rendimento dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raízes (secas e frescas) de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos através da extração por maceração e por soxhlet.	61
Tabela 9. Concentração eficiente (CE ₅₀) dos extratos etanólicos de raiz, caule, folha e sementes frescas e secas de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidos por Soxhlet e por maceração.	68
Tabela 10. Classificação dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raízes (secas e frescas) de <i>Jatropha curcas</i> L., obtidos através da extração por maceração e por soxhlet.	86

LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

°C	Graus Celsius
DMSO	Dimetilsulfóxido
CE ₅₀	Concentração Eficiente de cinqüenta por cento
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina Tamponada)
LBBB	Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos
SSE _{PU}	Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet
SC _{PU}	Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet
SR _{PU}	Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet
SF _{PU}	Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet
SSE _{PS}	Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet
SC _{PS}	Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet
SR _{PS}	Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet
SF _{PS}	Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet
MSE _{PU}	Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração
MC _{PU}	Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração
MR _{PU}	Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração
MF _{PU}	Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração
MSE _{PS}	Extrato de Semente Seca obtido por Maceração
MC _{PS}	Extrato de Caule Seco obtido por Maceração
MR _{PS}	Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração
MF _{PS}	Extrato de Folha Seca obtido por Maceração
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
S	Soxhlet
M	Maceração
PS	Amostra seca ou Peso seco
PU	Amostra fresca ou peso úmido
F	Folha
C	Caule
Se	Semente
R	Raiz
%AA	% Atividade Antioxidante

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	18
2.1 <i>Jatropha curcas</i> L.	18
2.2 Radicais Livres	19
2.3 Atividade Antioxidante	22
2.4 Desenvolvimento do câncer	25
2.5 Epidemiologia	27
2.6 Tratamento e novas perspectivas	27
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. Materiais e Métodos	32
4.1 Amostragem	33
4.2 Determinação da umidade	34
4.3 Preparo dos extratos	34
4.3.1 Extração por Maceração	35
4.3.2 Extração com a utilização do Extrator Soxhlet	35
4.3.3 Análise estatística	36
5. Resultados e Discussão	38
Capítulo 1 - Identificação de grupos fitoquímicos em extratos etanólicos de <i>Jatropha curcas</i> L.	38
Capítulo 2 Atividade Antioxidante de extratos etanólicos de <i>Jatropha curcas</i> L.	54
Capítulo 3 Triagem de extratos etanólicos de <i>Jatropha curcas</i> L. quanto efeito antitumoral.	80
6. Conclusão	97
7. Perspectivas	97
Referências	98
Anexos	108

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande diversidade em fauna e flora, que tem sido cada vez melhor investigada para aumento do uso medicinal de substâncias fitoquímicas, o que implica na identificação e isolamento destes produtos naturais que sejam efetivos a diversos tipos de enfermidades (CRAGG & NEWMAN, 2013). Estudos mostram que as pesquisas com produtos naturais, envolvendo análises e investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica), principalmente, sobre o uso de plantas medicinais é uma estratégia promissora para descoberta de medicamentos (PINTO *et al.*, 2002).

Dentre as diversas espécies utilizadas por populares contra enfermidades destaca-se o pinhão-manso, pois possui variadas propriedades que despertam o interesse em investigá-la melhor. É uma planta de fácil adaptação em regiões áridas podendo recuperar áreas degradadas e evitar a erosão do solo, além de funcionar como cerca viva (MISRA & MISRA, 2010; SATURNINO *et al.*, 2005).

O óleo do pinhão-manso tem sido utilizado como biodiesel o que proporciona para pequenos produtores uma fonte de renda na agricultura familiar (OPENSHAW, 2000). A planta é utilizada no tratamento de doenças de pele, desintéria, paralisia e reumatismo, a suas sementes são usadas no tratamento de icterícia e artrite, além de existirem relatos de uso popular como purgante, analgésico, antiinflamatório, antipirético, antiviral, além de ação contra alguns tipos de tumores (OSKOUÉIAN *et al.*, 2011a; DI STASI, 2002; BALAJI *et al.*, 2009; MAJUMDAR *et al.*, 2000). Desta forma, estudos sobre o uso das plantas pertencentes à família das euforbiáceas, como pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) são requeridos, já que tal planta é descrita na literatura como detentora de ações antioxidantes e medicinais.

Entre as doenças mais prevalentes na atualidade, destaca-se o câncer, segunda causa de morte mundial, caracterizado pela desordem no crescimento celular, uma enfermidade multicausal crônica (OMS, 2013).

A etiologia do câncer é multicasual e está associada a fatores intrínsecos e/ou extrínsecos. Dentre os diversos fatores intrínsecos, destacam-se os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas instáveis, quimicamente reativas e produzidas ao longo do metabolismo celular normal. Todavia, em condições adversas, pode haver um desequilíbrio entre a taxa de produção e os mecanismos de detoxificação, desencadeando um processo denominado de estresse oxidativo.

A geração exacerbada de ERO, conseqüentemente, estabelecimento do estresse oxidativo, tem sido descrito como um dos principais precursores de doenças como aterosclerose, catarata, doenças neurodegenerativas e, principalmente, o câncer (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Portanto, a busca por novos agentes antioxidantes é imprescindível, pois os que estão em uso atualmente ainda possuem problemas quanto à segurança e à toxicidade (AYRES *et al.*, 2009). Uma alternativa é a avaliação do potencial antioxidante de plantas como o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), já muito utilizado na medicina popular (RIBEIRO, 2010).

A incidência e taxa de mortalidade dos cânceres têm aumentado ao longo dos anos, sendo responsável por aproximadamente sete milhões de óbitos a cada ano (WHO, 2012). Atualmente, é a segunda causa de morte no mundo, menor apenas que as afecções cardiovasculares (MATOS, 2008). Em 2010, as mortes por malignidade representaram 15,4% das mortes no país (INCA, 2013).

Alguns cânceres são difíceis de tratar, sendo as intervenções cirúrgicas, quando possível, a opção de escolha clínica. Entretanto, alguns tipos de cânceres são de difíceis acessos, o que limita essa alternativa clínica. Ademais, os procedimentos cirúrgicos podem causar grandes impactos à vida do paciente, comprometendo o seu bem estar social. Assim, a quimioterapia passa a ser a estratégia de escolha (MATOS, 2008).

A quimioterapia consiste no uso de agentes antineoplásicos na tentativa de destruir células tumorais interferindo com as suas funções e reprodução. No entanto, a maioria destas drogas causa significativos efeitos colaterais, prejudicando também os tecidos normais. Além disso, observa-se uma resistência aos medicamentos anticancerígenos, o que limita a eficácia do tratamento (MESQUITA, 2009).

A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural (SOUZA, 2004; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Nesse contexto, o Brasil, país de maior biodiversidade, é um cenário propício para prospecção de novos fármacos antitumorais.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Jatropha curcas* L.

A *Jatropha curcas* L. é pertencente à família Euphorbiaceae (figura 1). A família Euphorbiaceae é amplamente distribuída em diversas partes do mundo sendo encontradas principalmente nas regiões tropicais (Américas e África) compreendendo cerca de 290 gêneros e 7500 espécies de ervas, subarbustos, arbustos, árvores e trepadeiras (JOLY, 1985). Na caatinga é a segunda família mais representativa em espécies sendo ultrapassada somente pela família Leguminosae, dentre os diversos gêneros pertencentes às euforbiáceas destacam-se *Acalypha*, *Croton*, *Euphorbia*, *Macaranga*, *Jatropha*, *Phyllanthus* e *Mallotus* (SANTOS *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2010).

Atualmente estudos envolvendo a família Euphorbiaceae têm sido mais explorados devido à grande incidência de intoxicações relatadas com as suas espécies (*Euphorbia milii* Des Moul., *Euphorbia cotinifolia* L., *Ricinus communis* L., *Manihot esculenta* Crantz, *Aleurites fordii* Hemsl. e a *Jatropha curcas* L.), o que traz prejuízos à pecuária e a saúde pública. Todavia, as mesmas espécies que possuem uma toxicidade elevada apresentam substâncias ativas capazes de proporcionar modelos moleculares de interesse farmacológico (HIROTA, 2011; RIBEIRO, 2010).

Diversos trabalhos apontam a atividade farmacológica de algumas espécies das euforbiáceas como antibacteriana, antitumoral, anticoagulante e coagulante, inseticida, anti-hipertensivos, antiinflamatórios, antimaláricos, antiespasmódicos, antiulcerogênicos, antivirais, e miorelaxantes (SALATINO *et al.*, 2007; MUJUMDAR & MISAR, 2004; OSONIYI & ONAJOBI, 2003) sendo estas amplamente utilizadas na medicina popular.

No entanto, os estudos não se concentram apenas nas propriedades biológicas das euforbiáceas, estas se destacam também como fonte alternativa na produção de biocombustíveis, em especial a espécie *Jatropha curcas* L. devido a ser uma planta perene de fácil adaptação em áreas semiáridas, e pode ser utilizada para sustento na agricultura familiar sendo então uma fonte agrícola para a região nordeste (MORAIS, 2010; RIBEIRO, 2010).

O gênero *Jatropha* pertence à subfamília *Crotonoideae*, tribo *Jatropheae*, possui cerca de 170 espécies, é caracterizado pela alta toxicidade e irritabilidade,

além da ação purgativa das sementes de algumas espécies. É amplamente distribuído nas regiões semiáridas tropicais da África e das Américas. As espécies *J. gossypiifolia*, *J. curcas*, *J. podagrica*, *J. elliptica*, *J. multifida* e a *J. glandulifera*, usadas na “medicina alternativa” no tratamento de doenças (RIBEIRO, 2010).

Possuem grande importância para a economia, pois, muitas estão envolvidas com o uso farmacológico e ornamental (MARINHO, 2011). A espécie mais estudada até o momento têm sido a *Jatropha curcas* por conta do seu potencial uso como biocombustível (HIROTA, 2011). Apesar dos dados satisfatórios, ainda pouco se sabe sobre as condições essenciais necessárias para que o seu óleo substitua os combustíveis fósseis e proporcione menor impacto junto ao meio ambiente (ACHTEN, 2008).

2.2. Radicais livres

Nos organismos aeróbios, o oxigênio é o combustível indispensável para a realização de peculiaridades pertinentes como a respiração e geração de energia. As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela fosforilação oxidativa (que permite a transferência de elétrons para o oxigênio) e consequente síntese de ATP (figura 1) (VENDITTI *et al.*, 2013).

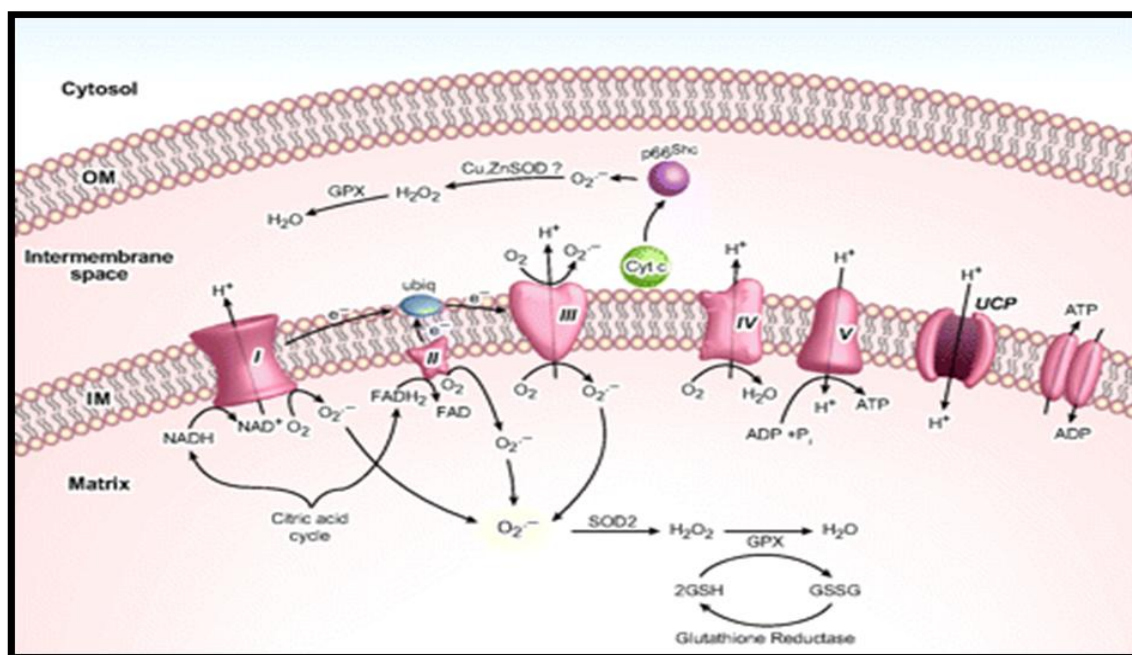


Figura 1. Produção de radicais livres na mitocôndria.

Fonte: FERREIRA & MATSUBARA, 1997.

Mas também, são as principais organelas produtoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres (RL), seguidas dos peroxissomos, retículos endoplasmáticos, e o próprio citosol (figura 2) (ZABLOCKA & JANUSZ, 2008). Os radicais livres são produzidos a partir da redução incompleta do O_2 molecular o que leva ao aparecimento de espécies altamente reativas a outras biomoléculas, especialmente, lipídios e proteínas das membranas celulares e o DNA (figura 3) (PEREIRA & PEREIRA, 2012).

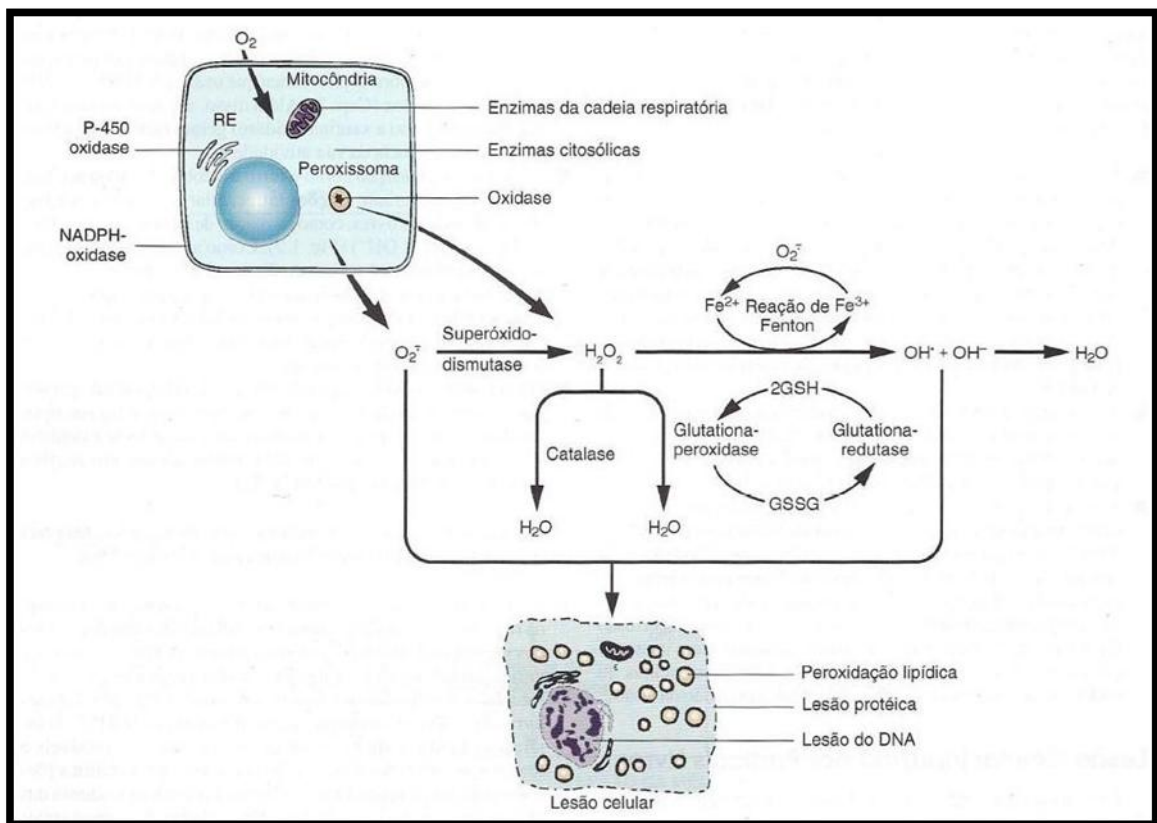


Figura 2. Geração de radicais livres a partir de outras organelas, mecanismos antioxidante biológicos e lesões ocasionadas pelos radicais livres.

Fonte: KUMAR *et al.*, 2005

O radical Superóxido (O_2^-) e o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) têm sido descritos como precursores das demais EROs, pois possuem grande facilidade em reagir com outras biomoléculas e atravessar membranas celulares (VENDITTI *et al.*,

2013; ZABLOCKA & JANUSZ, 2008). Na realidade, o superóxido é um radical moderadamente reativo, que quando dismutado pela enzima Superóxido Dismutase (SOD), se torna precursor na formação de ERO mais reativos. Antes, o superóxido dismutado forma o peróxido de hidrogênio que, por sua vez na presença de metais de transição reduzidos como Fe^{+2} ou Cu^{+} é convertido em radicais hidroxilas, estes sim, são altamente reativos e conferem desta forma a periculosidade das espécies reativas de oxigênio (VENDITTI *et al.*, 2013).

Existem diferentes mecanismos de reação dos radicais livres, eles podem reagir através de doação e/ou recepção de elétrons, redução de radicais, abstração de hidrogênio, reações de adição e autoaniquilação, o que aumenta mais a geração de radicais livres (figura3) (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

A partir destas reações, os radicais livres têm sido associados a diversas doenças graves como doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, acidente vascular encefálico e hipertensão, desordens neurológicas, distúrbios renais e hepáticos, diabetes mellitus, lúpus eritematoso, e câncer (LOBO *et al.*, 2010; LÜ *et al.*, 2010; RAHMAN, 2007; SINGH *et al.*, 2010). No entanto, o aparecimento de tais doenças está intimamente relacionado com o dano oxidativo provocado pelo desequilíbrio entre os níveis de radicais livres e antioxidantes.

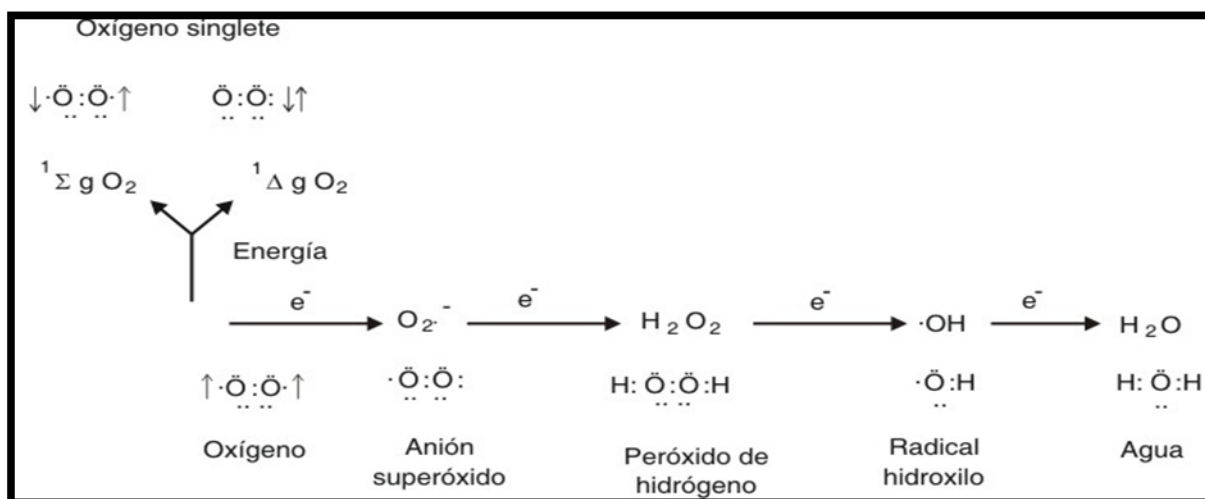


Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio com formação subsequente de novos radicais livres.

Fonte: FERREIRA & MATSUBARA, 1997.

2.3. Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias ou moléculas capazes de atrasar, e inibir a oxidação provocada pelos radicais livres, impedindo ou eliminando os danos oxidativos às biomoléculas alvo, sendo ainda capazes de formar um radical estável após a eliminação do radical oxidante (figura4) (HALLIWELL, 2007; KHLEBNIKOV *et al.*, 2007).

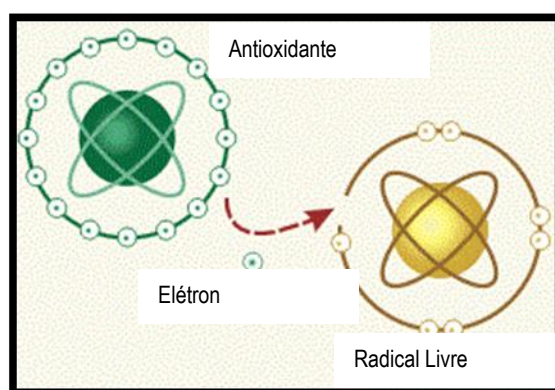


Figura 4. Ação neutralizante de uma molécula antioxidante.

Fonte: MARTINEZ, 2011.

Os antioxidantes são classificados em dois grupos: Naturais e Sintéticos. Os antioxidantes naturais são divididos em dois grupos: **enzimáticos** (Glutaciona Peroxidase, Catalase, Superóxido Dismutase, Redutase e Glutaciona Desidrogenase de Glicose-6-Fosfato) e **não-enzimáticos** (Retinol (Vitamina A), Coenzima Q10, Ácido Ascórbico (Vitamina C), Ácido Úrico, Tocoferóis (Vitamina E), Vitamina K, Flavonóides, Ácidos Fenólicos, Carotenóides, Selênio e Zinco (cofatores minerais)). Os antioxidantes sintéticos mais importantes são o BHT e BHA (figura 5) (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

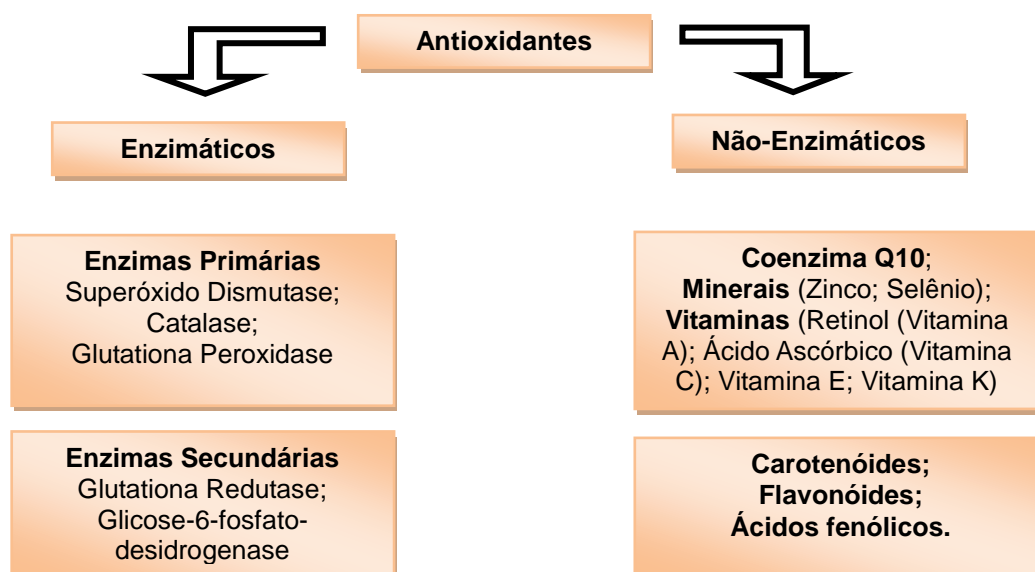


Figura 5. Esquema representativo da classificação dos antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Carochó & Ferreira, 2013.

Os antioxidantes naturais desempenham papéis importantíssimos nas reações metabólicas do organismo. A glutaciona peroxidase, por exemplo, são responsáveis pela doação de elétrons para redução de peróxidos eliminando-os como potenciais substratos para a reação de Fenton (figura 6) e além de reduzir a glutaciona para manutenção da neutralização dos radicais livres; a catalase, no entanto, é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e O₂ molecular; a superóxido dismutase (SOD) converte o superóxido em peróxido de hidrogênio para ação da catalase (RAHMAN, 2007).

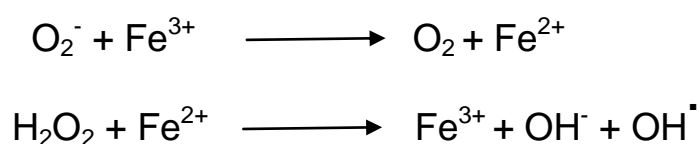


Figura 6. Reação de Fenton.

A redutase e a glutaciona redutase não atuam diretamente na neutralização de radicais livres, mas desempenham papéis secundários para a ação de outros agentes antioxidantes (RATNAM *et al.*, 2006).

