



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS**

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS  
ATIVOS DE EXTRATOS ANTIMICROBIANOS DE *Jatropha curcas* L.**

Salvador  
2014

**EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS**

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS  
ATIVOS DE EXTRATOS ANTIMICROBIANOS DE *Jatropha curcas* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Coorientador:

Prof. Dr. Martins Dias de Cerqueira

Salvador  
2014

B327 Bastos, Eduardo Muniz Santana

Isolamento, purificação e caracterização de compostos ativos de extratos antimicrobianos de *Jatropha curcas* L./ Eduardo Muniz Santana Bastos. – Salvador, 2014.

96 f.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Martins Dias de Cerqueira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Antibacterianos. 2. Bactérias. 3. *Jatropha curcas* L. I. Cunha, Vitor Hugo Moreau. II. Cerqueira, Martins Dias. III Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 615.33

## EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS

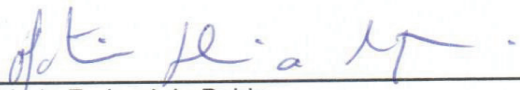
### Isolamento, Purificação e Caracterização de Compostos Ativos de Extratos Antimicrobianos de *Jatropha curcas* L.

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 14 de janeiro de 2014.

#### BANCA EXAMINADORA:

Vitor Hugo Moreau da Cunha – Orientador   
Doutor em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
UFRJ, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Martins Dias de Cerqueira   
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Anibal de Freitas Santos Junior   
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade do Estado da Bahia.



## AGRADECIMENTO

A Deus que me deu a vida e força para superar todas as barreiras que eventualmente apareceram no meu árduo caminho para finalizar este grandioso projeto de vida;

A minha querida Prof<sup>a</sup>. Dra. Astria Dias Ferrão Gonzales e Prof. Dr. Vitor Hugo pelo apoio, dedicação e orientação durante toda a minha vida na pesquisa laboratorial, até a elaboração desta dissertação;

A equipe do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI), pela organização e parceria dos técnicos do Gerlab, em especial Regina, alunos e professores;

Aos meus amigos, em especial Luiz Gonçalves pelas palavras de conforto, Caio Lopes, Charles Cardoso e Vera Trindade na orientação ortográfica estrutural;

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia, por compartilharmos momentos de descobertas, tristezas, sonhos e a conquista de mais uma etapa de nossas vidas;

Aos meus primos, em especial Rafael pelo carinho;

As minhas, Tias, Eliene, Maria da Glória, e em especial Helenita pela palavra de conforto, carinho como o de mãe, fé em Deus e por acreditar sempre em mim;

A minha bisavó Euvira, pelo carinho e muito amor;

Minha querida avó Lezenita, pelo amor, carinho, respeito e incentivo aos meus estudos;

Ao meu Pai Elias Mamede Bastos por tanto carinho e amor (em memória);

A minha mãe, Marizene Muniz, meu grande amor e inspiração, símbolo de respeito, união, perseverança, cuidado, luta e muita fé em Deus;

Aos meus irmãos, Gabriela e Herbert, fontes de amor, carinho, honestidade e superação; e ao meu sobrinho e afilhado Guilherme, que desde o seu nascimento só nos traz luz, paz e muitas alegrias.

*As dificuldades são o aço estrutural que entra na construção do caráter*  
(Carlos Dummond de Andrade)

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Etnobotânica .....	18
2.2 Etnofarmacologia.....	20
2.3 Uso de fitoterápicos.....	21
2.4 Bactérias .....	23
2.4.1 Bactérias patogênicas .....	27
2.5 Antibióticos .....	28
2.5.1. Resistência bacteriana aos antibióticos.....	29
2.5.2 Descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos .....	31
2.6 Pinhão-manso .....	32
2.6.1 Família <i>Euphorbiaceae</i> .....	32
2.6.2 <i>Jatropha sp.</i> .....	34
2.6.3 <i>Jatropha curcas</i> L. (Pinhão-manso).....	35
2.6.3.1 Origem e distribuição do Pinhão-manso.....	36
2.6.3.2 Características botânicas do Pinhão-manso .....	37
2.6.3.3 Principais vantagens do cultivo do pinhão-manso.....	39
2.6.3.4 Pinhão-manso na geração de energia.....	39
2.6.3.5. Segurança alimentar <i>versus</i> o pinhão-manso .....	41
2.6.3.6 Biodiesel a partir da <i>Jatropha curcas</i> L. ....	42
2.6.3.6.1 Programa Nacional e Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)....	44
2.6.3.7 Toxicidade da <i>Jatropha curcas</i> L.....	45
2.6.8 Atividade farmacológica da <i>Jatropha curcas</i> L. ....	46
3 OBJETIVOS .....	49
3.1 Objetivo Geral .....	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Materiais.....	50
4.1.1 Equipamentos utilizados.....	50
4.1.2 Solventes e produtos químicos utilizados.....	51
4.2. Métodos.....	52
4.2.2. Material vegetal .....	53

4.2.3. Folhas de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	53
4.2.4. Preparação dos extratos de folhas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	55
4.2.4.1. Técnica de partição por solventes .....	55
4.2.4.2. Obtenção do extrato hexânico bruto.....	57
4.2.4.3. Obtenção do extrato clorofórmio bruto .....	57
4.2.4.4. Obtenção do extrato acetato de etila bruto.....	57
4.2.4.5. Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto .....	58
4.2.5. Atividade biológica .....	58
4.2.5.1. Material Microbiológico.....	58
4.2.5.1.1. Padronização da densidade do inóculo bacteriano .....	58
4.2.5.1.2. Preparo dos inóculos bacterianos .....	59
4.2.6. Método da difusão em Ágar (Técnica do disco) .....	59
4.2.6.1. Preparo dos discos.....	59
4.2.6.2. Avaliação da atividade do extrato de folhas de <i>Jatropha curcas</i> 61	
4.2.6.3. Análise do perfil cromatográfico dos processos extrativos .....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
5.1. Identificação botânica do material vegetal.....	64
5.2. Rendimento obtido no processo de extração .....	64
5.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	64
5.4. Análise da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	71
5.5. Monitoramento do perfil cromatográfico através da CLAE .....	73
5.6. Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto seco de <i>J. curcas</i> L. a partir da CLAE.....	74
5.7. Atividade antibacteriana de frações do extrato hidroalcoólico bruto de <i>J.</i> <i>curcas</i> L. contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	76
5.8. Análise comparativa da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoóli- co bruto seco, frações do extrato por CLAE e da Vancomicina .....	77
6. CONCLUSÃO.....	79
7.REFERÊNCIAS .....	80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de <i>J. curcas</i> L. pelo método da difusão em Agar pela técnica do disco.	68
TABELA 2	Atividade antimicrobiana do extrato hexânico <i>J. curcas</i> L. pelo método da difusão em Agar pela técnica do disco.	68
TABELA 3	Bandas de absorção eletrônica de cromóforos	73
TABELA 4	Quantificação da atividade antibacteriana do extrato de <i>Jatropha curcas</i> L. e das frações 1 e 2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bactéria visualizada da parte externa para parte interna, circundadas por camadas.....	24
Figura 2. Diferença entre bactérias quanto à forma e tamanho. ....	25
Figura 3. Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	26
Figura 4. Curva de crescimento e morte de células bacterianas.....	29
Figura 5. Espécie <i>Jatropha curcas</i> .....	35
Figura 6. Região de origem e cultivo de <i>Jatropha curcas</i> L.....	37
Figura 7. Desenho botânico da espécie <i>Jatropha curcas</i> L. e suas respectivas descrições .....	38
Figura 8 . Fotossíntese para a conversão do dióxido de carbono em biomassa .....	40
Figura 9. Matérias-primas utilizadas à produção de biodiesel no Brasil .....	43
Figura 10. Pilares do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB).....	45
Figura 11. Procedimento para a obtenção dos extratos e frações, a partir de folhas de <i>Jatropha curcas</i> L.....	52
Figura 12. Mapa do estado da Bahia destacando a localização do município de Mutuípe .....	53
Figura 13. Exsicata da espécie <i>Jatropha curcas</i> L. nº 118 (Herbário FTC / Salvador-Ba) .....	54
Figura 14. Esquema que retrata a obtenção dos extratos de <i>J. curcas</i> L. a partir da partição em solventes .....	56
Figura 15. Partição por solventes utilizando um funil de separação.....	56
Figura 16. Soluções contendo extratos, hexano, clorofórmio e acetato de etila com acréscimo de metanol como solvente.....	57
Figura 17. Fórmula matemática para determinar o halo de inibição bacteriana através da técnica do disco em meio sólido.....	62
Figura 18. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de <i>Jatropha curcas</i> retratada pela formação de halo ao redor dos discos nas concentrações 1) 11µg; 2) 8,3µg; 3) 5,5µg; 4) 2,8µg; controle positivo (vancomicina 30µg) e não formação de halo (X) controle negativo.....	67
Figura 19. Halo de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> pelo extrato hidroalcoólico bruto seco comparado à vancomicina, antibiótico de referência .....	69

Figura 20. Halo de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus saprophyticus</i> pelo extrato Hidroalcoólico bruto seco comparado à vancomicina, antibiótico de referência .....	69
Figura 21. Halo de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> pelo extrato hidroalcoólico bruto seco em comparação ao antibiótico de referência. ....	70
Figura 22. Halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> pelo extrato hexânico bruto seco comparado à vancomicina, antibiótico de referência.....	70
Figura 23. Halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus saprophyticus</i> pelo extrato hexânico bruto seco comparado à vancomicina, antibiótico de referência as .....	70
Figura 24. Halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> pelo extrato hexânico bruto seco comparado à vancomicina, antibiótico de referência as .....	70
Figura 25. Análise dos extratos com atividade antibacteriana.....	71
Figura 26. Avaliação dose resposta do extrato hidroalcoólico bruto de <i>Jatropha curcas</i> L. contra bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> . ....	72
Figura 27. Espectro de absorção UV/Vis do extrato hidroalcoólica bruto seco de <i>J. curcas</i> L. ....	72
Figura 28. Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico bruto seco de <i>J. curcas</i> por CLAE.....	74
Figura 29. Fracionamento biodirecionado a partir do extrato hidroalcoólico de <i>Jatropha curcas</i> utilizando a CLAE, com eluição isocrática metanol 100%.....	75
Figura 30 Fracionamento biodirecionado a partir do grupo de picos (FI) do extrato hidroalcoólico de <i>Jatropha curcas</i> gerada pela CLAE, com eluição isocrática metanol/água 90:10 respectivamente .....	75
Figura 31. Atividade antibacteriana da <i>Jatropha curcas</i> . Frações obtidas por CLAE. (A) frações 1 a 5, (B) frações 6 a 9 e (X) controle negativo (metanol) pela técnica do disco em meio sólido .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Absorbância

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustíveis

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AMH – Ágar Miller Hinton

ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Controle X – Controle negativo

G – gramas

Gimp - *Image Manipulation program*

H – Halo de inibição bacteriana

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

LBI- Laboratório de Biotecnologia Industrial

mL - Mililitros

MeOH - Metanol

MS – Ministério da Saúde

MTC – Ministério da Ciência e Tecnologia

nm - Nanômetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.A. – Para Análise

pH – Potencial de Hidrogênio

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

PPAR - Peroxisome Proliferator-Activated Receptors

RBLAS - Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde

RBTB – Rede Brasil de Tecnologias de Biodiesel

RDC – Resoluções da Diretoria Colegiada

Rpm – Rotações por minuto

SUS - Sistema Único de Saúde

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro



UNEB – Universidade do Estado da Bahia

Van 30 – Vancomicina 30 $\mu$ g

Vis – Visível

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UV – Ultra-violeta

WHO - World Health Organization

$\mu$ L – Microlitro

$^{\circ}$ C - Grau centígrados

\* - Média

$\pm$  - Desvio padrão

$\emptyset_1$  – Soma dos diâmetros em triplicata da circunferência total

$\emptyset_2$  – Soma dos diâmetros em triplicata da circunferência do disco

$\lambda$  – Comprimento de ondas

>- Maior que

< - Menor que

Bastos, Eduardo Muniz Santana. Isolamento, purificação e caracterização de compostos ativos de extratos antimicrobianos de *Jatropha curcas* L. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

## RESUMO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma planta oleaginosa, arbustiva, da família das Euforbiáceas, utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades. Dados da literatura mostram atividades farmacológicas relevantes associadas a diferentes partes da planta, tais como: cicatrizante; hipoglicemiante; hemostático; larvicida, anticancerígeno e antimicrobiano. Por outro lado, a *Jatropha curcas* L., tem sido apontada como uma importante alternativa para a produção de biodiesel pelo seu alto teor de óleo, sua possibilidade de cultivo em ambientes desfavoráveis e por não competir com a indústria de alimentos. Considerando a possibilidade do incentivo ao seu plantio em consonância com a Política Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), torna-se evidente que o aproveitamento da biomassa residual gerada na extração do óleo, além de tornar sustentável a cadeia produtiva do biodiesel, pode possibilitar a elaboração de produtos medicinais úteis para a sociedade. Neste trabalho, objetiva avaliar a atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Jatropha curcas* L., e de suas frações, contra bactérias Gram-positivas. O fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto foi realizado pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e testado em ensaio qualitativo, teste do disco, que demonstrou atividade antibacteriana contra o gênero *Staphylococcus*. Dessa forma, os dados obtidos são importantes, pois direcionam a identificação da substância bioativa antibacteriana presente no extrato de folhas de *Jatropha curcas* L. que contribuem para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos além de agregar valor ao vegetal.

**Palavras chave:** antibacterianos, bactérias, *Jatropha curcas* L.

Bastos, Eduardo Santana Muniz. Isolation, purification and characterization of antimicrobial active compounds extracts of *Jatropha curcas* L. 96 f. Thesis (Master) - Federal University of Bahia. Institute of Health Sciences, 2014.

## **ABSTRACT**

The pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), is an oilseed plant, shrub, the family of Euphorbiaceae, used in folk medicine to treat various diseases. Literature data show relevant pharmacological activities associated with different parts of the plant, such as healing; hypoglycemic; hemostatic; larvicide, anticancer and antimicrobial. Moreover, *Jatropha curcas* L., has been identified as an important alter-native for biodiesel production for its high oil content, a possibility of growing in harsh environments and not compete with the food industry. Considering the possibility of encouraging its cultivation in line with the National Policy on Production and Use of Biodiesel (NPPB), it becomes clear that the use of residual biomass generated in the extraction of oil, in addition to making a sustainable biodiesel production chain, may enable the development of useful medicinal products for society. This work aimed to evaluate the antibacterial activity of extracts of leaves of *Jatropha curcas* L., and its fractions against Gram - positive bacteria. Fractionation of the crude hydroalcoholic extract was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and tested in qualitative assay, test disc, which showed antibacterial activity against *Staphylococcus*. Thus, the obtained data are important because they guide the identification of bioactive antibacterial substance present in the leaf extract of *Jatropha curcas* L. contributing to the development of new pharmaceutical products as well as adding value to the plant.

**Keywords:** antibacterial; bacteria; and *Jatropha curcas* L.

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados ao longo da história da humanidade (LACERDA, 2008). Seu uso surgiu a partir da própria necessidade humana, e vem sendo praticado e transmitido de gerações em gerações (LORENZI & MATOS, 2002). As plantas não apenas proporcionam alimentos saborosos, mas também toda a classe de remédios para a recuperação ou conservação da saúde (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta fundamental influência da cultura indígena, africana e, naturalmente, européia (DEAN, 1996). No entanto, milhares de plantas medicinais ainda não foram estudadas cientificamente dos pontos de vista farmacológico, biológico ou clínico (YUNES; CALIXTO, 2001). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com êxito baseadas, principalmente nas propriedades antimicrobiana e antiinflamatórias de plantas conhecidas na terapêutica popular (ZACCHINO; CALIXTO; YUNES, 2003).

Nas últimas décadas, o uso não racional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas de micro-organismos multirresistentes a drogas, impulsionando comunidade científica a pesquisar vegetais utilizados na medicina popular, para o tratamento de infecções que contribuem para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (FENNER *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003). Entre as numerosas espécies que fazem parte do arsenal de plantas com propriedades terapêuticas, encontra-se o Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Espécie da família das Euforbiáceas, encontrada no mundo em toda região tropical como arbustos e como cercas vivas, sendo que sua utilização principal relatada tem sido a partir das sementes, pois estas contêm grande quantidade de óleo armazenado (SEVERINO *et al.*, 2006).

A *Jatropha curcas* L. é uma oleaginosa que está sendo cogitada como potencial fonte de óleo para a produção de biodiesel, contribuindo no aspecto industrial, econômico, ambiental e social, no mundo atual (BERCHMANS; HIRATA, 2008). Além disso, o pinhão-manso é muito empregado pela cultura popular no

tratamento de doenças de pele e possui algumas de suas atividades farmacológicas comprovadas em estudos laboratoriais (SANTOS; SANT'ANA, 1999). Nas análises clínicas são, relatadas a importância do látex de pinhão-manso na terapêutica como hemostático (OSONIYI & ONAJOBI, 2003); o extrato bruto alcoólico de frutos é relatado como cicatrizante (SHETTY *et al.*, 2006); e como hipoglicemiante (RAU *et al.*, 2006); a curcuma, proteína tóxica presente principalmente nas sementes, tem sido relatada como agente antitumoral (MUANGMAN *et al.*, 2005).

Uma vez que os estudos sobre o pinhão-manso são escassos devido a sua exploração ser recente, o presente trabalho objetiva avaliar a atividade antibacteriana de extrato metanólico de folhas e suas frações de *Jatropha curcas* L. (BERCHMANS; HIRATA, 2008). Assim, o uso de vegetais como o pinhão-manso, poderá servir como base para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos e mais seletivos, que contribuam para a redução de efeitos colaterais e indesejáveis ao hospedeiro, além de diminuir a seleção de cepas resistentes provenientes do uso não racional de antibióticos.

Nesta perspectiva, a descoberta de novos compostos bioativos de ação antibacteriana, a partir de fontes naturais, incluindo plantas que são pouco estudadas, deverá estimular o desenvolvimento de tecnologias (patentes) pertinentes á exploração, ambientalmente sustentável para uso bioenergético e farmacológico, na descoberta de compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Etnobotânica

Em toda a história do conhecimento científico a relação entre recursos à base de plantas e populações humanas foi sempre relatada. No entanto, a pouco mais de um século, o termo etnobotânica referia-se, inicialmente, a povos primitivos como os aborígenes (LACERDA, 2008). Durante muito tempo, a etnobotânica levou apenas em consideração os aspectos específicos do uso de plantas por indígenas, passando posteriormente a dedicar-se à pesquisa entre outros grupos humanos (ALMEIDA, 1993). Atualmente, a etnobotânica é conceituada como sendo especialidade científica que se ocupa da interrelação entre plantas e populações humanas. A etnobotânica vem ganhando importância pelas suas implicações ideológicas, biológicas, ecológicas e filosóficas (AMOROZO, 1996).

O estudo etnobotânico, no mundo contemporâneo, tornou-se um dos caminhos alternativos que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). Neste contexto, a pesquisa e desenvolvimento do uso dos vegetais, no que diz respeito à etnobotânica, baseiam-se na dualidade do conhecimento entre dois diferentes eixos disciplinares, os seres humanos e as plantas (GUARIN NETO; SANTANA; BEZERRA, 2000). Segundo Amorozo (1996), a etnobotânica busca captar as diferentes dimensões da relação de grupos humanos com as plantas, incluindo aspectos objetivos como o manejo do ambiente, a utilização e domesticação de plantas e os aspectos mais subjetivos, como a forma como as pessoas pensam e percebem o ambiente.

Desta forma, muitas comunidades possuem sistemas próprios de manejo, resultado da experiência acumulada, historicamente, da sua relação com os recursos naturais, o que viabiliza a subsistência com um prejuízo ambiental mínimo (ALBUQUERQUE, 1997; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002) Neste aspecto, a etnobotânica é organizada através de dois fatores importantes: a coleta e a utilização medicinal das plantas. No primeiro fator, estão implicados o

estudo da região, estágio de desenvolvimento do vegetal, época do ano e procedimentos especiais como a preparação de exsiccatas (GUARIM NETO *et al.*, 2000). No segundo fator são analisados outros parâmetros de investigações para a seleção de espécies vegetais como abordagem randômica, abordagem quimiotaxonômica ou filogenética e até mesmo a abordagem etnofarmacológica (ALEXIADES, 1996).

Entre os principais métodos citados na literatura, Prance (1991) ressalta a importância de se realizar estudos etnobotânicos não só entre povos indígenas, remanescentes de quilombos, como também de populações rurais tradicionais. Estes grupos populacionais, muitas vezes, guardam heranças de conhecimentos e procedimentos relativos ao uso de plantas oriundas de gerações de povos há muito tempo extintos (AMOROZO, 1996). Segundo Simões e colaboradores (1998), muitas tribos indígenas e culturas na África têm as plantas como base de conhecimento para fins terapêuticos, que é transferido na unidade familiar de forma empírica e posteriormente dentro das comunidades (FRATKIN, 1996).