O retinol possui a capacidade de combinação dos radicais peroxil antes que

aja a peroxidação lipídica (JEE *et al.*, 2006). A Coenzima Q10 desempenha um papel fundamental na cadeia respiratória, atua impedindo a formação de peróxilas, além de neutralizar radicais livres e regenerar a vitamina E (TURUNEN *et al.*, 2004). O ácido úrico evita o excesso de oxidantes resultantes da reação dos peróxidos com a hemoglobina (oxo-Hem), além de ser um excelente captador de radicais hidroxilas e oxigênio singlete (KAND'ÁR *et al.*, 2006).

O ácido ascórbico é eficaz na eliminação do radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, oxigênio singlete e óxido de nitrogênio reativo. A vitamina E atua interrompendo a peroxidação lipídica doando o seu hidrogênio fenólico para os radicais peróxil. A vitamina K é essencial para conversão translacional dos glutamatos ligados às proteínas carboxiglutamatos, conferindo o efeito de proteção antioxidante (BARROS *et al.*, 2011).

Os flavonóides possuem ação de agentes redutores devido aos grupos fenóis ligados a sua estrutura (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2011). Os ácidos fenólicos agem como quelantes e captadores de radicais livres (KRIMMEL *et al.*, 2010). Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microorganismos, a atividade antioxidante exercida por eles é a capacidade de dissipação de energia do oxigênio, proporcionando a não geração de radicais livres (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

O selênio não possui ação direta contra os radicais livres, mas é uma parte indispensável na maioria das enzimas antioxidantes (TABASSUM *et al.*, 2010). O zinco pela mesma forma do selênio não atua diretamente contra os radicais livres, mas é um inibidor da oxidase de NADPH que catalisam a produção de radicais de oxigênio singlete (PRASAD *et al.*, 2004).

Os antioxidantes sintéticos BHT e BHA têm sido utilizados para conservação de alimentos (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Embora tais substâncias possuam atividade antioxidante, a concentração destas no organismo podem também as tornar tóxicas, transformando-as em agentes prooxidantes (definidas como produtos químicos (pós-reação) capazes de gerar estresse oxidativo, a partir de geração de novos radicais livres) (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

2.4. Desenvolvimento do câncer

Os radicais livres podem induzir ao aparecimento de doenças graves, dentre elas, o câncer, como citado anteriormente. O termo câncer se refere ao conjunto de mais de 250 doenças, as quais podem se manifestar em qualquer tecido do organismo (HANAHAN & WEINBERG, 2000). O câncer é uma doença genética que possui duas principais características: a primeira é o crescimento não regulamentado das células e em segundo a capacidade de invadir tecidos provocando a metástase (figura 7) (FINKEL *et al.*, 2007).

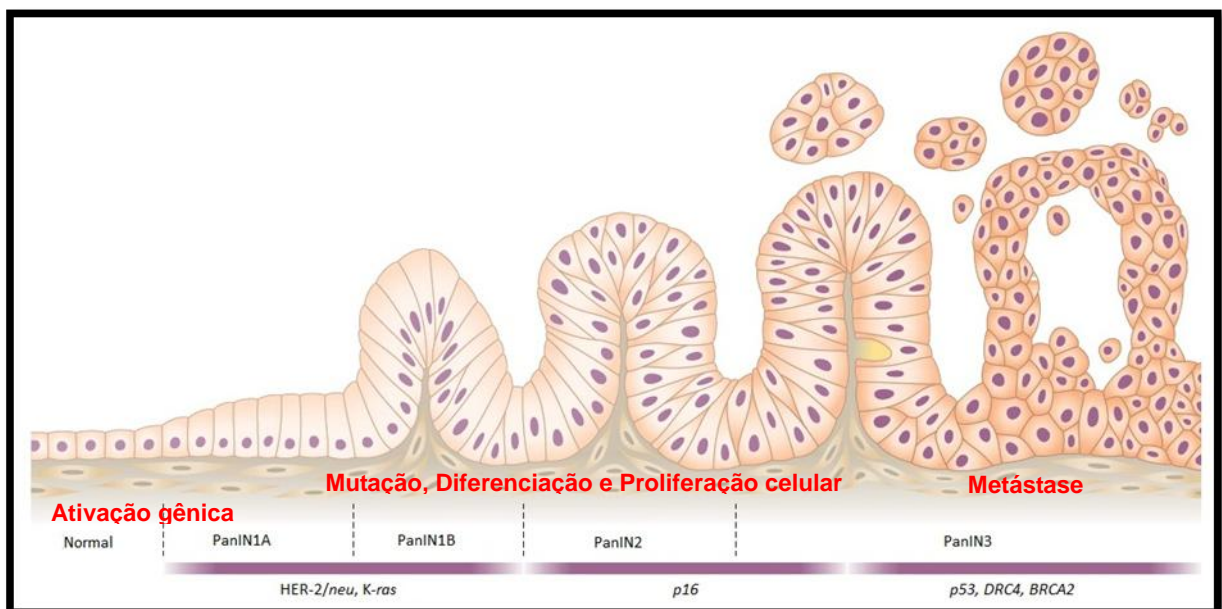


Figura 7. Origem e eventos moleculares de progressão do câncer.

Fonte: SOHAL *et al.*, 2011.

Diversas mutações em genes específicos podem alterar drasticamente as quantidades e/ou atividades das proteínas produzidas por estes, alterando consequentemente as propriedades celulares fundamentais (COTTER, 2009).

Os protooncogenes e os genes supressores de tumor desempenham papéis fundamentais no surgimento do câncer. Quando modificados são os principais responsáveis pela proliferação celular desordenada, os protooncogenes passam a ser oncogenes provocando um crescimento exagerado com produção excessiva e anormal de proteínas que estimulam tal comportamento, levando a diminuição da

diferenciação celular no tecido tumoral (BILD *et al.*, 2006). Já os genes supressores de tumor quando mutados passam a ser inativos e contribuem para o aparecimento da doença, pois eliminam o controle da divisão celular suprimindo a apoptose (SHARMA *et al.*, 2007).

Nas células cancerosas os *checkpoints* do ciclo celular apresentam-se deficientes. A transição da fase G1 para a fase S é um ponto regulador para a proliferação celular, onde é realizada a primeira checagem verificando a situação celular, a fosforilação da proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRb) no ponto de restrição na fase G1 determina se a célula entrará na fase S (DAI & GRANT, 2007).

O complexo CDK4 e CDK6 com ciclinas do tipo D formam uma quinase específica na fase G1 e sua atividade é regulada por fatores de crescimento, nutrientes, e interações entre célula-célula e célula-matriz (HUBER *et al.*, 2005). O resultado é a formação de cdk2/ciclina e complexos ativos na fosforilação completa de pRB, aliviando os efeitos inibidores sobre o fator regulador E2F/DP1 de transcrição da fase S, o que permite a ativação necessária de genes para a fase S (HUBER *et al.*, 2005). A atividade do complexo CDK / ciclina pode ser bloqueada por inibidores de CDK-p21Cip1/Waf1 incluindo, p16INK4a, e p27KIP1, os quais bloqueiam a progressão da fase S impedindo a fosforilação da pRb (JOHNSTON, 2009).

Alterações ou lesões genéticas que inviabilizam a via de retinoblastoma são apontadas na ocorrência de todos os tipos de câncer humano. A perda da função de pRb como guardião do ponto de restrição da fase G1 permite que as células cancerosas introduzam um ciclo mitótico sem a entrada normal de sinais externos (HUBER *et al.*, 2005; JOHNSTON, 2009).

Outra proteína importante é a p53, conhecida como a "guardiã do genoma", é uma sequência específica do fator de transcrição, cuja atividade é regulamentada através de um rígido controle dos seus níveis (VOUSDEN & LANE, 2007). Normalmente, os níveis de p53 são mantidos baixos pela sua associação com a MDM2, um produto oncogene, que leva a p53 para fora do núcleo para a degradação proteolítica (VOUSDEN & LANE, 2007).

Os níveis da p53 são regulados por duas vias de *checkpoint*: a primeira é devido a ativação como resposta a um dano no DNA e a segunda é pela indução da

proliferação celular por um oncogene. A perda da função da p53 anula esses postos de controle permitindo as células tumorais escapar do ponto de checagem do ciclo celular ou da apoptose (ROSEN & JORDAN, 2009).

2. 5. Epidemiologia

O câncer é um crescente problema público, cuja estimativa de novas incidências a nível mundial é de aproximadamente 12 milhões de casos por ano. É a segunda maior causa de mortes após doenças cardiovasculares, sendo caracterizada pela desregulação da proliferação celular (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). No Brasil, o câncer ocupa uma posição de destaque ao lado das doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, doenças infecciosas e parasitárias, sendo a terceira causa de morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Neste âmbito, os fatores de risco do câncer estão associados ao estilo de vida, ao meio ambiente ou ainda a fatores genéticos (ocasionados por fatores intrínsecos ou extrínsecos) que podem determinar o aparecimento de diferentes tipos de câncer (ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.6. Tratamento e novas perspectivas

O tecido tumoral é formado por células mistas, nas quais umas são sensíveis ao tratamento e outras são resistentes, desta forma, a quimioterapia modalidade mais aplicada ao tratamento do câncer, eventualmente, elimina as células sensíveis deixando as resistentes ou agredindo as células normais (GRAUDENS *et al.*, 2006). Esta modalidade de tratamento sistêmico usa agentes antineoplásicos tóxicos a qualquer tecido de rápida proliferação, o que acarreta o aparecimento de consideráveis efeitos colaterais (FONSECA *et al.*, 2000).

Os efeitos colaterais mais apresentados por pacientes com câncer são toxicidade hematológica, alterações gastrointestinais, além da toxicidade pulmonar (BONASSA, 2005). A cardiotoxicidade desencadeada pelo uso de alguns medicamentos neoplásicos é um efeito cumulativo, podendo ocasionar insuficiência cardíaca congestiva e, subsequente, falência cardíaca, fator que ocasiona desistência do tratamento pelo paciente (FONSECA *et al.*, 2000; BONASSA, 2005).

Os procedimentos cirúrgicos, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia são

as abordagens disponíveis para o tratamento do câncer, sendo que quando utilizado apenas uma modalidade muitas vezes é ineficiente (INCA, 2013).

Os quimioterápicos introduzidos nos últimos anos no tratamento do câncer são de origem natural, isto reforça o interesse industrial em medicações oriundas de produtos naturais (ARÊAS, 2007). PINTO e colaboradores (2002) mostram que as pesquisas com produtos naturais, principalmente, plantas medicinais envolvem análises e investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de produtos naturais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos.

O Brasil possui uma riqueza fitoterápica muito vasta, propiciando a descoberta de novas substâncias isoladas a partir de extratos de plantas nativas com atividade antitumoral (PINTO *et al.*, 2002). Deste modo, destaca-se a atenção dada nos últimos anos a extratos e compostos de *J. curcas* (Pinhão-manso). Estudos apontam que extratos e compostos como: a curcina, flavonóides, saponinas do pinhão-manso possuem atividade contra alguns tipos tumorais através da inibição da proliferação e/ou da síntese protéica nos ribossomos (LIN *et al.*, 2003; SAHIDIN *et al.*, 2011).

Neste contexto, pesquisas que visem avaliar tais produtos naturais que possuam capacidade de prevenir a formação de radicais livres e porventura possuírem atividade antitumoral se fazem necessárias. Além de entender os mecanismos de ação tomam-se requeridas, para melhorar a terapêutica atual dessa doença que acomete acentuada parcela da população mundial.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar extratos etanólicos de sementes, folhas, raiz e caule de *Jatropha curcas* L. quanto ao potencial antioxidante e antitumoral.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar screening fitoquímico dos extratos etanólicos brutos de *J. curcas*;
- ✓ Determinar a atividade antioxidante *in vitro* em extratos etanólicos brutos de *Jatropha curcas* L.;
- ✓ Quantificar compostos fenólicos totais em extratos etanólicos de *J. curcas* obtidos por dois métodos de extração (contínua e a frio);
- ✓ Correlacionar os teores de compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos brutos de *J. curcas*;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral, *in vitro*, dos extratos etanólicos brutos de *J. curcas* sobre a linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular).
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos etanólicos de *J. curcas* mais promissores quanto a atividade antitumoral.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido nos Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos do Departamento de Biofunção da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA), e no Núcleo de Biotecnologia e Bioprospecção - EBMSB da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública.

Para o desenvolvimento deste estudo, utilizaram-se amostras de diferentes partes botânicas (sementes, raiz, caule e folhas) de *Jatropha curcas* L. para preparo de extratos etanólicos obtidos através de dois métodos de extração (contínuo e a frio) e com e sem retirada da água das amostras botânicas utilizadas. Estes extratos foram então utilizados para avaliação das suas propriedades, explorando suas atividades que foram divididas em três capítulos: o capítulo 1 aborda a identificação de grupos fitoquímicos dos extratos etanólicos de *J. curcas*; o capítulo 2 trata sobre a atividade antioxidante destes extratos e o capítulo 3 aborda a atividade antitumoral (Figura 8).

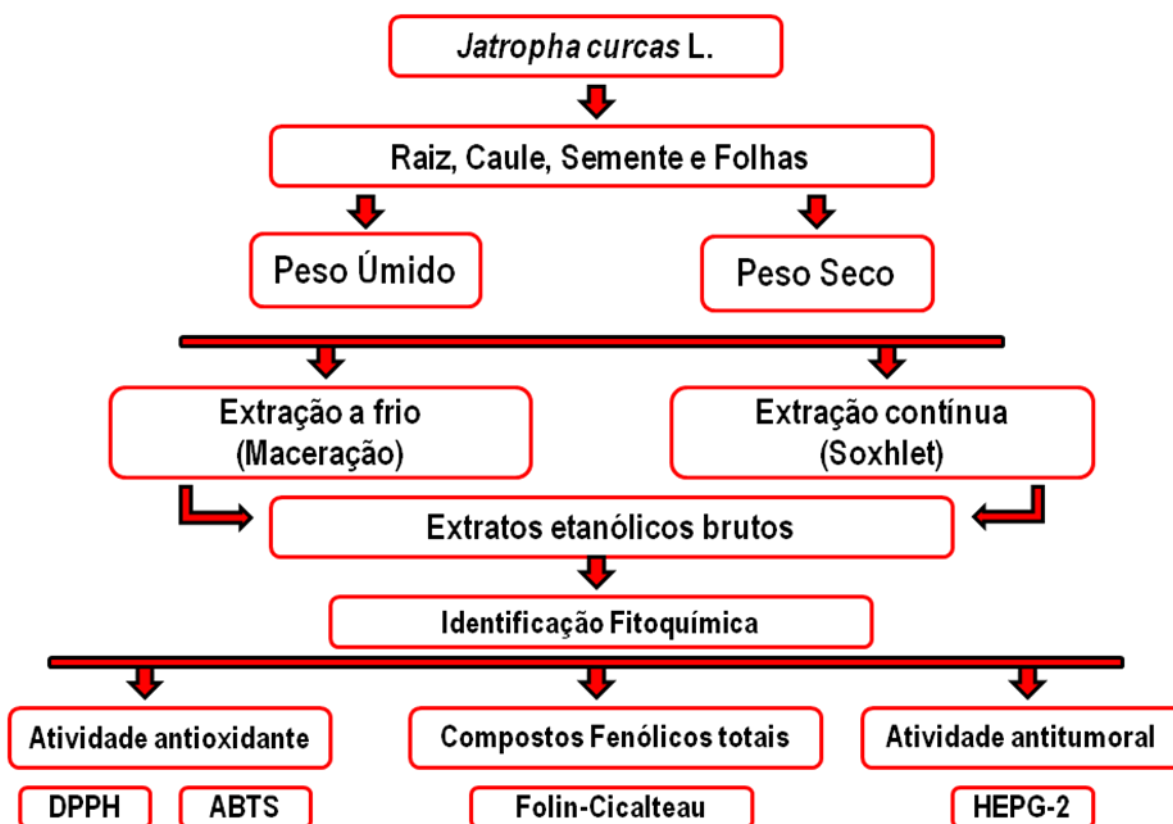


Figura 8. Esquema de desenvolvimento do estudo.

Inicialmente serão descritos neste item a metodologia empregada para coleta

do material biológico, obtenção do peso seco e dos extratos etanólicos de *J. curcas*, que são comuns para todas as análises posteriormente desenvolvidas.

4.1. Amostragem

As amostras de raiz, caule, folha e semente de *J. curcas* (Figura 9) utilizadas neste estudo foram coletadas em 28 de fevereiro de 2012, única coleta, na estação experimental Alagoinhas (12°7'13"S e 38°24'35"W) da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA (Figura 10). As amostras de cada uma das partes botânicas de *J. curcas* coletadas foram retiradas de diversas espécimes (total de 10) ao longo das bordas do experimento de cultivo desta espécie na estação experimental, foram acondicionadas em sacos plásticos, separadamente, e refrigeradas em isopor com gelo sob temperatura aproximada de 15°C para transporte até o laboratório LBBB.

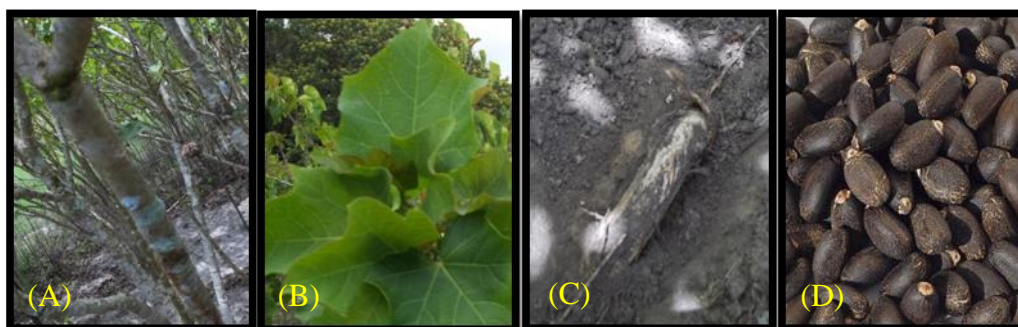


Figura 9. Amostras de (A) Caule; (B) Folhas; (C) Raiz e (D) Sementes de *Jatropha curcas* L. coletadas na estação experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA.



Figura 10. Estação experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA.

4.2. Determinação da umidade

A determinação do teor de umidade das sementes, raiz, caule e folhas foram realizados pelo método de secagem em estufa a 105°C por 24 horas conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

4.3. Preparo dos extratos

As amostras de raiz, caule, folhas e sementes de *J. curcas* foram divididas em dois grupos: amostras frescas (peso úmido) corresponderam às amostras sem secagem em estufa e amostras secas (peso seco) àquelas submetidas à secagem em estufa as quais foram utilizadas para o preparo de extratos etanólicos por dois métodos: Maceração e Soxhlet (Figura 11).



Figura 11. Preparo de extratos etanólicos de amostras de *Jatropha curcas* L.. (A) Método de Maceração e (B) Aparelho Soxhlet.

4.3.1. Extração por Maceração

Pesou-se 150g de cada uma das amostras botânica (raiz, caule, folha e sementes frescos e secos) que foram trituradas com auxílio de grau e pistilo e posteriormente foram depositadas em béqueres ou erlermeyers com 500 mL do solvente extrator (Etanol P.A). O material permaneceu em contato com o solvente por 72 horas, sendo agitados eventualmente com o auxílio de um bastão de vidro (Figura 10A). Após este período, os extratos foram peneirados com auxílio de uma peneira e filtrados com papel filtro Qualy J.Prolab Ltda. 250 μ m. Após a extração, o solvente evaporado e recuperado em um rotaevaporador *Laborota 4000* a 40 °C com vácuo (MATOS, 2009). Determinou-se o percentual de rendimento através da fórmula $R(\%) = \text{Massa Obtida} / \text{Massa Inicial} \times 100$ (SOUSA *et al.* 2007).

4.3.2. Extração com a utilização do Extrator Soxhlet

Foi pesado aproximadamente 30g de cada amostra triturada (raiz, caule, folha e sementes), e distribuídos em cartuchos de papel filtro. Os cartuchos foram colocados no Soxhlet (Figura 10B) e utilizou-se 300 mL etanol P.A como solvente extrator, permanecendo em refluxo a 36 horas para as amostras de sementes, caule e raiz e 72 horas para os extratos de folha. Após a extração, o solvente foi evaporado e recuperado em um rotaevaporador *Laborota 4000* a 40 °C com vácuo

(SOUSA *et al.*, 2007), e calculado o rendimento de cada extrato obtido

4.3.3. Análise estatística

Todos os resultados referentes ao rendimento dos extratos das diferentes estruturas botânicas (sementes, raiz, caule e folhas) obtidos por extração contínua por soxhlet e extração a frio por maceração foram analisadas através do teste estatístico ANOVA (análise de variância) com significância de $p < 0,05$ e pós-teste de Tukey.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 1 - Identificação de grupos fitoquímicos em extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L.

1. Introdução

O organismo humano possui defesas endógenas que inibem a ação nociva dos radicais livres, no entanto, existe uma infinidade de moléculas naturais que ajudam a combater a ação maléfica dos radicais livres, dentre os quais se pode destacar os fitoquímicos (FERREIRA & ABREU, 2007).

Os fitoquímicos são compostos bioativos de origem vegetal, trata-se de um vasto grupo que podem ser responsáveis por propriedades fisiológicas importantes como a capacidade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos oriundos de plantas utilizadas como nutracêuticas são úteis no auxílio ao combate do estresse oxidativo (LIU, 2003; FANG *et al.* 2002). Exercem de um modo geral, papel direto na prevenção e/ou tratamento de várias doenças (FERREIRA & ABREU, 2007).

São classificados como carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides, compostos nitrogenados e organosulfurados. A identificação destes compostos em espécies vegetais é fundamental para a avaliação do uso fitoterápico, o que amplia a busca por novas plantas que possam ser inclusas na terapia contra os radicais livres e o câncer (CARDOSO *et al.*, 2009).

2. Classificação dos Grupos Fitoquímicos

2.1. Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos heterocíclicos que possuem um ou mais nitrogênio em seu esqueleto carbônico, derivados de aminoácidos e farmacologicamente ativos (KAR, 2007). Os alcalóides são amplamente utilizados na medicina e os mais conhecidos (Figura 12) são morfina, taxol e reserpina (KAR, 2007).

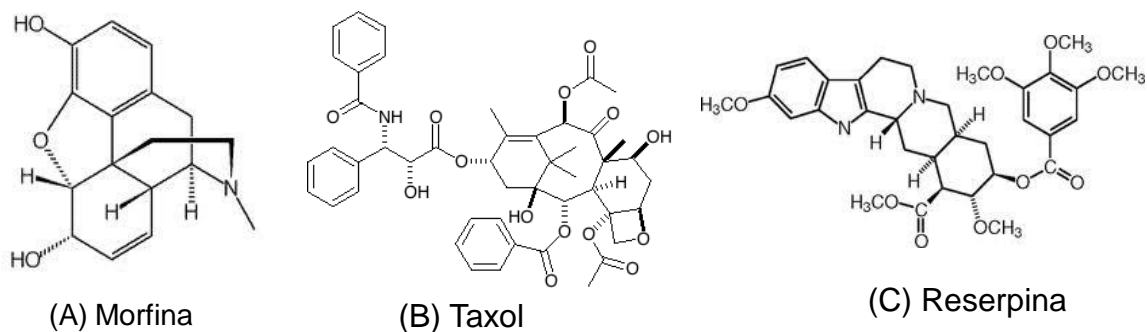


Figura 12. Estruturas moleculares da morfina (A); taxol (B) e reserpina (C).

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

São classificados de acordo com o aminoácido que fornece tanto o esqueleto fundamental alcaloídico como o átomo de nitrogênio (Tabela 1). São sólidos cristalinos, solúveis em água e de sabor amargo (KAR, 2007).

Tabela 1. Classificação estrutural dos alcaloides (SAKER & NAHAR, 2007).

Tipos Estruturais	Estrutura genérica
<i>Aporfina</i>	
<i>Betaína</i>	
<i>Imidazol</i>	
<i>Indol</i>	
<i>Purina</i>	
<i>Esteroidal</i>	

2.2. Glicosídeos isoprenóides

São agliconas derivados biossinteticamente de unidades de isopreno. Existem duas classes principais de glicosídeos isoprenóides: as saponinas e os glicosídeos cardíacos (LIU, 2004).

2.2.1. Saponinas

As saponinas são glicosídeos que possuem a capacidade de formar espuma quando misturados em água, o que leva a produção de uma aglicona denominada sapogenina (Figura 13). Existem dois tipos de sapogenina as esteróides e as triterpênicas (LIU, 2004).