No Brasil, a utilização popular de plantas medicinais com fins terapêuticos e em rituais religiosos provem de diferentes origens e culturas tradicionais, decorrentes da colonização pelo europeu, da imigração de populações africanas e do conhecimento tradicional indígena (GOMES; DANTAS; CATÃO, 2008). O conhecimento empírico quanto ao uso de vegetais pode servir para propiciar novos usos de plantas conhecidas e, até então não utilizadas, além de novas fontes de fórmulas conhecidas e necessárias para o tratamento de enfermidades que acometem a humanidade, animais e até mesmo vegetais (KUNWAR *et al.*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) afirma que cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional em cuidados primários de saúde (WHO, 2002). O conhecimento empírico dessas populações propiciou ao longo dos anos a preservação da cultura e descoberta de novas drogas a partir de vegetais (GOMES; DANTAS; CATÃO, 2008). O interessante é que o uso de plantas na medicina popular em países relativamente pobres torna-se uma prática mais acessível e, em determinadas situações, é a única forma de tratamento disponível (REVENE; BUSSMANN; SHARON, 2008). Nas regiões mais pobres do país e

periferias de grandes cidades brasileiras, as plantas são vendidas em mercados de rua e feiras livres e encontradas nos quintais de residências (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

## 2.2 Etnofarmacologia

O uso de plantas para tratar e curar doenças é tão antigo quanto à espécie humana (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). Para tanto, as plantas medicinais possuem compostos químicos bioativos produzidos durante o metabolismo da planta que lhe conferem a ação terapêutica (WAGNER; WISENAUER, 2006). Uma das maneiras de triagem de vegetais com propriedades terapêuticas mais comuns é estudo da medicina tradicional e/ou popular em diferentes culturas, conhecida como etnofarmacologia (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Estratégias de busca de medicamentos com base na etnofarmacologia têm sido aplicadas no tratamento e cura de diferentes doenças, tais como o câncer (WAGNER; WISENAUER, 2006).

A Etnofarmacologia foi definida durante muito tempo como a exploração interdisciplinar, científica de agentes biológicos ativos tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (HOLMSTEDT, 1983). Segundo Etkin e Elisabetsky (2005), a definição sobre a etnofarmacologia, compreende a junção de duas palavras: etno-(cultura, ou de pessoas) fármaco (droga) importantes para a etnografia médica e da biologia de ação terapêutica (AMOROZO, 1996). Sendo assim, com base nas definições anteriores, etnofarmacologia pode ser visto como o estudo dos produtos naturais tradicionais de acordo com as partes do vegetal usadas biologicamente de ações terapêuticas definidas em diferentes culturas ou grupos étnicos (HOLMSTEDT, 1983).

Para as investigações etnofarmacológicas experimentais ou clínicas, o ponto de partida proeminente é entender quem usa a medicina popular e como os estudiosos podem obter informações valiosas a respeito do uso para a seleção de plantas medicinais na pesquisa mais aprofundada (ELISABETSKY, 2002). A estratégia principal da etnofarmacologia na investigação de plantas medicinais



abrange a combinação de informações adquiridas junto a usuários de plantas medicinais, com estudos químicos e farmacológicos (VLIETINCK, VAN DEN BERGHE, 1991).

Segundo Elisabetsky e Setzer (1985), o método etnofarmacológico permite a formulação de teorias quanto às atividades farmacológicas e às substâncias bioativas responsáveis pelas ações terapêuticas. Para tanto, a seleção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento pode ser um valioso atalho para a descoberta de fármacos. No entanto, as análises de toxicidade das plantas medicinais ou remédios caseiros são de suma importância para validar o efeito terapêutico desejado, consagrado pelo uso contínuo nas sociedades tradicionais (ELISABETSKY, 2002).

### 2.3 Uso de fitoterápicos

Fitoterápicos, de acordo com, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetal, com qualidade constante e reprodutível e que ambos, os riscos quanto à eficácia sejam caracterizadas por estudos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos (NICOLETTI *et al.*, 2007). Segundo Sacramento, (2000), a população brasileira revitaliza a fitoterapia, uma vez que a consciência popular reconhece a eficácia e a validação deste tipo de terapêutica.

Muitos foram os avanços nas últimas décadas com a formulação e implementação de políticas públicas, programas e legislação, com vistas à valorização das plantas medicinais e derivados, nos cuidados com a saúde e sua inserção na rede pública (RODRIGUES; SANOTOS; AMARAL, 2006). O uso de fitoterápicos ou diferentes formas farmacêuticas, a partir de plantas sem a utilização de substâncias ativas isoladas, para o tratamento de enfermidades, vem crescendo nas últimas décadas (BRASIL, 2006). De acordo com Laplantine e Rabeyron (1989), os fitoterápicos estão intrinsecamente ligados à medicina popular de forma não sistematizada e, normalmente, sem comprovação científica,

com imensa variedade de métodos terapêuticos tradicionais, fundamentados em conhecimentos e habilidades transmitidos, essencialmente, de forma oral e gestual pelas famílias.

A World Health Organization (WHO), considera os fitoterápicos como importantes instrumentos da assistência farmacêutica, expressada pelo respeito da necessidade de valorizar no âmbito sanitário a utilização de plantas medicinais e seus derivados, pois 70% a 90% da população de nações em desenvolvimento dependem delas no que diz respeito à atenção primária à saúde (WHO, 1993; 2011). De acordo com Brasil (2006), a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, aprovada através do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, considera a utilização das plantas medicinais como uma estratégia para o fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, uso sustentável da biodiversidade brasileira, avanço tecnológico e melhoria da atenção à saúde da população brasileira.

Atualmente no Brasil, os principais instrumentos norteadores (RDC 48/2006) para o desenvolvimento das ações/programas com plantas medicinais e fitoterapia são: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Mediciniais e Fitoterapia no SUS”, e a “Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico”, com abrangência da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicas (BRASIL, 2008). Essas políticas foram formuladas em consonância com as recomendações da OMS, os princípios e diretrizes do SUS, o potencial e oportunidades que o Brasil oferece para o desenvolvimento do setor, a demanda da população brasileira pela oferta dos produtos e serviços na rede pública e pela necessidade de normatização das experiências existentes no SUS (RODRIGUES; SANTOS; AMARAL, 2006).

No que diz respeito à legislação do setor, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseada nas diretrizes das políticas nacionais, para a revisão das legislações para o setor, elaborando novas normas, como a RDC nº 10/2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais, assim como por meio da Farmacopeia Brasileira, a revisão das monografias de plantas medicinais no intuito de apresentar avanços no setor de regulamentação brasileiro, sendo

importantes para vários segmentos desde as Farmácias comunitárias até o industrial (BRASIL, 2010). Para tanto, a abordagem ao estudo de plantas medicinais a partir de seu emprego por sociedades tradicionais, de tradição oral, pode contribuir com muitas informações significativas para a elaboração de estudos etnofarmacológicos, farmacológicos, fotoquímicos e agrônômicos sobre essas plantas, com grande economia de tempo como também no tocante à área financeira (AMOROZO, 1996).

## 2.4 Bactérias

As bactérias são micro-organismos unicelulares pertencentes ao grupo dos procariotos, cuja sua característica principal é a carência de núcleo ou qualquer outra organela interna, envolvida por membrana (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Não realizam endocitose, absorção de macromoléculas ou pedaços de células através da membrana celular, e são incapazes de ingerir partículas ou gotículas de líquido (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A ausência de membrana nuclear permite o procarioto sintetizar simultaneamente proteínas e RNA mensageiro (SCHAECHTER, 2002).

As bactérias visualizadas da parte externa para parte interna (figura 1) são circundadas por um conjunto de camadas cuja composição difere de uma espécie para outra (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Entretanto, as bactérias possuem a membrana citoplasmática como todas as células. A membrana citoplasmática é uma estrutura responsável por uma barreira de separação entre o meio interno (citoplasma) e externo celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Tem como funções principais o transporte de soluto, biossíntese de componentes, duplicação de sequência de DNA, secreção de enzimas a produção de energia pelo transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (TRABULSI, *et al.*, 1999; SCHAECHTER, 2002).

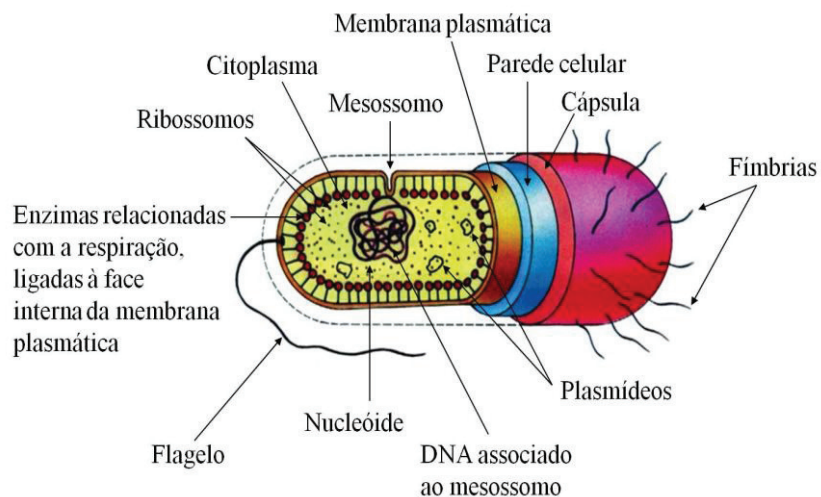


Figura 1. Bactéria visualizada da parte externa para parte interna, circundadas por camadas.

Fonte: Fonte: ROBERTIS; HIB, 2001.

O pequeno tamanho das bactérias permite taxas metabólicas elevadas, devido à razão da superfície e o volume aumentado com a diminuição do tamanho da célula (SUARÉZ; GUDIOL, 2009). No entanto, a velocidade das reações bioquímicas é limitada pela difusão, quanto menor a célula menor a limitação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Conseqüentemente, as bactérias estão em contato íntimo com os nutrientes externos e são capazes de taxas metabólicas mais elevadas do que as células eucarióticas (MURRAY *et al.*, 2000).

A velocidade com que as bactérias convertem nutrientes em energia e promovem a biossíntese de unidades básicas que requerem a coordenação das atividades metabólicas (ZHANG *et al.*, 2013). Sendo assim, a estrutura celular e a síntese de macromoléculas promovem a sua sobrevivência (TRABULSI *et al.*, 1999). Dessa forma, (Figura 2) as bactérias apresentam grande diversidade em relação ao tamanho e forma, podendo variar desde esferas, medindo aproximadamente 0,2 µm de diâmetro a espirais medindo cerca de 10 µm de comprimento (WATER; BARRA, 2001).

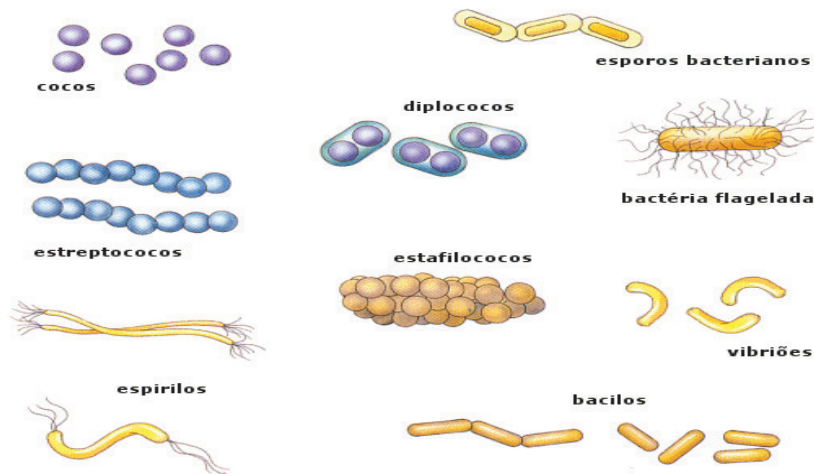


Figura 2- Diferença entre bactérias quanto à forma e tamanho.  
 Fonte: ROBERTIS; HIB, 2001.

A manutenção da forma bacteriana (cocos, bacilos, entre outros), deve-se a presença de parede celular bacteriana (SUARÉZ & GUDIOL, 2009). A parede desempenha papel importante na divisão celular, pois da origem ao septo que separa os dois novos corpos celulares (COOPER, 1991). As bactérias, em maioria, têm na sua parede celular uma rígida camada composta por substâncias (heteropolissacarídeo ligados a peptídeos) encontradas, exclusivamente, em procariotos que recebe o nome de peptídeoglicano (TRABULSI *et al.*, 1999).

Segundo Schaechter (2002), a parede de bactérias Gram-positivas é importante para facilitar a ligação e regulação da entrada e saída de íons na célula; serve de sítio de ligação com o epitélio do hospedeiro, devido a presença de antígenos celulares que possibilita identificação sorológica de espécies bacterianas e regula as atividades das autolisinas durante o processo de divisão celular.

De acordo com a técnica de Gram ou coloração de Gram, desenvolvida pelo médico dinamarquês *Hans Christian Joachim Gram* (1853-1938), no que se refere à constituição química da parede, as bactérias são divididas em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que se diferenciam pela estrutura (propriedades de permeabilidade) e composição (componentes de superfície), nomeadamente no diferente teor lipídico, da parede celular bacteriana (Figura 3) (MIMS *et al.*, 1999).

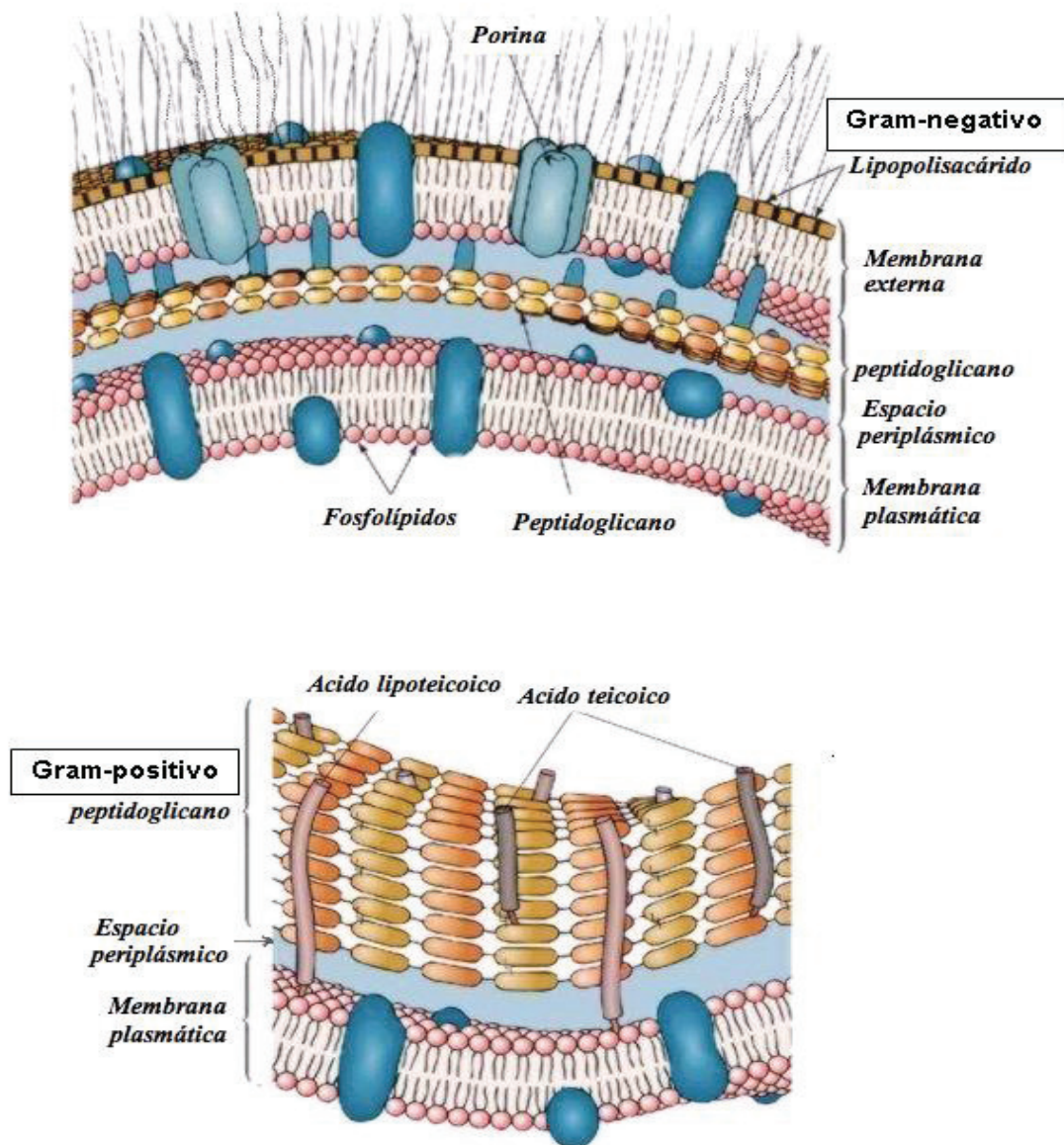


Figura 3. Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.  
 Fonte: Adaptada de KLEIN; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 1996.

A parede celular das bactérias Gram-negativas tem um teor de lipídios elevado na sua membrana externa contendo lipopolissacarídeo e proteínas, para além de uma camada fina de peptidoglicano que circunda a membrana plasmática (TORTORA *et al.*, 2005). Em consequência, durante o passo de diferenciação pelo álcool, partes dos lipídios são dissolvidas, formando-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de cristal) sai das células. Estas células ficam transparentes após o passo de diferenciação pelo álcool, sendo posteriormente

coradas com o corante secundário (safranina ou fucsina) revelando coloração vermelha (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A parede celular das bactérias Gram positivas é constituída principalmente por uma camada grossa de peptidoglicano no espaço periplasmático, e o seu teor em lipídios é nulo ou muito baixo (em poucas espécies bacterianas). A camada de peptidoglicano atua, assim, como uma barreira impedindo a saída do corante primário (violeta de cristal) e estas células ficam coradas de violeta escuro (TRABULSI *et al.*, 2005).

#### 2.4.1 Bactérias patogênicas

As bactérias patogênicas são aquelas que causam doenças (SAARELA, *et al.*, 2000) No século XIX, Koch através dos seus experimentos, foi possível comprovar a associação direta entre bactérias e doenças. A presença das bactérias seria a causa provável de muitas das patologias que afetam o ser humano (GRADMANN, 2005). As infecções bacterianas ocupam um lugar de destaque nas patologias humanas, principalmente no trato respiratório e urinário (CAMARGO *et al.*, 2002). A maioria destas infecções é controlada ou até mesmo combatida com tratamento empírico. No entanto, estas formas de tratamento podem representar situações muito graves, que colocam em risco a vida do ser humano (AKRAM; SHATID; KHAN, 2007).

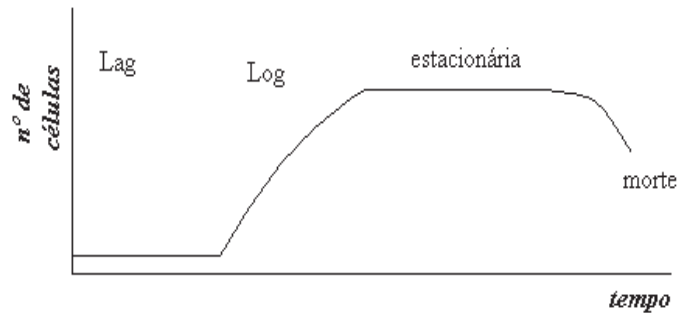
Uma das formas de classificar as infecções bacterianas é entre as adquiridas em comunidades, associadas a seres humanos não institucionalizados e, hospitalares, que acometem doentes internados em instituições de saúde (KONEMAN *et al.*, 2001). O *Staphylococcus aureus* é a espécie bacteriana Gram positivo, que geralmente está envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária como hospitalar localizadas na pele (foliculites, furunculose, impetigo, pústulas ou abscessos cutâneos) ou em regiões mais profundas (osteomielites, bacteremias, endocardites, pneumonias e toxinfecções alimentares) principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou submetidos a implantes como próteses nos ambientes hospitalares (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Além desta, há outras bactérias Gram-positivas patogênicas: o *Staphylococcus saprophyticus*, que pode ser encontrada na microbiota normal da pele e região periuretral tanto do homem como da mulher, sendo patógeno oportunista em infecções do trato urinário. Sua patogenicidade parece estar relacionada à sua capacidade de se aderir às células do trato urinário (KONEMAN *et al.*, 2001); e a espécie *Staphylococcus epidermidis*, bacteriana Gram-positiva que, coloniza a pele do homem sem risco à saúde (MURRAY *et al.*, 2000). Frequentemente, é inoculada durante procedimentos invasivos são veiculados pela equipe de saúde, e essa situação é agravada (hemólise, proteólise e formação de biofilme) quando ocorrem surtos endêmicos de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar (MICHELIM *et al.*, 2005). Neste contexto, a avaliação da resistência aos agentes antimicrobianos, em isolados clínicos e na comunidade, pode contribuir para a compreensão da distribuição e transmissão de resistência e ajudar na seleção do antibiótico apropriado para a terapêutica.

## 2.5 Antibióticos

Os agentes antimicrobianos ou antibióticos são compostos, naturais ou sintéticos, que impedem ou destroem micro-organismos ou micróbios. Termos estes, são utilizados, para descrever fungos e, principalmente, as bactérias, maiores causadoras de doenças infecciosas (PROJAN; SHLAES, 2004). Os antibióticos podem ser classificados como bactericidas, pois matam os micro-organismos e são eficazes durante a fase de crescimento logarítmico (figura 2), uma vez que o aumento da atividade metabólica proporciona susceptibilidade máxima, ou bacteriostática, apenas previnem o crescimento bacteriano e são clinicamente menos desejáveis (WALSH, 2003).





**Lag**: adaptação celular ao meio.

**Log**: multiplicação bacteriana (espaço e nutrientes disponíveis).

**Estacionária**: multiplicação e morte bacteriana são iguais (falta de algum nutriente).

**Declínio**: Morte celular por falta de nutrientes.

Figura 2. Curva de crescimento e morte de células bacterianas

Fonte: Adaptada de TORTORA; FUNKE; CASE, 2000.

De modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade por meio de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, além da inibição da síntese de ácidos nucleicos (FONSECA, 1999). Contudo, numerosos estudos têm sido realizados com a finalidade de estabelecer o sítio específico da ação de um agente antimicrobiano (PROJAN; SHLAES, 2004). Esses estudos mostraram-se bastante complexos pelo fato das várias modificações que ocorrem nas células expostas a um agente antimicrobiano, tornando difícil o estabelecimento do local primário da lesão celular, onde vai ocorrer, como consequência, a deterioração das atividades vitais (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1993).

### 2.5.1 Resistência bacteriana a antibióticos

Estudos mostram que, por mais de seis décadas, a resistência bacteriana a antibióticos é constatada e vem demonstrado um aumento considerável nos dias atuais (RANG; DALE; RITTER, 2001). As sucessivas implementações da terapia antinfetiva têm se tornado cada vez mais difícil por causa da disseminação da

resistência bacteriana, da emergência de novos patógenos e a decorrência de infecções em pacientes imunodeprimidos, nos quais as drogas antimicrobianas tornaram-se menos efetivas (LEMONICK, 1994). O uso desenfreado de antibióticos sem uma cuidadosa avaliação das suas indicações apropriadas leva ao crescimento de cepas resistentes ou mutação seletiva (VARALDO, 2002).

Bactérias vêm sendo avaliadas quanto à sua sensibilidade aos antibióticos desde a descoberta da penicilina e, é notória a presença da resistência que existe a estes agentes ou que se desenvolveu após sua introdução (PROJAN; SHLAES, 2004). Seja por meio de atividade bactericida ou através de atividade bacteriostática os mecanismos de ação dos antibacterianos foram definidos (MIMS *et al.*, 1999). A disseminação de bactérias antibiótico-resistentes ocorre tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (NICOLAOU *et al.*, 1999; WALSH, 2000; ALVAN; EDLUND; HEDDINI, 2011).

Alguns fatores que influenciam a seleção de mutantes antibióticos resistentes incluem o estado imunológico do paciente, o número de bactérias no sítio de infecção, o mecanismo de ação do antibiótico e o nível da droga que atinge a população bacteriana (RICHET, 2001). Mecanismos rotineiramente descritos da atividade antibacteriana são: ação inibitória na síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição ou alteração da síntese protéica e atuação nos ácidos nucléicos (TRABULSI *et al.*, 2005).

Além disso, o antibiótico para agir, precisa interagir ainda que, parcialmente, a um sítio de ligação bacteriana para interferir em seu metabolismo e tentar destruí-la (HÉLIO, 2009). Com a todos estes mecanismos e sítios de ligação, as bactérias desenvolveram formas de sobrevivência como: bomba de efluxo, impenetrabilidade, proteção ribossômica, beta-lactamases, entre outros. E, dessa forma, a bactéria combate o mecanismo de ação do fármaco que gera a resistência a antibióticos (ACAR, 2002).

A resistência antibiótica ocorre quando a bactéria pode adquirir genes e outros mecanismos que permitem a interferência ação do antibiótico (TAVARES, 2000) Várias pesquisas têm mostrado que existem três importantes tipos de resistência bacteriana: resistência intrínseca, resistência por mutação, e resistência mediada por plasmídeo (COHEN; TARTASKY, 1997). A resistência intrínseca é descrita

quando a bactéria evolui para a produção de uma enzima capaz de degradar o fármaco, por exemplo, a enzima *b*-lactamase, sendo uma resistência intrínseca ao microrganismo (OPLUSTIL, 2010).

A resistência por mutação ocorre com a evolução e mutação que leve a alteração estrutural do micro-organismo impedindo as ações do fármaco (HÉLIO, 2009). A resistência mediada por plasmídeo é a que envolve a passagem de informação da resistência por mutação de um micro-organismo para outro. O DNA alterado, que confere a resistência, é envolvido (empacotado) dentro de um plasmídeo que pode ser transferido a outros organismos vivos (TAVARES, 2000).

### 2.5.2 Descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos

Nos últimos 10 anos, os pesquisadores têm voltado sua atenção para a busca de novos antibióticos, a partir de fontes naturais (metabólitos secundários), ainda pouco exploradas como microalgas, bactérias do solo e plantas medicinais (CLARDY; WALSH, 2004). A crescente resistência microbiana, doenças infecciosas (segunda maior causa de mortalidade do mundo) e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso, são as principais razões necessárias e emergenciais por novos compostos de ação antibiótica (PAYNE; GWYNN; HOLMES; PAMPLIANO, 2007).

Os antibióticos naturais por apresentarem estruturas químicas complexas são importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas (WALSH, 2003). Neste contexto, derivados vegetais têm sido investigados como possíveis fontes de tratamento para os mecanismos de multirresistência bacteriana (GIBBONS, 2004). As plantas podem contribuir na descoberta de novos antibióticos a partir dos metabólitos secundários, já que, produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de herbívoros e microrganismos patogênicos, atração de polinizadores, permitir a tolerância de temperaturas extremas e processos de adaptação a estresse hídrico ou deficiência de nutrientes e minerais do solo (GURIB-FAKIM, 2006).

Várias plantas, da rica flora brasileira, são utilizadas na medicina popular com atividade antisséptica ou no tratamento de doenças infecciosas, e seus estudos têm demonstrado que, inúmeras vezes ocorrem a confirmação da atividade antimicrobiana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

## 2.6 Pinhão-manso

### 2.6.1 Família *Euphorbiaceae*

A família *Euphorbiaceae* merece destaque entre as Angiospermas por abrigar aproximadamente 7500 espécies reunidas em 290 gêneros (Govaerts *et al.* 2000). Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400), *Acalypha* L. (400), *Macaranga Du Petit Thouars* (400), *Antidesma Burman* (150), *Manihot Miller* (150), *Tragia Plumier* (150) e *Jatropha* L. (150) (Webster, 1994). A família *Euphorbiaceae* é encontrada, principalmente, nas regiões tropical e subtropical, sendo que são mais concentradas, especialmente, nos continentes americano e africano (BARROSO; GUIMARÃES; ICHASO, 1991).

Conforme Simpson (2006), a família *Euphorbiaceae* compreende um dos grupos taxonômicos mais complexos e, morfologicamente, diversos entre as eudicotiledôneas. Apesar do elevado número de espécies, os seus representantes são reconhecidos por um conjunto de caracteres importantes como porte arbóreo, arbustivo, subarbustivo ou herbáceo com folhas alternas, simples ou compostas, estipuladas, flores unissexuadas, em geral monoperiantadas, em plantas monóicas ou dióicas. Apresentam frutos secos deiscentes ou indeiscentes, comumente do tipo cápsula esquizocárpica, ou ainda cápsulas septífragas, loculicidas e circundantes, drupóides e bacóides (CASAS; DOMINGUEZ, 2005).

No Brasil, estima-se a ocorrência de 1.100 espécies e 72 gêneros, habitando os mais diferentes tipos de vegetação (SOUZA; LORENZI, 2006). Em pesquisa, Cordeiro & Carneiro-Torres (2006) demonstrou-se evidente ocorrência de 211

espécies e 45 gêneros para a região Nordeste. A Euphorbiaceae compreende um grupo de plantas reunidas em cinco subfamílias, reunindo táxa uniovulados e biovulados: *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* e *Euphorbioideae* (WEBSTER, 1994; WURDACK *et al.*, 2005) e KATHRIARACHCHI *et al.*, 2005). Sendo ainda, registrada como importante grupo de plantas do semiárido nordestino (MMA, 2002).

Para tanto, na região do nordeste brasileiro, algumas espécies da família da Euphorbiaceae têm se destacado pela importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular (SATIRO; ROQUE, 2008). Algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, como *Manihot esculenta* Crantz (macaxeira), da qual é extraída a farinha de mandioca. As túberas de uma variedade dessa espécie da macaxeira são, amplamente consumidas e, delas pode ser produzida uma bebida alcoólica, a tiquira (BRAGA, 1976).

Adicionalmente, a partir de espécies dos gêneros *Hevea* Aublet (seringueira) faz-se a extração de látex para a produção de borracha natural, representando grande fortalecimento econômico para a região amazônica. As espécies de *Manihot* Miller foram, ainda, responsáveis por garantir, durante um bom tempo, a economia da região da caatinga nordestina (SAMPAIO *et al.*, 2002). Na indústria das borrachas naturais, as *Euphorbiaceae* têm, também, se destacado na extração de óleo, a partir de espécies do gênero *Ricinus* L. que apresentam diversos usos na indústria de tintas, plásticos, sabões têxteis, fibras sintéticas, cosméticos e papel (BRAGA, 1976). Os óleos extraídos de espécies do gênero *Jatropha* L., são acrescentados no uso em misturas de combustíveis derivados do petróleo (SEVERINO, 2006).

Diversas espécies da família *Euphorbiaceae* são também utilizadas na medicina popular. O chá extraído de espécies do gênero *Phyllanthus* L. tem sido relatado como potencial efeito diurético e antiespasmódico (SAMPAIO *et al.*, 2002). O chá das raízes de *Cnidocolus* Pohl ou de espécies do gênero *Euphorbia* L. demonstra efeito cicatrizante, tônico e diurético. (BRAGA, 1976). Fernandes Baccarin e Michima (2002) apontam ainda, a espécie *Ricinus communis* L. como

produtora da fitotoxina ricina, que apresenta propriedades purgativas, tal qual a curcina, oriunda da espécie *Jatropha curcas* L.

### 2.6.2 *Jatropha* sp

O gênero *Jatropha* está inserido na família Euphorbiaceae (Govaerts *et al.* 2000). Esta família compreende 245 gêneros e aproximadamente 6300 espécies, distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. São plantas de hábitos variados, existindo na forma de ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras (GOVAERTS *et al.* 2000). Recentemente, constatou-se que o gênero *Jatropha* contém aproximadamente 170 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da África e América (HELLER, 1996). As plantas deste gênero apresentam valor medicinal, ornamental e algumas são produtoras de óleo (NEVES; FUNCH; VIANA, 2010)

As espécies do gênero *Jatropha* são conhecidas por serem muito tóxicas e irritantes. A atividade purgativa do óleo de suas sementes são semelhantes a atividade mostrada por ésteres diterpenos presentes no óleo de sementes de muitas outras espécies de *Euphorbiaceae*. Os ésteres diterpenos irritantes foram extraídos, isolados e caracterizados a partir do óleo das sementes de quatro espécies de *Jatropha*: *J. podagrica*, *J. multifida*, *J. curcas* e *J. gossypifolia* (ADOLF; OPFERKUCH; HECKER, 1984; KUMAR; SHARMA, 2008).

Constatou-se, nas espécies, deste gênero, a presença de ricina, uma toxalbumina que causa vômitos, diarreia, desidratação, choque e danos nos rins e fígado Makkar; Aderibigbe; Becker,(1998). O óleo de sementes de *J. curcas* L., *J. mollissima* L., e *J. podagrica* Hook foram avaliados quanto à sua composição de ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico). As sementes de *J. podagrica* apresentaram 46% do teor de óleo, neste caso, o mais elevado (TEIXEIRA, 1987).

As proteínas de *Jatropha* possuem propriedades nutricionais e biomédicas interessantes (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). O alto conteúdo de proteínas com digestibilidade e a composição de aminoácidos destas proteínas fazem com que haja a possibilidade de utilizá-las como fonte para incorporação

em dietas de ruminantes e animais monogástricos, incluindo peixes (HIROTA *et al.*, 2010). Uma particular proteína bioativa, a cursina, tem potencial para ser utilizada com sucesso como imunocombinado na quimioterapia. Muitos peptídeos cíclicos de sementes de *Jatropha sp* possuem importância clínica e mostraram potencial para uso farmacêutico (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010).

### 2.6.3 *Jatropha curcas* L. (Pinhão-mansô)

O pinhão-mansô ou *Jatropha curcas* L. pertence à família *Euphorbiaceae*, a mesma da mamona e da mandioca; é uma planta de cultura perene, caducifolia, ou seja, perde as folhas no período da seca (janeiro/outubro), a partir do primeiro ano, é rústica e adaptada às mais diversas condições edafoclimáticas. (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).



Figura 5. Espécie *Jatropha curcas* L.  
Fonte: Elaborada pelo autor

A *Jatropha curcas* L. é uma oleaginosa considerada arbustiva que pode atingir até 4 metros de altura, popularmente conhecida no Brasil como: pinhão-mansô, pinhão-paraguaio, pinhão de purga, e pinhão de cerca (PINTO; MENDONÇA, 2009). Já em outras regiões do mundo a *Jatropha curcas* L. é conhecida como: yu-lu-tzu (China), mupuluka (Angola), tempate (Honduras e El Salvador), physic

nut, purging nut (Inglaterra/Estados Unidos), médicinier, pognon d'inde, purghere (França) kadam, (Nepal), butuje (Nigéria), ratanjyot jangli erandi (Hindi) e piñoncillo (México) (MARTIN, G.; A. MAYEUX, 1984).

#### 2.6.3.1 Origem e distribuição do pinhão-mansô

Vários pesquisadores tentaram definir a origem do pinhão-mansô, porém os estudos são bastante controversos. A maioria dos relatos refere-se à América do Sul como origem provável do pinhão-mansô, sendo encontrada de forma espontânea em quase todas as regiões intertropicais (figura 6), ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e em número bastante reduzido nas regiões temperadas (PEIXOTO, 1973). Atualmente, o seu cultivo tem sido promovido por organizações governamentais e não governamentais, em países como África do Sul, Brasil, Mali, Nepal e em outros (GUIMARAES, 2008).

Os Portugueses, no fim do século XVIII, introduziram a planta *Jatropha curcas* L. nas ilhas de Cabo Verde e em Guiné, no intuito de aproveitar as terras ainda não exploradas daquele arquipélago, cujos solos eram de pouca fertilidade e, dificilmente, poderiam ser utilizados para culturas menos rústicas de onde mais tarde foi disseminada pelo continente africano (MARTIN; AYEUX, 1984). De acordo com Saturnino e colaboradores (2006), a distribuição geográfica no Brasil do pinhão-mansô é bastante extensa devido a sua resistência a longas estiagens, sendo adaptável às condições edafoclimáticas de extrema variação, desde a região Nordeste ao Sudeste do país.



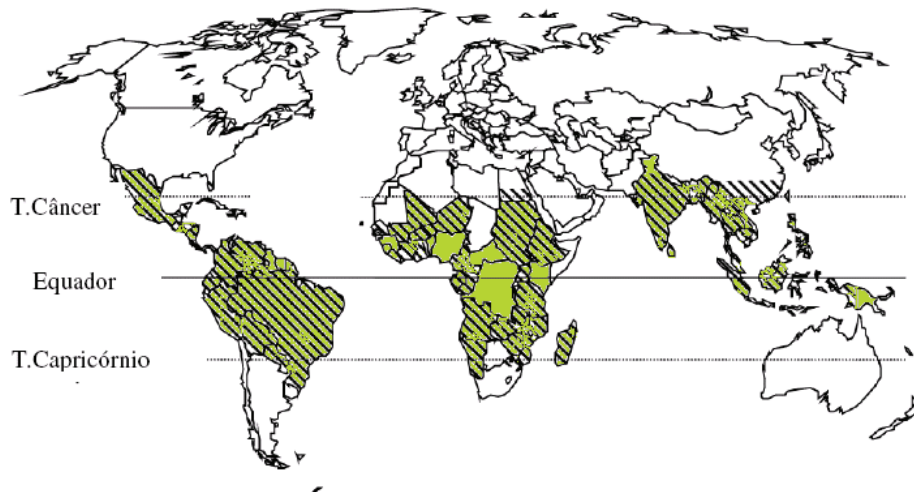


Figura 6. Região de origem e cultivo de *Jatropha curcas* L.  
 Fonte: Adaptado de Heller, 1996.

#### 2.6.3.2 Características botânicas do pinhão-mansô

O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm; possui raízes curtas e pouco ramificadas, caule liso, de lenho pouco resistente e medula desenvolvida; floema com longos canais que se estende até as raízes, onde circula o látex. O tronco é dividido em vários ramos compridos desde a base, que apresentam cicatrizes devido a queda das folhas na estação seca, que ressurgem logo após o início de período de chuva (ARRUDA *et al.*, 2004).

O pinhão-mansô (figura 7) possui folhas verdes, esparsas e brilhantes, largas alternadas de pecíolo longo na forma de coração com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior (SATURNINO *et al.*, 2006). As inflorescências são em forma de panículas cimeiras definida com flores pequenas na cor amarelo-esverdeada, em um mesmo ramo podem ocorrer flores masculinas, flores femininas e flores hermafroditas. Possuem também uma floração descontínua com frutos da mesma inflorescência de idades diferentes (ARRUDA *et al.*, 2004).

Os frutos são cápsulas, ovóides, de cor marrom escuro, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm, quando maduro possuem três sementes escuras, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, indeiscente, inicialmente verde e no estágio

de maturação de cor preta onde são encontradas amêndoas brancas, ricas em óleo (PÉREZ *et al.*, 2007).

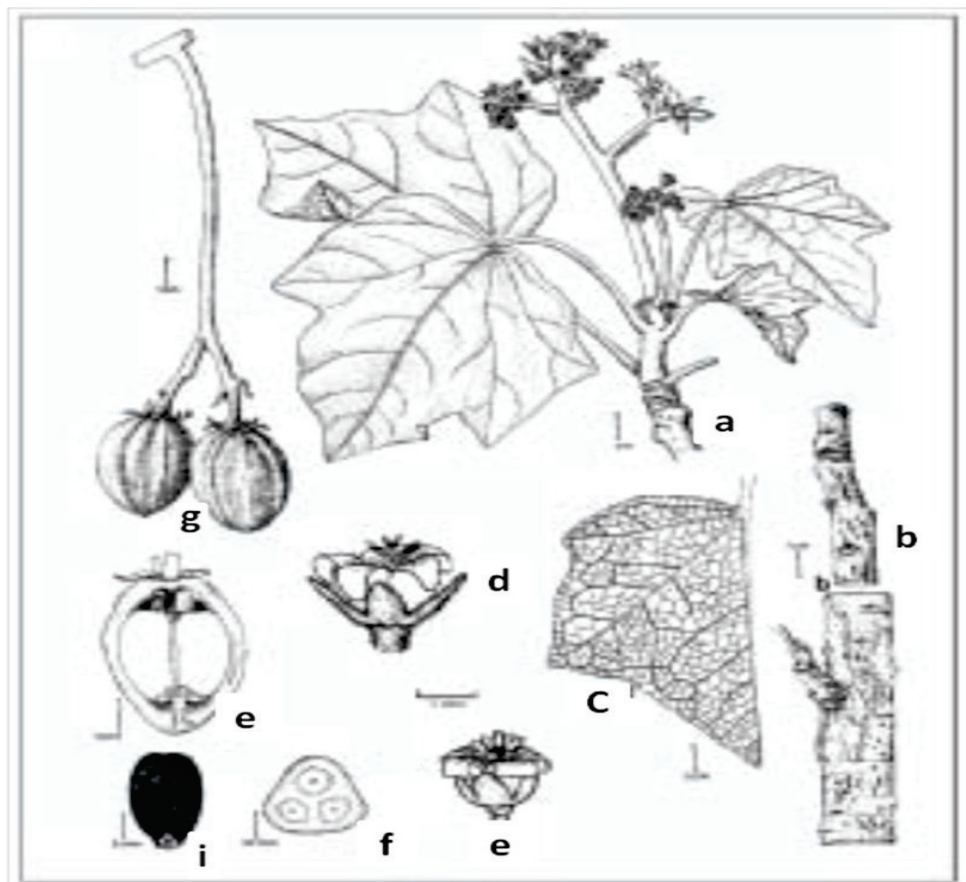


Figura 7. Desenho botânico da espécie *Jatropha curcas* L. e suas respectivas descrições: **a** – ramo florido, **b**- galho, **c**- folha, lado esquerdo, **d** - pistilo da flor, **e** - estame da flor, **f** – corte transversal no fruto imaturo, **g**- frutos, **h**- corte longitudinal nos frutos, **i** –semente. Fonte: Heller, 1996.

Segundo Frigo Sato e colaboradores (2008), dentre as culturas com potencial produtivo de óleo, a partir das sementes, na produção de biocombustível, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L) apresenta ser, entre outros vegetais o mais positivo pelo alto rendimento de óleo por hectare ou pela não concorrência com outros mercados, como ocorre com o milho e outras oleaginosas (FRIGO SATO *et al.*, 2008).