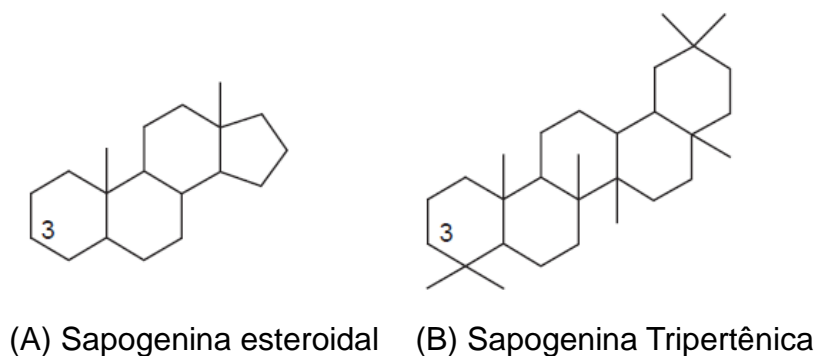


Figura 13. Molécula estrutural de sapogenina esteroidal (A) e sapogenina tripterênica (B).

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

Habitualmente, o açúcar em saponinas está ligado no carbono de número 3, as sapogeninas, no entanto, como apresentam um grupamento hidroxila no C-3. São utilizados na produção comercial de hormônios sexuais. Doughari (2012) descreve que os dois principais tipos de sapogenina esteróides são diosgenina (produz progesterona) e hecogenina (produz os hormônios esteroides cortisona e hidrocortisona) (Figura 14).

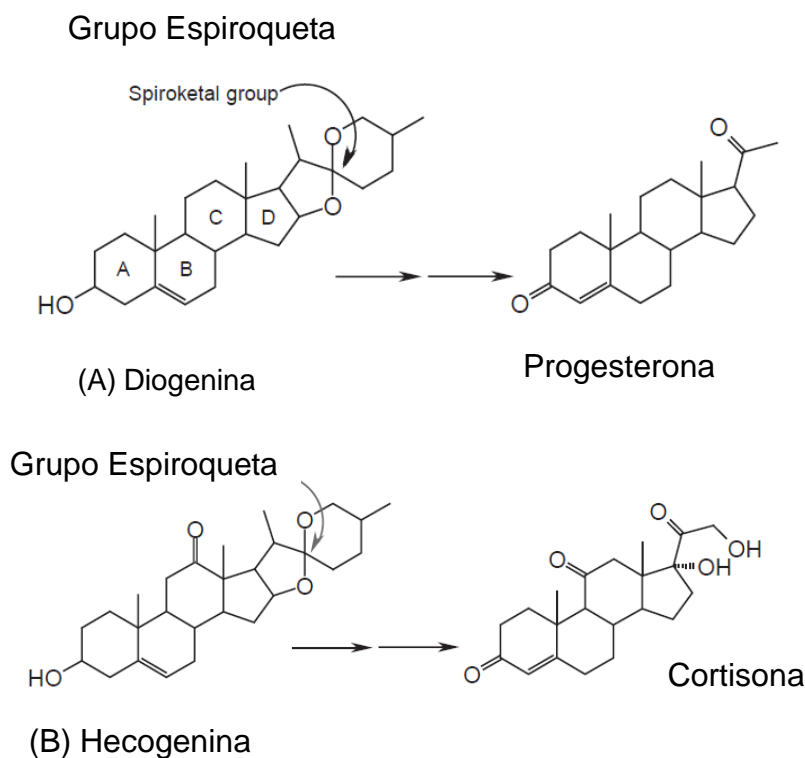


Figura 14. Sapogeninas esteroidais. (A) Diogenina precursora de progesterona e (B) Hecogenina precursora de cortisona.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

As saponinas triterpênicas apresentam como aglicona um triterpeno. A maioria destas agliconas é formada por compostos pentacíclicos derivadas de uma das três classes estruturais básicas representados por α -amirina, β -amirina e lupeol (SAKER & NAHAR, 2007).

2.2.2. Glicosídeos cardíacos

Os glicosídeos cardíacos são esteroides de cadeia lateral contendo um anel de lactona insaturado que exercem um efeito de destaque no músculo cardíaco, através da contração do miocárdio e da condução atrioventricular (KAR, 2007).

São encontrados em algumas famílias botânicas, por exemplo, Liliaceae, Ranunculaceae, Apocynaceae e Scrophulariaceae sendo estas as principais fontes de tais glicosídeos. Dentre os glicosídeos até hoje isolados destacam-se a digitoxina e digoxina (Figura 15), que são os dois cardiotônicos mais importantes e mais utilizados na medicina atual (KAR, 2007).

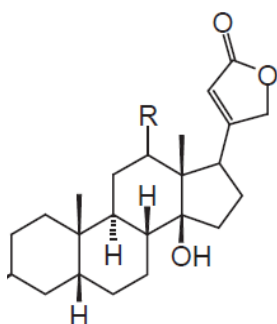


Figura 15. Estrutura básica dos glicosídeos cardíacos digitoxina (R=H) e digoxina (R=OH).

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007

2.3. Terpenóides

Os terpenóides são compostos derivados da combinação de dois ou mais unidades de isopreno. O isopreno é formado por cinco átomos de carbono, conhecida pela designação química, 2-metil-1,3-butadieno (Figura 16) (CARDOSO *et al.*, 2010).

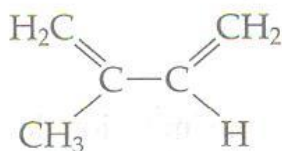


Figura 16. Estrutura molecular do isopreno.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

Os terpenos são encontrados em todas as partes de plantas (CARDOSO *et al.*, 2010). São classificados de acordo com o número de unidades de isopreno envolvidos na formação destes compostos (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos terpenóides de acordo com o número de isopreno.

Tipos de Terpenóides	Nº de átomos de carbono	Nº de unidades de isopreno
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8

2.4. Esteróides

Os esteróides, também conhecidos como hormônios são mensageiros químicos, sintetizados em glândulas e levados ao tecido alvo através da corrente sanguínea. São lipídeos (apolares), o que confere a capacidade de atravessar membranas celulares. Estruturalmente são caracterizados pela fusão de 4 anéis hexagonais simples (Figura 17) derivados a partir da biosíntese da acetil-CoA (DOUGHARI, 2012).

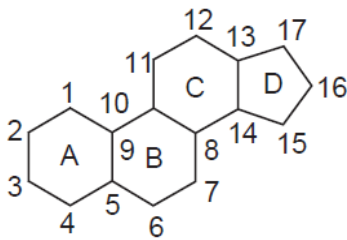


Figura 17. Estrutura básica de um esteróide denominada ciclopentanoperifenantreno.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007

2.4.1. Tipos de esteróides

Os esteróides são categorizados de acordo com a função biológica, são elas: anabolizantes, corticosteróides, esteróides sexuais, fitoesteróis e ergosteróis.

- a) Esteróides anabolizantes ou esteróides anabólicos androgênicos - são uma classe que interagem com os receptores de andrógenos para promover crescimento e divisão celular, especialmente em tecidos ósseos e musculares. Exemplos: testosterona (FIRN, 2010).

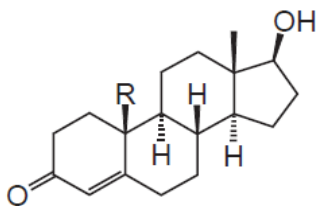


Figura 18. Estrutura básica de um esteroide anabolizante. Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

- b) Os corticosteróides (glicocorticóides e mineralocorticóides) - Os glicocorticoides são hormônios capazes de desempenhar efeitos semelhantes ao cortisol quando se ligam ao receptor específico. Os mineralocorticóides são corticóides que ajudam a manter o volume de sangue e controlar a excreção renal de eletrólitos. Exemplos: Cortisol e aldosterona (DOUGHARI, 2012).

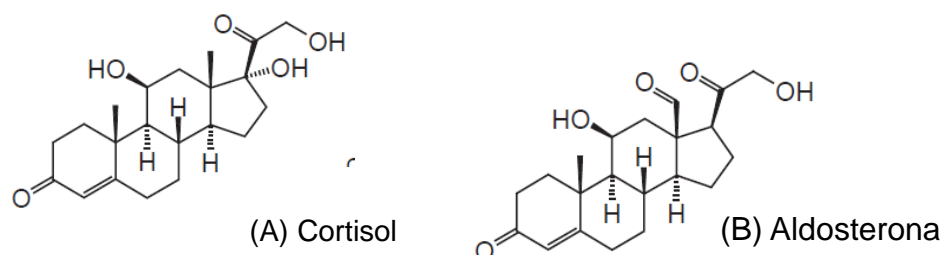


Figura 19. Estruturas de corticosteróides cortisol e aldosterona. Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

c) Esteróides sexuais - são um subconjunto dos hormônios sexuais que interagem com os receptores andrógenos ou estrogênios para produção de características sexuais primárias e secundárias específicas. Exemplos: estradiol e progesterona (DOUGHARI, 2012).

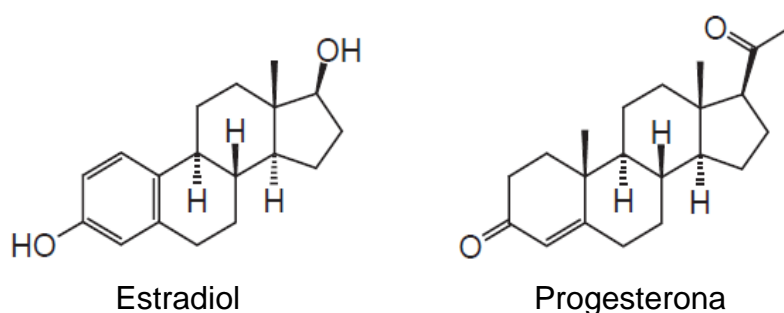


Figura 20. Estrutura dos esteróides estradiol e progesterona. Fonte: SAKER & NAHAR, 2007

d) Os fitoesteróis ou esteróis de plantas - são álcoois de esteróides que ocorrem naturalmente nas plantas. Exemplo: β -sitosterol.

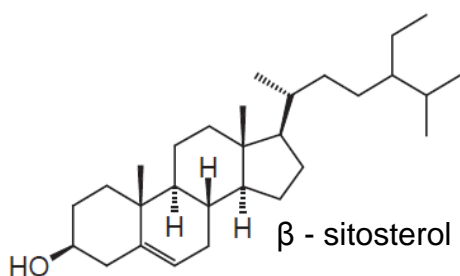


Figura 21. Estrutura molecular do fitoesterol β – sitosterol.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

2.5. Compostos Fenólicos

É um grupo grande, de compostos estruturalmente diversos, caracterizados pela presença de um grupamento fenol. São apontados como excelentes agentes antioxidantes, devido à capacidade redutora frente aos radicais livres, além do mais, têm sido utilizados na medicina para tratamento de diversas doenças inclusive o câncer. Dentre os compostos presentes neste grupo destacam-se as cumarinas, flavonoides e isoflavonóides e taninos (SAKER & NAHAR, 2007).

2.5.1. Cumarinas

As cumarinas (2H-1-benzopirano-2-ona) é a maior classe de derivados do benzopirano (Figura 22), são encontradas na maioria das plantas superiores, apresentam como característica a oxigenação no Carbono 7. Além disso, o grupo prenil presente nas cumarinas apresenta grande variação biogenética, incluindo a ciclização para dihidropiranos, piranos, dihidrofurans e furanos o que confere a atividade biológica do grupo (KAR, 2007).

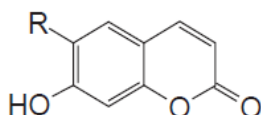


Figura 22. Estrutura básica das cumarinas.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007

2.5.2. Flavonóides e Isoflavonóides

Os flavonóides são produtos naturais, derivados do 1,3-difenilpropano de 15 átomos de carbono, estão presentes na maioria das plantas superiores possuem coloração amarela e apresentam-se como glicosídeos, principalmente nas formas O- e C-glicosídeo. São potentes compostos antioxidantes e apresentam diversas propriedades como antiinflamatório, antimicrobiano, antiviral e antitumoral (KAR, 2007; FIRN, 2010).

São classificados de acordo com as origens sintéticas (KAR, 2007; MCGRAW *et al.*, 2005). Alguns flavonóides são produtos intermediários e finais da sua biossíntese, são exemplos as chalconas e flavanonas. Outras classes de flavonoides são conhecidas apenas como produtos finais de biossíntese, por exemplo, antocianinas, flavonas e flavonóis. Os isoflavonóides e isoflavanonas são

caracterizados pela mudança na posição do grupo fenil em três posições (Figura 23).

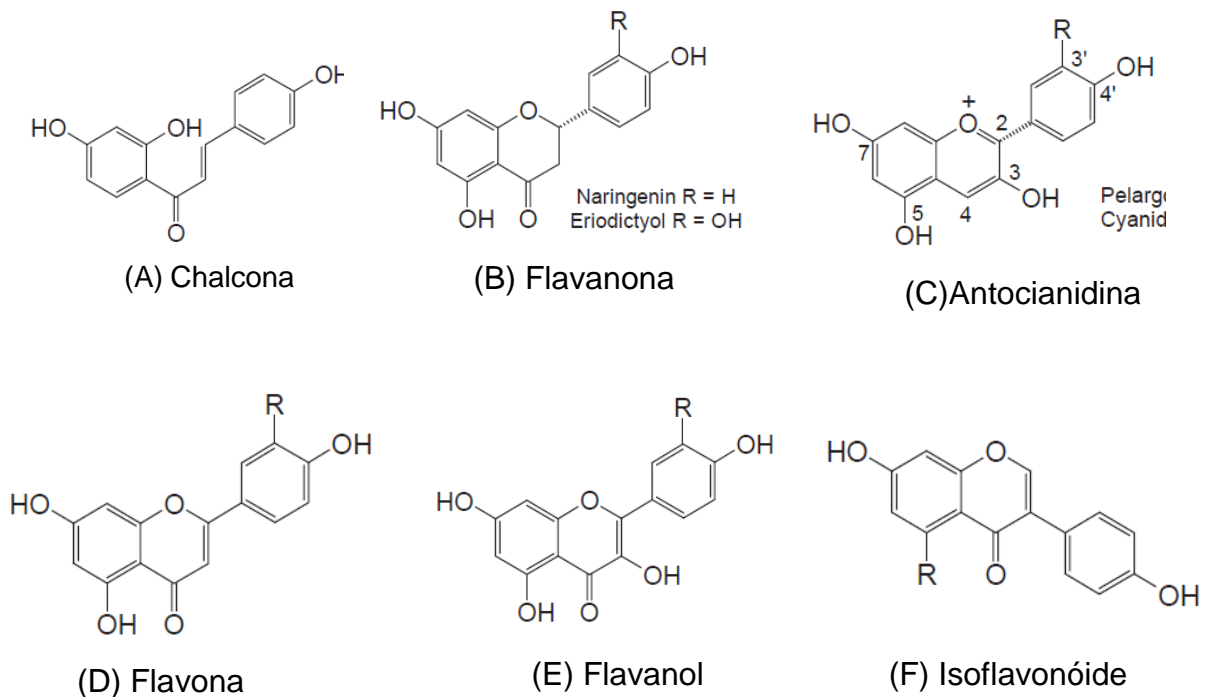


Figura 23. Estrutura molecular da (A) Chalcona; (B) Flavanona; (C) antocianidina, (D) flavona; (E) flavanol e (F) isoflavonóide.

Fonte: SAKER & NAHAR, 2007

2.5.3. Taninos

São polifenóis de plantas, encontrados frequentemente em frutos verdes estão associados com a defesa antimicrobiana. Possuem dois tipos estruturais: as proantocianidinas condensadas como núcleo uma catequina; derivados do hexahidroxidifenol (Figura 24). São substâncias amorfas que produzem solução ácida em meio aquoso. Podem ser classificados em taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e condensados (catequinas) (FIRN, 2010).

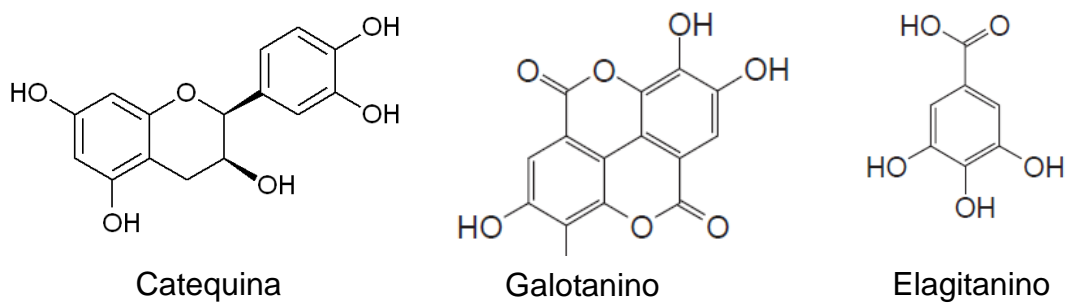


Figura 24. Estrutura molecular de taninos. Fonte: SAKER & NAHAR, 2007.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem, determinação da umidade e preparo dos extratos

A coleta das amostras botânicas, determinação de umidade e preparo dos extratos estão descritos no item 4 deste trabalho.

3.2. Caracterização química dos extratos de *Jatropha curcas* L.

Nesta etapa foram realizados ensaios colorimétricos para caracterização dos diversos grupos funcionais presentes nos diferentes extratos das partes botânicas através de ensaios fitoquímicos. A detecção de diferentes grupos químicos nos extratos poderá nortear os possíveis achados nos experimentos *in vitro* (MOUCO, 2003; SILVA, 2010). A caracterização foi realizada conforme as instruções descritas em Matos, 2009.

Primeiramente 4 mL dos extratos frescos e secos das partes botânicas obtidos pelos métodos de maceração e soxhlet foram distribuídos em tubos de ensaio numerados. Em béqueres foram adicionados 10 mL dos extratos frescos e secos obtidos pelos métodos de maceração e soxhlet, depois colocados em banho-maria a 40°C até a secura e depositados no dessecador até a ocasião de uso. O extrato foi concentrado em banho-maria até obter a metade do volume. Acidificado a pH 4,0 e filtrado com papel de filtro Qualy J.Prolab Ltda. 250 µm. Os grupos avaliados foram:

- Fenóis e Taninos
 - No tubo 1 foi adicionado três gotas da solução alcoólica de cloreto férrico N (FeCl_3). Após agitação foi observado se havia a variação da cor ou formação de precipitado abundante escuro. A coloração variável entre o azul e o vermelho indica a presença de fenóis, quando o teste branco é negativo (todas as soluções usadas sem extrato). Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquinos).
- Antocianinas/Antocianidinas/ Flavonóides
 - Nos tubos de números 2, 3 e 4 foram respectivamente acidificado a pH 3,0, alcalinizado a pH 8,5 e o terceiro a pH 11,0. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes, de acordo com o descrito em Matos (2009) na tabela 3.

Tabela 3. Avaliação colorimétrica como indicativo da presença de diferentes grupos químicos em ensaio ácido-alcalino.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido (pH 3,0)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11,0)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul - púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-----	-----	Amarela
Chaconas e auronas	Vermelha	-----	Vermelho – púrpura
Flavonóis	-----	-----	Vermelho alaranjado

- Catequinas/Flavonas
 - O tubo 5 foi acidificado por adição de ácido clorídrico 1 N (HCl) até pH 1,0 - 3,0 e o tubo 6 foi alcalinizado com hidróxido de sódio 1 N (NaOH) até pH 11,0. Foram aquecidos cuidadosamente com auxílio de uma lâmparina de álcool durante 2-3 minutos. Este ensaio corresponde como complemento do descrito acima, o aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de

constituintes especificados na tabela 4 (MATOS, 2009).

Tabela 4. Cores utilizadas como indicativo da presença de diferentes grupos químicos em ensaio ácido-alcalino complementar.

Constituintes	Cor em meio	
	Acido (pH 3,0)	Alcalino (pH 8,5)
Leucoantocianidinas	Vermelha	-----
Catequinas	Pardo-amarelada	-----
Flavanonas	-----	Vermelho alaranjado

- Esteróides/Triterpenóides (Teste Lieberman-Burchard)
 - O resíduo seco dos extratos obtidos anteriormente foi extraído com três lavagens com clorofórmio PA. A solução clorofórmica foi filtrada em um funil fechado com bola de algodão coberta com 200mg de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) PA, e depositada em um tubo de ensaio seco. Foi adicionado ao tubo de ensaio 1 mL de anidrido acético a 3 % e três gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), e agitado cuidadosamente. O aparecimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres, quando ocorre o aparecimento de coloração parda até vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.
- Saponinas
 - O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no teste anterior (Esteróides/Triterpenóides) foi redissolvido com 5 - 10 mL de água destilada e filtrada para um tubo de ensaio. O tubo foi agitado fortemente por 2 minutos, a formação de espuma persistente e abundante indica presença de saponinas.

4. Resultados e Discussão

Os grupos químicos encontrados nos extratos etanólicos brutos de *Jatropha curcas* L. estão explicitados na tabela 5 e 6.

Tabela 5. Prospecção fitoquímica de classes químicas em extratos de *J. curcas* obtidos por maceração.

<u>Grupos Fitoquímicos</u>	<u>Maceração</u>							
	Extratos Frescos (Peso Úmido)				Extratos Secos (Peso Seco)			
	MF	MR	MC	MSe	MF	MR	MC	MSe
Chalconas	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	-	-	-	***	+	+	***
Esteroides	+	-	+	+	+	***	+	+
Fenóis simples	+	+	+	-	+	+	+	+
Flavonas	+	+	+	-	-	+	+	+
Flavonóis	+	+	+	-	-	+	+	+
Flavanonas	+	+	+	-	-	-	-	-
Flavanonóis	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	-	+	-	+	-	-
Taninos catéquicos	+	+	+	-	+	+	+	+
Taninos pirogáticos	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenóides	-	+	-	-	-	+	-	-
Xantonas	+	-	+	-	-	+	+	+

M= Maceração; Folha = F; Raiz = R; Caule = C; Semente = S; + = Presença ; - = Ausência.

Tabela 6. Prospecção fitoquímica de classes químicas em extratos de *J. curcas* obtidos por soxhlet.

<u>Grupos Fitoquímicos</u>	<u>Soxhlet</u>							
	Extratos Frescos (Peso Úmido)				Extratos Secos (Peso Seco)			
	SF	SR	SC	SSe	SF	SR	SC	SSe
Chalconas	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides	+	-	+	+	+	-	+	+
Fenóis simples	+	+	-	-	+	-	-	-
Flavonas	-	+	+	+	+	+	+	+
Flavonóis	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavanonas	+	+	+	-	+	-	+	-
Flavanonóis	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	+	+	-	+	-	+	-
Taninos catéquicos	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos pirogáticos	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenóides	-	+	-	-	-	+	-	-
Xantonas	-	+	+	+	-	+	+	+

S= Soxhlet; Folha = F; Raiz = R; Caule = C; Semente = S; + = Presença; - = Ausência.

Através da avaliação qualitativa dos extratos etanólicos de sementes, raiz, caule e folhas de *J. curcas* verificou-se que todos os extratos obtidos não apresentaram chalconas, cumarinas, flavoanonóis, leucoantocianidinas e taninos pirogáticos nas condições utilizadas. De modo geral os extratos etanólicos brutos de *J. curcas* apresentaram a presença de taninos catéquicos excetuando extrato de sementes frescas obtidos por maceração, flavonóis, excetuando extrato de sementes frescas obtidos por maceração e de folhas secas também obtidas por maceração. Fenóis simples também foram encontrados na maioria dos extratos (10). Quando comparados os extratos obtidos por maceração e por soxhlet verificou-se que houve diferença nos achados quando comparados entre os extratos de base seca. Os extratos etanólicos brutos de folhas secas obtidos por soxhlet apresentaram a presença do grupo dos flavonóides (flavonas e flavonóis), esteróides e saponinas, enquanto os mesmos extratos obtidos por maceração apresentaram apenas esteróides e fenóis simples.

Os extratos de raiz fresca obtidos por maceração e por soxhlet apresentaram fenóis simples, flavonas, flavonóis e flavanonas, entretanto, com a extração contínua obteve-se ainda xantonas. Já os extratos etanólicos brutos de raiz seca obtida por soxhlet apresentaram compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides, triterpenóides, taninos catéquicos e xantonas, enquanto os extratos obtidos por maceração das raízes nas mesmas condições apresentaram além dos descritos, a presença de catequinas e saponinas.

Quanto os extratos etanólicos brutos de caule e sementes obtidos por soxhlet e maceração apresentaram os mesmos grupamentos químicos, que foram xantonas, taninos catéquicos, esteroides e flavonóides.

Os extratos etanólicos de folhas, raiz e caule frescos obtidos por soxhlet e maceração apresentaram de forma geral a presença dos mesmos grupamentos químicos (saponinas, flavonoides, esteroides, triterpenóides (raiz), catequinas (folha), xantonas, taninos catéquicos e fenóis simples). Já os extratos etanólicos de sementes frescas obtidos por soxhlet apresentaram maior quantidade de grupamentos químicos (esteroides, flavonoides, taninos catéquicos e xantonas), enquanto os extratos das mesmas partes botânicas obtidos por maceração apresentaram apenas esteróides e saponinas.

EBUEHI & OKORIE (2009) verificaram em screening fitoquímico de extratos

metanólicos de *J. curcas* a presença dos seguintes grupos: alcalóides, glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos, flobataninos, taninos, flavonóides e saponinas, assim como neste estudo, apesar dos solventes serem diferentes apresentam características químicas similares que permitem a comparação.

NWOKOCHA *et al.*, 2011 mostraram através de ensaio colorimétrico a presença de taninos, alcaloides, flavonoides, fenóis simples e saponinas em extratos de *J. curcas* sendo mais predominante nas folhas, que de fato foram constatados neste estudo, as folhas apresentam maior quantidade de grupos fitoquímicos devido a intensa atividade, tanto na produção energética como até mesmo, ação defensora contra microrganismos nocivos por está mais exposta.

A identificação de grupos fitoquímicos em extratos vegetais é fundamental, pois norteiam as investigações biológicas posteriores permitindo o melhor entendimento das ações ocorridas. Os achados neste ensaio fitoquímico estão de acordo com a literatura pertinente, embora não tenham sido achados relatos de tais testes realizados em extratos etanólicos de *J. curcas*.

5. Considerações Finais

Os extratos etanólicos brutos de raiz, caule, folha e sementes de *Jatropha curcas* L. obtidos por maceração e soxhlet apresentaram linearidade quanto à presença dos grupos fitoquímicos analisados, em especial os grupos dos flavonóides e taninos catéquicos.

6. Referências

CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P. N.; TROVÃO, F. C. de S.; Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. **E**instein: Educação Continuada em Saúde. 2009

DOUGHARI, J. H.; Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, **InTech**; 2012.

EBUEHI, O. A., & OKORIE, N. A. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. **Nigerian Quartely Journal of Hospital Medicine**. 2009.

- FIRN, R.; Nature's Chemicals. **Oxford University Press**, Oxford, 2010.
- KAR, A. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology (Revised-Expanded Second Edition). **New Age International Limited Publishres New Delhi**, 2007
- LIU, R.H.; Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal Nutrition**. 2004.
- MCGAW, L.J.; LAGER, A., GRACE, O., FENNELL, C. & van STADEN, J. Medicinal plants. In: *van Niekerk, A (Ed.), Ethics in Agriculture-An African Perspective*. **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. 2005.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MOUCO, G., Bernadino, M. J., Cornélio, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento*. Edição nº31, 2003.
- NWOKOCHA, A.; BLESSING, I.O.; AGBAGWA and OKOLI, B.E.; Comparative Phytochemical Screening of *Jatropha L.* Species in the Niger Delta. **Research Journal of Phytochemistry**, 2011.
- PHILIPSON, J.D. Phytochemistry and pharamacognosy. **Phytochemistry**. 2007.
- SAKER, S. D.; NAHAR, L.; Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic or Natural Product Chemistry, Wiley, 2007.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B.; Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

CAPÍTULO 2 - Atividade Antioxidante de extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L.

1. Introdução

Jatropha curcas L., também conhecida como pinhão-manso, pinhão-bravo, purgante-de-cavalo, pinhão-de-purga, pinhão-paraguaio, *pulza*, *physic-nut* é originária das ilhas de Cabo Verde e Guiné, introduzida por navegadores portugueses nas Américas do Sul e Central, no Brasil, é possivelmente oriunda das regiões áridas do nordeste brasileiro (FELIPPE, 2009; SATO *et al.*, 2007). É uma planta arbustiva (Figura 25), perene de médio porte chegando a medir cerca de 2 a 4 metros de altura, o seu tronco possui aproximadamente 20 cm de diâmetro, dividido desde a base com ramos compridos e numerosos, de raízes tipo pivotante não muito profundas com pouca ramificação, caule liso, com látex leitoso abundante em qualquer parte da planta (SATURNINO *et al.*, 2005). Suas folhas são verdes, esparsas e brilhantes, largas em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior, de disposição alterna (HIROTA, 2011).



Figura 25. Arbusto de *Jatropha curcas* L. Estação Experimental Alagoinhas, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, Bahia, 2012.

Possui floração monóica, porém os sexos são separados, os frutos são capsulares ovóides, triloculares com uma semente em cada cavidade, podendo estar

em diferentes estágios de desenvolvimento (DIAS *et al.*, 2007; HIROTA, 2011).

Além de ser amplamente utilizada como cerca viva, sua madeira, o pinhão-manso tem sido empregado na medicina popular. O pinhão manso é usado como analgésico, antiinflamatório, antipirético, antiviral (OSKOUÉIAN *et al.*, 2011b; DI STASI, 2002). O óleo purgativo é usado como abortivo, no tratamento da gota e em várias formas de reumatismo. O macerado de folhas é usado para estancar sangramentos, na Odontologia é usado para tratamentos de aftas da boca, além de possuir atividade antioxidante e existem indícios de suas sementes possuíam atividade antitumoral (FELIPPE, 2009; BALAJI *et al.*, 2009). Está sendo considerada como uma excelente opção para a produção de biodiesel devido as suas características multiuso, adaptação a ambientes secos, altas temperaturas e teor óleo em suas sementes.

2. Atividade Antioxidante

O termo antioxidante é empregado a moléculas ou grupos moleculares que têm como propriedade o bloqueio, a inibição ou o retardo da deterioração oxidativa, reduzindo ação de radicais livres (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). Ultimamente, as atenções têm se voltado para as propriedades antioxidantes de plantas e alimentos, devido às crescentes descobertas dos efeitos deletérios dos radicais livres nos organismos aeróbicos (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Os antioxidantes são classificados em primários e sinérgico. Os antioxidantes primários estão envolvidos com o retardo e inibição da formação dos radicais livres. Os antioxidantes sinérgicos atuam em diversas reações inibitórias, pois são agentes quelantes de metais, de oxigênio singlet e atenuadores dos peróxidos, reduzindo radicais fenoxil quando associados com o ácido ascórbico (SUHAJ, 2006).

Radicais livres, Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) são definidos como moléculas e (ou) átomos que apresentam um ou mais elétrons não pareados na última camada de valência, tornando-se, altamente instáveis e quimicamente reativos (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Apesar de apresentarem vida curta, a presença dessas moléculas no organismo ocorre como subprodutos do processo natural no metabolismo oxidativo nas mitocôndrias, formados durante a transferência de elétrons a partir da via de ação catalítica de

enzimas e por exposição a fatores exógenos (BIANCHI & ANTUNES, 1999; MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007).

Por apresentarem tal característica, os radicais livres capturam aleatoriamente elétrons de outras moléculas resultando numa reação em cadeia produzindo rapidamente outros radicais livres, que dificulta a caracterização dos seus produtos de reação, sendo então, todas as classes moleculares biológicas suscetíveis à sua ação. São considerados radicais livres, $1O_2$ (Oxigênio Singlete), NO (Óxido Nítrico), ONOO⁻ (Peroxinitrito), Q[•] (Radical Semiquinona), OH[•] (Radical Hidroxila), O₂⁻ (Radical Superóxido), sendo esse último precursor das outras espécies reativas. A presença prolongada desses radicais se torna crítica para a manutenção de muitas funções biológicas normais (SILVA & FERRARI, 2011).

Quando há um desequilíbrio entre as taxas de produção de moléculas oxidantes (radicais livres) e de degradação por moléculas antioxidantes (enzimáticas ou não enzimáticas), que, de algum modo, apresentam-se alteradas, seja pela superprodução de radicais livres, seja por uma deficiência nos mecanismos antioxidantes denomina-se de estresse oxidativo (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). Fatores como predisposição genética, condições ambientais e propriedades específicas de grupos celulares podem acentuar o dano oxidativo, ou até mesmo diminuir a capacidade de degradação desses agentes em organismos celulares, levando a danos irreversíveis e morte celular. A principal consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, resultando na danificação das membranas biológicas e aumentando a sua fluidez. Isso compromete sua integridade e inativa a interação entre membrana e receptor e entre membrana e enzima, além de ocasionar lesões oxidativas que favorecem o aparecimento de mutações no nível de DNA (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Diversos estudos apontam que os danos trazidos pelo estresse oxidativo estão relacionados diretamente à etiologia de várias doenças, como aterosclerose, catarata, diabetes, disfunção cerebral, doenças cardíacas, pulmonares e neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Huntington são exemplos), câncer (em processos de mutagênese ou carcinogênese), além de estarem associadas ao processo de envelhecimento precoce (AYRES *et al.*, 2009).

3. Determinação de atividade antioxidante (AA)

3.1. Ensaio DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil)

O DPPH, de coloração púrpura, é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; RUFINO *et al.*, 2007a), e por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R^{\cdot}) é reduzido e forma o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção a 515 nm. (Figura 26), podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (SOUSA *et al.*, 2007).

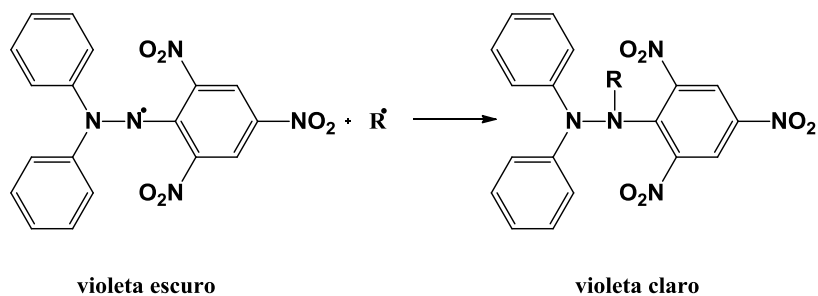


Figura 26. Estabilização do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil). Fonte: RUFINO *et al.*, 2007a

A avaliação antioxidante através do método da captura do radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), descrito por Rufino e colaboradores, 2007 com modificações, foi realizada preparando uma solução a 120 μ M de DPPH em metanol, essa solução ficou em repouso no escuro por 1 hora para formação do radical DPPH. O percentual da atividade antioxidante foi determinado dissolvendo-se 2,5 mg (concentração de 250 μ g/mL) de cada extrato bruto frescos e secos (extrato de folhas, caule, raízes e sementes) em 10 mL de metanol. Em ensaios posteriores para a determinação da concentração eficiente de 50% (EC₅₀), o extrato estoque foi preparado dissolvendo-se 15 mg do extrato bruto em 20 mL de metanol para as amostras de raiz, caule e semente (frescos e secos) e dissolvendo-se 3 mg em 15 mL de metanol para a amostra de folha (frescas e secas). Para avaliação da captura do DPPH, 1mL dessa solução foi acrescentada a 1mL de cada amostra e, após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, no escuro, foram realizadas as

leituras de absorvância à 515 nm utilizando espectrofotômetro (Analyser Espectro 850M).

A curva analítica linear do Ácido Gálico, utilizado como padrão, foi construída, preparando-se seis concentrações deste padrão (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 µg/mL). As amostras foram diluídas em seis concentrações (0, 150, 300, 450, 600 e 750 µg/mL) para a construção das curvas de inibição do radical DPPH (EC₅₀). Assim, foi calculada a concentração eficiente para inibir 50% do DPPH (EC₅₀) ou concentração inibitória (IC₅₀) por cada um dos extratos (BRAND-WILIAMS; CUVELIER, 1995; RUFINO *et al.*, 2007b; THAIPONG *et al.*; 2006). O experimento foi realizado em quadruplicata.

A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante, que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelos antioxidantes em cada extrato e a concentração eficiente (EC₅₀) ou concentração inibitória (IC₅₀). O percentual da atividade antioxidante foi calculado para cada uma das amostras (extratos), a partir expressão descrita (VICENTINO & MENEZES, 2007):

$$\% \text{ Atividade Antioxidante (\%AA)} = 100 - (\Delta\text{Abs} \times 100) / \text{Abs cont.}$$

Onde: ΔAbs é a diferença de absorvância entre a amostra e o branco e Abs cont é o valor de absorvância encontrado para o controle. Para o cálculo da concentração eficiente (EC₅₀) utilizou-se a equação oriunda das leituras das amostras, em geral representada pela equação descrita como $y = -ax + b$, onde: y = Absorvância inicial do controle / 2 e x = EC₅₀ (µg/mL).

3.2. Ensaio ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•+) pode ser gerado através de reação química, eletroquímica ou enzimática. O método ABTS•+ se enquadra como um dos testes de atividade antioxidante mais rápido e que oferece resultados reprodutíveis, pois pode medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica, lipofílica, compostos puros e extratos vegetais (RUFINO *et al.*, 2007b).

Segundo KUSKOSKI *et al.* (2005), o método se baseia na geração do radical ABTS•+, que possui coloração azul esverdeado, por meio da reação entre ABTS

com persulfato de potássio (K_2SO_5) atingindo absorção máxima em 734 nm. Na presença de um composto antioxidante o $ABTS^{\bullet+}$ é reduzido a ABTS promovendo a perda gradual da coloração de azul esverdeado até a coloração incolor (Figura 27). Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ é determinada em função do padrão comercial análogo à vitamina E (Trolox).

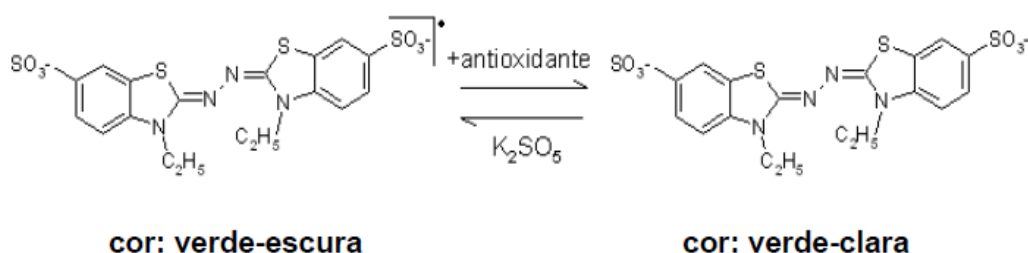


Figura 27. Estabilização do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: RUFINO *et al.*, 2007b

Para avaliação do potencial antioxidante, uma solução de 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) 7mM foi preparada em água destilada. Dessa solução, retirou-se 5 mL e adicionou-se 88 μ L de persulfato de potássio a 2,45 mM permanecendo 16 horas em repouso no escuro para promover a produção do radical cátion $ABTS^{\bullet+}$. Posteriormente, a solução foi diluída em etanol até atingir a absorbância de 700 ± 20 à 734nm em espectrofotômetro (Q898U - Quimis), denominada então solução $ABTS^{\bullet+}$ diluída. A cada 30 μ L dos extratos de raiz, caule, folha e sementes obtidos por maceração e por soxhlet, foram adicionados à 3mL da solução $ABTS^{\bullet+}$ diluída e, após 6 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorbâncias das soluções testes foram determinadas à 734nm. A atividade antioxidante foi calculada em relação ao Trolox e o ácido gálico, padrões da reação e também pela porcentagem da inibição do radical ABTS, calculado segundo a fórmula: $\frac{(1 - \text{Abs.da amostra} \times \text{Abs controle} \times 100)}{\text{Abs.controle}}$ (RUFINO *et al.*, 2007 a; THAIPOONG *et al.*, 2006).

3.3. Determinação do teor de Fenóis Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados através da oxidação obtida pelo uso do reagente Folin-Ciocalteu. O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação dos fenóis com os ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico (coloração amarelada) em meio básico resultando numa coloração verde intensa que absorve luz em comprimento de onda de 750 nm (Morais, 2009). Desta forma, 100 µL dos extratos etanólicos das folhas, caule, raiz e sementes de *J. curcas* (1 mg/mL⁻¹ da solução estoque em metanol) foram adicionados a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu juntamente com 6 mL de água destilada. Após 1 minuto acrescentou-se 2 mL de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) a 15%, e a mistura foi agitada por 30 segundos. O volume por fim foi aferido para 10 mL com água destilada. As amostras então foram incubadas ao abrigo da luz por 2 horas. Após a incubação as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Analyser Espectro 850M) no comprimento de onda de 750 nm. Utilizou-se o metanol como “branco” e preparou-se uma solução contendo metanol e todos os reagentes, exceto os extratos, como “zero”. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica linear construída com padrão de ácido gálico (0 a 3,6 µg/ mL). As análises foram realizadas em quadruplicata.

3.4. Análise estatística:

Os resultados foram analisados estatisticamente, através do programa IBM SPSS Statistics. Para tais análises foi utilizado o teste ANOVA não-paramétrico e o pós-teste de Tukey calculando a média ± desvio padrão com níveis de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

Os resultados do teor de umidade obtidos estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Porcentagem de Peso Seco e Umidade dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raiz de *Jatropha curcas* L..

Amostra	Peso Seco		Umidade	
	(%)	Desvio	(%)	Desvio
Folha	27,20	±0,0048c	72,80	±0,0054a
Caule	23,33	±0,0035c	76,67	±0,0040a
Semente	92,78	±0,0007a	7,22	±0,0008c
Raiz	37,90	±0,0073b	62,10	±0,0064b

Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais numa mesma coluna não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após a remoção da água, as amostras secas (peso seco) foram submetidas ao processo de extração contínua por soxhlet, bem como, a frio por maceração. De maneira análoga, as amostras frescas (peso úmido), sem secagem em estufa, foram submetidas extração por soxhlet e por maceração. O rendimento dos extratos é descrito na tabela 8.

Dentre os extratos obtidos por soxhlet, verificou-se que apesar das amostras obtidas a partir das sementes apresentarem um percentual elevado de matéria seca (92,78%), o rendimento obtido foi o menor (1,24%) quando comparado com os demais extratos, o que é esperado por se tratar de um órgão metabolicamente ativo com pouco teor de água.

Tabela 8. Rendimento dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raízes (secas e frescas) de *Jatropha curcas* L. obtidos através da extração por maceração e por soxhlet.

Amostra	Extração por Soxhlet				Extração por Maceração			
	Sigla	Rendimento (%)	Sigla	Rendimento (%)	Sigla	Rendimento (%)	Sigla	Rendimento (%)
Folha (F)	SF _{PS}	16,32±0,026a	SF _{PU}	0,94±0,006a	MF _{PS}	21,97±0,011a	MF _{PU}	5,88±0,018b
Caule (C)	SC _{PS}	19,99±0,019a	SC _{PU}	0,41±0,004a	MC _{PS}	19,60±0,005a	MC _{PU}	8,69±0,029b
Semente (Se)	SSe _{PS}	1,24±0,009b	SSe _{PU}	0,37±0,007a	MS _{PS}	24,96±0,034a	MS _{PU}	14,17±0,037a
Raiz (R)	SR _{PS}	2,61±0,008b	SR _{PU}	0,07±0,002a	MR _{PS}	13,59±0,022b	MR _{PU}	18,62±0,019a

S=Soxhlet; M=Maceração; PS= amostra seca ou Peso seco; PU= amostra fresca ou peso úmido; F=Folha; C=Caule; Se=Semente e R=Raiz. Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais numa mesma coluna não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os rendimentos dos extratos obtidos por ambas as metodologias de extração mostram diferenças em termos de percentual. O rendimento dos extratos obtidos pelo método de soxhlet apresentou de forma geral menor percentual em relação ao rendimento dos extratos obtidos por maceração. Sendo assim, em termos quantitativos a extração por maceração é mais adequada para se obter maiores quantidades de extrato. Entretanto, apesar de que os extratos obtidos pelo método de maceração apresentaram maior rendimento quando comparados aos obtidos por soxhlet isso não significa que qualitativamente esta metodologia produza os melhores extratos, ou seja, que houve maior quantidade de biocompostos extraídos. A extração por maceração é uma técnica onde o material botânico é extraído em um recipiente fechado que não permite que a amostra sofra grandes degradações (formação de artefatos), que podem ocorrer numa técnica que utilize altas temperaturas, como a extração por soxhlet preservando desta forma, compostos que podem possuir boas atividades nos testes submetidos (p.ex. atividade antioxidante) (RODRIGUES, 2002).

O soxhlet, por sua vez, é um método de extração contínua de sólidos com solvente atingindo o seu ponto de ebulição tendo como principal ponto fraco a possível decomposição térmica dos compostos extraídos (RODRIGUES, 2002).

Em ambas as metodologias podem ser utilizadas solventes apolares (hexano, éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano) ou polares (acetato de metila, metanol ou etanol), estes solventes possuem propriedades extrativas diferentes (VALE & ORLANDA, 2011). O etanol foi o solvente adotado para o preparo dos extratos e de acordo com Vale & Orlanda (2011), extratos confeccionados utilizando o etanol possuem especialmente substâncias do grupo dos heterosídeos (Cianogênicos, Flavônicos, Antraquinônicos), que podem ser identificados a partir de testes fitoquímicos. Veiga (2008) destaca que a polaridade do solvente utilizado influencia diretamente a atividade antioxidante do extrato, pois a presença de determinadas substâncias – como compostos fenólicos e flavonoides, que possuem características antioxidantes – potencializa ação do extrato, o que foi descrito no seu estudo com frações etanólicas de *Jatropha gossypifolia* e comprovado por este estudo.

No teste fitoquímico realizado neste estudo (Capítulo 1) observou-se que os extratos brutos etanólicos de *J. curcas* apresentaram de forma geral a presença de flavonoides (flavonas e flavonóis) e taninos. PROCHÁZKOVA *et al.*, 2011 evidenciam

que estes compostos, em especial os flavonoides possuem ação antioxidante, a sua estrutura permite que promovam a inibição direta de radicais livres (reduzindo) tornando-os estáveis, podem ativar enzimas antioxidantes que inibem a ação deletéria das EROs, além de agirem como quelantes metálicos. E de fato é o que pode ter ocorrido nos ensaios antioxidantes realizados.

A atividade antioxidante dos extratos de *Jatropha curcas* L. avaliada através do método de sequestro do radical DPPH variou em função do método de preparo do extrato, das amostras utilizadas (peso úmido e peso seco) e da parte botânica analisada. Inicialmente, foram realizadas curvas analíticas do ácido gálico (padrão) e do DPPH em diferentes concentrações, com o intuito de verificar a linearidade do método, bem como, o comportamento do padrão nas concentrações testadas (Figura 28).

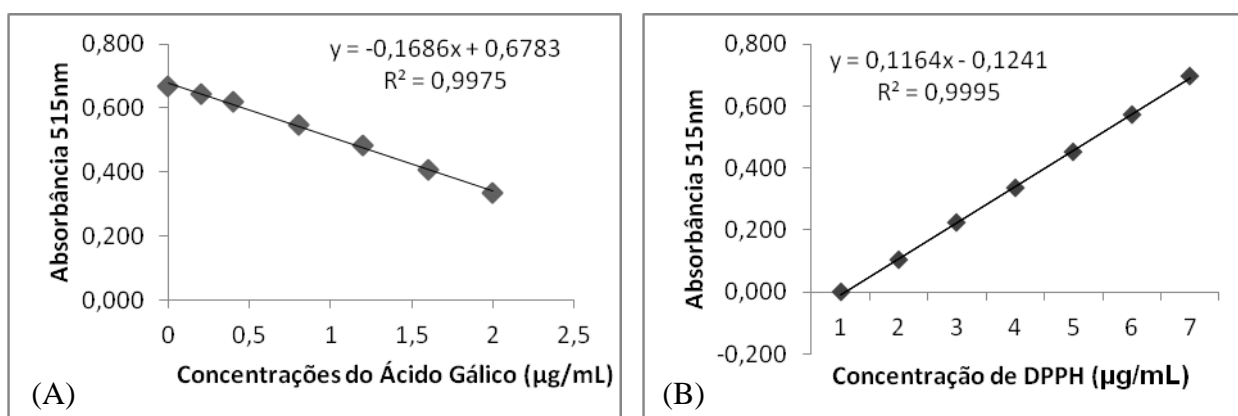


Figura 28. Curvas analíticas lineares (A) Padrão Ácido Gálico e (B) Radical DPPH.

Os diversos extratos (250 µg/mL) de folha, raiz, caule e semente de *J. curcas* apresentaram elevada atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir a concentração do radical DPPH em até 80 % da concentração inicial. Os extratos obtidos a partir das amostras de caule fresco por soxhlet (SC_{PU}), por maceração (MC_{PU}) e a partir das amostras de sementes frescas e secas por Maceração (MSe_{PU} e MSe_{PS}, respectivamente) apresentaram os menores valores de atividade antioxidante na concentração testada, não havendo diferenças significativas entre os dados obtidos, com 5% de probabilidade (Figura 29).

Os extratos obtidos a partir das raízes frescas por ambas as metodologias de

extração, os extratos de folhas frescas obtidos por soxhlet e de folhas secas e caule secos obtidos por maceração apresentaram atividade antioxidante inferior a 53%. Quando analisados os extratos de folha obtidos por soxhlet verificou-se que o extrato preparado com amostras secas apresentou o percentual de atividade antioxidante de 83,1% enquanto o extrato preparado com amostras frescas apresentou um percentual de 51,6%. Já os extratos de folha extraídos por maceração ocorreu o contrário, o extrato obtido a partir de amostras frescas apresentou um percentual de atividade antioxidante de 68,1%, enquanto o extrato de amostras secas apresentou um percentual de 52,2%. Portanto, os extratos de folha apresentaram diferenças em relação à atividade antioxidante entre os extratos obtidos de amostras secas e frescas nas duas formas de extração, havendo diferenças significativas entre a atividade antioxidante. Esta diferença dos valores pode ser atribuída ao perfil metabólico de cada extrato obtido, evidenciando que o teor destes metabólitos pode interferir principalmente na extração contínua (soxhlet).