### 2.6.3.3 Principais vantagens do cultivo do pinhão-mansô

As Principais vantagens do pinhão-mansô sãõ, o fato de ser uma planta perene e do seu longo ciclo produtivo podendo chegar a 40 anos e manter a média de produtividade de duas toneladas por hectare (AZEVEDO, 2006). O pinhão-mansô possui vantagens em relação às outras oleaginosas, como: o possível uso na recuperação de áreas degradadas, ser usado em áreas marginais e de baixa fertilidade como também em regiões de baixa precipitação. Outro fator importante é a não necessidade de mecanização da área a ser plantada, permitindo o uso em consórcio com outras culturas como feijão, milho, abóbora, melancia, tornando a sua utilização mais propícia à agricultura familiar (ACCARINI, 2008).

No setor produtivo, a cultura de *J. curcas* L. também apresenta como ponto atrativo o alto potencial de rendimento de óleo a partir das sementes. Enquanto a soja produz 500 Kg de óleo/ha, o pinhão mansô tem potencial para produção de 1500 Kg óleo/ha (MELLO; PAULILO; VIAN, 2007). O alto teor protéico dos frutos 58-60% tem chamado a atenção de pesquisadores, no sentido de desintoxicar o óleo e outros extrativos para uso na alimentação animal (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Para tanto, a espécie *J. curcas* L. ainda se encontra em processo de domestificação e, vem sendo extensamente estudada, no que diz respeito aos aspectos agrônômicos, devido ao seu potencial uso como fonte de óleo para a produção de biodiesel (SATURNINO *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2004).

### 2.6.3.4 Pinhão-mansô na geração de energia

A crescente demanda mundial da produção de energia no século XX caracterizou-se pelo domínio dos combustíveis fósseis como o carvão, petróleo e gás que representam ainda no início do século XXI, cerca de 80% de toda a energia produzida no mundo (WEA, 2000). A necessidade de energia, a ameaça do aquecimento global e a previsão da extinção dos combustíveis fósseis promoveram bastante à motivação de nações desenvolvidas, ou não, a incentivar a participação significativa das fontes energéticas alternativas renováveis em suas

matrizes energéticas, visando a sustentabilidade econômica e ambiental (PARK *et al.*, 2012).

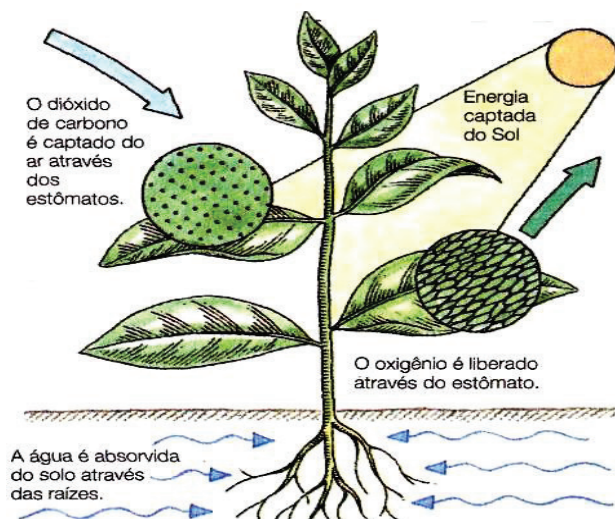


Figura 8. Fotossíntese para a conversão do dióxido de carbono em biomassa  
Fonte: Adaptado de HOPKINS, 2000. Disponível em: <<http://phyzykal.nafoto.net/>>Da magia a ciência da vida. Acesso em 12 out. 2013.

De acordo com Venturi e Venturi (2003), de modo geral, as culturas vegetais com finalidade para a produção de energia, podem ser classificadas em três grupos, a partir do tipo de matéria-prima energética como: os derivados da fermentação de culturas ricas em celulose, açúcar e amido (etanol); oriundos de espécies com alta produção de matéria seca, usadas em processos como combustão, pirólise e gaseificação (biomassa); baseado em culturas vegetais, principalmente as oleaginosas, das quais se extrai o óleo e o transesterifica (Biodiesel).

Uma destas potenciais culturas energéticas para a produção de biodiesel é a do pinhão-mansão (Camargo *et al.*, 2004). Considerada opção agrícola para áreas áridas, semiáridas e na recuperação de áreas degradadas. A *J. curcas* L., promove a integração do acesso à produção com renda, através da venda do óleo das sementes para fins combustíveis (VARGAS *et al.*, 1999). Além disso, o óleo pode ser utilizado em motores e máquinas para a geração de eletricidade (WILHELM *et al.*, 2008), contribuindo no o desenvolvimento rural com o emprego da mão-de-obra familiar, e com conseqüente fixação do homem no campo, além

da segurança alimentar, pois permite o uso de culturas anuais alimentícias, em consórcio, propiciando melhorias ambientais que favorecem o desenvolvimento de outras culturas (BIODIESEL, 2006; ASSUMPÇÃO, 2006).

#### 2.6.3.5 Segurança alimentar versus o pinhão-mansão

O uso de óleo vegetal no Brasil, nação tropical de dimensões continentais, constitui o diferencial para a organização do programa de produção e uso do biodiesel (CAMPOS; CARMELIO, 2006). O desafio colocado é o do aproveitamento das potencialidades regionais, válido tanto para culturas já tradicionais, como a soja, o amendoim, o girassol, a mamona e o dendê, quanto para novas alternativas, como o pinhão-mansão e uma grande variedade de oleaginosas a serem exploradas (BRASIL, 2005). No entanto, a implementação da produção de energia através da biomassa como lei, ainda é um desafio ambiental e socioeconômico (ASSUMPÇÃO, 2006).

O uso da biomassa como alternativa renovável, pode gerar efeitos positivos ou negativos, principalmente no que diz respeito à segurança alimentar, que se baseia em quatro parâmetros principais: disponibilidade, acesso, utilização e estabilidade (FAO, 2010). Ao mesmo tempo, se as boas práticas não são implementadas, podem levar a impactos negativos sobre a capacidade produtiva da terra ou sobre a disponibilidade e qualidade da água, com repercussões negativas para a segurança alimentar (KLAGI *et al.*, 2008; KARP; HAUGHTON; BOHAN, 2010).

A produção de biodiesel no Brasil é considerada um problema, pelo fato de que maior parte da produção de óleo vegetal está relacionada com o setor de alimentos para consumo humano, podendo gerar uma competição entre a produção de combustíveis e alimentos, elevando os preços deste último (PINTO; MENDONÇA, 2007). O Brasil é o 2º maior produtor de soja do mundo (BRASIL, 2010). Desta forma, a distribuição de matéria-prima para produção de biodiesel no país está representada por 67,43% para o óleo de soja, 21,7% ficam com a gordura bovina (sebo de boi) e apenas 2,69% de outras matérias-primas como o pinhão-mansão (ANP, 2011).

Tanto a natureza quanto a magnitude dos impactos do desenvolvimento da bioenergia moderna, sobre a segurança alimentar vai depender de uma série de fatores relacionados principalmente ao tipo de bioenergia considerado, o modo de produção que é gerenciado, do contexto ambiental, sócioeconômico e político em que esse desenvolvimento ocorre (CAMPOS; CARMELIO, 2006). Sendo assim, a contribuição da bioenergia para possíveis mudanças nos preços dos alimentos básicos, dependerão, das culturas que são utilizadas dentre outros fatores como as matérias-primas de bioenergia; a disponibilidade local, o preço acessível da terra; água, insumos, trabalho agrícola, a energia e as políticas comerciais (KARP; HAUGHTON; BOHAN, 2010).

Esta possibilidade viabiliza o potencial regional, permitindo que a biomassa local seja explorada de forma sustentável, a tal ponto que ocorra concorrência direta com a energia produzida por fontes fósseis. Atualmente, a energia proveniente da biomassa tem dado ênfase a aplicações que produzem combustíveis líquidos para o setor de transportes (GOLDEMBERG, 2008). Destaca-se o bioetanol de cana-de-açúcar e o biodiesel, ambos biocombustíveis, que apresentam importante atuação ecologicamente correta e elevada vantagem socioeconômica em relação ao diesel de petróleo (GALEMBECK; BARBOSA; SOUSA, 2009).

#### 2.6.3.6 Biodiesel a partir da *Jatropha curcas* L.

O biodiesel é definido pela "National Biodiesel Board" dos Estados Unidos como o derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes como gordura animal ou óleos vegetais (LIMA *et al.*, 2007). A obtenção do biodiesel ocorre a partir de reações de transesterificação de um óleo (animal ou vegetal) com um álcool de cadeia curta como o metanol ou etanol em presença de um catalisador. Pode ser utilizado puro ou em misturas com óleo diesel, derivado do petróleo, em diferentes proporções (SILVA; SAKATSUME, 2008).

Além disso, conforme Pereira e colaboradores (2004), o biodiesel apresenta várias características importantes como: livre de enxofre e aromáticos; maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional; possui teor médio de oxigênio em torno de 11%; possui nicho de mercado específico associado à

atividades agrícolas; o uso de óleo de fritura se caracteriza por um grande apelo ambiental; e apresenta preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial. Além disso, oleaginosas como a *J. curcas* L. para produção de biodiesel, podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria prima disponível em cada local (RAMOS, 1999).

Sendo assim, a produção de biocombustíveis alternativos ao óleo diesel, a partir de óleos vegetais brutos, tem sido alvo de diversos estudos (DUNN; SHOCKLEY; BAGBY, 1996). Os óleos vegetais mais comumente usados como matéria-prima para a produção de biodiesel são: soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, palma, mamona, entre outros (BRASIL, 2010). O uso do biodiesel como alternativa ao petróleo surge pela perspectiva da escassez, a contribuição do efeito estufa e pela sua concentração em algumas poucas regiões do mundo (BIODIESEL, 2006). Com base nestes entraves, o preço do petróleo se eleva e isso viabiliza economicamente fontes de energia antes inviáveis quando comparado às vantagens e conveniências oferecidas pelos combustíveis líquidos derivados do petróleo (GALEMBECK; BARBOSA; SOUSA, 2009).

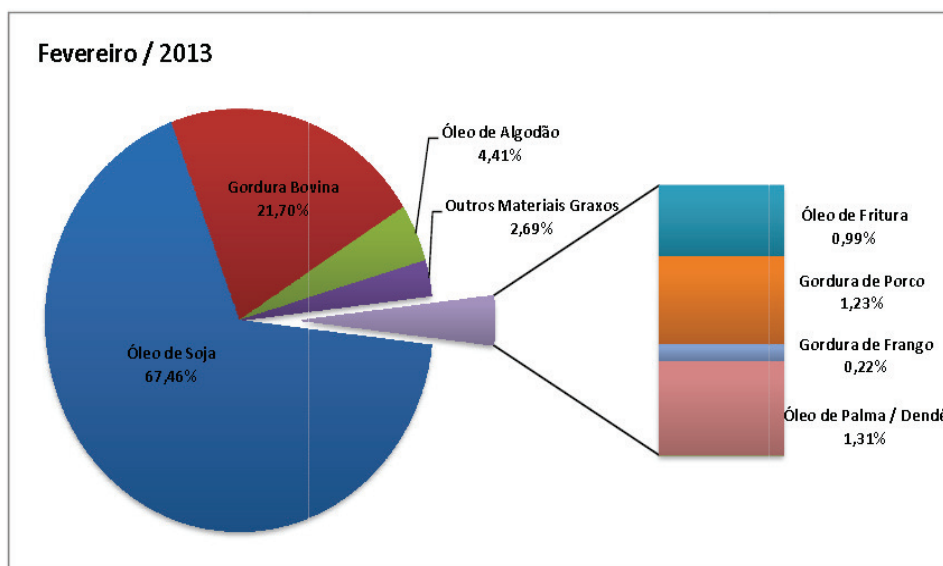


Figura 9. Matérias-primas utilizadas à produção de biodiesel no Brasil  
Fonte: BRASIL, 2013.

#### 2.6.3.6.1 O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB)

Neste contexto, o Governo Federal vem investido esforços para viabilizar a produção de biodiesel como uma alternativa renovável ao diesel de petróleo. Entre as diversas vantagens do uso do biodiesel está a diminuição da emissão de carbono e composto de enxofre na atmosfera, além de ser uma fonte renovável de energia (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). No Brasil, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) prevê com a adição obrigatória de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo desde 2009 (BRASIL, 2009).

O Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB) é um programa interministerial do Governo Federal que objetiva: 1) a implementação de forma sustentável, tanto técnica, como economicamente, a produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda; 2) criação do Selo Combustível Social em 2005, Figura 11, para o estímulo da inclusão social da agricultura, nessa importante cadeia produtiva, conforme Instrução Normativa Nº. 01, de 05 de julho de 2005 coordenado pelo MDA (Ministério do Desenvolvimento Agrário).

Além disso, o PNPB prioriza também a criação da Rede Brasil de Tecnologias de Biodiesel, cuja formação da Rede constitui-se em uma das ações do módulo de Desenvolvimento Tecnológico, coordenado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), no âmbito do PNPB e a realização dos leilões de compra de biodiesel. A ANP (Agência Nacional de Petróleo) realiza os leilões para garantir a mistura obrigatória de biodiesel prevista em lei e a formação de estoques para que eventuais problemas de fornecimento das usinas sejam compensados com a oferta adicional (BRASIL, 2009).

Para tanto, o volume anual de biodiesel produzido para atender a este programa é calculado em cerca de 2,4 bilhões de litros, o que se configura um desafio para a cadeia produtiva nacional (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). Para iniciar a produção de biodiesel no Brasil, o Governo, reconhecendo a importância socioeconômica (figura 10), viabiliza a criação do Grupo de Trabalho Interministerial encarregado de apresentar pesquisas sobre a possibilidade da



utilização de óleo vegetal para a produção do biodiesel, além de propor ações necessárias para o seu uso.

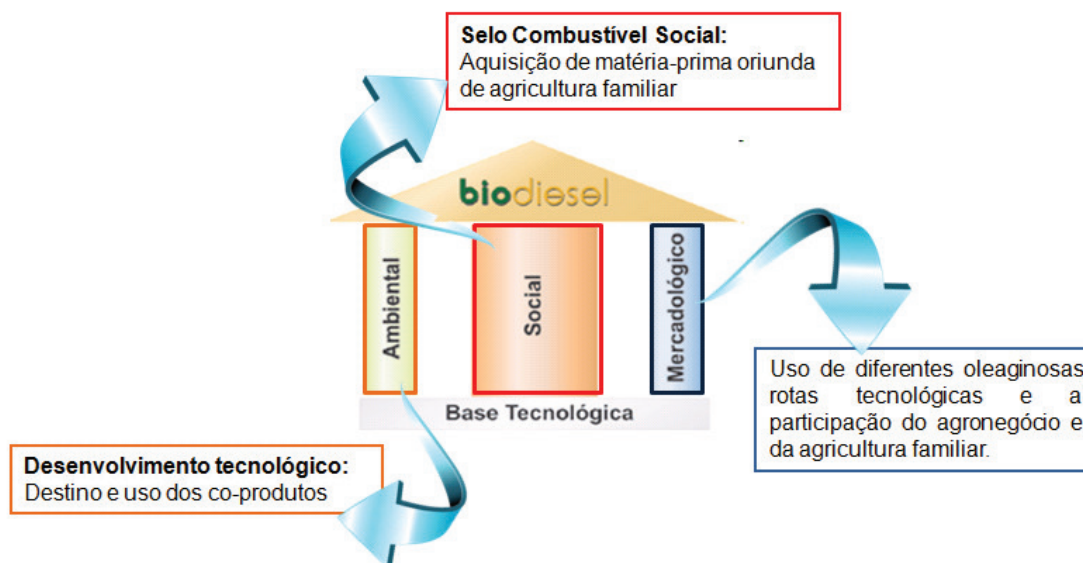


Figura 10. Pilares do Programa Nacional de produção e uso do Biodiesel (PNPB)  
Fonte: Ministério de Minas e Energia MME. Disponível em <<http://www.mme.gov.br>>  
Acesso em 15 jan., 2013.

Dessa forma, o PNPB vincula a produção de biodiesel com a agricultura familiar no país, gerando desenvolvimento local em regiões economicamente menos favorecidas (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). Nesse contexto, o pinhão-mansão mostra ser uma importante oleaginosa que agrega adaptação às condições climáticas do nordeste, alta produtividade de matéria-prima à produção de biodiesel e a biomassa residual como adubo orgânico.

#### 2.6.3.7 Toxicidade da *Jatropha curcas* L.

Elevado grau de toxicidade foi verificado nas sementes cruas, cozidas ou assadas de *J. curcas*. Ratos tratados com dieta contendo estas amostras morreram num período de 2 a 16 dias (LIBERALINO; BAMBIRRA; MORAES-SANTOS; VIEIRA, 1988). O extrato metanólico, éter de petróleo e diclorometano das frutas apresentou efeito abortivo em ratas grávidas (GOONASEKERA, *et al.*, 1995). Os Ésteres de forbol, ou ésteres diterpenos são as substâncias mais tóxicas

presentes na *J. curcas* L. pois são indutoras de formação de tumores e resposta inflamatória. Por ser lipossolúvel, grande parte dos ésteres diterpenos são extraídos juntamente com o óleo (GONÇALVES *et al.*, 2009; ACHTEN *et al.*, 2010). Não foram publicados até então relatos de outras variedades de *J. curcas* L. sem atividade tóxica. Quanto a outras atividades biológicas, a *J. curcas* L. apresentou atividade cicatrizante em feridas. Em ensaios posteriores o extrato bruto das cascas apresentou uma efetiva aceleração no processo de cicatrização em ratos albinos (VILLEGAS *et al.*, 1997).

Testes histopatológicos detectaram uma aceleração no processo de cura com maior concentração de colágeno em forma de feixes, observou-se o aumento de resistência do tecido epitelial da pele à ruptura e diminuição da ferida (SHETTY *et al.*, 2006). O extrato das folhas apresentou atividade antifúngica contra fungos isolados e o autor constata que este extrato tem um potencial uso com substância inibitória em meios de cultura contra fungos contaminantes como *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (AYANBIMPE *et al.*, 2009).

#### 2.6.8 Atividade farmacológica da *Jatropha curcas* L.

Desde tempos remotos a planta pinhão-manso é, usualmente, empregada na medicina popular, na produção de sabão e para a iluminação de residências (SATURNINO *et al.*, 2006). No mundo contemporâneo, o produto extraído da semente tem sido sugerido para fins energéticos. Além disso, a planta arbustiva tem sido considerada uma grande opção de cultivo agrícola, em áreas de solos pedregosos e quase inagricultáveis (NUNES; PASQUAL; DOS SANTOS, 2008).

Preparações de todas as partes do vegetal, incluindo sementes, folhas e casca, frescas ou como um decocto, são utilizadas na medicina tradicional (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O óleo das sementes tem ação laxante forte e também é amplamente usado para doenças de pele e para aliviar dor causada por reumatismo (GANDHI; CHERIAN; MULKY, 1995). A decocção das folhas é usada contra a tosse e como antisséptico após o nascimento (HELLER, 1996).

Nos países tropicais, a *Jatropha curcas* L., é utilizada tradicionalmente, também como hemostático, o que incentivou a realização de estudos sobre a ação coagulante do látex produzido pela planta. O látex dessa planta demonstrou atividade coagulante (OSONIYI; ONAJOBI, 2003). Pesquisas apresentaram também que, o Látex, possui ter propriedade antimicrobiana contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* (THOMAS, 1989). O extrato bruto da casca do caule de *Jatropha curcas* L. em estudo realizado em camundongos acelerou o processo de cicatrização de feridas por vários mecanismos, ainda não esclarecidos (SHETTY; UDUPA; UDUPA; VOLLALA, 2006).

Em 1994, Salas e colaboradores, analisaram o efeito cicatrizante do látex de *Jatropha curcas* L. sobre feridas cirúrgicas na pele de camundongos Balb/c. O efeito cicatrizante foi observado apenas nos camundongos machos e doses múltiplas numa concentração acima de 50% apresentavam efeito cáustico sobre a pele tratada (SALAS *et al.*, 1994). O extrato alcoólico dos frutos desta espécie vegetal é também utilizado como hipoglicemiante. De acordo com Rau *et al.* (2006), o extrato pode ativar os Receptores Proliferador de Peroxissomo Ativadas (PPAR), que possuem importante função na homeostasia da glicose e do lipídio, o que permite relacionar uma possível função no tratamento da dislipidemia e da diabetes.

Os extratos de frutos de pinhão-manso demonstraram ainda interrupção da gravidez em ratas, sugerindo mais estudos para elucidar se o efeito embriotóxico é devido a uma ação específica ou resultado da toxicidade em geral (GOONASEKERA *et al.*, 1995). Ao mesmo tempo, para a avaliação da atividade antiinflamatória, de acordo com Mujumdar e Misar (2004), foi realizada uma aplicação tópica de uma pasta preparada a partir do pó da raiz de *Jatropha curcas* L. em ratos albinos. Essa atividade pode estar associada a mediadores inflamatórios e ao metabolismo<sup>1</sup> do ácido araquidônico produzido pela via da cicloxigenase. Recentemente, a atividade larvicida do extrato etérico de *Jatropha curcas* L. foi avaliado contra *Aedes aegypti*. Para tanto, este extrato, sugere ser utilizado como tentativa, para obtenção de uma resposta ecologicamente correta, no controle dos vetores da dengue (RAUHMANN *et al.*, 2008).