Não foram achados artigos que façam comparação entre os métodos de extração em espécies vegetais, no entanto, os artigos que avaliaram a atividade antioxidante de extratos obtidos por soxhlet apresentaram atividade similar ao encontrado neste estudo (DIWANI *et al.*, 2009; OSKOUETIAN *et al.*, 2011b)

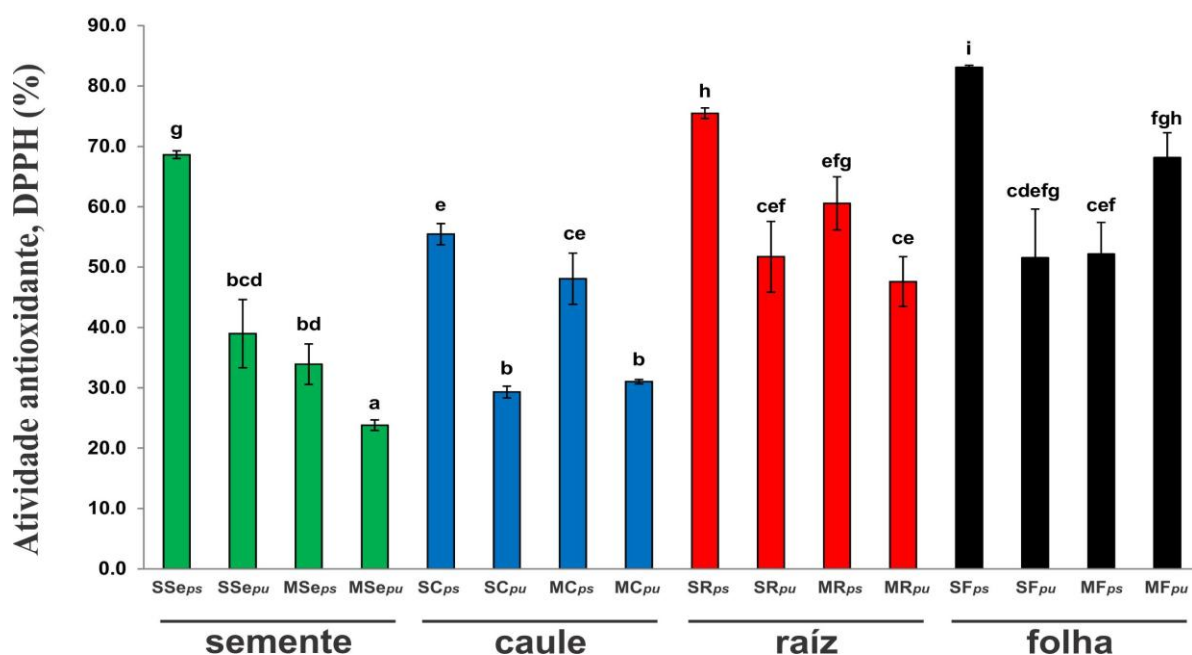
A extração a frio (maceração) pode preservar moléculas, enquanto a extração contínua (soxhlet) pode promover a degradação de algumas destas moléculas, devido a utilização de calor no preparo destes extratos, entretanto, dos 16 extratos preparados (oito por soxhlet e oito por maceração), apenas 2 extratos obtidos por maceração apresentaram atividade antioxidante superior aos extratos obtidos por soxhlet, demonstrando assim, que a extração contínua promoveu maior quantidade de substâncias (podendo ser em concentração ou em espécies químicas de moléculas) de características antioxidantes. Os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante pelo método do DPPH foram os extratos de raiz e folhas obtidos por soxhlet. Os extratos obtidos por maceração das diferentes partes botânicas de *J. curcas* L., entre si, não apresentaram grandes variações entre os extratos obtidos de amostras frescas, ao contrário do que ocorreu quando a amostra foi seca.

Carvalho e colaboradores (2010) apontam que a secagem do material botânico é fundamental para conservação do extrato evitando a contaminação por

microorganismos, e degradação dos princípios ativos, através da redução enzimática após a retirada da água, o que neste caso não apresentou diferença na conservação dos extratos avaliados neste estudo.

A eficácia de um extrato vegetal começa desde a escolha da forma de obtenção deste extrato, o que foi muito bem executado neste trabalho, utilizando solvente polar, de baixa toxicidade e de alto potencial extrativo (maior diversidade de substâncias) (MARTINS, 2005). A comparação entre extratos frescos e secos é evidente que com a presença ou ausência da água influencia na atividade biológica investigada, além do processo de secagem que de qualquer modo se perde compostos que poderiam possuir atividades biológicas interessantes (MARTINS, 2005).

Estudos apontam (OSKOUÉIAN et al., 2011a; OSKOUÉIAN et al., 2011b) que extratos metanólicos de raiz e látex de *Jatropha curcas* L. apresentam atividade antioxidante satisfatória, quando avaliados com 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e FRAP (Poder Antioxidante de Redução de Ferro).



Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais numa mesma coluna não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

SSe_{pu}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **SC_{pu}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **SR_{pu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **SF_{pu}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **SSe_{ps}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **SC_{ps}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **SR_{ps}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **SF_{ps}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet; **MSe_{pu}**- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; **MC_{pu}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; **MR_{pu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; **MF_{pu}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; **MSe_{ps}**- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; **MC_{ps}**- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; **MR_{ps}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; **MF_{ps}**- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração.

Figura 29. Atividade Antioxidante através do ensaio DPPH dos extratos de raiz, caule, semente e folhas (250 µg/mL) de *Jatropha curcas* L. obtidos por soxhlet e por maceração.

Entre os oito extratos de algumas plantas medicinais comuns testados *in vitro* utilizando também o método de DPPH, Khalaf e colaboradores (2008) encontraram no extrato bruto de folhas de chá verde e chá preto (*Camellia sinensis* L.), frutos de *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) B. H. e *Piper cubeba* L., rizomas de *Zingiber officinale* R. e frutos de *Piper nigrum* L. valores de EC₅₀ de 6.7 ± 0.1, 9.7 ± 0.1, 9.9 ± 0.2, 11.3 ± 0.3, 65.1 ± 1.7, 144,1 ± 2.2 µg/mL, respectivamente. Para os extratos de fruto das espécies *Trigonella Foenum graecum* L. e *Elettaria cardamomum* L. M. registrou-se valores de IC₅₀ de 444.1 ± 5.5 e 681.5 ± 8.4 µg/ml, respectivamente. Os valores encontrados no estudo citados em comparação aos apresentados neste estudo demonstram a variabilidade do potencial antioxidante que pode existir em

diferentes espécies assim como nos diferentes compartimentos que se queira investigar.

Comparando-se o efeito da remoção de água das diferentes partes botânicas na atividade antioxidante, verificou-se que as amostras obtidas a partir do material seco apresentaram melhor atividade antioxidante (ANOVA, $p < 0,05$) quando comparadas as amostras obtidas a partir do material fresco, excetuando as amostras de folhas, em que os extratos de folhas frescas obtidos por maceração apresentaram maior percentual de atividade antioxidante quando comparado com os extratos das folhas secas.

Analisando-se estatisticamente os dados, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das partes botânicas analisadas. Aplicando-se a Análise de Variância e o pós-teste de Tukey, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias dos extratos de folha, raiz, semente e caule secos analisadas no método Soxhlet, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos extratos de folha (seca e fresca) e raiz seca, demonstrando que a maior atividade antioxidante foi dos extratos de folha obtidos por ambas as metodologias.

A atividade antioxidante em extratos de folhas de *J. curcas* já foram evidenciadas por diversos estudos que mostraram que tal atividade é conferida devido a presença de diversos grupos fitoquímicos como esteroides, flavonoides, alcaloides, fenóis e taninos (NWOKOCHA *et al.*, 2011; HIROTA *et al.*, 2010). O que também foi encontrado na avaliação fitoquímica realizada podendo assim atribuir a atividade antioxidante demonstrada pela presença destes compostos.

Os extratos de *J. curcas* analisados demonstraram uma atividade menor que o ácido gálico utilizado como padrão neste estudo. Quanto à determinação da atividade antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, denominada concentração eficiente (EC_{50}), os extratos analisados apresentaram uma EC_{50} maior do que o padrão utilizado, sendo as folhas (SF_{PS} - $EC_{50} = 47,46 \mu\text{g/mL}$; MF_{PU} - $EC_{50} = 52,88 \mu\text{g/mL}$) que apresentam maior atividade antioxidante (Tabela 9), pois a interpretação a partir dos valores obtidos é que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua EC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Tabela 9. Concentração eficiente (CE₅₀) dos extratos etanólicos de raiz, caule, folha e sementes frescas e secas de *Jatropha curcas* L. obtidos por Soxhlet e por maceração.

Extratos (peso seco e peso úmido) SIGLA	Parte botânica	EC₅₀ (µg/mL) ± Desvio	
		Soxhlet	Maceração
S_{PU}	Semente Fresca	82,33 ± 1,09c	98,16 ± 1,27c
C_{PU}	Caule Fresco	95,86 ± 1,44c	101,79 ± 2,08c
R_{PU}	Raiz Fresca	62,07 ± 2,04b	85,77 ± 1,47b
F_{PU}	Folha Fresca	92,74 ± 1,10c	52,88 ± 1,06a
S_{PS}	Semente Seca	142,01 ± 2,32d	100,99 ± 2,01c
C_{PS}	Caule Seco	202,66 ± 1,10e	81,74 ± 1,07b
R_{PS}	Raiz Seca	120,97 ± 1,62d	66,66 ± 1,09a
F_{PS}	Folha Seca	47,46 ± 1,03a	107,07 ± 2,02c
AGp	Ácido Gálico (Padrão)	0,84 ± 0,03	0,84 ± 0,03

Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais numa mesma coluna não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os extratos etanólicos de raiz, caule, folha e sementes frescas e secas de *J. curcas* L. analisados pelo ensaio ABTS (1000 µg/mL), apresentaram-se semelhantes ao ensaio com DPPH (250 µg/mL), no entanto, as melhores atividades foram dos extratos de folha seca extraído por soxhlet (97,69%) e extrato de folha fresca extraído por maceração (98,54%).

Analisando-se estatisticamente os resultados de atividade antioxidante obtidos pela metodologia do ABTS, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. Aplicando-se a ANOVA e o teste de Tukey, verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos extratos de folha, raiz, semente e caule secos, respectivamente, obtidas pelo método soxhlet. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos extratos de folha fresca e raiz seca obtidos pelo método de maceração, demonstrando que a maior atividade antioxidante foi dos extratos de folha obtidos por ambas as metodologias (Figura 31).

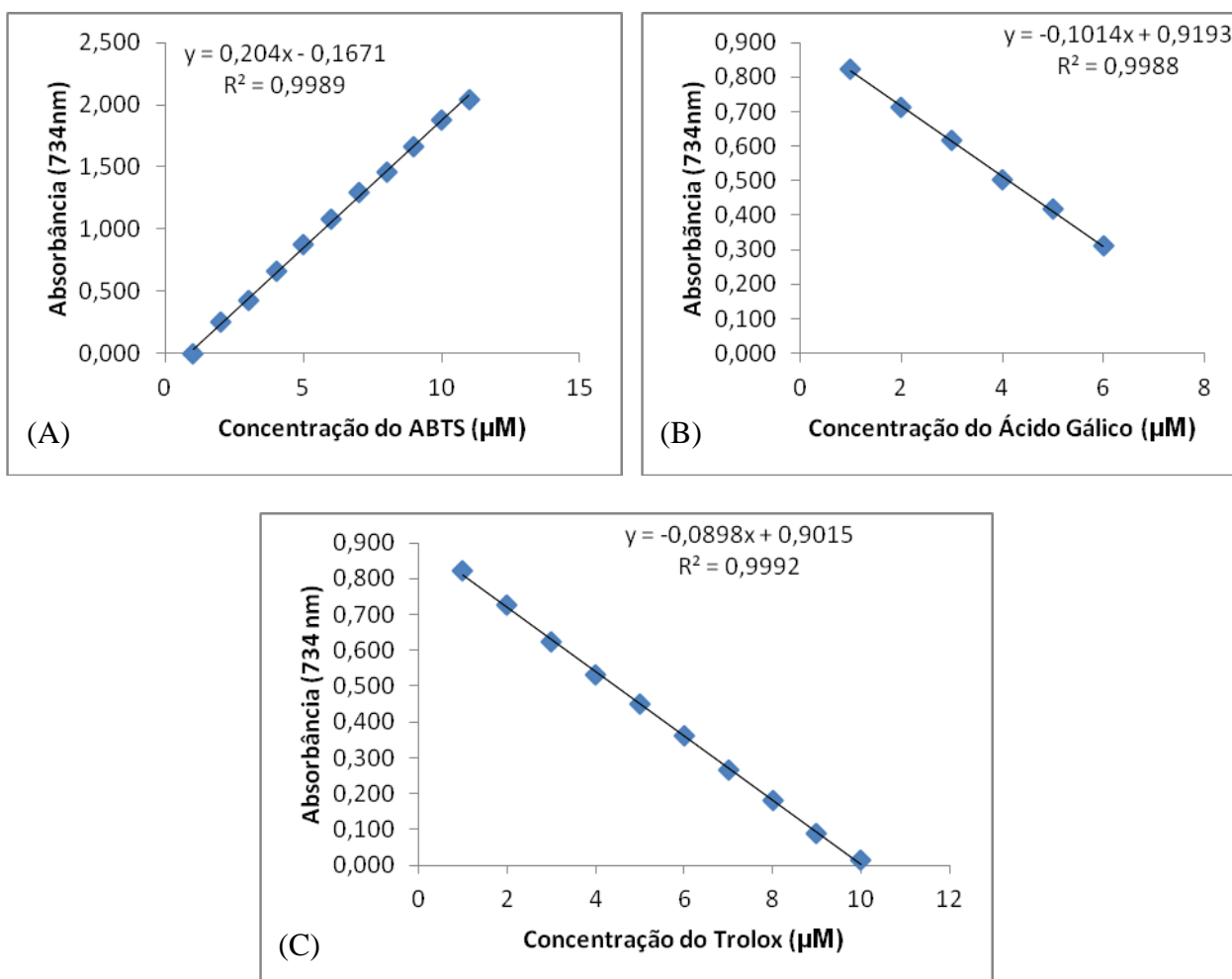
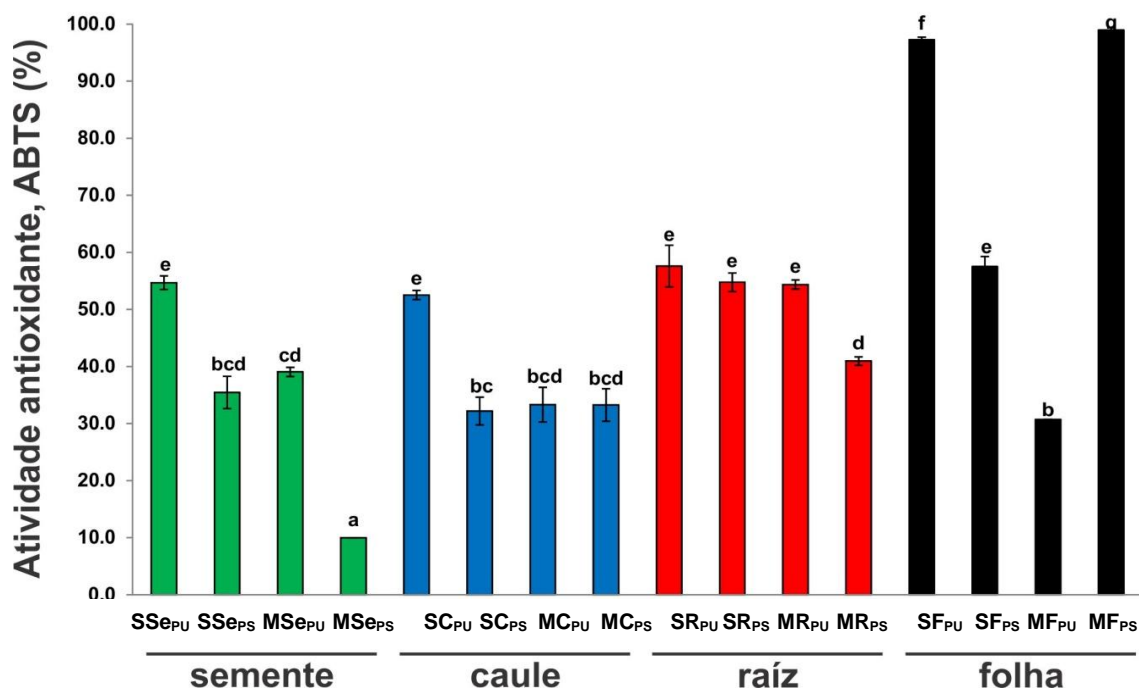


Figura 30. Curvas analíticas (A) Radical ABTS, (B) Padrão Ácido Gálico e (C) Equivalente a Vitamina E (Trolox).

Quando comparados quanto à capacidade antioxidante dos extratos de *J. curcas* com os padrões utilizados ácido gálico e trolox (vitamina E), pode-se verificar que os extratos de folha seca obtidos por soxhlet (SF_{PS}) e o extrato de folha fresca extraída por maceração (MF_{PU}), foram os que obtiveram maior capacidade antioxidante em relação aos demais extratos (Figura 32), não havendo diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).



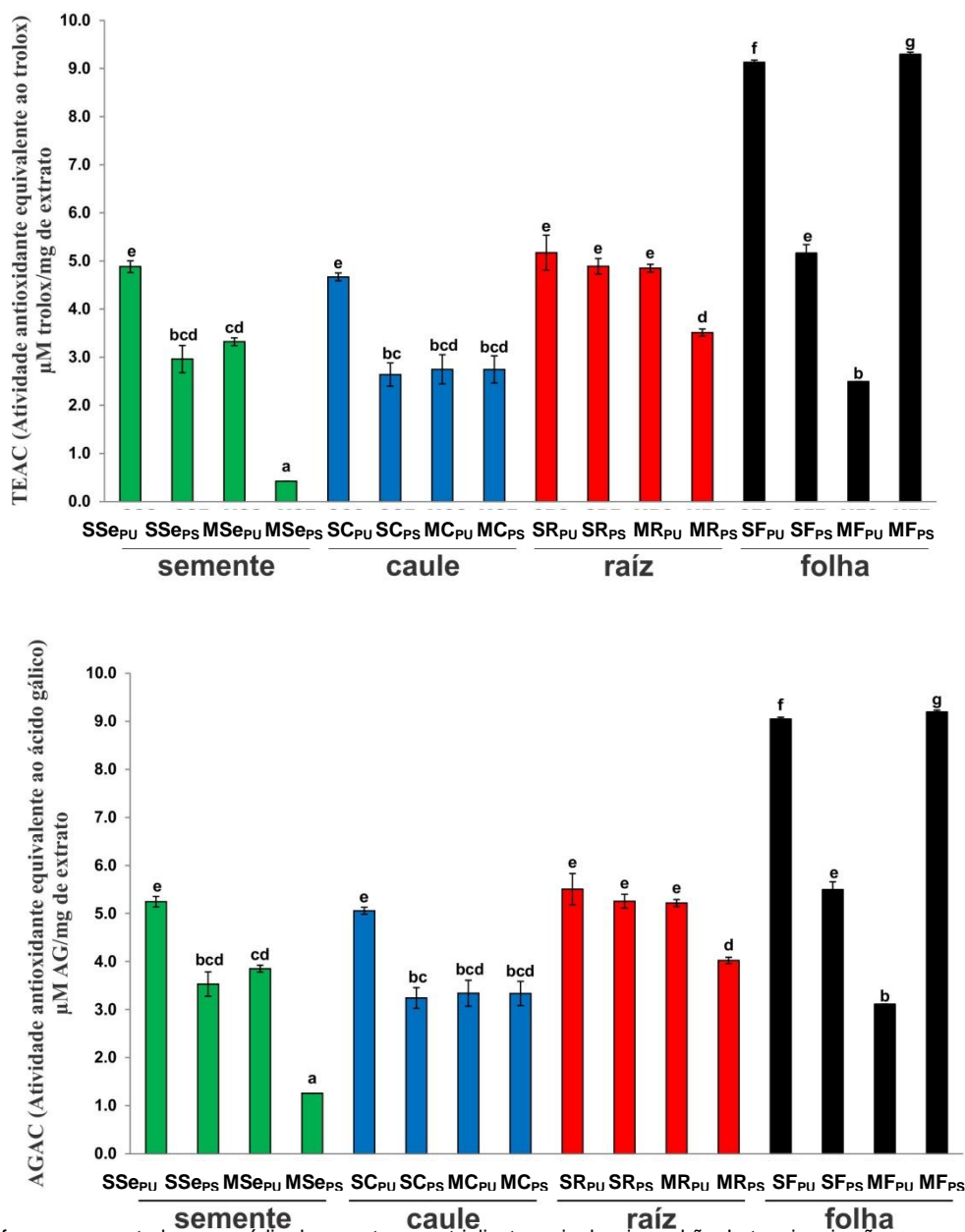
Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

S_{SePU}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **S_{CPU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **S_{RPu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **S_{FPU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **S_{SePS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **S_{CPs}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **S_{RPs}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **S_{FPS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet; **M_{SePU}**- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; **M_{CPU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; **M_{RPu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; **M_{FPU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; **M_{SePS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; **M_{CPs}**- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; **M_{RPs}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; **M_{FPS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração.

Figura 31. Percentual de Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos de raiz, caule, semente e folhas (1000 µg/mL) de *Jatropha curcas* L. obtidos por Soxhlet e por Maceração através do ensaio ABTS.

Para se determinar a atividade antioxidante de extratos vegetais, não há um método oficial utilizado atualmente, tendo em vista os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. A literatura evidencia diversos métodos antioxidantes, com princípios distintos utilizam radicais livres e/ou padrões diversos. Deste modo, pesquisas que avaliam propriedades antioxidantes de extratos vegetais utilizam mais de uma metodologia para inferir, com maior segurança, se os extratos estudados podem apresentar atividade em combater os radicais livres formados no interior do organismo humano. Entre as diversas metodologias que têm sido utilizadas, destacam-se as que utilizam

os radicais livres sintéticos DPPH• e ABTS•+, pela facilidade de execução e pela boa correlação com as demais metodologias antioxidantes (SOUSA *et al.*, 2011). Neste estudo foi constatado a eficiência de ambas as metodologias utilizadas.



Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

SSe_{PU}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **SC_{PU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **SR_{PU}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **SF_{PU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **SSe_{PS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **SC_{PS}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **SR_{PS}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **SF_{PS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet; **MSe_{PU}**- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; **MC_{PU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; **MR_{PU}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; **MF_{PU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; **MSe_{PS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; **MC_{PS}**- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; **MR_{PS}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; **MF_{PS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração.

Figura 32. Atividade antioxidante equivalente ao trolox (A) e ao ácido gálico (B)

pelo método do ABTS dos extratos de sementes, caule, raízes e folhas de *Jatropha curcas* L. obtidos por soxhlet e por maceração.

Trabalhos que utilizam a metodologia do radical ABTS divergem quanto ao tempo empregado para quantificar a atividade antioxidante. Alguns autores preferem empregar o tempo de 2 minutos para avaliar o TEAC, pois, nesse tempo ocorre quase que por completo a reação entre o radical e o antioxidante (LIMA, 2012). Já outros estudos preferem utilizar tempos mais longos de até 60 minutos, pois percebem que após 2 minutos de reação, os antioxidantes presentes no extrato continuam a neutralizar os radicais livres presentes na solução, esses tempos maiores são utilizados principalmente quando se trabalha com extratos de vegetais e não com antioxidantes sintéticos puros (LIMA, 2008).

Van den berg *et al.*(1999) dizem que o uso de tempos mais longos se justifica pelo fato de que certos antioxidantes seguem uma reação bifásica frente ao radical ABTS, com uma fase inicial rápida e outra fase considerada lenta. No nosso estudo adotou-se o tempo de 6 minutos visto que a reação neste período foi o suficiente para estabilização da reação. Diante do exposto, as metodologias empregadas neste estudo tiveram por finalidade comprovar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L.

A presença de compostos fenólicos em diversas plantas possui uma ação redutora, que desempenha importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (LIMA *et al.*, 2006). Assim como os flavonoides desempenham atividades antioxidantes devido à facilidade em sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por meio da sua configuração estrutural (AYRES *et al.*, 2009).

Diversas pesquisas apontam (DIWANI *et al.*, 2009) que os vegetais possuem uma alta atividade antioxidante devido à presença de compostos que atuam especialmente na proteção contra danos oxidativos. Estes compostos são descritos como compostos fenólicos, nos quais estão inseridos os flavonóides, ácido cinâmico e derivados, cumarinas, dentre outros. Estes compostos ocorrem em praticamente todos os vegetais mantendo o equilíbrio oxidativo, bem como protegendo a planta de mudanças bruscas que podem ocorrer no meio ambiente (DAUQAN *et al.*, 2011). No homem, estes compostos podem funcionar como modificadores de respostas biológicas atuando nos processos inflamatórios,

alérgicos, virais, antienvhecimento e anticancerígeno (DIWANI *et al.*, 2009; DAUQAN *et al.*, 2011).