No estudo de Rug e Ruppel (2000) foi sugerido que o extrato aquoso de sementes verdes trituradas e frutos maduros de *Jatropha curcas* L. poderiam ser utilizados no controle da esquistossomose, pois estes apresentaram atividade contra o caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* e do *S. haematobium*. Além disso, o extrato aquoso demonstrou atividade contra a cercaria e os caramujos *Biomphalaria glabrata*, *Bulinus truncatus* e *B. Natalensis* (CHIMBARI; SHIFF, 2008). Esta atividade foi associada aos ésteres de forbol (4 beta-phorbol-13- decanoate) extraídos do óleo dessa planta (LIU *et al.*, 1997). Muanza; Euler; Williams (1995), descobriram que um extrato metanólico de folhas de pinhão-manso, apresentou proteção para linfoblastóides humanos cultivados em células contra os efeitos citopáticos do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Substâncias isoladas da *Jatropha curcas* L. como: Jatropham, Jatrophine e curcaína com propriedades anticancerígenas. Estes compostos contra enfermidades de pele úlceras e até mesmo hemorroidas em animais são eficazes (THOMAS; SAH; SHARMA, 2008).

Outros compostos bioativos de *Jatropha curcas* L. foram obtidos como proteínas funcionais aquaporinas, glucanases, esterases, lipases e peptídeos cíclicos de potencial uso farmacêutico (*jatrophidin*) que mostrou atividade antifúngica e curcaciclina, a qual exibiu atividade antimalária (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010).

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Fracionar, purificar e caracterizar através de procedimentos cromatográficos e espectroscópicos, os extratos de folhas de *Jatropha curcas* L. e avaliar a atividade antibacteriana das frações isolados.

#### 3.2 Objetivos específicos

Fracionar, purificar extratos a partir de folhas da *Jatropha curcas* L. através de procedimentos cromatográficos e espectroscópicos;

Avaliar atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos, bem como os compostos puros obtidos das folhas da *Jatropha curcas* L. contra diferentes bactérias Gram-positivas através da técnica do disco em meio sólido.

Fracionar e purificar através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), extratos a partir das folhas de *Jatropha curcas* L., biomonitorar a separação das frações por ensaios de inibição bacteriana (Técnica do disco);

Avaliar a atividade antibacteriana comparativa entre os extratos brutos e os compostos fracionados, isolados e caracterizados.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Equipamentos utilizados

Agitador de tubos (Marca: Vortex, Modelo: QL-901);

Balança analítica digital (Marca: Marte, Modelo: AY220);

Banho maria (Marca: Fonem, Modelo: 100);

Câmara de fluxo laminar (Marca: Pachane, Modelo: PCRT2);

Contador Eletrônico de Colônias (Marca: QUIMIS, Modelo: Q295B);

Espectrofotômetro UV-VIS com varredura (Marca: QUIMIS, Modelo: Q798U2VS);

Estufa de secagem com renovação e circulação de ar (Marca: Fonem, Modelo: C-LT);

Estufa para crescimento de Micro-organismos (Marca: Fonem, Modelo: C-LT);

Evaporador Rotatório com pressão reduzida (Marca: Fisatam, Modelo: 550);

Microscópico (Marca: QUIMIS, Modelo: Q708SK-PLCF);

Micropipetas de volume regulável entre 5-50 $\mu$ L e 100-1000 $\mu$ L (LABMATE, Modelo: LM 100, LM 200, LM 250 e LM 1000);

Multiprocessador (Marca: WALITA, Modelo: PA011);

Placa de petri de 90mm (MP90-25I300);

Sealing film (Marca: Red is B exposed, Modelo BF-400-S).

#### 4.1.2 Solventes e produtos químicos utilizados

Acetato de etila ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ , P.M.: 88.11 g mol<sup>-1</sup>, Synth);

Agar *Mueller Hinton* desidratado (ACUMDIA, Michigam, USA);

Agar nutrientes (Himedia, M001-500);

Álcool Etanol hidratado 94,6% ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  P.M.:46,06 g mol<sup>-1</sup> , QEEL);

Álcool Metanol hidratado 94,6% ( $\text{CH}_3\text{OH}$  P.M.: 32.04 g mol<sup>-1</sup>, QEEL);

Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$  P.M.: 119.38 g mol<sup>-1</sup>, Synth);

Hexano ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$  P.M. 86.18 g mol<sup>-1</sup> Synth);

Disco Vancomicina (30µg 50lb Laborclin).

## 4.2 Métodos

Etapas básicas para obtenção dos extratos, frações, a partir de folhas de *Jatropha curcas* L. e, o bioensaio, técnica do disco em meio sólido, (figura 11), para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e frações contra bactérias Gram-positivas.

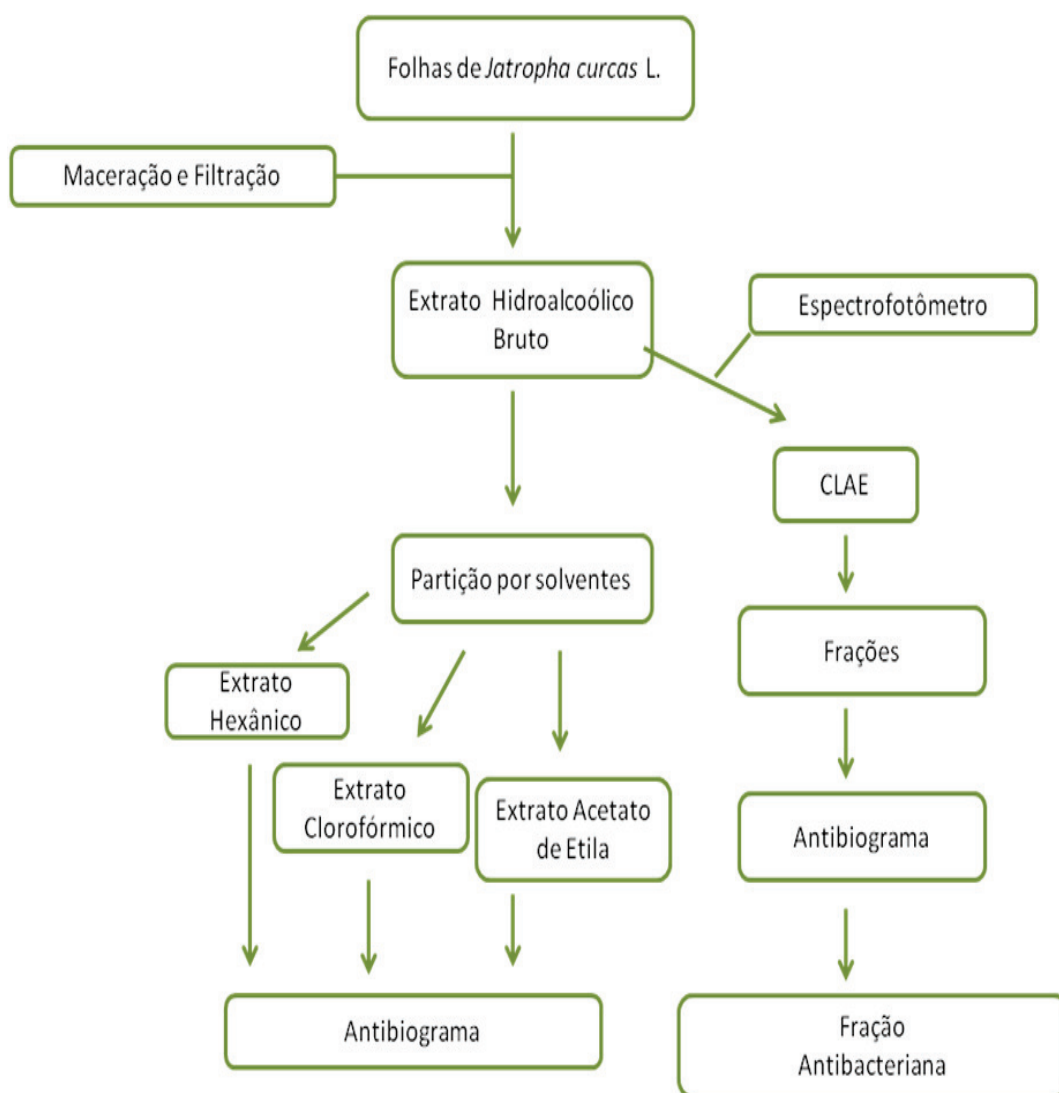


Figura 11. Procedimento para a obtenção dos extratos e frações, a partir de folhas de *Jatropha curcas* L.



#### 4.2.2 Material vegetal

#### 4.2.3 Folhas de *Jatropha curcas* L.

A coleta das folhas de *Jatropha curcas* L. foi realizada no município de Mutuípe, localizado no sudoeste da Bahia (figura 12), especificamente na zona fisiográfica do recôncavo, região do Vale Jiquiriçá, de clima quente e úmido e solo do tipo latossolo. A coleta propriamente dita foi realizada com o auxílio da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

Mapa da Bahia indicando a região da coleta. Latitude de 13° 15' 0" ao sul e Longitude de 39° 31' 0" a oeste.



Figura 12. Mapa do Estado da Bahia destacando a localização do município de Mutuípe. Fonte: GOOGLE. Dados cartográficos 2014.

Uma exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC) em Salvador (BA), sob o número 118 (figura 13), onde foi realizada a identificação da espécie da planta pela Botânica, Sonia Sales de Oliveira, coordenadora do referido Herbário.



Figura 13. Exsicata da espécie *Jatropha curcas* L. n° 118. Fonte: (Herbário FTC/Salvador-Ba).

#### 4.2.4 Preparação dos extratos de folhas de *Jatropha curcas* L.

As folhas do vegetal em estudo foram secadas em estufa de circulação de ar a 45°C, por 48 horas. Em seguida, os pecíolos foram descartados e preservou-se apenas a região do limbo foliar para o processo de trituração em multiprocessador. Retirou-se o material seco da estufa e foi triturada uma massa inicial de 1500g de folhas secas do vegetal (*Jatropha curcas* L.), utilizando-se multiprocessador (WALITA), padronizou-se 600g de pó verde que, foi transferida para um erlenmeyer de 2 L, adicionou-se 1,5L de solvente (Metanol P.A), coberto, posteriormente, por folha de alumínio com pequenos furos, iniciando-se o processo de maceração.

A cada três dias, filtrou-se o líquido da maceração em um frasco *erlenmeyer*, utilizando-se funil de cano longo e papel de filtro (Watman), obtendo-se o extrato hidroalcoólico bruto. Uma parte do material obtido (aproximadamente 50%) foi utilizada para o processo de partição por solventes (hexano, clorofórmio e acetato de etila); a outra parte (50% restante) foi concentrada em rotaevaporador a uma pressão reduzida (-700 atm, 40 °C e 90 rpm) do metanol.

##### 4.2.4.1 Técnica de partição por solventes

O processo para a extração vegetal, tendo como ponto de partida a partição por solventes orgânicos de polaridades diferentes utilizando uma dissolução seletiva e uma distribuição entre as duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, pode ser representada na ilustração a seguir (Figura14).

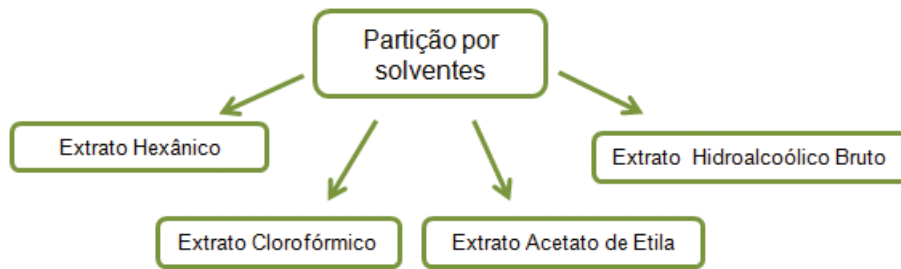


Figura 14. Esquema que retrata a obtenção dos extratos de *J. curcas* L. a partir da partição em solventes

Utilizou-se a técnica de partição por solventes (figura 15), a partir do extrato metanólico bruto, as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila.



Figura 15. Partição por solventes utilizando um funil de separação.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.4.2 Obtenção do extrato hexânico bruto

O extrato metanólico concentrado foi solubilizado com aproximadamente 300 mL da mistura metanol/H<sub>2</sub>O (270:30) e transferido para um funil de separação. Para tanto 300 mL de hexano, posteriormente, foram adicionados e extraídos. Repetiu-se 3 vezes a partição com hexano e as 3 extrações foram concentrados em rotaevaporados (40°C, 90 rpm).

#### 4.2.4.3 Obtenção do extrato clorofórmio bruto

Para a fase hidroalcoólico restante da partição por hexano, adicionou-se 500 mL de clorofórmio e repetiu-se, o mesmo procedimento descrito para o extrato hexânico.

#### 4.2.4.4 Obtenção do extrato acetato de etila bruto

Para a fase hidroalcoólico restante da partição por clorofórmio, adicionou-se 500 mL de acetato de etila e repetiu-se o procedimento descrito para o extrato hexânico. As frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila (figura 16), secas, foram dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/mL.



Figura 16. Soluções contendo extratos, hexano, clorofórmio e acetato de etila com acréscimo de metanol como solvente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.4.5. Obtenção do extrato hidroalcoólico Bruto

O extrato hidroalcoólico bruto foi ressuspenso em 20 mL de metanol para remoção total do extrato hidroalcoólico seco do balão de conservação. O extrato foi armazenado e seco em um béquer foi pesado em capela com exaustor, no intuito de evaporar todo o metanol utilizado. Após 24 h gerou-se apenas extrato hidroalcoólico bruto seco de aspecto pastoso de coloração verde e de odor forte.

#### 4.2.5 Atividade Biológica

##### 4.2.5.1 Material microbiológico

A avaliação da atividade antibacteriana de extrato a partir das folhas da *Jatropha curcas* foi realizada contra bactérias Gram-positivas das espécies como: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1), *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (C2), e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (C3), *Corynebacterium spp* ATCC 21745 (C4) e *Micrococcus spp.* ATCC 29829 (C5), foram fornecidos pelo Laboratório de microbiologia, Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Salvador, Bahia.

As bactérias foram mantidas em Agar nutrientes e conservadas em refrigeração (4°C) no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC) Salvador-Ba, sendo repicadas em intervalo de 30 dias para manter as colônias sempre viáveis.

Determinou-se a sensibilidade dos micro-organismos frente ao uso do extrato hidroalcoólico bruto seco, a partir do método de difusão em Agar – Técnica do Disco.

##### 4.2.5.1.1 Padronização da densidade do inóculo bacteriano

Como a densidade do inóculo influencia no resultado dos experimentos, padronizou-se a concentração do inóculo a ser utilizado, a fim de assegurar a

reprodutibilidade dos ensaios. Inicialmente preparou-se a escala 0,5 de *McFarland* que equivale à concentração bactéria ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para isso, adicionou-se 0,5 mL de cloreto de bário a 1% em 99,5 mL de ácido sulfúrico a 1%. Em seguida, transferiu-se 2 mL dessa suspensão para uma cubeta, cúbica de quartzo, espectrofotométrica (BIER, 1981). Para calibrar a transmitância a 100% em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm, utilizou-se água bidestilada.

#### 4.2.5.1.2 Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo dos inóculos foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1), *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (C2), e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (C3), *Corynebacterium spp* ATCC 21745 (C4) e *Micrococcus spp.* ATCC 29829 (C5). Cada bactéria foi transferida do meio de manutenção (Agar nutrientes), para o meio *Mueller Hinton* e incubada a 35 °C por 24 horas para ativação das culturas. Posteriormente, foram capturadas com o auxílio de uma alça de platina de 3 a 4 colônias da bactéria ativada em Agar *Mueller Hinton* e transferidas para tubos de ensaio com 4 mL de solução NaCl 0,9% estéril, seguido de homogeneização manual dos tubos por 20 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 530 nm, por comparação com a escala de 0,5 de *McFarland* (NCCLS, 2003).

#### 4.2.6 Método da difusão em Agar – Técnica do disco

##### 4.2.6.1 Preparo dos discos

O preparo dos discos de papel contendo antibióticos ou soluções contendo o extrato hidroalcoólico bruto seco seguiu a metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira, 5 edição (ANVISA, 2010).

Utilizou-se os discos de papel filtro secos medindo 6 mm ou 342 pixels de diâmetro, esterilizados pela autoclave a temperatura 121 °C/20'. Em câmara de



fluxo laminar (Pachane), distribuiu-se 10 a 15 discos em cada placa de Petri estéril 90 mm de diâmetro, previamente identificados, sendo uma placa para cada concentração teste de extrato hidroalcoólico bruto seco de *Jatropha curcas* L., uma placa de *petri* para o controle positivo antibiótico de referência (Vancomicina) e outra para o controle negativo (Metanol) solvente utilizado como veículo à impregnação do extrato nos discos.

Para tanto, foram pesados 100 mg de extrato hidroalcoólico bruto seco de *Jatropha curcas* L. em tubo *Falcon* de 15 mL e, posteriormente, foi adicionado 10 mL de metanol P.A., homogeneizado com o auxílio de Vortex por 10 segundos a temperatura ambiente.

Da solução Mãe (100 mg/10 mL) extrato/metanol, foi realizada 3 diluições: 1) a partir da solução Mãe, foi retirado 400 µL e acrescentado 600 µL de metanol em microtubo 1 de capacidade de 1,5 mL, que foi homogeneizado; 2) Da diluição 1, (400 µL/600 µL) solução/metanol, foi retirado uma alíquota de 500 µL e acrescido 500 µL de metanol em microtubo 2 homogeneizando-o e por fim, 3) da diluição 2 foi retirado uma alíquota de 500 µL e acrescentado 500 µL de metanol em microtubo 3 homogeneizando-o. Cada diluição foi utilizada para a impregnação de disco com o auxílio de micropipeta.

Para cada disco utilizado, foi inserido um volume padronizado de 5,5 µL de soluções testes e seus controles. Os discos impregnados com metanol (controle negativo), e metanol mais o extrato em diferentes concentrações foram conservados por 24 h em suas respectivas placas de acordo com o extrato e suas concentrações, no intuito de que, o metanol evaporasse por completo e não influenciasse no resultado. Sem deixar de ressaltar, o controle positivo, discos contendo vancomicina (Biolab) na concentração de 30 µg/disco. Os testes foram realizados em triplicatas.

Realizou-se teste para padronizar o volume adequado do extrato a ser transferido para cada disco de papel e a análise da preparação, no intuito de validar se o procedimento poderia ser realizado no mesmo momento ou em dias posteriores.

Assim, foi realizado ensaio antimicrobiano piloto, juntamente com a preparação dos discos (método da difusão em Agar) em vários tempos: 30 minutos, 5 horas,



24 horas, 48 horas, 72 horas e após 1 semana. Verificam-se, em ensaios que os discos impregnados com o extrato de *J. curcas* L., após 30 minutos poderiam ser utilizados no experimento (antibiograma) sem que o metanol influenciasse no resultado.

Foi realizado o teste de padronização no intuito de avaliar a atividade antimicrobiana através do método da difusão em Agar, utilizando discos de papel de filtro contendo os extratos da *J. curcas* L. nas concentrações 11 µg, 8,3 µg, 5,5 µg e 2,8 µg de extrato hidroalcoólico bruto seco de *J. curcas* L.

#### 4.2.6.2 Avaliação atividade do extrato de folha de *Jatropha curcas* L.

O teste utilizado para avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foi realizado utilizando a técnica de difusão em Agar *Mueller Hinton*- técnica do disco (BAUER; KIRBY; SHERRIS, 1966; ANVISA, 2010). O Agar *Mueller Hinton*, depois de fundido e previamente autoclavado 121 °C/20 min, foi depositado em placas de *Petri* estéril de 90 mm. Em seguida, após o meio ser solidificado, as placas foram acondicionadas e conservadas em geladeira a temperatura 5 °C até 72 h.

Retirou-se da geladeira as placas contendo meio *Mueller Hinton*, preparadas antecipadamente que fossem conservadas em repouso até atingir a temperatura ambiente 25 °C a 27 °C. Posteriormente, para a coleta das bactérias testes, foram retiradas do meio de preservação (Agar nutrientes) 4 °C do banco de colônias do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI). As cepas bacterianas foram repicadas no Agar *Mueller-Hinton* e conservadas em estufa bacteriológica (37 °C/24 h), no intuito de revitalizar as colônias.

Com o auxílio da alça de platina estéril após crescimento bacteriano em Agar *Mueller-Hinton*, foram coletadas 3 a 4 colônias de cada bactéria teste e inoculadas em tubos de ensaio com rosca, contendo 5,0 mL de solução salina

homogeneizando-as até atingir a turbidez correspondente a 0,5 da escala de *McFarland* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) ou 530 nm de absorvância no espectro.

Logo após, foram pipetados 100  $\mu$ L da solução salina contendo as bactérias teste e distribuídas uniformemente sobre a superfície do *Agar Mueller Hinton*, utilizando-se *Swab* estéril para o espalhamento. As placas permaneceram em repouso, em temperatura ambiente, até a solução ser adsorvida pelo *Agar* (aproximadamente 3 minutos).