O teor de fenóis totais presentes nos extratos etanólicos de *J. curcas*, realizada utilizando o método de Folin–Ciocalteu, com modificações (Morais, 2009), e utilizando-se ácido gálico como padrão (Figura 33), corroboram com os achados antioxidantes anteriormente expostos.

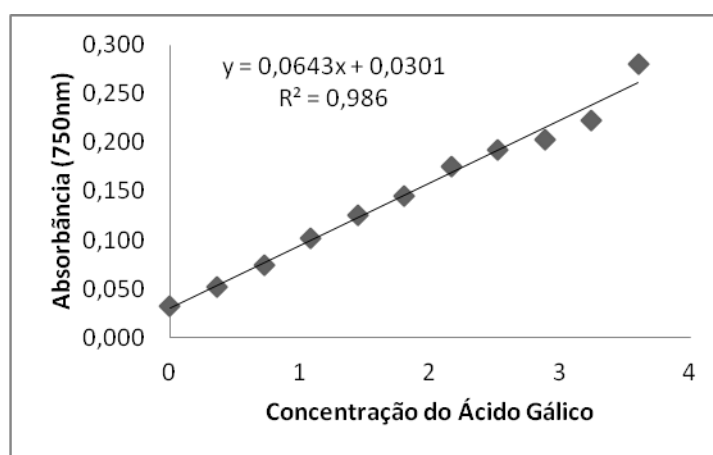
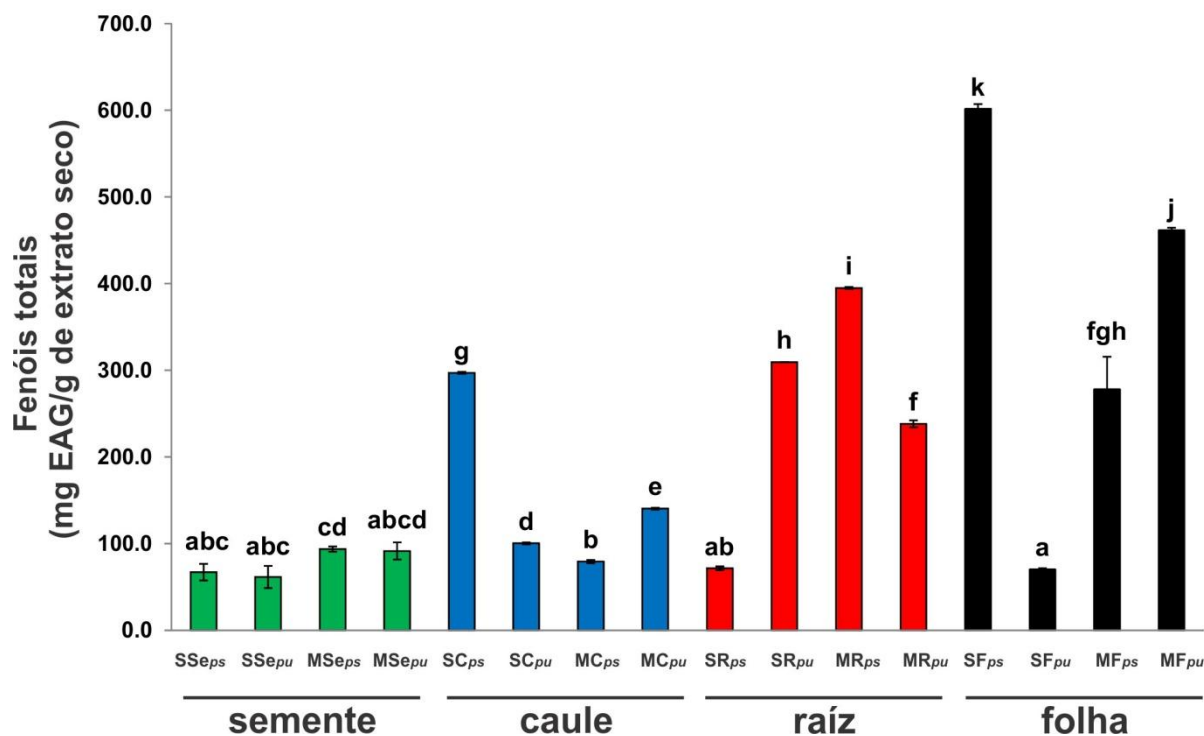


Figura 33. Curva analítica linear do padrão Ácido Gálico utilizado para determinação de Compostos Fenólicos Totais.

Os extratos que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos totais foram os extratos de folhas secas obtidas por soxhlet e folhas frescas obtidas por maceração, seguido pelo extrato de raiz fresca obtido por soxhlet e raiz seca obtida por maceração. Verificou-se que os grupos fitoquímicos achados (flavonoides, taninos, cumarinas) se enquadram com os evidenciados através do teste de Folin-Ciocalteu. Estes resultados podem indicar a diferença na distribuição destes metabólitos, pois está claro que cada parte botânica apresenta uma necessidade diferente frente a estímulos externos. Os métodos de extração utilizados neste caso influenciaram na obtenção dos compostos fenólicos totais.

A presença de compostos fenólicos nas amostras de extratos etanólicos de *J. curcas* estão associados com a atividade antioxidante obtida (Figura 35), mas não significa que, não haja outras moléculas que atuem de forma sinérgica e culminei em tal atividade. Para isso, se faz necessárias análises cromatográficas para identificação de todos compostos presentes nos extratos.



Os dados foram apresentados por média de amostras em triplicata mais desvio-padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

SSe_{pu}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **SC_{pu}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **SR_{pu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **SF_{pu}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **SSe_{ps}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **SC_{ps}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **SR_{ps}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **SF_{ps}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet; **MSe_{pu}**- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; **MC_{pu}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; **MR_{pu}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; **MF_{pu}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; **MSe_{ps}**- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; **MC_{ps}**- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; **MR_{ps}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; **MF_{ps}**- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração.

Figura 34. Compostos Fenólicos Totais dos extratos etanólicos de raiz, caule, folha e sementes de *Jatropha curcas* L. obtidos por soxhlet e por maceração.

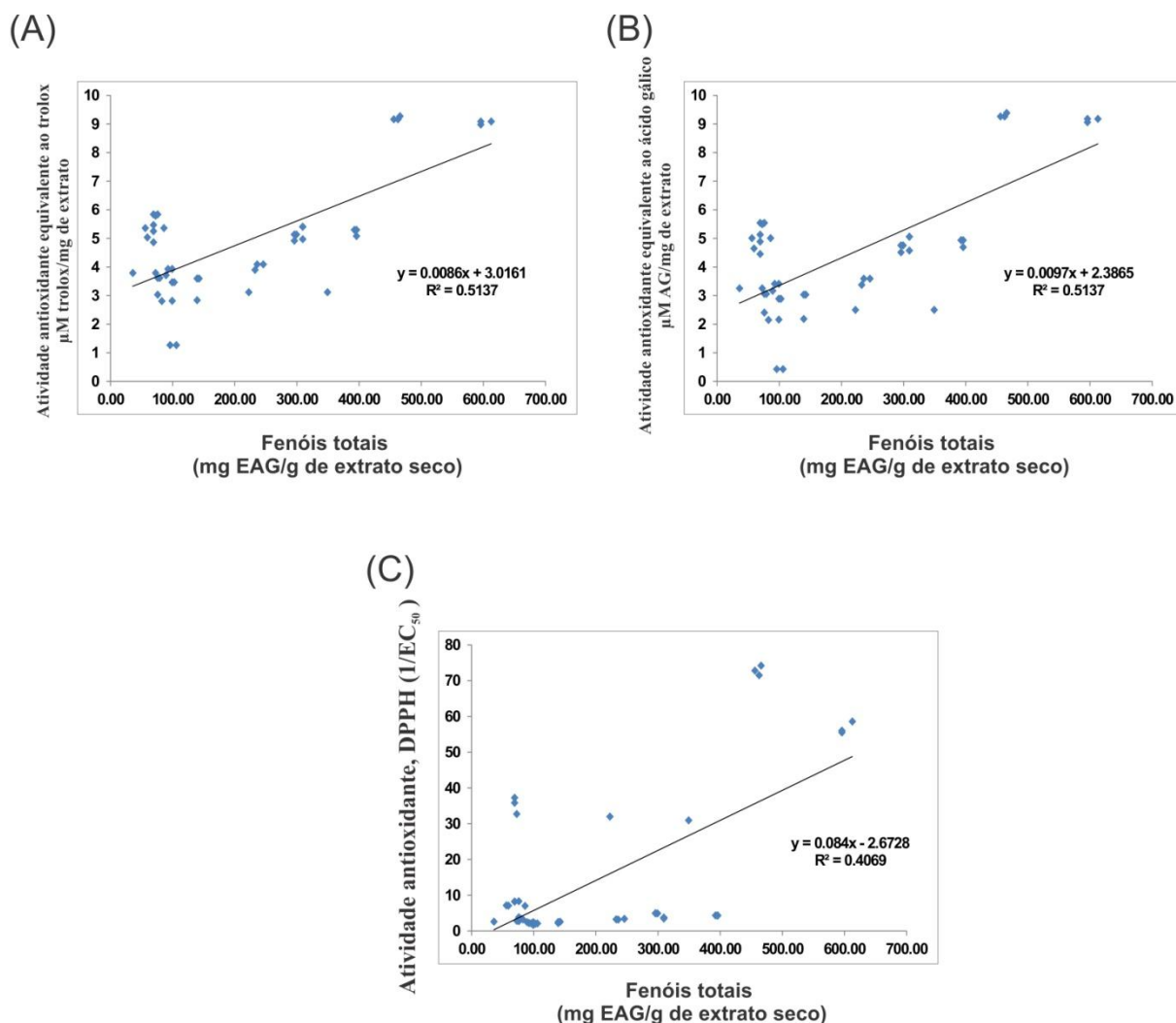


Figura 35. (A e B) Correlação dos teores de compostos fenólicos em relação a atividade antioxidante pelo método ABTS; (C) Correlação dos teores de compostos fenólicos em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH.

5. Considerações finais

Os extratos etanólicos folha de *J. curcas* obtidos por soxhlet e maceração apresentaram maior atividade antioxidante quando analisadas a partir do peso úmido e peso seco.

As metodologias DPPH^{*} e ABTS⁺⁺ utilizadas para a investigação da atividade antioxidante, não diferiram significativamente quando comparadas entre si.

Os compostos fenólicos achados estão correlacionados coma a atividade antioxidante encontrada em ambos métodos de avaliação.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.C. ; CHAVES, A ; RINALDO, D. ; VILEGAS, W; MAGELA JR, G. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Quím. Nov.**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, Julho 2009.
- BALAJI, R.; REKHA, N.; DEECARAMAN M.; and MANIKANDAN L.; Antimetastatic and antiproliferative activity of methanolic fraction of *Jatropha curcas* against B16F10 melanoma induced lung metastasis in C57BL/6 mice. **Afr. J. of Pharm. and Pharmacol.** Nairobi, Vol. 3(11), pp. 547-555, November 2009.
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, Mai./Ago.1999.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **F. Sci. and Techn.**, London, vol.28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para Análise de Sementes. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 365p. 2009.
- CARVALHO, L. M. de et al. Qualidade em plantas medicinais; **Com. Téc. Embr. Tab. Cost.**; Aracaju, 2010.
- DAUQAN, Eqbal; ABDULLAH, Aminah; SANI, Halimah; Natural antioxidants: Lipid profile, lipid peroxidation, antioxidant enzymes of different vegetable oils. **Adv. J. Food Sci. Technol.** United Kingdom; v. 3(4): p. 308-316; 2011
- DE MORAIS, S. M. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. Bras. Farmacog.**, João Pessoa; v. 19, p. 315-320, 2009.
- DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O. L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível.** Viçosa. v. 1. 40p, 2007.
- DI STASI, Luiz Claudio. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** Luiz Claudio Di Stasi, Clélia Akiko Hiruma-Lima; colaboradores Alba Regina Monteiro Souza-Brito, Alexandre Mariot, Claudenice Moreira dos Santos. - 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.
- DIWANI GE, RAFLE SE, HAWASH S, Antioxidant activity of extracts obtained from residues of nodes, leaves, stem and root of Egyptian *Jatropha curcas*. **Afr. J. Pharm, Pharmacol.** Nairobi; v.11, p.521-530. November, 2009:
- FELIPPE, Gil. **Venenosas: plantas que matam também curam.** São Paulo: Editora SENAC; São Paulo, 2009.

HIROTA, B. C. K., Estudo Fitoquímico e das Propriedades Biológicas de *Jatropha multifida* L. (EUPHORBIACEAE). **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

HIROTA, B. C. K., TREVISAN, R. R., DIAS, J. F. G., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Fitoquímica e Atividades Biológicas do Gênero *Jatropha*: Mini-Revisão. **Vis. Acad.**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez./2010

KHALAF, N. A. et al. Antioxidant Activity of Some Common Plants, **Turk J Biol**, Turkey, v.32 p.51-55, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Cienc. Tecnol. Alim.**, Campinas; v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LIMA, A. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Rev. Bras. Farmacog.**, João Pessoa; v. 16, n. 4, p. 531-536, out./dez. 2006.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). (**Tese Doutorado**), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, R. M. T. de ; Fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn.): Compostos bioativos, atividade antioxidante e aplicação tecnológica; **Tese de Doutorado**; Universidade Federal do Piauí; Teresina, 2012

MARINHO, R. F., Crescimento e Teores de Nutrientes de Cinco Acessos de Pinhão-Manso (*Jatropha Curcas* L.) Cultivados no Município de Santa Terezinha-PB. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Campina Grande Patos – Paraíba – Brasil 2011

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, abr./jun. 2007

MARTINS, P. M.; Influência de parâmetros de secagem e armazenamento sobre princípios ativos de interesse de duas espécies medicinais: guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Tese de doutorado**; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Campos dos Goytacazes; 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MELO, E. de C, RADÜNZ, L. L, MELO, R. C. de A. e; Influência do Processo de Secagem na Qualidade de Plantas Medicinais – **Rev. Not. Tec. Eng. Agr.**, Viçosa, MG, v.12, n.4, 307-315, Out./Dez., 2004

OSKOU EI AN, Ehsan; ABDULLAH, Norhani; SAAD, Wan Zuhainis; OMAR, Abdul Rahman; AHMAD, Syahida; KUAN, Wen Bin; ZOLKIFLI, Nor Azlina; HENDRA,

Rudi; and YIN Wan Ho. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. **J. Med. Plant. Res.**, Nsukka, Vol. 5(1), pp. 49–57, 4 January, 2011a

OSKOUÉIAN, Ehsan; ABDULLAH, Norhani; SAAD, Wan Zuhainis; AHMAD, Syahida; OMAR, Abdul Rahman; YIN Wan Ho. Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v.12. 2011b

PROCHAZKOVA, D., Boušova, I., Wilhelmova, N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoter.** 82, 513–523, 2011.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embr. Agr. Trop. Comunicado Técnico 127**, Fortaleza, 2007 a.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embr. Agr. Trop. Comunicado Técnico 128**, Fortaleza, 2007 b.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) . **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44 – 78, 2005.

SILVA W. J. M; FERRARI, C K B; Mitocôndria, Radicais livres e Envelhecimento. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, Rio de Janeiro; 14(3):441-451; 2011

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Braz. J. Food Techn.**, v. 14, n. 3. Campinas-SP, p. 202-210, 2011.

SOUZA TJT, APEL MA, BORDIGNON S, MATZENBACHER NI, ZUANAZZI JAS, HENRIQUES AT Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Rev. Bras. Farmacog.**, João Pessoa; v.17 p.368-372; 2007

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **J. Food Compos. Anal.**, v.19, 2006.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comp. Anal.**, London, vol.19, p. 669-675, 2006.

VALE, V. V. & ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Scien. Plen.** Aracaju, Vol. 7, Num. 4, Abril, 2011

VAN DEN BERG, R; HAENEN, G. R. M. M; VAN DEN BERG, H; BAST, A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chem.**, Philadelphia; v.66, p. 511, 1999.

VEIGA, A. A. S. da. Isolamento e quantificação de flavonoides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2008.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. de S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev. Bras. Farmacog.** Curitiba, v. 17, n.3, p. 384-387, Jul./Set. 2007.

CAPÍTULO 3 - Triagem de extratos etanólicos de *Jatropha curcas* L. quanto efeito antitumoral

1. Introdução

O câncer é um grave problema de saúde pública mundial. Atualmente, a cirurgia, radioterapia e quimioterapia perfazem as formas de tratamento da doença. A quimioterapia consiste no uso de agentes químicos com atividade antitumoral (MESQUITA, 2009). Todavia, a terapêutica para o tratamento da maioria dos cânceres ainda é limitada.

Dentre os cânceres de maior prevalência destaca-se o câncer de fígado, sexto mais incidente e representa a terceira causa de mortalidade por câncer no mundo. No Brasil, este tumor não consta entre os dez mais incidentes e sua taxa pode variar entre 1 a quase 10 casos em 100 mil habitantes, ocorrendo em uma frequência três vezes maior em homens do que em mulheres (OMS, 2013).

O Hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia primária oriundas das células do fígado, os hepatócitos, caracteriza-se pela neovascularização e por uma alta propensão à invasão venosa, a qual está bastante relacionada com a progressão da doença e prognóstico do paciente (GOMES *et al.*, 2013).

Entre os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento de CHC constam as infecções pelos vírus da hepatite B e vírus da hepatite C (VHC), doenças alcoólicas do fígado e doença hepática gordurosa não alcoólica (figura 36). A distribuição mundial destes fatores de riscos é variável e depende principalmente da região geográfica e etnia

O CHC é considerado uma neoplasia maligna, sendo muito agressivo, com prognóstico altamente negativo. Possui alto índice de óbito após o início dos sintomas, pois está relacionado com o comprometimento funcional do fígado. Dentre os sintomas associados são descritos as dores abdominais, peritonite bacteriana espontânea, distensão abdominal, falta de apetite, tumor palpável a direita do abdômen, emagrecimento, sinais de encefalopatia hepática e mais comumente icterícia e/ou ascite (BRUIX & SHERMAN, 2005). Se o diagnóstico for feito na fase sintomática, estudos apontam que a expectativa de vida média de tais pacientes chega a ser inferior a um mês e nesta fase os tratamentos disponíveis são limitados

e pouco eficazes (GOMES *et al.*, 2013; KHARE *et al.*, 2013).

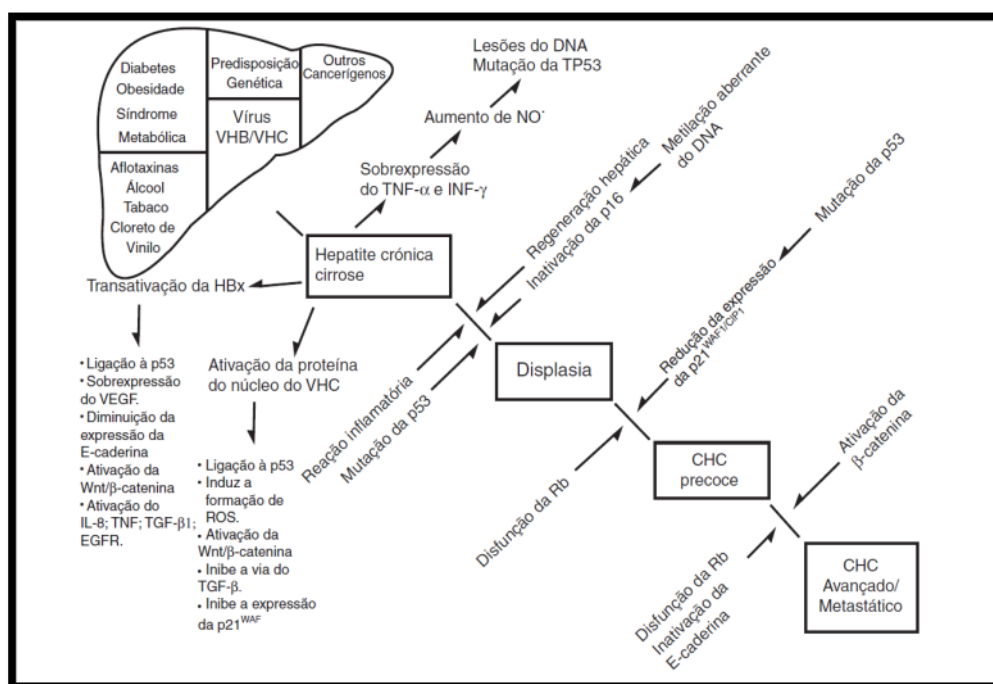


Figura 36. Fatores de risco e eventos moleculares desencadeadores do carcinoma hepatocelular. Fonte: GOMES *et al.*, 2013.

Dentre as neoplasias hepáticas primárias, o CHC constitui cerca de 70 a 85% dos achados clínicos, sendo um dos tumores mais frequente e comum em todo mundo. É a segunda neoplasia que acomete pacientes do sexo masculino e sexto em sexo feminino (KHARE *et al.*, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2013, evidenciou que é a neoplasia que possui maior incidência no Oriente, em áreas do continente africano e no oeste do Pacífico, ocorre em maior frequência em países em desenvolvimento, onde a infecção pelo vírus da hepatite B é incidente. Mundialmente diagnosticado em mais de meio milhão de indivíduos a cada ano (JEMAL *et al.*, 2011; FERLAY *et al.*, 2010). No Brasil, a incidência do carcinoma hepatocelular é baixa, sendo elevada nos estado do Espírito Santo e da Bahia (OMS, 2013).

A alta prevalência do câncer de fígado está intimamente associada às infecções crônicas pelos vírus das hepatites B e C, esses infectam as células e desencadeiam uma resposta imune contra os hepatócitos. Existem três mecanismos

distintos quanto ao desenvolvimento do CHC, pela infecção da hepatite B. O primeiro promove a integração do DNA viral ao genoma hospedeiro gerando instabilidade cromossômica (MINAMI *et al.*, 2005; SHAFRITZ *et al.*, 2003). O segundo mecanismo segue através de mutações gênicas por inserção levando a integração do genoma do vírus em locais específicos que podem ativar genes endógenos (PATERLINI-BRÉCOT *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 1990; GOZWACIK *et al.*, 2001). Por fim, o terceiro implica na modulação da proliferação celular através da expressão de proteínas virais, como a proteína X (HBx) que atua na super expressão de uma gama de genes virais e celulares (GOZWACIK *et al.*, 2001; MURAKAMI, 2001).

A HBx está relacionada com diversos processos de alteração celular (malignidade) no CHC, esta proteína viral está associada com a ativação de genes promotores de proliferação celular, que promovem o aumento na produção e liberação de interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF), fator de transformação do crescimento (TGF-1) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ANDRISANI & BARNABAS, 1999, MORRIS *et al.*, 2012). Em suma, atua na desregulação de pontos de checagem do ciclo celular, através da ativação de cascatas de sinalização envolvendo a via Ras/Raf/MAPK (TARN *et al.*, 2001) e ativação de diversos oncogenes (c-myc, c-jun e o c-fos) (NATOLI *et al.*, 1994; BENN & SHNEIDER, 1994). Outro mecanismo de ação da HBx é ligar-se ao gene da p53 levando a inativação das atividades dependentes de p53, como a apoptose mediada pela p53 ou inibindo a transcrição da TP53, conferindo a malignidade tumoral do carcinoma hepatocelular (STAIB *et al.*, 2003; LEE & RHO, 2000).

Gomes e colaboradores (2013) demonstram que indivíduos infectados com hepatite C tendem a desenvolver o CHC mais agressivo comparados a indivíduos infectados pelo vírus da hepatite B. Isso se deve ao fato do HVC ser um vírus de RNA que não se integra diretamente ao genoma hospedeiro, porém, as interações entre vírus e o hospedeiro promovem a hepatocarcinogênese indireta do vírus (GOMES *et al.*, 2013). A proteína do núcleo do HVC possui ação moduladora na proliferação celular, apoptose e resposta imune, além de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através da interação com a proteína Hsp60 e possui a capacidade de se ligar à p53 e a proteína Rb, que culmina na

inibição do processo de apoptose e a acentuada proliferação celular (BARTOSCH *et al.*, 2009; TSAI & CHUNG, 2010).

Assim, dentre os mecanismos envolvidos no surgimento do CHC, associado ou não a infecção com os vírus das hepatites B e C, destacam-se a peroxidação lipídica, decorrente do estresse oxidativo, desencadeada a partir com alta produção de radicais livres, que, por sua vez, promovem o desenvolvimento tumoral através da ativação do inibidor da quinase kappa beta, indutor da inflamação hepática e fibrose cística, pela hiperinsulinemia e hiperglicemia, que leva a danos no DNA, proliferação celular, fibrose e angiogênese (EDMISON & MCCULLOUGH, 2007; STAIB *et al.*, 2005; FUKUMURA *et al.*, 2006; LALA & CHAKRABORTY, 2001).