Utilizando-se uma pinça esterilizada, foram distribuídos os discos de papel de filtro impregnados com as soluções teste e controles uniformemente sobre a superfície do *Agar* previamente inoculado com as cepas bacterianas com um intervalo mínimo de 15 mm de distância entre os discos.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24-48 h. Após a incubação, foram fotografadas as placas e medidos os halos de inibição do crescimento bacteriano através do programa informatizado *Image Manipulation program GIMP* (<http://www.gimp.org/Downloads>).

A análise da atividade antimicrobiana foi determinada com base no diâmetro dos halos de inibição bacteriana através da fórmula matemática retratada pela figura 17.

$$H = (\varnothing_1/3) - (\varnothing_2/3)$$

H – Halo de inibição bacteriana

$\varnothing_1$  – Soma dos diâmetros em triplicata da circunferência total

$\varnothing_2$  – Soma dos diâmetros em triplicata da circunferência do disco

Figura 17. Fórmula matemática para determinar o halo de inibição bacteriana através da técnica do disco em meio sólido.

#### 4.2.6.3 Análise do perfil cromatográfico dos processos extrativos

A avaliação do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC) Salvador-Ba. Na CLAE, utilizou-se uma coluna

Lichrospher Merck C18 semipreparativa (4,5 ml de volume de leito de poros e 10  $\mu$ m) com coluna equilibrada a 40 °C a um fluxo de 6 mL/min. Na fase móvel, utilizou-se o metanol a um fluxo de 4mL/min. O extrato analisado foi preparado na concentração de extrato 1 mg/mL de MeOH. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L com detecção por absorvância no UV a 210 nm, utilizando-se o metanol na eluição de forma gradiente. Da mesma forma, o fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico bruto seco de *J. curcas* L., foi realizada utilizando C18 semipreparativa (4,5 ml de volume de leito de poros e 10  $\mu$ m) com coluna equilibrada a 40 °C a um fluxo de 6ml/min. Sendo que a detecção, foi realizada por absorvância no UV a 210 nm com eluição isocrática 90:10 metanol/água respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Identificação botânica do material vegetal

Embora os vegetais apresentem diversos compostos originários do seu metabolismo tanto primário como secundário os compostos bioativos apresentam em sua maioria menor concentração e, portanto, a análise dessas substâncias ativas torna-se complexa e demorada (MALHERIROS *et al.*, 2001).

O extrato metanólico bruto, e o extrato hexânico, clorofórmico e acetato de etila das folhas da *Jatropha curcas* L. foram submetidos aos ensaios de avaliação de atividade antibacteriana, como descritos no item 6.2.6.2. O extrato com maior atividade foi direcionado para o fracionamento através do CLAE e à difusão em meio sólido (técnica do disco) como análise qualitativa.

A espécie *Jatropha curcas* L., foi identificada pelo Departamento de Biologia (DB), especificamente no Herbário da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC) Salvador-Ba, onde há uma exsicata 118.

### 5.2. Rendimento obtido no processo de extração

A partir da extração hidroalcoólica ou metanólica seguido da técnica de partição mais rotaevaporador, resultou nos extratos metanólico, hexânico, clorofórmio e acetato de etila, nas concentrações aproximadamente de 29,7g/L, 4,6g/L, 23,7g/L e 2,1g/L e rendimentos de 4,95%; 0,77%; 3,95%; e 0,35%, respectivamente.

### 5.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Jatropha curcas* L.

Inúmeras pesquisas estão sendo feitas em todo o mundo com vegetais que têm sido comprovados propriedades antimicrobianas. Assim, estas propriedades antimicrobianas são estudadas e avaliadas através de estudos e ensaios *in vitro* como o teste de susceptibilidade ou sensibilidade (SOUZA *et al.*, 2003). Sendo

assim, para iniciar o estudo biomonitorado pela atividade antibacteriana, o extrato hidroalcoólico bruto seco a partir das folhas de *Jatropha curcas*, foram ensaiadas pela metodologia da difusão em Agar (técnica do disco), com o intuito de avaliar o perfil de sensibilidade frente bactérias patogênicas, Gram-positivas.

Os extratos isolados das folhas da *Jatropha curcas* L. foram avaliados quanto a sua capacidade em inibir o crescimento e/ou destruir os microorganismo *in vitro*. Utilizou-se a técnica do disco em Meio Sólido (Agar *Mueller Hinton*) como análise qualitativa. Sendo assim, para a determinação da atividade antibacteriana foram utilizadas as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1), *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (C2), e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (C3), *Corynebacterium spp* e *Micrococcus spp*, representando o grupo das Gram positivas conforme mostra a figura 19.

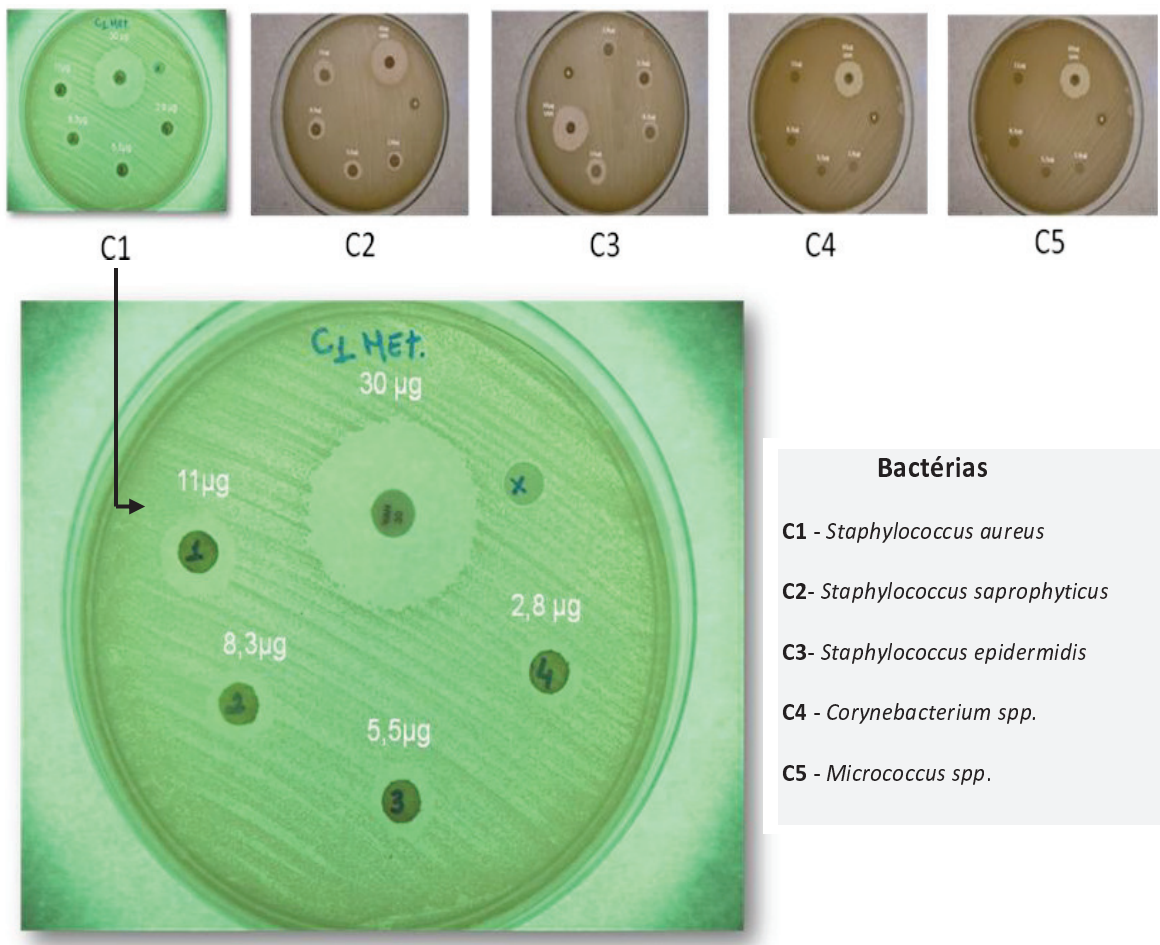
Através da avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico e extrato (hexânico, clorofórmio e acetato de etila) pela técnica do disco em difusão em Agar apresentaram somente atividade inibitória dos extratos metanólico e hexânico contra: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (C1), *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 (C2), e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (C3). Por outro lado, os extratos não exibiram inibição contra *Corynebacterium spp* ATCC 21745 (C4) e *Micrococcus spp*. ATCC 29829 (C5). Os extratos Clorofórmio e Acetato de etila não apresentaram nenhuma atividade antibacteriana contra as cepas de bactérias testadas.

O inóculo bacteriano em meio *Mueller Hinton* e adição dos discos em triplicata, devidamente impregnados com o extrato metanólico e hexânico, após 24 horas apresentaram formação de halo circundante ao disco, demonstrando potencial inibitório ao crescimento bacteriano.

De acordo com a análise de proporcionalidade entre os halos de inibição e a concentração o extrato metanólico e hexânico no método de difusão com uso dos discos, houve diferença entre as quatro concentrações testadas, ou seja,  $2,8 \mu\text{g} < 5,5 \mu\text{g} < 8,3 \mu\text{g} < 11 \mu\text{g}$ . No entanto, no que diz respeito à quantidade de produto vegetal, não houve inibição proporcional pela formação de halo, sugerindo ser pela dificuldade do extrato e solvente em difundir-se proporcionalmente no meio sólido pela diferença de polaridade.

A atividade antibacteriana observada permitiu concluir que, conforme mostra a tabela 1, para as espécies ensaiadas, o extrato hidroalcoólico bruto seco apresentou atividade apenas para o gênero Gram-positivo (*Staphylococcus*), não apresentando assim, nenhuma inibição do crescimento nas demais bactérias testadas. Estes resultados, provavelmente, estão relacionados com as diferenças na composição química da membrana existem entre os grupos de bactérias, como permeabilidade, composição e estrutura da parede celular.

De acordo com a figura 18, verifica-se a inibição do crescimento bacteriano da cepa de *S. aureus* através da formação do halo em torno dos discos impregnados com extrato hidroalcoólico bruto seco de *Jatropha curcas* L., representados pelos discos 1 a 4, maior concentração para menor concentração, respectivamente, demonstrando atividade proporcional da concentração do extrato teste utilizada na impregnação. Além disso, é importante salientar que em todas as cepas de bactérias testadas apresentaram intensa inibição do crescimento bacteriano em torno do disco controle positivo, 30µg de vancomicina (Van 30). No entanto, quanto ao controle negativo (controle X) não houve inibição do crescimento bacteriano, impregnado exclusivamente com metanol, solvente usado para veicular o extrato hidroalcoólico bruto seco de *Jatropha curcas* L.



- Bactérias**
- C1** - *Staphylococcus aureus*
  - C2** - *Staphylococcus saprophyticus*
  - C3** - *Staphylococcus epidermidis*
  - C4** - *Corynebacterium spp.*
  - C5** - *Micrococcus spp.*

Figura18. Atividade antibacteriana do extrato hidrolalcóolico bruto de *Jatropha curcas* L. contra retratada pela formação de halo ao redor dos discos 1) 11µg; 2) 8,3µg; 3) 5,5µg; 4) 2,8µg; controle positivo (vancomicina 30µg) e não formação de halo (X) controle negativo.

Como podem ser evidenciados na Tabela 1 e 2, os ensaios de atividade antibacteriana demonstraram que o extrato metanólico e extrato hexânico, respectivamente, a partir das folhas da *Jatropha curcas* L., apresentaram atividade contra bactérias do gênero *Staphylococcus*, revelando que esta planta apresenta especialidade contra este grupo de bactérias.

Tabela 1 – Atividade antibacteriana do extrato metanólico *J. curcas* L. pelo método da difusão em Agar (Técnica do disco).

Média* ± EPM do halo de inibição					
Bactérias	Controle	Concentração do extrato metanólico da <i>Jatropha curcas</i> L.			
	Positivo	11µg	8,3µg	5,5µg	2,8µg
C1	420,5* ± 0,5	144,5* ± 16,3	125,1* ± 7,7	102* ± 10,4	92,6* ± 1,8
C2	469,9* ± 0,7	185,5* ± 14,7	164,3* ± 8,2	120,7* ± 15,1	101,5* ± 14,7
C3	416,1* ± 0,2	166* ± 3,8	146,8* ± 14,3	111,6* ± 14,5	90,3* ± 3,6
C4	480,5* ± 0,5	**	**	**	**
C5	423,5* ± 0,5	**	**	**	**

*Staphylococcus aureus* (C1), *Staphylococcus saprophyticus* (C2), *Staphylococcus epidermidis* (C3), *Corynebacterium spp* (C4) e *Micrococcus spp* (C5). Controle positivo: Vancomicina 30 µg; (\*) Média de três ensaios; (\*\*) não aplicável, pois não houve formação de halo de inibição.

Tabela 2 – Atividade antibacteriana do extrato hexânico *J. curcas* L. pelo método da difusão em Agar (Técnica do disco).

Média* ± EPM do halo de inibição					
Bactérias	Controle	Concentração do extrato hexânico da <i>Jatropha curcas</i> L.			
	Positivo	11µg/mL	8,3µg	5,5µg	2,8µg
C1	420,5* ± 0,5	132* ± 1,0	109,8* ± 6,1	95,8* ± 1,8	91,1* ± 0,7
C2	469,9* ± 0,7	86,6* ± 1,9	107,3* ± 16,8	86,8* ± 6,5	67,6* ± 2,8
C3	416,1* ± 0,2	112,8* ± 5,3	81,9* ± 5,3	73,4* ± 5,4	69,4* ± 10,2
C4	480,5* ± 0,5	**	**	**	**
C5	423,5* ± 0,5	**	**	**	**

*Staphylococcus aureus* (C1), *Staphylococcus saprophyticus* (C2), *Staphylococcus epidermidis* (C3), *Corynebacterium spp* (C4) e *Micrococcus spp* (C5). Controle positivo: Vancomicina 30 µg; (\*) Média de três ensaios; (\*\*) não aplicável, pois não houve formação de halo de inibição.



O controle negativo (metanol) não apresentou atividade antimicrobiana frente a nenhum micro-organismo testado. No entanto, o controle positivo (antibiótico Vancomicina) apresentou inibição dos micro-organismos testados conforme o esperado. O tratamento de escolha para *Staphylococcus* é a penicilina, porém, o surgimento e disseminação de amostras resistentes, atribuído à produção de enzimas denominada penicilinases ou betalactamases, codificada por genes plasmidiais, vem limitando a atuação deste fármaco (TAVARES, 2002).

Além disso, meticilinas e outras penicilinas semissintéticas (oxacilina e cloxacilina) depois de um período de dois anos aproximadamente do início do seu uso, apresentam resistência que sugere estar relacionadas as proteínas ligadoras de penicilinases (PBP), sendo que seus determinantes gênicos parecem ser cromossomais. Para tanto, utilizou-se a vancomicina como controle positivo neste ensaio, pois este antibiótico apresenta melhor alternativa terapêutica principalmente em infecções graves, empregado no tratamento específico para bactérias Gram-positivas (TAVARES, 2002).

As culturas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentaram halos crescentes de inibição de crescimento bacteriano de acordo com os extratos e as concentrações testadas, como são observados nas figura 19 a 24.

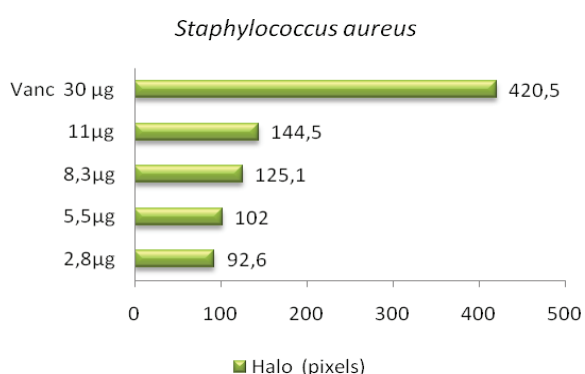


Figura 19. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* pelo extrato metanólico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

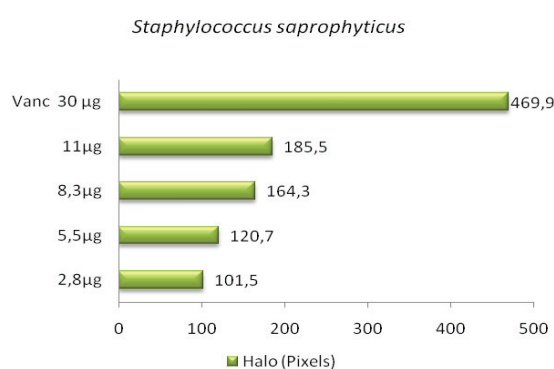


Figura 20. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Sataphylococcus saprophyticus* pelo extrato metanólico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

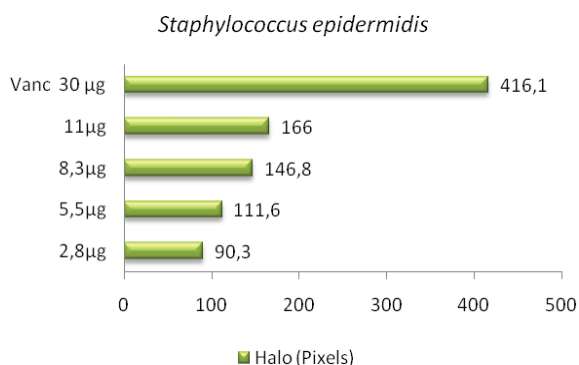


Figura 21. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis* pelo extrato metanólico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

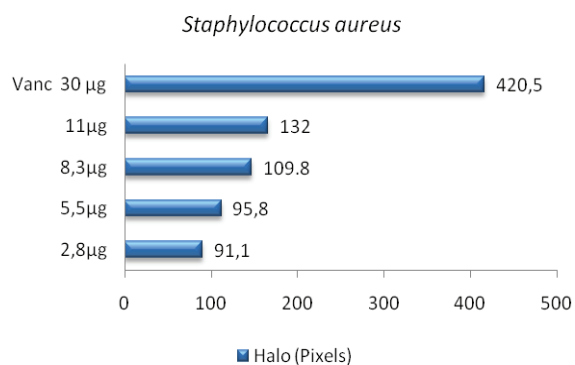


Figura 22. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* pelo extrato hexânico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

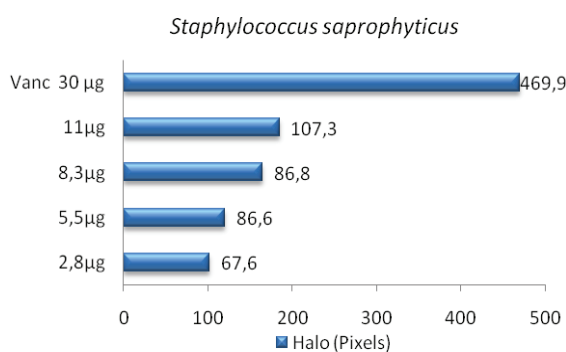


Figura 23. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* pelo extrato hexânico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

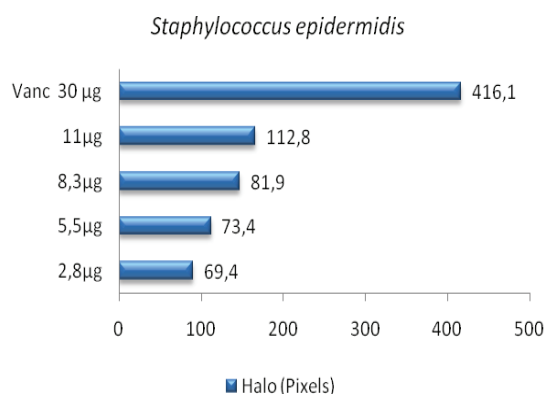


Figura 24. Halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis* pelo extrato hexânico obtidos em comparação ao antibiótico de referência.

Para Srinivasan e colaboradores (2001), há uma relação entre o teor de determinadas substâncias ativas existentes na planta e a atividade dessas substâncias contra bactérias Gram-positivas, pois estas apresentam parede celular quimicamente menos complexa, menor teor lipídico e ausência de uma membrana celular externa em comparação com as Gram-negativas.

Inúmeros pesquisadores relatam, em seus experimentos, que a relação entre a sensibilidade microbiana aos extratos de vegetais e a estrutura celular das bactérias não estão bem definidas, e também não possuem uma regra geral para

tais interações. Sendo assim, é proposto que uma ação inibitória mais eficaz ou menos eficaz dos extratos sobre as bactérias podem ser associadas à peculiaridade da composição dos extratos agindo sobre a composição celular dos micro-organismos (DORMAN; DEANS, 2000).

De acordo com os resultados da formação de halo, inibição do crescimento bacteriano, verifica-se que, o extrato metanólico em relação ao extrato hexânico apresentou maior atividade antibacteriana. Os dados são apresentados na Figura 25.

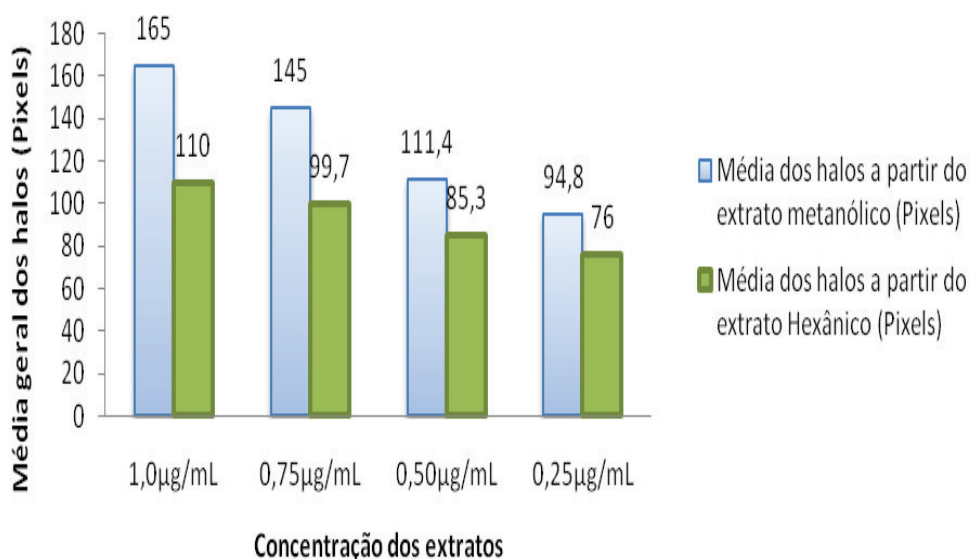


Figura 25. Análise dos extratos com atividade antibacteriana.

#### 5.4. Análise da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Jatropha curcas* L.

O extrato alcoólico de *J. curcas* L., por ter apresentado maior formação de halo circundante ao disco (atividade antibacteriana), para todas as espécies de *Staphylococcus* testadas. O extrato hidroalcoólico bruto seco configurou-se como o extrato de maior eficiência para ser utilizado no fracionamento do extrato de folhas de *Jatropha curcas* L. Para tanto, a figura 26, retrata a inibição de

crescimento dos micro-organismos sensíveis de acordo com a avaliação dose resposta.

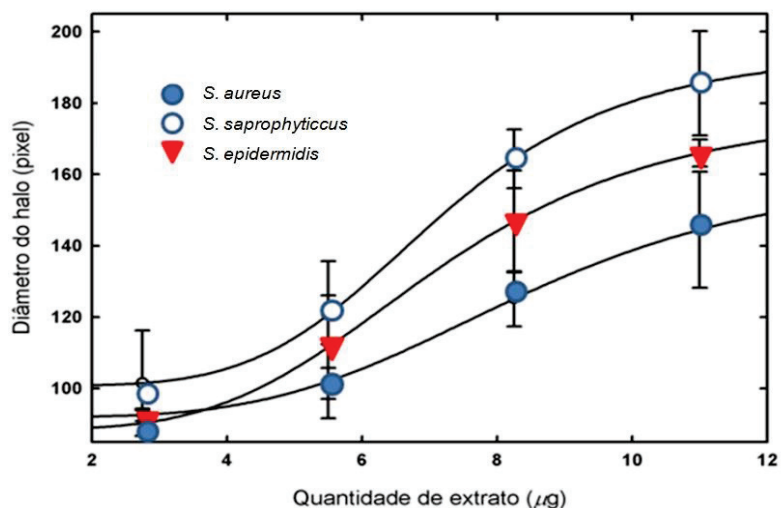


Figura 26. Avaliação dose resposta do extrato hidroalcoólico bruto de *Jatropha curcas* L. contra bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Em prosseguimento ao estudo biomonitorado, a investigação concentrou-se na análise preparativa do extrato (absorbância de 1 mg/ml e 0,1 mg/ml) por varredura utilizando comprimento de ondas diferentes determinadas pelo espectrofotômetro UV/VIS tendo como branco o etanol. Como segue na figura 27.

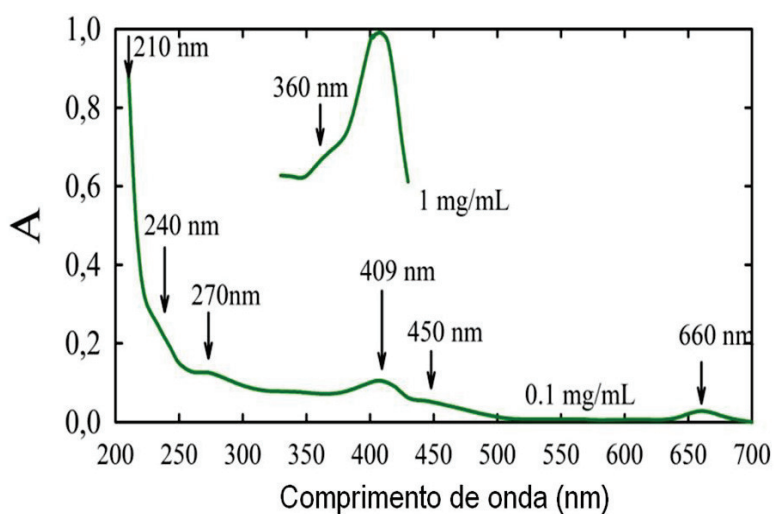


Figura 27. Espectro de absorção UV/Vis do extrato hidroalcoólico bruto seco de *J. curcas* L.

De acordo com Skoog (2002), cada comprimento de onda no espectrofotômetro pode ser um indicador de determinados metabolitos secundários de vegetais. Para tanto, segue (Tabela 3), a correlação dos comprimentos de ondas e possíveis compostos orgânicos de origem vegetal.

Tabela 3. Bandas de absorção eletrônica de cromóforos

<b>Função orgânica</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Comprimento de onda</b>
Aldeído	-CHO	210
Amino	O	195
Brometo	-Br	208
Carbonila	=C=O	195
		270-285
Carboxila	-COOH	200-210
Dissulfeto	-S-S	194
		255
Éster	-COOR	205
Éter	-O-	185
Nitro	O	210
Nitroso	-NO	302
Tiocarbonila	=C=S-	205
Tioeter	-S-	194
		215
Tiol	-SH	195

Fonte: SKOOG, HOLLER; NIEMAN, (2002).

### 5.5 Monitoramento do perfil cromatográfico através da CLAE

A análise cromatográfica com o auxílio da CLAE desenvolveu-se com a finalidade de monitorar possíveis alterações no perfil cromatográfico decorrentes do processo de extração do material vegetal. Para isso, procedeu-se com a escolha do  $\lambda$  (comprimento de onda) a ser utilizado no detector do equipamento CLAE, através da análise do espectro do UV da fração apolar. Dessa forma, os cromatogramas permitiram a visualização do perfil químico do extrato. Pode-se observar que o cromatograma realizado com  $\lambda$  210 nm apresentou com maior

clareza os picos no cromatograma (figura 28), ao aumentar o valor de  $\lambda$  diminui a detecção pelo equipamento.

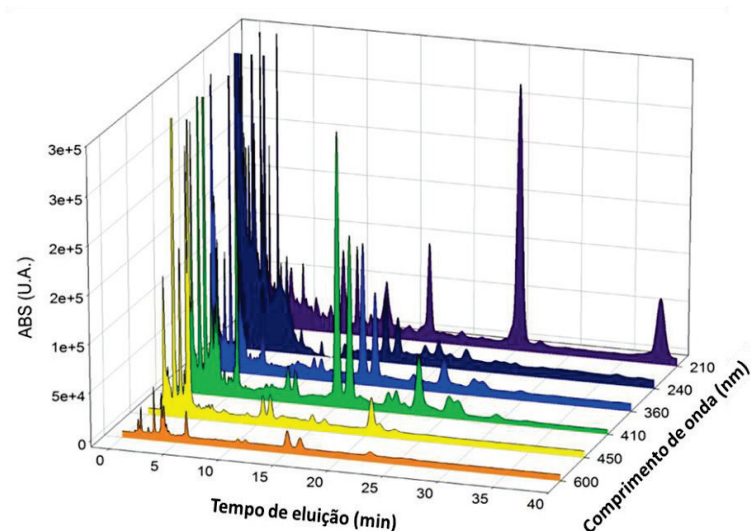


Figura 28. Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico bruto seco de *J. curcas* L. por CLAE.

### 5.6 Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto seco de *J. curcas* L. a partir da CLAE

A análise cromatográfica, para o fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto seco de *Jatropha curcas* realizou-se a partir da Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE), com um Lichrospher Merck C18 semi-preparativa (4,5 mL de volume de leito de poros e 10 mm) com coluna equilibrada a 40 °C a um fluxo de 6ml/min. A detecção foi feita por absorvância no UV a 210 nm. A figura 29, mostra um cromatograma com eluição isocrática, com metanol a 100%. Este cromatograma, gerou vários grupos de picos que foram enumerados como: FI, FII, FIII, FIV, FV e FVI, foram testados separadamente pelo teste do disco em meio sólido contra a espécie *Staphylococcus aureus*. Dos seis grupos de picos gerados pelo CLAE, apenas o grupo FI com o tempo de retenção até 4 minutos, demonstrou atividade antibacteriana. Enquanto na figura 30, mostra a

cromatografia executada com eluição isocrática 90:10 metanol/água respectivamente. O metanol com o acréscimo de água 10% possibilitou ainda que parcialmente, a separação dos picos, que a princípio encontravam-se quase que sobrepostos no grupo FI.

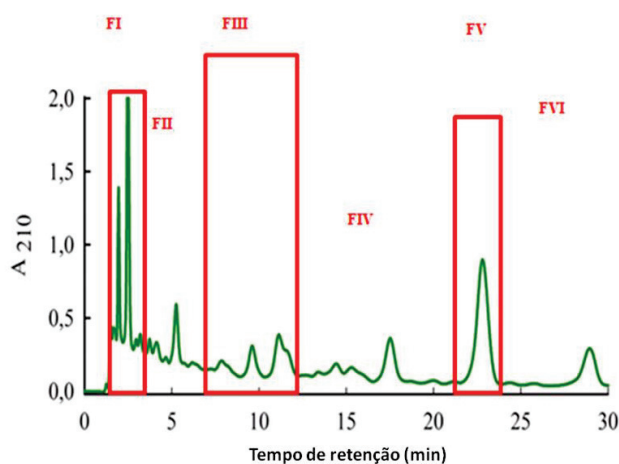


Figura 29. Fracionamento biodirecionado a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *Jatropha curcas* utilizando CLAE com eluição isocrática metanol 100%.

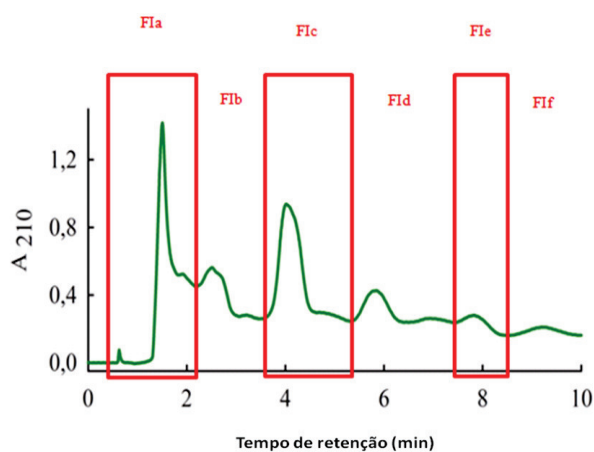


Figura 30. Fracionamento biodirecionado a partir do grupo de picos (FI) do extrato hidroalcoólico de *Jatropha curcas* L. gerado pela CLAE com eluição isocrática metanol/água 90:10 respectivamente.

Os picos foram reunidos, a partir de corridas semipreparativas utilizando a CLAE. O Metanol foi separado das frações por rotaevaporador a 40 °C e 120 rpm. As frações secas foram ressuspensas em metanol, que posteriormente foram acrescidos nos discos padronizados para o ensaio (antibiograma) e determinada a atividade antibacteriana, através da formação de halo de inibição de crescimento bacteriano em meio sólido através do Teste do disco, como é visualizada na Figura 18.

### 5.7 Atividade antibacteriana de frações do extrato hidroalcoólico bruto de *J. curcas* L. contra *Staphylococcus aureus*

Os picos ou frações obtidos por separação em CLAE foram testados em relação à atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Dos nove picos testados no ensaio do disco em meio sólido (técnica do disco), apenas um único pico do cromatograma demonstrou atividade antibacteriana pela formação de halo ao redor do disco 2 (fração dois). Figura 31.

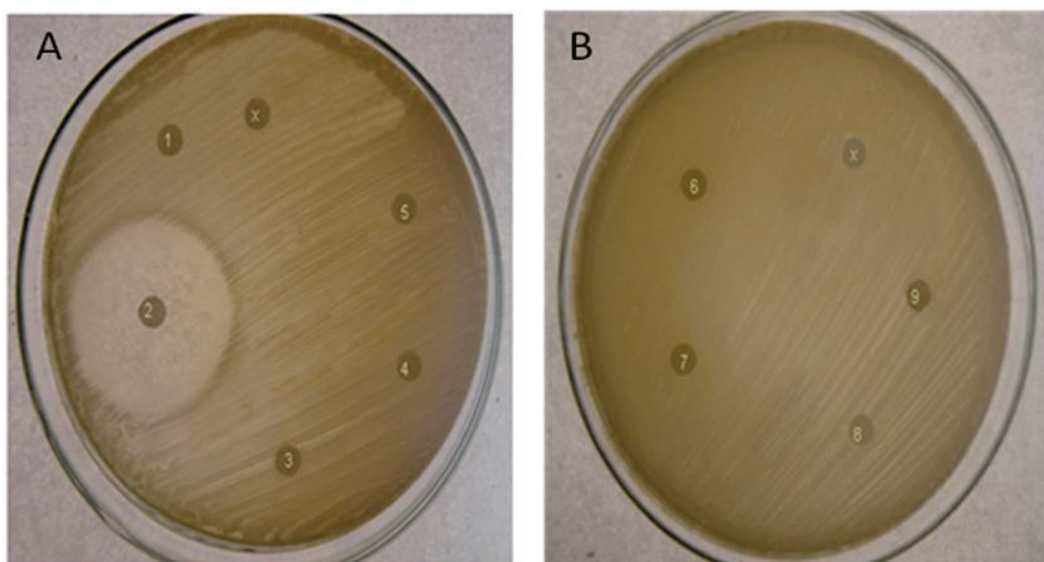


Figura 31. Atividade antibacteriana da *Jatropha curcas*. Frações obtidas por CLAE. (A) frações 1 a 5, (B) frações 6 a 9 e (X) controle negativo (metanol) pela técnica do disco em meio sólido.



Verificou-se que, de todas as frações testadas (1 a 9) obtidas pelo auxílio do CLAE no ensaio, teste do disco, para avaliar a atividade antibacteriana das frações do extrato hidroalcoólico de *Jatropha curcas* L., contra a espécie bacteriana *Staphylococcus aureus*, apenas há evidência formação de halo (atividade antibacteriana) circundando o disco de número (2) que corresponde a fração 2. Dessa forma, sugere-se que, o composto bioativo com possível potencial de atividade antibacteriana, esteja concentrado neste pico.

#### 5.8. Análise comparativa da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto seco, frações do extrato por CLAE e da Vancomicina

Realizando uma comparação do antibiótico de referência, Vancomicina 30 µg (Controle positivo), com o extrato hidroalcoólico bruto 11 µg e, a fração (2) 3,6 µg (Tabela 3), verifica-se que, a fração 2, hidroalcoólica detém maior inibição do crescimento bacteriano da espécie *Staphylococcus aureus* (C1), pois a fração 2, apresentou aproximadamente 45% a mais do valor em pixels do seu halo quando comparado à vancomicina em mesma proporção, ou seja, 3,6 µg.

Tabela 4. Análise comparativa da atividade antibacteriana da fração 2 do extrato hidroalcoólico, extrato hidroalcoólico bruto e a Vancomicina contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Discos	Concentração	Atividade Antibacteriana
Fração 2	3,6 µg	789* ± 0,21
Extrato hidroalcoólico	11 µg	144,5* ± 0,37
Vancomicina	30 µg	420,5* ± 0,5

± Desvio padrão das médias dos halos de inibição bacteriana.

\*Médias dos halos em pixels (atividade antibacteriana).

O composto ativo, conservado pela fração 2, a partir, do fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto de *Jatropha curcas* L., por Comatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE), caracteriza atividade antibacteriana contra a o *Staphylococcus aureus* através da técnica do disco (*Agar Miller Hinton*), por apresentar formação de halo de inibição bacteriana. Dessa forma, é evidente a constatação de que o componente vegetal bioativo a partir do extrato de folhas de *Jatropha curcas* L., sugere ser substância de grande importância, no que diz respeito, a atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus*, pois esta bactéria é uma das maiores causadoras de infecções hospitalares e que pode propiciar agravos de enfermidades ou até mesmo a morte do ser humano.

## 6. CONCLUSÃO

Extratos obtidos através das folhas de *Jatropha curcas* L., apresentaram pronunciada atividade antibacteriana, através da técnica do disco em meio sólido, contra bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*.

Verificou-se, que os extratos hidroalcoólico e hexânico de *J. curcas* L., demonstraram atividades específicas contra as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*) e não foi evidenciada atividade antibacteriana contra as bactérias (*Corynebacterium spp* e *Micrococcus spp*).

Utilizou-se o extrato hidroalcoólico bruto seco e a cepa da espécie *Staphylococcus aureus*, como padrões nos ensaios de biodirecionamento para o fracionamento e purificação do composto vegetal ativo, pois o extrato hidroalcoólico apresentou melhor atividade antibacteriana e a cepa *Staphylococcus aureus* melhor reprodutividade dos resultados.

Apenas a fração 2 do extrato hidroalcoólico, demonstrou atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus*, que quando comparada ao extrato hidroalcoólico bruto e a Vancomicina, controle positivo, pela Técnica do Disco em meio sólido, apresentou maior atividade antibacteriana.

O extrato antibacteriano de folhas do pinhão-manso constitui uma perspectiva para obtenção de antibiótico natural, por apresentar evidente atividade antibacteriana frente aos micro-organismos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis*, e contribui para justificar o uso da *Jatropha curcas* L. no tratamento de infecções pela medicina popular.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACAR, J. F. **Resistance mechanisms**. *Semin Respir Infect*, v. 17, n. 3, p.184-8, 2002.
- ACHTEN, W.; NIELSEN, L.; AERTS, R.; LENGKEEK, A.; KJAER, E.; TRABUCCO, A., HANSEN, J.; MAES, W.; GRAUDAL, L.; AKINNIFESI, F.; MUYS, B. **Towards domestication of *Jatropha curcas***. *Biofuels*, 1, p.91-107. 2010.
- ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. **Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species**. *Phytochemistry*, v.23, p.129-132, 1984.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) / Fundação Oswaldo Cruz. **Farmacopeia Brasileira**, Copyright ©, v.1, 5 ed. Brasília, 2010.
- AKRAM, M.; SHAHID, M.; KHAN, A. U. **Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India**. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.6:4, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. Etnobotânica: uma **aproximação teórica e epistemológica**. *Revista Brasileira de Farmacologia*. v.78, n.3, p.60-64, 1997.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, C. H. L. **Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso Agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil)**. *Interciências*. v.27, n.7, p.335-364, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; COOPER, E. L.; MEDEIROS, M. F. T.; RÔMULO, R. N. A.; LADIO, A. H., **Medical Ethnobiology and Ethnopharmacology in Latin America**. *Hindawi Publishing Corporatio, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2012, Article ID 379160, 2 pages, doi:10.1155/2012/379160, 2011.
- ALEXIADES, M. Diretrizes selecionados para a pesquisa etnobotânica: um manual de campo. New York Botanical Garden, em Nova York, 1996.
- ALLEM, A. C. **Notas sistemáticas y nuevos sinónimos em euphorbiaceae da américa del sur - iii**. *revista brasil. biol.* 37: 103-109, 1977.
- ALMASSY, A. A.; LOPES, R. C.; SILVA, F.; ARMOND, C.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá – plantas medicinais na terapêutica humana**, Editora UFV, p.233. 2005.
- ALMEIDA, E. R. de. **Plantas medicinais: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: HEMUS, p.341. 1993.
- ALVAN, G.; EDLUND, C.; HEDDINI, A. **The global need for effective antibiotics - a summary of plenary presentations**. *Drug Resistance Updates*, 14, p70-76. 2011.

AMOROZO, M. C. M. **A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais.** In: DI STASI, L. C. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar.* Botucatu: UNESP, p. 47-68, 1996.

ANGELA, K.; GOETZ, M. R. **Meeting the challenge of food and energy security,** *food security Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 10, pp. 3263–3271, 2011 doi:10.1093/jxb/err099

AQUINO, D. S. Por que o uso racional de medicamentos deve ser uma prioridade? *Ciência & Saúde Coletiva*, vol. 13, núm. Sup, pp. 733-736 2008.

ARRUDA, F. P.; MACÊDO, N. E. B.; ANDRADE, A. P.; WALTER, E. P.; LIV S. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

ASSUMPÇÃO, R. M. Dissertação de mestrado. **“Visão de mercado sobre disponibilidade de matérias-primas para produção de biodiesel.** Estudo de caso no Estado do Paraná”, 119, pg, 2006.

AYANBIMPE, G. M.; O. J. O, T. K.; AFOLABI, E.; OPARA, F.; ORSAAH, S.; OJERINDE, O. S. **Evaluation of extracts of *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* in culture media for selective inhibition of saprophytic fungal contaminants.** *J Clin Lab Anal* , 23 (3), 2009.161-4.