Na hepatite crônica há uma superexpressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ e IL-1), que aumentam os níveis de óxido nítrico (NO⁻) nos hepatócitos (De VERA *et al.*, 1996). Este aumento nos níveis de NO⁻ causa danos no DNA e induz a resposta anticarcinogênica da p53, quando esta se encontra inibida pode levar a mutação do gene TP53, que é relacionado ao surgimento de câncer e a condição de estresse inflamatório (FUKUMURA *et al.*, 2006).

O CHC possui um elevado grau de heterogeneidade genética, o que implica na utilização de diversas vias moleculares indutoras da neoplasia, tornando mais difícil o tratamento deste câncer. No entanto, estudos evidenciam que a utilização de produtos naturais pode ser uma estratégia promissora para inibir ou eliminando tal doença (SZIC *et al.*, 2011).

De modo geral, a detecção de um câncer só ocorre quando estão num estado mais avançado. Quando são diagnosticados apresentam sistemas degenerados que muitas vezes, são irreparáveis (SPORN, 2011). Ademais, os medicamentos que são adotados na prática clínica são promotores de desconforto e existem casos refratários. Nesse contexto, a busca de novos fármacos multifuncionais e alternativas quimiopreventivas que atuem de forma sistêmica, mas sem agredir as células saudáveis é requerido. Esse é o desafio renovou o interesse na medicina tradicional e fitoquímica atual, encontrar moléculas encontrar que atuem no tratamento seletivo das neoplasias (SZIC *et al.*, 2011).

Estudos mostram que há uma variedade de metabólitos (curcumina, triptenos, carotenóides, flavonoides, compostos fenólicos, etc.) extraídos de produtos naturais como frutas, vegetais, chás e ervas que atuam em diversas vias

de promoção e regulação de neoplasias (YANG & DOU, 2010; KI WON LEE *et al.*, 2011).

Atualmente, evidências apontam que combinações entre fitoquímicos podem ser mais efetivos do que compostos químicos ou fitoquímicos isolados (KOK *et al.*, 2008). Essas combinações atuam sobre os mecanismos de defesa celular como detoxificação, interação com sistemas enzimáticos antioxidantes, na indução de respostas inflamatórias, antitumorais e antimetásticas (MEERAN *et al.*, 2010; PARASRAMKA *et al.*, 2011).

Dentre as diversas plantas, a família Euphorbiaceae vem se destacando, por suas espécies apresentarem moléculas com atividades farmacológicas, dentre essa se destacam atividades antibacteriana, anticoagulante e coagulante, inseticida, anti-hipertensivos, antiinflamatórios, antimaláricos, antiulcerogênicos, antivirais, miorelaxantes e antitumoral (SALATINO *et al.*, 2007; MUJUMDAR & MISAR, 2004; OSONIYI & ONAJOBI, 2003) sendo estas amplamente utilizadas na medicina popular.

Vale destacar que dentre as diversas espécies euforbiáceas, a *Jatropha curcas* L. vem sendo extensivamente estudada nos últimos tempos, decorrente, sobretudo, de suas aplicabilidades biotecnológicas na produção de biodiesel. Além das promissoras atividades farmacológicas, dentre essas, propriedade analgésica, antiinflamatória, antipirética e antiviral (DI STASI, 2002; OSKOUÉIAN *et al.*, 2011).

Essa planta possui fácil adaptação a ambientes secos e a altas temperaturas, possui acentuado teor óleo em suas sementes. O óleo purgativo é usado como abortivo e no tratamento de diferentes manifestações de reumatismo. O macerado de suas folhas usado por ribeirinhos para estancar sangramentos e na Odontologia, para tratamentos de aftas da boca. Outras atividades como antioxidante e antitumoral também já foram assinaladas (FELIPPE, 2009; BALAJI *et al.*, 2009).

Desta forma, este estudo objetivou triar extratos de raiz, folhas, sementes e caule frescos e secos de *Jatropha curcas* L. obtidas por Soxhlet e maceração quanto ao potencial antitumoral sobre a linhagem HepG2, bem como a citotoxicidade dos extratos mais promissores em macrófagos peritoneais.

Esta linhagem tumoral de hepatocarcinoma foi descrita por Knowles e colaboradores em 1980, oriunda do tecido hepático de um paciente, sexo masculino de 15 anos de idade, com carcinoma hepatocelular. A linhagem HepG2 apresenta

morfologia típica dos hepatócito, são aderentes com crescimento em monocamada. Em cultura *in vitro* secretam proteínas plasmáticas, como a albumina, transferrina, fibrinogênio, a-2-macroglobulina, o plasminogênio e respondem à estimulação com HGH (KNOWLES *et al.*, 1980).

2. Material e métodos

Cultivo celular: a linhagem modelo de estudo usada foi a HEPG-2 (ATCC), cultivada em garrafas de cultivo de plástico, em meio RPMI 1640 GIBCO™ com L-glutamina, tamponado com 2,2 g de bicarbonato de sódio (SIGMA) e 4,76 g de HEPES e suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, mantidas em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ à temperatura de 37°C, por 48 e 72 horas antes dos experimentos até a formação da confluência celular (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Avaliação antitumoral: inóculos de $1-5 \times 10^5$ células/mL foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços com volume final de 2,5 mL, em presença ou ausência dos extratos testados, por 24 e 48 horas a 37 °C, em atmosfera de 5 % CO₂. Após o período de incubação as células em suspensão foram descartadas e as aderidas lavadas com salina tamponada (PBS) pH 7,2, 37 °C. Posteriormente, foram fixadas com metanol P.A., lavadas novamente com PBS e coradas com azul de metileno 0,1 % em tampão borato 0,01 M, pH 8,7. Por fim, foram lavadas com solução tampão borato 0,01 M, pH 8,7 e adicionado o ácido clorídrico 0,1 M para extrair o corante incorporado nas células. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Versa Max-Molecular Devaices®) a 630 nm (Adaptado de BUSATTI & GOMES, 2007).

Avaliação de citotoxicidade: Macrófagos foram obtidos de cavidade peritoneal de camundongos BALB/c em meio RPMI 1640 gelado e plaqueados em placas de 24 poços. Após 1 hora, as células foram lavadas com salina tamponada (PBS), e adicionado meio RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal. Após 24 horas de cultivo, os extratos mais efetivos foram acrescentados nas concentrações utilizadas na triagem e incubadas por mais 48 horas. Então, foi avaliada a viabilidade celular pela técnica colorimétrica do azul de metileno (descrito acima) A leitura foi realizada em

leitor de ELISA (Versa Max- Molecular Devaices®) a 630 nm.

Análise estatística: os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, através do programa Graphpad prism 5.0. Para tais análises utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA não-paramétrico e o pós-teste de Dunnet calculando a média \pm desvio padrão com níveis de significância de $p < 0,05$. Foram realizados três experimentos independentes e todos em triplicatas.

3. Resultados e Discussão

As células foram incubadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos frescos e secos de *J. curcas* L., (Tabela 10), por 24 e 48 horas. Após este período as células foram analisadas por microscopia óptica, para verificação do padrão morfológico celular e, em seguida, a susceptibilidade foi avaliada através do método colorimétrico do azul de metileno de acordo com BUSSATTI; GOMES, 2007.

Tabela 10. Classificação dos extratos etanólicos de folhas, caule, sementes e raízes (secas e frescas) de *Jatropha curcas* L., obtidos através da extração por maceração e por soxhlet.

Amostra	Extração por Soxhlet		Extração por Maceração	
	Sigla (Peso Seco)	Sigla (Peso Úmido)	Sigla (Peso Seco)	Sigla (Peso Seco)
Folha (F)	SF _{PS}	SF _{PU}	MF _{PS}	MF _{PU}
Caule (C)	SC _{PS}	SC _{PU}	MC _{PS}	MC _{PU}
Semente (Se)	SSe _{PS}	SSe _{PU}	MS _{PS}	MS _{PU}
Raiz (R)	SR _{PS}	SR _{PU}	MR _{PS}	MR _{PU}

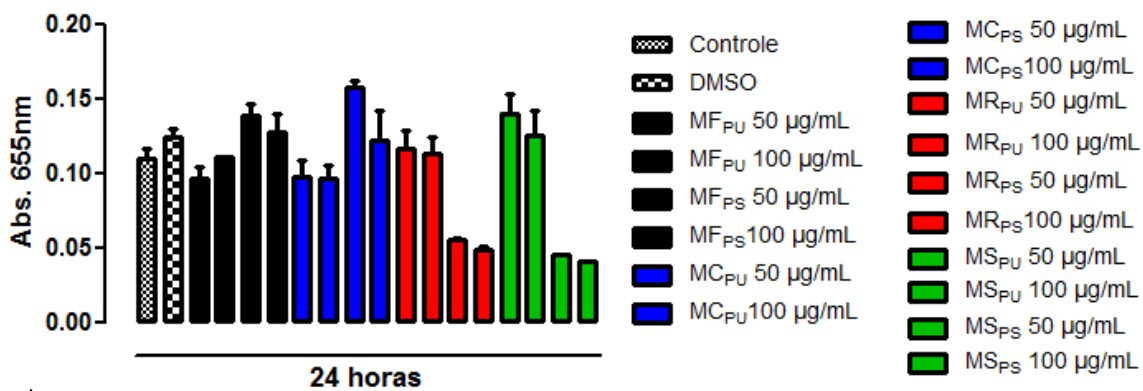
SSe_{PU}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **SC_{PU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **SR_{PU}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **SF_{PU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **SSe_{PS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **SC_{PS}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **SR_{PS}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **SF_{PS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet; **MSe_{PU}**- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; **MC_{PU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; **MR_{PU}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; **MF_{PU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; **MSe_{PS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; **MC_{PS}**- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; **MR_{PS}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; **MF_{PS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração

O percentual de inibição foi determinado em relação ao controle do diluente, o DMSO, para descartar que a ação antiproliferativa era atribuída ao efeito do solvente e não dos extratos. Os extratos frescos e secos obtidos pelo método a frio (maceração), de modo geral apresentam baixa efetividade quando comparados com os extratos obtidos pelo método de extração soxhlet.

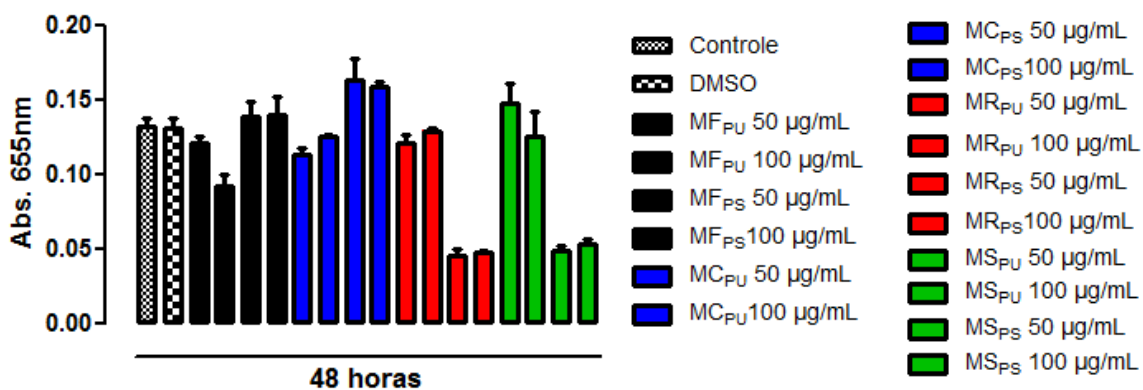
Estudos indicam que o método de extração e secagem são fatores de suma importância, para obtenção do(s) efeito(s) esperado(s), pois diversos metabólitos são diretamente influenciados pelo calor (MELO *et al.*, 2004). No entanto, os extratos de raiz e sementes secas obtidas por maceração (MR_{PS} e MS_{PS} 50-100 µg/mL) apresentaram percentual de inibição superior a 55% quando incubadas por 24 horas, persistindo a sua ação após 48 horas (figura 37 e 38), indicando que nesses extratos a ação inibitória pode não estar associada com os grupamentos químicos voláteis. Segundo Diwani e colaboradores (2009), a atividade terapêutica de extratos etanólicos de raiz de *J. curcas* egípcia está associada à presença de compostos fenólicos que possuem atividades diversas, dentre elas modulador da atividade antioxidante, que neste caso pode possuir efeito pró-oxidante, conferindo toxicidade às células tumorais.

Oskoueian e colaboradores (2011) mostram que os extratos de raízes conferem atividade antitumoral em células da linhagem HT-29 (Adenocarcinoma de cólon humano), assim como o presente estudo, que obteve inibição superior a 80% nas concentrações de 50 e 100 µg/mL de extrato metanólico. Sugere-se que o efeito esteja relacionado à presença de flavonoides e fenóis (OSKOUÉIAN *et al.*, 2011).

O modelo celular S180 (câncer gástrico) mostrou-se sensível a ação da cursina, substância presente nas sementes de *J. curcas* L., visto que a substância foi capaz de induzir a morte dessas células pelo mecanismo de ativação da via de apoptose nesse modelo celular, indicando que esse espécime vegetal possui moléculas promissoras para o estudo da prospecção antitumoral (LOU *et al.*, 2006).



A



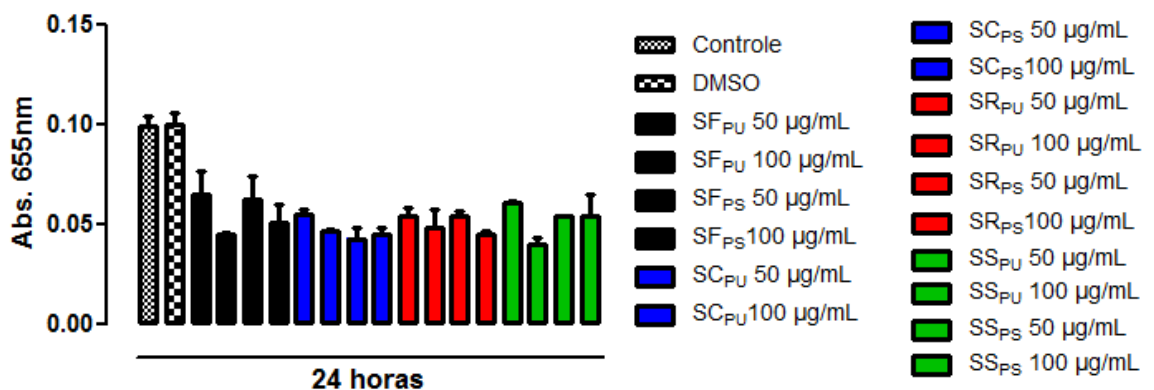
B

MSe_{PU}- Extrato de Semente Fresca obtido por Maceração; *MC_{PU}*- Extrato de Caule Fresco obtido por Maceração; *MR_{PU}*- Extrato de Raiz Fresca obtido por Maceração; *MF_{PU}*- Extrato de Folha Fresca obtido por Maceração; *MSe_{PS}*- Extrato de Semente Seca obtido por Maceração; *MC_{PS}*- Extrato de Caule Seco obtido por Maceração; *MR_{PS}*- Extrato de Raiz Seca obtido por Maceração; *MF_{PS}*- Extrato de Folha Seca obtido por Maceração.

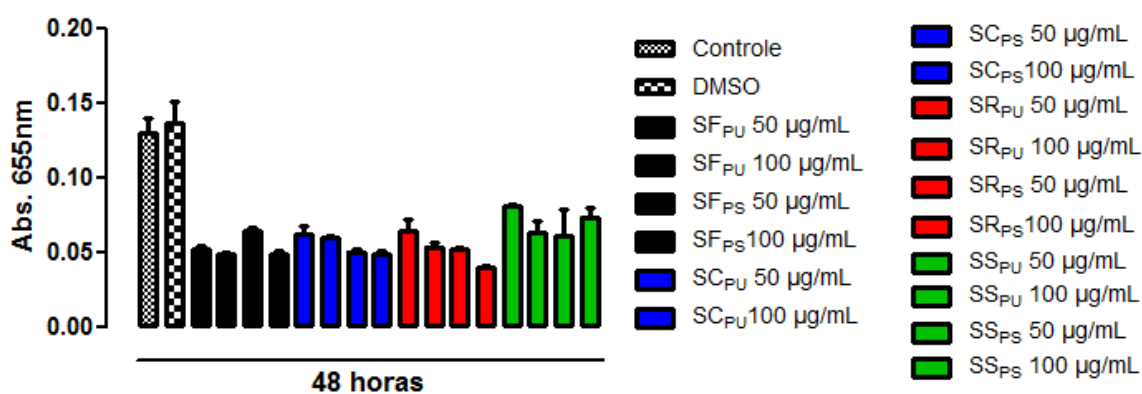
Figura 37. (A) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de *J. curcas* obtidos por Maceração, sob a linhagem HepG2 por 24 horas. (B) Análise da atividade antiproliferativa dos extratos de *J. curcas* obtidos por Maceração, sob a linhagem HEPG-2 por 48 horas.

Foram observados valores percentuais de inibição semelhantes entre os extratos etanólicos frescos e secos de *J. curcas* L. obtidos por soxhlet, não havendo diferença significativa. Os extratos da raiz seca foram os que apresentaram maior

taxa de inibição do crescimento celular (SR_{PS} 50 µg/mL- 61,95%; SR_{PS} 100 µg/mL- 71,10%), seguidos pelo do caule seco (SC_{PS} 50 µg/mL- 63,95%; SC_{PS} 100 µg/mL- 64,88%) e folha seca (SF_{PS} 50 µg/mL- 53,17%; SF_{PS} 100 µg/mL- 64,88%).



A



B

SS_{PU}- Extrato de Semente Fresca obtido por Soxhlet; **SC_{PU}**- Extrato de Caule Fresco obtido por Soxhlet; **SR_{PU}**- Extrato de Raiz Fresca obtido por Soxhlet; **SF_{PU}**- Extrato de Folha Fresca obtido por Soxhlet; **SS_{PS}**- Extrato de Semente Seca obtido por Soxhlet; **SC_{PS}**- Extrato de Caule Seco obtido por Soxhlet; **SR_{PS}**- Extrato de Raiz Seca obtido por Soxhlet; **SF_{PS}**- Extrato de Folha Seca obtido por Soxhlet;

Figura 38. (A) Analise da atividade antiproliferativa dos extratos de *J. curcas* obtidos por Soxhlet, sob a linhagem HEPG-2 por 24 horas. (B) Analise da atividade antiproliferativa dos extratos de *J. curcas* obtidos por Soxhlet, sob a linhagem HepG2 por 48 horas.

A atividade antitumoral de raízes e caule já foi evidenciada para outro modelo tumoral (SANTOS *et al.*, 2008; MUAGMAN *et al.*, 2005), sendo a folha demonstrada como a parte que possui maior potencial antioxidante (MORAIS *et al.*, 2009; DIWANI *et al.*, 2009). Neste estudo, os extratos de folhas secas obtiveram um percentual

acima de 50%.

As células tumorais diferem do metabolismo energético das células normais, quanto à obtenção de energia. Enquanto, as células não tumorais buscam energia pela via oxidativa, com consequente formação de EROS, onde produzem cerca de 36 moléculas ATP, as células tumorais optam pela anaerobiose, via glicólise, embora seja um processo com rendimento energético de 2 moléculas de ATP. Contudo, essa é uma via mais rápida para obtenção de energia, pois a relação tempo/produção gera aproximadamente 10 vezes mais ATP, assim células tumorais que estão constantemente em alta atividade mitótica e possuem sensibilidade a ação dos EROS erros, essa via torna-se mais favorável (SZIC *et al.*, 2011).

A prospecção de moléculas que interfiram com o metabolismo redox tumoral é uma estratégia muito investigada. Os extratos secos de folha atuam como agentes pró-oxidantes, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), através de reações como a de Fenton, aumentando a toxicidade celular, desnaturando proteínas fundamentais ao crescimento celular e ativando a via *p53* o que leva as células tumorais a desencadearem a apoptose e consequente morte (LIANG *et al.*, 2011). Assim, a morte das células da linhagem tumoral HepG2 pode estar sendo por múltiplas via, dentre elas destaca-se a indução de apoptose pela produção de EROS e ativação da *p53*.

Quanto à avaliação de citotoxicidade, os extratos promissores obtidos por soxhlet avaliados não apresentaram caráter tóxico em células de mamíferos (Figura 39).

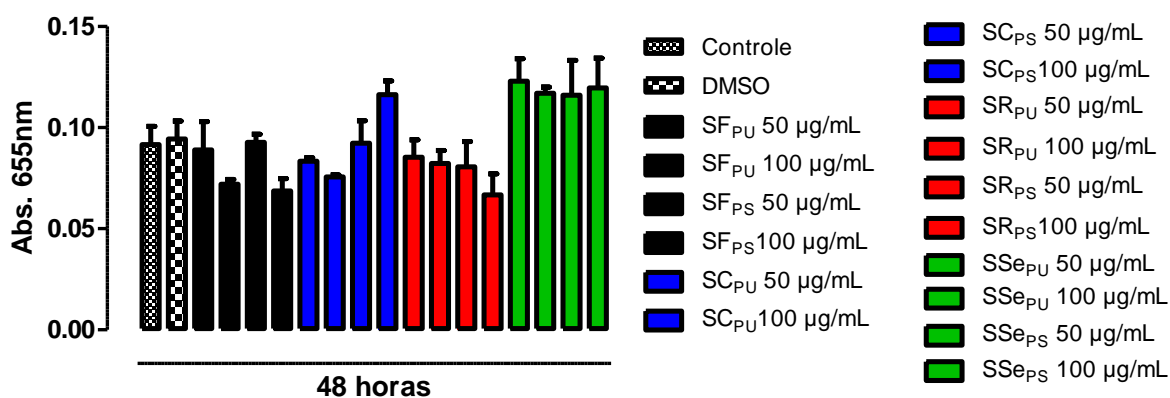


Figura 39. Avaliação da citotoxicidade dos extratos promissores obtidos por Soxhlet após incubação de 48 horas

4. Considerações finais

Os extratos etanólicos de raiz, caule e folhas *J. curcas* secos, obtidos por soxhlet, apresentaram melhor efeito antitumoral sobre as células tumorais da linhagem HEPG-2.

Os extratos etanólicos de raiz e sementes secos obtidos por maceração apresentaram promoção da atividade antiproliferativa, evidenciando que a secagem prévia influencia na atividade dos extratos quanto à preservação dos componentes bioativos.

A metodologia de melhor aproveitamento para obtenção de compostos bioativos quanto atividade antitumoral para a linhagem de hepatocarcinoma foi a extração contínua por soxhlet.

REFERÊNCIAS

ANDRISANI OM, BARNABAS S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). **Int J Oncol.** 1999;15:373–9.

BARROS, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Goncalves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P., 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food Chem.** 128, 165–172, 2010.

BARTOSCH B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. **J Hepatol.** 51:810–20; 2009.

BENN J, SCHNEIDER RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAPkinase signaling cascade. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1994;91:10350–4.53.

BRESSAC B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature.** 1991;350:429–31.

BRUIX J, SHERMAN M. Management of hepatocellular carcinoma. **Hepatology.** 2005;42:1208–36.

CAROCHO M., FERREIRA I.C.F.R., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Tox.** 51 15–25, 2013

De VERA ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene

bycytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. **Proc Natl Acad Sci USA**. 93:1054–9. 1996

EDMISON J, McCULLOUGH AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. **Clin Liver Dis**. 2007;11:75–104.

FERLAY J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. **Eur J Cancer**. 2010;46:765–81

FUKUMURA D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nat Rev Cancer**. 2006;6:521–34.

GOMES MA, et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Rev Assoc Med Bras**. 2013.

GOZUACIK D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, Okanoue T, et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. **Oncogene**. 2001;20:6233–40.

HALLIWELL, B., Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** 35, 1147–1150, 2007.

HSU I, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**. 1991;350:427–8.

JEMAL A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2011;61:69–90.

KAND'AR, R., Z' akova, P., Muz'akova, V., Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. **Clin. Chim. Acta** 365, 249–256, 2006.

KHLEBNIKOV, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.** 15, 1749–1770, 2007

KOK, T. M.; Breda, S. G. & Manson, M. M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. **Europ. J. Nutr.** 47: 51-59; 2008

KRIMMEL, B., Swoboda, F., Solar, S., Reznicek, G., OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. **Radiat. Phys. Chem.** 79, 1247– 1254, 2010.

LALA PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncol**. 2001;2:149–56.

LEE SG, RHO HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. **Oncogene**. 2000;19:468–71.63

LIANG, Dong, Qing Zhou, WeiGong, YiWang, Zhikui Nie, Hui He, Jiangtao Li, Jiahui Wu, Chenxi Wu, Jiuliang Zhang. STUDIES ON THE Antioxidant And Hepatoprotective Activities of Polysaccharides From *Talinum triangulare*. **J.Ethnopharm.**, 2011

LOBO, V., Phatak, A., Chandra, N., Free radicals and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn. Rev.** 4, 118–126, 2010.

LU, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell Mod. Med.** 14, 840–860, 2010.

LUTWICK L. Relation between aflatoxin, hepatitis-B virus, and hepatocellular carcinoma. **Lancet.** 1979;313:755–7.

PEERS F, Bosch X, Kaldor J, Linsell A, Pluijmen M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. **Int J Cancer.** 1987;39:545–53.

MINAMI M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. **Oncogene.** 2005;24:4340–8.

MORAIS, S. M.; Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. Bras. Farmacog.**, João Pessoa; v. 19, p. 315-320, 2009.

MORRIS SM, Baek JY, Koszarek A, Kannigurn S, Knoblauch SE, Grady WM. Transforming growth factor-beta signaling promotes hepatocarcinogenesis induced by p53 loss. **Hepatology.** 55:121–31; 2012.

MURAKAMI S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. **J Gastroenterol.** 36:651–60. 2001.

NATOLI G, Avantaggiati ML, Chirillo P, Costanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. **Mol Cell Biol.** 14:989–98; 1994.

PATERLINI-BRÉCHOT P, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. **Oncogene.** 22:3911–6. 2003.

PEREIRA, B. C. & PEREIRA, A. K. F. da T. C. Radicais Livres: Uma Nova Abordagem. **Rev. Saúde Quant.** / vol.1 – nº 1 / Jan – Dez 2012

PRASAD, A.S., Bao, B., Beck, F.W.J., Kuck, O., Sarkar, F.H., Antioxidant effect of zinc in humans. **Free Radic. Biol. Med.** 37, 1182–1190, 2004.

PROCHAZKOVA, D., Boušova, I., Wilhelmova, N., Antioxidant and prooxidant

properties of flavonoids. **Fitoterapia**. v.82, 513–523, 2011.

RAHMAN, K., Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Interv. Aging** v. 2, 219–236, 2007.

RATNAM, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, N.M.V.R., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J. Control Release** v.113, 189–207, 2006.

SHAFRITZ DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, KewMC. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. **N Engl J Med**.305:1067–73; 1981.

SINGH, P.P., Chandra, A., Mahdi, F., Ray, A., Sharma, P., Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. **Ind. J. Clin. Biochem**. v.25, 225–243, 2010.

SPORN, M. B. Perspective: The big C - for Chemoprevention. **Nature** 471: S10-11; 2011

STAIB F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. **Hum Mutat**. 2003;21:201–16.

STAIB F, Robles AI, Varticovski L, Wang XW, Zeeberg BR, Sirotnin M, et al. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. **Cancer Res**. v. 65:10255–64; 2005.

SZIC K. S. vel, Palagani A., Hassannia B., Sabbe L., Heyninck K., Haegeman G. and Berghe W. V. Chapter 7 - **Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: Epigenetic Friends or Foe?** In *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health. Agricultural and Biological Sciences* edited by [Iraj Rasooli](#), ISBN 978-953-307-424-5, 388 pages, 2011

TABASSUM, A., Bristow, R.G., Venkateswaran, V., Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? **Cancer Treat. Rev**. 36, 230–234, 2010.

TARN C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis Bvirus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. **J Biol Chem**. 2001;276:34671–80.

TURUNEN, M., Olsson, J., Dallner, G., Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochim. Biophys. Acta** 1660, 171–199, 2004.

VENDITTI P., Stefano L. Di, Meo S. Di, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion** 13 71–82; 2013

YANG, H. & DOU, Q. P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. **Curr Drug Targets** 11: 733-

744, 2010

WANG J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis Bvirus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. **Nature**. v.343:555–7. 1990.

.

Conclusão

6. Conclusão

- Os extratos etanólicos brutos de *Jatropha curcas* L. apresentaram os seguintes grupos fitoquímicos: Esteróides, Triterpenóides, Flavonóides, Taninos catéquicos, Xantonas, Cumarinas, Saponinas e Fenóis.
- Os extratos etanólicos de folha de *J. curcas* obtidos por soxhlet e maceração apresentaram maior atividade antioxidante quando analisadas a partir do peso úmido e peso seco.
- Quanto às metodologias DPPH• e ABTS•+ utilizadas para a investigação da atividade antioxidante não apresentaram diferenças significativas.
- Os fenóis totais encontrados nos extratos estão correlacionados com a atividade antioxidante dos extratos avaliados por ambas metodologias.
- Os extratos etanólicos secos de raiz, caule e folhas *J. curcas*, obtidos por soxhlet, apresentaram melhor efeito antitumoral sobre as células tumorais da linhagem HEPG-2.
- Os extratos etanólicos secos de raiz e sementes obtidos por maceração apresentaram promoção da atividade antiproliferativa, evidenciando que a secagem prévia influencia na atividade dos extratos quanto à preservação dos componentes bioativos.
- A metodologia de melhor aproveitamento para obtenção de compostos bioativos quanto atividade antitumoral para a linhagem de hepatocarcinoma foi por soxhlet.
- Quando realizado o teste de citotoxicidade, os extratos mais promissores (Soxhlet), não apresentaram ação tóxica sob as células normais.

7. Perspectivas

A espécie avaliada neste trabalho, a *Jatropha curcas* L. correspondeu com as expectativas da proposta de estudo evidenciando a sua importância quanto às atividades biológicas avaliadas, sendo necessária uma melhor investigação dos seus compostos bioativos (identificação e isolamento) através de fracionamento dos extratos, análise em cromatografia de camada delgada ou outras técnicas pertinentes.

REFERÊNCIAS

ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGH, V. P.; AERTS, R.; MUYS, B. Jatropha bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 1063-1084, 2008.

ANDRISANI OM, BARNABAS S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol*. 1999;15:373–9.

ALMEIDA, Vera Lúcia de; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barrett; MONTANARI, Carlos Alberto; e DONNICI, Claudio Luis; *Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o Dna: Uma Introdução*. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005

ARÊAS, Patrícia Cristina Fernandes; *Avaliação da Atividade Antitumoral de Naftoquinonas*. 2007. Tese (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense - UFF, Instituto de Biologia.

AYRES, M.C. ; CHAVES, A ; RINALDO, D. ; VILEGAS, W; MAGELA JR, G. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, Julho 2009.

BALAJI, R.; REKHA, N.; DEECARAMAN M.; and MANIKANDAN L.; Antimetastatic and antiproliferative activity of methanolic fraction of *Jatropha curcas* against B16F10 melanoma induced lung metastasis in C57BL/6 mice. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. Nairobi, Vol. 3(11), pp. 547-555, November 2009.

BARROS, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Goncalves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P., 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem*. 128, 165–172, 2010.

BARTOSCH B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*.2009;51:810–20.

BENN J, SCHNEIDER RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAPkinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*.1994;91:10350–4.53.

BILD AH et al: Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439:353, 2006

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, Mai./Ago.1999.

BONASSA EMA. *Enfermagem em Terapêutica Oncológica*. In: Bonassa EMA, Santana TR. São Paulo (SP): Atheneu; 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, vol.28, p. 25-30, 1995.

BRESSAC B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350:429–31.

BRUIX J, SHERMAN M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42:1208–36.

BUSATTI, H.G., Gomes, M.A. *A Simple Colourimetric Method to Determine Anti-Giardial Activity of Drugs*. *Parasitol Res*, 101: 819-21, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para Análise de Sementes. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 365p. 2009.

CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P. N.; TROVÃO, F. C. de S.; Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. **E**inst. Ed. Cont. Saúde. 2009

CARVALHO, L. M. de et al. Qualidade em plantas medicinais; **Comunicado Técnico: Embrapa Tabuleiros Costeiros**; Aracaju, 2010.

CAROCHO M., FERREIRA I.C.F.R., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51 15–25, 2013

COSTA-LOTUFO L. V.; ET AL. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Agosto - 2010. *Rev. Virtual Quim.*, 2010, 2 (1), 47-58.

COTTER TG: Apoptosis and cancer: The genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9:501, 2009

DAI, Y.; GRANT, S.; Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res* 67:2908, 2007

DAUQAN, Eqbal; ABDULLAH, Aminah; SANI, Halimah; Natural antioxidants: Lipid profile, lipid peroxidation, antioxidant enzymes of different vegetable oils. **Adv. J. Food Sci. Technol.** United Kingdom; v. 3(4): p. 308-316; 2011

De VERA ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:1054–9.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O. L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S.; SOUSA, L. C. A.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. *Viçosa*. v. 1. 40p, 2007.

DI STASI, Luiz Claudio. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Luiz Claudio Di Stasi, Clélia Akiko Hiruma-Lima; colaboradores Alba Regina Monteiro Souza-Brito, Alexandre Mariot, Claudenice Moreira dos Santos. - 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DIWANI GE, RAFLE SE, HAWASH S, Antioxidant activity of extracts obtained from residues of nodes, leaves, stem and root of Egyptian *Jatropha curcas*. **Afr. J. Pharm, Pharmacol**. Nairobi; v.11, p.521-530. November, 2009:

DOUGHARI, J. H.; Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, **InTech**; 2012.

EBUEHI, O. A., & OKORIE, N. A. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. **Nig. Q. J. Hosp. Med.**. 2009.

EDMISON J, McCULLOUGH AJ. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis*. 2007;11:75–104.

FELIPPE, Gil. **Venenosas: plantas que matam também curam**. São Paulo: Editora SENAC; São Paulo, 2009.

FERLAY J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46:765–81

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo *Rev. Assoc. Med. Bras*. vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997

FINKEL, T. et al.; The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448:767, 2007

FIRN, R.; *Nature's Chemicals*. **Oxf. Univ. Press**, Oxford, 2010.

FONSECA SM, Almeida, EPM, Massunaga VM. *Protocolo de Intervenções de Enfermagem Frente às Reações Adversas aos Quimioterápicos Antineoplásicos*. In: Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, et al. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ): Reichmann & Affonso; 2000. p. 28-54.

FUKUMASU, H.; J.L. Avanzo, M.K. Nagamine, J.A. Barbuto, K.V. Rao and M.L.Z. Dagli. *Paullinia cupana Mart Var. Sorbilis, Guaraná, Reduces Cell Proliferation And Increases Apoptosis Of B16/F10 Melanoma Lung Metastases In Mice*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2008) 41: 305-310.

FUKUMURA D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:521–34.

GOMES MA, et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras*. 2013.

GOZUACIK D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, Okanoué T, et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis

B Virus DNA tagging. *Oncogene*. 2001;20:6233–40.

GRAUDENS, Esther; Virginie Boulanger; Cindy Mollard; Régine Mariage-Samson; Xavier Barlet; Guilaine Grémy; Christine Couillault; Malika Lajémi; Dominique Piatier-Tonneau; Patrick Zaborski; Eric Eveno; Charles Auffray and Sandrine Imbeaud. *Deciphering Cellular States of Innate Tumor Drug Responses*. *Genome Biology* 2006

HALLIWELL, B., Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150, 2007.

HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A.; The hallmarks of cancer, **Cell, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.**

HIROTA, B. C. K., Estudo Fitoquímico e das Propriedades Biológicas de *Jatropha multifida* L. (EUPHORBIACEAE). **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

HUBER, M.A. et al.; Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17:548, 2005

HSU I, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 1991;350:427–8.

INCA, 2013; *INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER*. Acessado em 16/02/2013. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=483

JEMAL A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.

JIANG, Pei-Du; Ying-Lan Zhao , Xiao-Qiang Deng, Yong-Qiu Mao, Wei Shi, Qing-Qing Tang, Zheng-Guang Li, Yu-Zhu Zheng, Sheng-Yong Yang, Yu-Quan Wei. *Antitumor and Antimetastatic Activities of Chloroquine Diphosphate In A Murine Model Of Breast Cancer*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64 (2010) 609–614.

JOHNSTON, L.A.; Competitive interactions between cells: Death, growth, and geography. *Science* 324:1679, 2009

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

KAR, A. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology (Revised-Expanded Second Edition)*. **N. A. Inter. Limt. Publ. N. Del.**, 2007

KAND'AR, R., Ẓ akova, P., Muẓ akova, V., Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 365, 249–256, 2006.

KHALAF, N. A. et al. Antioxidant Activity of Some Common Plants, **Turk J Biol**, Turkey, v.32 p.51-55, 2008.

KHLEBNIKOV, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T.,

Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1749–1770, 2007

KNOWLES B.B, HOWE C.C, ADEN D.P.; Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* Jul 25; 209 (4455):497-9, 1980.

KUMAR, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Robbins e Cotran: *Patologia: Bases Patológicas das Doenças – 7ª Edição Ed.ELSEVIER*; 2005

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas; v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KOK, T. M.; Breda, S. G. & Manson, M. M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal of Nutrition* 47: 51-59; 2008

KRIMMEL, B., Swoboda, F., Solar, S., Reznicek, G., OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. *Radiat. Phys. Chem.* 79, 1247–1254, 2010.

LALA PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2001;2:149–56.

LEE SG, RHO HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene.* 2000;19:468–71.63

LIANG, Dong, Qing Zhou, WeiGong, YiWang, Zhikui Nie, Hui He, Jiangtao Li , Jiahui Wu, Chenxi Wu, Jiuliang Zhang. STUDIES ON THE Antioxidant And Hepatoprotective Activities of Polysaccharides From *Talinum triangulare*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011

LIMA, A. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa; v. 16, n. 4, p. 531-536, out./dez. 2006.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). (**Tese Doutorado**), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, R. M. T. de ; Fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn.): Compostos bioativos, atividade antioxidante e aplicação tecnológica; **Tese de Doutorado**; Universidade Federal do Piauí; Teresina, 2012

LIN Juan, YAN Fang, TANG Lin, CHEN Fang. *Antitumor effects of curcumin from*

seeds of *Jatropha curcas*. Acta Pharmacol Sin 2003 Mar; 24 (3): 241-246

LIU, R.H.; Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J. Nutr.** 2004.

LOBO, V., Phatak, A., Chandra, N., Free radicals and functional foods: impact on human health. Pharmacogn. Rev. 4, 118–126, 2010.

LU, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J. Cell Mod. Med. 14, 840–860, 2010.

LUTWICK L. Relation between aflatoxin, hepatitis-B virus, and hepatocellular carcinoma. Lancet. 1979;313:755–7.

MARINHO, R. F., Crescimento e Teores de Nutrientes de Cinco Acessos de Pinhão-Manso (*Jatropha Curcas* L.) Cultivados no Município de Santa Terezinha-PB. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Campina Grande Patos – Paraíba – Brasil 2011

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, abr./jun. 2007

MARTINEZ M.; Radicais Livres 2011. Retirado de <http://www.infoescola.com/bioquimica/radicais-livres/> acesso: 26/10/2013.

MARTINS, P. M.; Influência de parâmetros de secagem e armazenamento sobre princípios ativos de interesse de duas espécies medicinais: guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Tese de doutorado**; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Campos dos Goytacazes; 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MATOS, Djamil Cordeiro. *Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas. Araraquara, 2008.

MCGAW, L.J.; LAGER, A., GRACE, O., FENNELL, C. & van STADEN, J. Medicinal plants. In: *van Niekerk, A (Ed.), Ethics in Agriculture-An African Perspective*. **Spring.**, Dordrecht, The Netherlands. 2005.

MELO, E. de C, RADÜNZ, L. L, MELO, R. C. de A. e; Influência do Processo de Secagem na Qualidade de Plantas Medicinais – Revisão Nota Técnica ; **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.12, n.4, 307-315, Out./Dez., 2004

MINAMI M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene*.

2005;24:4340–8.

Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2010: incidência atual do câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2009.

MOUCO, G., Bernadino, M. J., Cornélio, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento*. Edição nº31, 2003.

MORAIS, S. M.; Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa; v. 19, p. 315-320, 2009.

MORRIS SM, Baek JY, Koszarek A, Kannurn S, Knoblaugh SE, Grady WM. Transforming growth factor-beta signaling promotes hepatocarcinogenesis induced by p53 loss. *Hepatology*. 2012;55:121–31.

MUJUMDAR, A.M., MISAR, A.V., Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 90 (2004) 11–15

MURAKAMI S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*. 2001;36:651–60.46.

NATOLI G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Costanzo A, Artini M, Balsano C, Levrero M. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol*. 1994;14:989–98.

NWOKOCHA, A.; BLESSING, I.O.; AGBAGWA and OKOLI, B.E.; Comparative Phytochemical Screening of *Jatropha L.* Species in the Niger Delta. **Res. J. Phytochem.**, 2011.

Organização Mundial da Saúde. **Câncer**. Nota descritiva N°297. Febrero de 2013.

OSKOU EIAN, Ehsan; ABDULLAH, Norhani; SAAD, Wan Zuhainis; OMAR, Abdul Rahman; AHMAD, Syahida; KUAN, Wen Bin; ZOLKIFLI, Nor Azlina; HENDRA, Rudi; and YIN Wan Ho. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. **Journal of Medicinal Plants Research**. Nsukka, Vol. 5(1), pp. 49–57, 4 January, 2011a

OSKOU EIAN, Ehsan; ABDULLAH, Norhani; SAAD, Wan Zuhainis; AHMAD, Syahida; OMAR, Abdul Rahman; YIN Wan Ho. Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas L.* Kernel Meal Extract **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v.12. 2011b

PATERLINI-BRÉCHOT P, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*. 2003;22:3911–6.43.

PEERS F, Bosch X, Kaldor J, Linsell A, Pluijmen M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int J Cancer*. 1987;39:545–53.

PEREIRA, B. C. & PEREIRA, A. K. F. da T. C. Radicais Livres: Uma Nova Abordagem. *Revista Saúde Quântica / vol.1 – nº 1 / Jan – Dez 2012*

PHILIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochem.** 2007.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. *Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas*. Química Nova, 25, p.45-61. 2002.

PRASAD, A.S., Bao, B., Beck, F.W.J., Kuck, O., Sarkar, F.H., Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1182–1190, 2004.

PROCHAZKOVA, D., Boušova, I., Wilhelmova, N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523, 2011.

PUPO, Mônica Tallarico; GALLO, Margareth Borges Coutinho; *Biologia Química: Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais*. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1446-1455, 2007

RAHMAN, K., Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219–236, 2007.

RATNAM, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, N.M.V.R., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J. Control Release* 113, 189–207, 2006.

RIBEIRO, S. S. Estudo **Fitoquímico e Atividades Biológicas De *Jatropha Curcas* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, Sergipe, 2010.

ROSEN, J.M; JORDAN, C.T.; The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324:1670, 2009

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa, Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 127**, Fortaleza, 2007 a.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embrapa, Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 128**, Fortaleza, 2007 b.

SAHIDIN, SAUBA NAKAZIBWE, MUHAMMAD TAHER, ANIL KUMAR SAXENA, SOLACHUDDIN JAUHARI ARIEF ICHWAN, ARDIYANSYAH. *Antiproliferative Activity of Curcusone B from *Jatropha Curcas* on Human Cancer Cell Lines*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(8): 47-51, 2011

SAKER, S. D.; NAHAR, L.; *Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic or Natural Product Chemistry*, **Wiley**, 2007.

SANTOS, M. J., MACHADO, I. C. e LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, V.28, n.2, p.361-373, abr.-jun. 2005

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) . **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44 – 78, 2005.

SHAFRITZ DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, KewMC. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. *N Engl J Med.* 1981;305:1067–73

SHARMA, S.V. et al: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7:169, 2007

SINGH, P.P., Chandra, A., Mahdi, F., Ray, A., Sharma, P., Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. *Ind. J. Clin. Biochem.* 25, 225–243, 2010.

SILVA W. J. M; FERRARI, C K B; Mitocôndria, Radicais livres e Envelhecimento. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, Rio de Janeiro; 14(3):441-451; 2011

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B.; Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Sem. Cienc. Agr.**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SOHAL D, Sun W, Haller D.; Pancreatic, gastric, and other gastrointestinal cancers. *ACP Medicine.* p.1-29; 2011

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 14, n. 3. Campinas-SP, p. 202-210, 2011.

SOUZA TJT, APEL MA, BORDIGNON S, MATZENBACHER NI, ZUANAZZI JAS, HENRIQUES AT Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa; v.17 p.368-372; 2007

SOUZA M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. Rio de Janeiro – RJ, 2004. *Químico Nova*; volume 27; número 2; 308-312.

SPORN, M. B. Perspective: The big C - for Chemoprevention. *Nature* 471: S10-11; 2011

SRIVASTAVA, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M.; Khanuja, S. P. S.; Plant-based anticancer molecules: *A Chemical and Biological Profile of Some Important Leads*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13. 2005

STAIB F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003;21:201–16.

STAIB F, Robles AI, Varticovski L, Wang XW, Zeeberg BR, Sirotnin M, et al. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. *Cancer Res.* 2005;65:10255–64

SZIC K. S. vel, Palagani A., Hassannia B., Sabbe L., Heyninck K., Haegeman G.

and Berghe W. V. Chapter 7 - **Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: Epigenetic Friends or Foe?** In *Phytochemicals - Bioactivities and Impact on Health. Agricultural and Biological Sciences* edited by [Iraj Rasooli](#), ISBN 978-953-307-424-5, 388 pages, 2011

TABASSUM, A., Bristow, R.G., Venkateswaran, V., Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? *Cancer Treat. Rev.* 36, 230–234, 2010.

TARN C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis Bvirus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:34671–80.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS,L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, vol.19, p. 669-675, 2006.

TURUNEN, M., Olsson, J., Dallner, G., Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 171–199, 2004.

VALE, V. V. & ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Scientia Plena**. Aracaju, Vol. 7, Num. 4, Abril, 2011

VAN DEN BERG, R; HAENEN, G. R. M. M; VAN DEN BERG, H; BAST, A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, Philadelphia; v.66, p. 511, 1999.

VENDITTI P., Stefano L. Di, Meo S. Di, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13 71–82; 2013

VEIGA, A. A. S. da. Isolamento e quantificação de flavonoides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2008.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. de S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n.3, p. 384-387, Jul./Set. 2007.

VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P; p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275, 2007

YANG, H. & DOU, Q. P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Curr Drug Targets* 11: 33-744, 2010

WANG J, Chenivesse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis Bvirus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature.* 1990; 343:555–7.

ANEXOS

Reagentes

Para este estudo utilizou-se os reagentes seguintes:

Metanol PA. (MERCK); Etanol PA (MERCK); Etanol 95% (F. MAIA); Reagente de FOLIN-CIOCALTEU; Ácido Bórico (SIGMA); HEPES (VETEC); RPMI 1640 (GIBCO™); Bicarbonato de Sódio (SIGMA); Azul de Metileno (MERCK); Carbonato de Sódio (SIGMA); Ácido Gálico (SIGMA); Persulfato de Potássio (SIGMA); Fosfato de Potássio monobásico (SIGMA); Fosfato de Sódio dibásico c/7.H₂O (SIGMA); Cloreto de Sódio (SIGMA); TROLOX (SIGMA); 2,2- azinobis(3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfônico) – ABTS (SIGMA); 2,2- difenil-1-picril hidrazil – DPPH (SIGMA), Anidrido Acético ((CH₃CO)₂O) (PANREAC); Cloreto férrico (FeCl₃) (VETEC);

Soluções

Solução de Azul de Metileno 0,1%

Foram pesados 1g de azul de metileno e diluídos em 100 mL da solução tampão borato, com auxílio de magneto e agitador magnético IKA C-MAG H54. Após diluição a solução foi armazenada em garrafa plástica sob refrigeração aproximada de 10°C, até a sua utilização.

Solução Tampão Borato 0,01M

0,6183g de ácido bórico foram pesados e diluídos em 1 L de água destilada, após diluição o pH foi aferido para pH 8,7 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. A solução foi armazenada em frasco de vidro sob refrigeração de aproximadamente 10°C.

Solução salina tamponada (PBS)

Foram pesados 0,566g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 2,850g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) c/7.H₂O e 8,4g de cloreto de sódio (NaCl) e

diluídos em 1 L de água destilada com auxílio de magneto e agitador magnético IKA C-MAG H54. Após diluição, o pH da solução foi ajustado para pH 7,2 com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M, armazenada em frasco de vidro mantida sob refrigeração.

Solução Ácido Clorídrico (HCl) 0,1M

Foram transferidos 33,3 mL de ácido clorídrico concentrado e diluídos em 66,7 mL de água destilada, armazenados em garrafa plástica, mantidos sob refrigeração até o uso.

Solução Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,1M

Foram pesados 5 g de hidróxido de sódio e diluídos em 100 mL de água destilada, armazenados em garrafa plástica, mantidos sob refrigeração até o uso.

Meio de cultura RPMI 1640

A solução estoque de RPMI 1640 (GIBCO™) foi diluída em 1L de água destilada, suplementada com 2,2 g de bicarbonato de sódio e 4,76g de HEPES, o pH da solução foi ajustado para pH 7,4. Após diluição o meio foi filtrado a vácuo em membrana esterilizante de 0,22 µm.

Solução de Carbonato de Sódio 15%

Foram pesados 15 g de carbonato de sódio e diluídos em 100 mL de água destilada, armazenados em frasco de vidro em temperatura ambiente.

Cloreto férrico (N) (FeCl₃)

Foram dissolvidos 9g de cloreto férrico em 50 mL de água e 2 mL de ácido clorídrico 3N que depois foram diluídos em álcool etílico para obter 100 mL.



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>