BALUNAS, M. J., KINGHORN, D. **Drug discovery from medicinal plants.** *Life Sciences*. 78, 2005. p.431-41.

BARROSO, G. M., GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** v. 2. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1991.

BARROW, E. G. C.: **The dry lands of Africa: Local participation in tree management Nairobi, Initiative,** Publishers; 1996.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M., SHERRIS, J. C., **Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** *Am J Clin Pathol*, 45: 493-6. 1966.

BEFSCI, **Bioenergy and Food Security Criteria and Indicators,** Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Environment and natural resources management working paper, ed. 52 pg.3-24, 2004.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. **Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids.** *Bioresource Technology*, v.99, p.1716-1721, 2008.

BERLIN, B. **On the making of a comparative ethnobiology.** In: *Ethnobiological Classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies*, Princeton, Princeton University. 1992.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e à higiene**, Ed. Melhoramentos: São Paulo, 1981.

BINTENCOURT, M. J. C., SANTANA-BASTOS, E. M., MOREAU, V. H., GONZALES, A. D. F., **Desenvolvimento de cosmeceuticos a partir de extratos antibacterianos de pinhão-manso**. diálogos & ciência – revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências – Rede de Ensino FTC. ISSN 1678-0493, Ano 9, n. 27, set. 2011.

BIODIESEL 2006. **Selo Combustível Social**. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/selo.htm>> Acesso em 10/12/2008.

BNDES, CGEE, FAO e CEPAL. **Bioetanol de cana-de-açúcar Energia para o desenvolvimento sustentável**, 2008.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste – especialmente do Ceará**. 3.ed., v. XLII comemorativa do II congresso Brasileiro de florestas tropicais – Mossoró: Escola superior de agricultura de Mossoró, 1976.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS ANP. **Autorizações para produção de biodiesel**. 2011. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=29048&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebut=1302790803656>> Acesso em: 14/05/2011.

BRASIL. Governo Federal. Biodiesel - **O Novo Combustível do Brasil**. 2009. Disponível em <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>> acesso em: 10/09/2012.

BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2010. Disponível em<[http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=1605](http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1605)>, acesso em: 14/05/2011.

BRASIL. Decreto Presidencial nº 5813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RDC no. 10 de 09 de Março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)** e dá outras providências. [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em agost. de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. BRICKS L. F. Uso judicioso de medicamentos em crianças. *J Pediatr* 2003; 79:107-114.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. **Relatório de Gestão 2006/2010: Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 148p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério de Minas e Energia MME. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel**. Disponível em <<http://www.mme.gov.br>> Acesso em 15 ., 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **“Balanço Energético Nacional 2004, Ano Base 2003”**. Secretaria de Energia, República Federativa do Brasil, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Matérias-primas utilizadas à produção de biodiesel no Brasil**. 2013. Disponível em:<<https://.anp.gov.br/>> Boletins ANP março de 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DE RELAÇÕES EXTERIORES-MRE. **“O Brasil em foco, O Brasil e a economia mundial contemporânea — Agroindústria — Biomassa”**, 2004. Disponível em <[www.mre.gov.br](http://www.mre.gov.br)>. Acesso em 22 jan., 2011.

BRASIL. **Plano Nacional de Agroenergia 2006 – 2001**. Brasília-DF 2005.

BRASIL. **Portaria Interministerial no 2.960, de 09 de dezembro de 2008**. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 dez. 2008a. Seção 1. p.56.

CAMARGO, C. B.; PEDRO, C. C.; LOURENÇO, D. S.; GIRONI, R. H.; MARTINEZ, R. **Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto: Etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas**. Medicina, Ribeirão Preto.35:173–8, 2002.

CAMARGO, R.; MALDONADO, A. C. D.; SILVA, P. A.; COSTA T. R. Biossólido como substrato na produção de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Engenharia Agricultura e Ambiental**, v 14, p. 1304-1310, 2004.

CAMPOS, A.; CARMELIO, E. C. **Biodiesel e agricultura familiar no Brasil: resultados socioeconômicos e expectativa futura**. In: O futuro da indústria: Biodiesel, 2006.

CASAS, F. J. F.; DOMINGUEZ, J. M. P. **Cnidoscolum notulae (Euphorbiaceae)**: C. infestus Pax & K. Hoffm. Adumbrationes ad Summae Editionem 13: 1-28, 2005.

CHIMBARI, M. J.; SHIFF, C. J. A. **Laboratory assessment of the potential molluscicidal potency of Jatropha curcas aqueous extracts**. African Journal of Aquatic Science, v. 33, n. 3, p. 269-273, 2008.

CLARDY, J.; WALSH, C. **Lessons from natural molecules.** Nature, 432, 829. 2004. (16 December 2004) doi:10.1038/nature03194

CNPE – **Conselho Nacional de Política Energética.** 2008. Resolução CNPE 02/2008. Disponível em [www.mme.gov.br/site/menu](http://www.mme.gov.br/site/menu). Acesso em 01/02/2014.

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. **Microbial resistance to drug therapy: a review.** Am J Infect Control. 25(1):51-64. 1997.

COOPER, S. **Crescimento bacteriano e divisão.** Academic Press, Nova Iorque, EUA, 1991.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. S. **Euphorbiaceae.** In: M.R.V. Barbosa, C. Sothers, S. Mayo, C.F.L. Gamarra & A.C. Mesquita. (orgs.). Checklist das plantas do Nordeste brasileiro v.1: **Angiospermas e Gymnospermas.** Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, pp.71-74. 2006.

DALCOLMO, M. P. **Tratamento da tuberculose sensível e resistente.** Treatment of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Forms of Tuberculosis. Pulmão RJ; 21(1):55-59, 2012.

DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica Brasileira.** São Paulo: Companhia das Letras, 1996.

DEVAPPA, R. K., MAKKAR, H. P., & BECKER, K. **Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potencial of proteins and peptides from *Jatropha*: Review.** J Agric Food Chem , 58 n. 11, pp. 6543-6555. 3.1.3. 2010.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 604p. 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** Journal of Applied Bacteriology. v. 88, n.2, p. 308-316, 2000.

DUNN, R. O.; SHOCKLEY, M. W.; BAGBY, M. O.; **Improving the low-temperature properties of alternative diesel fuel. Vegetable oil derived methyl esters.** J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 1719, 1996.

EGGIMANN, P; PITTET, D. **Infecções cateter relacionados em Unidades de Terapia Intensiva: Uma Visão Geral, com especial ênfase na prevenção.** *adv. Sepse*, 1,2-15, 2000.

ELISABETSKY, E.; SETZER, R. **“Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for Ethnopharmacology and health systems in Amazonia”.** In: *The amazon caboclo: historical and contemporary perspectives.* Williamsburgh: *Studies On Third World Societies* Publication Series, 32, 243, 1985.



ELISABETSKY, E. **“Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug ation”**. In: **Ethnomedicine and drug development, advances phytomedicine**, vol 1, 2002.

ETKIN, N.L.; ELISABETSKY, E. **Seeking atransdisciplinary and culturally germane science: the future of ethnopharmacology**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, n.2, p.23-6, 2005.

FANGE, D. **Drug efflux pump defi ciency and drug target resistance masking in growing bacteria**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May 1, 2009.

FAO. **Bioenergy and Food Security – The BEST Analytical Framework**. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO) of the UN. 2010.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A. E RATES, S. M. K. **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. vol.42, n.3, pp. 369-394. ISSN 1516-9332, 2006.

FERNANDES, W. R.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHIMA, L. E. S. **Intoxicação em eqüino por Ricinus communis: relato de caso**. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 3 (1): 26-31, 2002.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; ARDALLA SCABIO, A.; *Quim. Nova*, 28, 19, 2005.

FONSECA , A. L. **Antibiótico na Clínica Diária**. 6 ed. Rio de Janeiro: EPUB. 1999.

FRATKIN E. M. **Traditional medicine and concepts of healing among Samburu pastoralists of Kenya**. *Journal of Ethnobiology* 1996, 16(1):63-97.

GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. de. **Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química**. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 571-581, 2009.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. **Toxicological studies on ratanjyot oil**. *Food and Chemical Toxicology*, v.33, p.39-42, 1995.

GIBBONS, S. *Nat. Prod. Rep.* 21, p263. 2004.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. **The sustainability of ethanol production from sugarcane**. *Energy Policy*. Vol. 36. 6ª ed. Jun. 2008. P. 2086-2097.

GOMES, H. H. S.; DANTAS, I. C.; CATÃO, M. H. C. V. **Plantas medicinais: sua utilização nos terreiros de umbanda e candoblé na zona leste de cidade de Campina Grande-Pb**. *BioFar*, vol. 3, no. 1, p. 110-129, 2008.

GONÇALVES, S. B.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no Pinhão Manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Circular Técnica EMBRAPA Agroenergia, pp. 1-5. 2009.

GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAM, S. **Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats**, *J Ethnopharmacol.*, 47(3):117-23, 1995.

GOVAERTS, R., et al. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Royal Botanical Gardens, Kew, v. 1-4, 2000.

GPC, GLOBAL PETROLEUM CLUB. ***Oil from algae***. Global Petroleum Club. Disponível em: [http:// www.globalpetroleumclub.com](http://www.globalpetroleumclub.com). Acesso em: novembro 2012.

GRADMANN C. **Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin**. *Med Hist.* 45:1–32, 2001.

GRADMANN, C. **Krankheit im Labor: Robert Koch und die medizinische Bakteriologie**. Göttingen: Wallstein. 2005.

GUARIM NETO, GERMANO; SANTANA, SANTINA RODRIGUES AND SILVA, JOSEFA VALDETE BEZERRA DA. **Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu**. *Acta Bot. Bras.* vol.14, n.3, pp. 327-334, 2000.

GUARIM-NETO, G., **O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental**. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental*, v. 17, p. 71-89. 2006.

GUIMARAES, A. S. **Crescimento e desenvolvimento inicial do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) em função de fontes e quantidades de fertilizantes**. 92 f. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. *Molecular Aspects of Medicine*, v.27, p.1-93, 2006.

HALL, D. O. **“Biomass energy development and carbon dioxide mitigation options”**. **International Conference on National Action to Mitigate Global Climate Change**. Copenhagen, jun., 1995. Disponível em <<http://uneprisoe.org/CopenhagenConf/>>. Acesso em 10 jan., 2005.

HANNY JOHANES BERCHMANS, SHIZUKO H. **Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids**. *Bioresource Technology* 99, 1716–1721, 2008.

HEINIMO, J.; JUNGINGER, M. **Production and trading of biomass for energy - an overview of the global status.** Biomass and Bioenergy 33, 1310–1320. 2009.  
HÉLIO, V. L. **Antibióticos, resistência e novos mecanismos de ação.** Punto de vista/ponto de vista. Rev Panam Infectol; 11(2):67-68, 2009.

HELLER, J. *Jatropha curcas* L., **Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** Physic nutria. 1996.

HIROTA, B. C. K., TREVISAN, R. R., DIAS, J. F. G., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. **Phytochemistry and biological activities of genus *jatropha*: mini-review** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.2, Jul. Dez./2010 - ISSN 1518-5192

HOLMSTEDT, B.; BRUHN, J. G. **Ethnopharmacology – a challenge.** *Journal of Ethnopharmacology* 8: 251–256. 1983.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology.** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., p.512, 2000.

HU, T. et al. Total Synthesis and Preliminary Antibacterial Evaluation of the RNA polymerase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry* 1998;63(7):2401- 2406.  
KAMINSKI, M.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; ROMANIK, G.; *J. CHROMATOGR., A* 1122, 153. 2006.

KARP, A.; HAUGHTON, A. J.; BOHAN, D. A. **Perennial energy crops: implications and potential.** In: Winter M, Lobley M, eds. **What is Land For? The Food, Fuel and Climate Change Debate.** London, UK: Earthscan, 2010.

KING, S. R. **Em Society for Applied Anthropology;** Greaves, T.; ed; Oklahoma City: OK, p.69. 1994.

KLADI, T.; DEIMLING, S.; KNUCHEL, R. F.; GAILLARD, G.; HOLSCHER, T.; MULLER-SAMANN, K. **Environmental impacts of annual and perennial energy crops compared to a reference food crop rotation.** Empowerment of the rural actors: a renewal of farming systems perspectives: 8th European IFSA Symposium, Clermont-Ferrand, France, 6–10 July 2008 675–681, 2008.

KLEIN, P. H.; PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiologia.* 3ed. United States of America: Times Mirror Higher Education Group, Inc, 1996.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel.** Edgard Blucher, São Paulo, 340pp. 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico.** 5ed. Medsi: Rio de Janeiro, p 796-809, 2001.

KUMAR, A.; SHARMA, S. **An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review.** *Industr.Crops Prod.*, v.28, p.1-10, 2008.

KUNWAR, R. M.; NEPAL, B. K.; KSHHETRI, H. B.; RAI, S. K.; BUSSMANN, R. W. **Ethnomedicine in Himalaya: a case study from Dolpa, Humla, Jumla and**

**Mustang districts of Nepal.** *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 2, no. 27, 6 p. 2006.

LACERDA, V. D. **Quintais do Sertão do Ribeirão: Agrobiodiversidade sob um enfoque etnobotânico.** p.55, Monografia (Graduação) - UFSC, Florianópolis. 2008.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology.** New York: Springer Verlag, 1998.

LAPLANTINE, F; RABEYRON, P. **Medicinas paralelas.** Tradução: Ramom Américo vasques. São Paulo: Editora Brasiliense, 1989.

LEMONICK, M. D. **The killers all around.** Sept; 144(11):34-41. 1994.

LIBERALINO, A. A. A.; BAMBIRRA, E. A.; MORAES-SANTOS, T.; VIEIRA, C. E. **Jatropha curcas L. Seed. Chemical analysis and toxicity.** Arquivos de. Biologia e Tecnologia v.31, p.539-550, 1988.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS JR., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R.; **Quim. Nova** 30, 600. 2007.

LIU, S. Y.; SPORER, F.; WINK, M.; JOURDANE, J.; HENNING, R; LI, Y.L.; RUPPEL, A. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*, *Trop. Med. Int. Health.*, 2(2):179-88, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA H. A. L. **“Avaliação do biodiesel no Brasil”.** Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, p.233. Brasília, 2005.

MACEDO, I. C. *et al.* **“Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020”.** *Biomass and Bioenergy*, v. 32 (4), 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. E. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova* 23: 429-438. 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, P.608. 2004.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** Pearson, 10 ed. Prentice Hall, cap. 17, p. 531, 2004.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. **Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factory** *Food Chem*, v. 62, 207-215, 1998.

MARTIN, G.; A. MAYEUX. **Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques. II. -Le Pourghère (*Jatropha curcas* L.): un carburant possible.** *Oléagineux* 39(5):283-287, 1984.

MC DONNELL, G.; RUSSELL, A. D. **Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance,** *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 12(1): 147–179. 1999.

MELLO, T. O. F.; PAULILO, F. L.; VIAN, F. E. C. **O Biodiesel no Brasil: panorama, perspectivas e desafios.** *Informações econômicas*, SP, v 37, n1, Janeiro de 2007.

MICHELIM, LESSANDRA *et al.* **Fatores patogênicos e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus epidermidis* associados a infecções nosocomiais ocorrem em unidades de terapia intensiva.** *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2005, vol.36, n.1, pp 17-23. ISSN 1517- 8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100004>.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITTI, I; WAKLELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**, 2 ed. Manole: São Paulo, 1999.

MUANGMAN, S.; THIPPORNWONG, M & TOHTONG, R. **Anti-metastatic effects of curcumin B, a diterpene from *Jatropha curcas*.** *In Vivo*. 19(1):265-8, 2005.

MUANZA, D. N.; EULER, K. L.; WILLIAMS, L. **Screening for antitumor and anti-hiv activities of 9 medicinal-plants from Zaire.** *International Journal of Pharmacognosy*, v.33, p.98-106, 1995.

MUJUMDAR, A. M.; MISAR, A. V. **Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats,** *J. Ethnopharmacol*, 90(1):11-5, 2004.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PHALER. M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: ASM Press, 2000.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro. Cap. 1 e 2. 2010.

NATIONAL BIODIESEL BOARD; In: **Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos; Instituto de Tecnologia do Paraná;** Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior; Curitiba, PR, p. 42, 1998.

NCCLS, Changes Name to Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically** *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. Vol. 23 No. 2 Substitui a Norma M7-A5 Vol. 20 No. 2. 2003.

NCCLS, Changes Name to Clinical and Laboratory Standards Institute. **Draft Guidelines for Herbal ATC Classification**. Uppsala Monitoring Centre. Geneva, 2002.

NCCLS, Changes Name to Clinical and Laboratory Standards Institute. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, p.12, 2011.

NICOLAOU, K. C.; BODDY, C. N. C.; BRÄSE, S.; WINSSINGER, N.; **Angew. Chem.**, Int. Ed. 38, 2097. 1999.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; CAPOROSI, P. Y.; TAVARES A. P. L. **Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos**. *Infarma*, v.19, n.1, p.32-50, 2007.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; DOS SANTOS, D. N. **Different supplements for in vitro embryo culture of physic nut**. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.43, p.9-14, 2008.

OLIVEIRA, A. K. M. **Pantanal – alguns parâmetros físico-químicos e biológicos**. In BARBOSA, L. M. and SANTOS JUNIOR, N. A., Ed. **A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil. p. 263-266. 2007.

OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B. **Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil**. *Braz. J. Biol.* [online]. vol.71, n.1, suppl.1, pp. 283-289. 2011. ISSN 1519-6984. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842011000200007>.

OPLUSTIL, C. P. **Novas abordagens na resistência bacteriana. A importância da automação na precisão dos resultados**. 2010. Disponível em: <[http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/textos/Aula\\_Carmen\\_Oplustil\\_br\\_asilia\\_outubro\\_2010.pdf](http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/textos/Aula_Carmen_Oplustil_br_asilia_outubro_2010.pdf)>. Acesso em 11 out. 2013.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. **Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas latex***. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 101-105, 2003.

OSUNKOYA, O. O.; ASH, J. E.; HOPKINS, M. S.; GRAHAN, A. **Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance of rain-forest tree species in northern Queensland**. *Journal of Ecology*. v.82 p.149-163.1994.

PATRICK, G. L.; ***An Introduction to Medicinal Chemistry***, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16; Patrick, G. L.; ***An Introduction to Medicinal Chemistry***, Oxford University Press: New York, cap. 10. 1995.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; PAMPLIANO, D. L. **Nat. Rev. Drug Discovery**. 6, 29. 2007.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 284p. 1973.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology: Concepts and applications**. New York: McGraw-Hill Inc., 1993.

PEREIRA, P. A. DE P.; SANTOS, L. M. B.; SOUSA, E.T.; DE ANDRADE, J. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 646, 2004.

PEREZ, S. C. J. G. A. **Envoltórios**. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.125-134. 2004.

PINTO, E.; MENDONÇA, M. M. **O mito dos combustíveis . Brasil de Fato**. Disponível em: <<http://www.brasildefato.com.br>>. Acesso em 19 de Dezembro de 2012.

POUSA, G. P. A.; G.; SANTOS, A. L. F; SUAREZ, P. A. Z. **History and Policy of Biodiesel in Brazil**. *Energy Policy*, v. 35, p. 5393-5398, 2007.

PRANCE, G. T.; **Ethnopharmacol.** 32,209, 1991.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. **Clin. Microbiol. Infec.** 10, 18. 2004.

RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. **Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)**, *Parasitol. Res.*, 102(5):867- 73, 2008.

RAMOS, L. P.; In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja; Centro Nacional de Pesquisa de Soja**; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária; Londrina, PR, p. 233, 17 a 20 de maio, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**, 4a ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2001.

RAU, O.; WURGLICS, M.; DINGERMANN, T.; ABDEL-TAWAB, M.; SCHUBERTZSILAVECZ, M. **Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor**, *Pharmazie*, 61(11):952-6, 2006.

REMADE, **Revista Nacional da Madeira**, Copyright 2001-2009. Disponível em <<http://www.remade.com.br/>> acesso em: 10 de janeiro 2013.

REVENE, Z.; BUSSMANN, R. W.; SHARON, D. **From Sierra to Coast: Tracing the supply of medicinal plants in Northern Peru – A plant collector’s tale**. *Ethnobotany Research & Applications*, vol. 6, p. 15-22. 2008.

RICHET, H. M. **Better antimicrobial resistance surveillance efforts are needed**. *ASM News Jun*; 67(6):304-9. 2001.

ROBERTIS, E. M. F. De.; HIB, J. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan S. A. 2001.



RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. **Políticas Públicas em Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.** Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde) p.148. 2006.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. Fitoterapia na Saúde da Família. In: Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade (Org.). **Programa de Atualização em Medicina Família e Comunidade (PROMEF).** Porto Alegre: Artmed/Panamericana, p. 31-65, 2011.

RUG, M.; RUPPEL, A. **Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes,** Trop. Med. Int. Health, 5(6):423-30, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. **Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.** J. Biotech., Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SACRAMENTO, H. T. **Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais.** In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5.; 2001. Botucatu. Anais. Botucatu: UNESP, p.33. 2000.

SALAS, J.; TELLO, V.; ZAVALETA, A.; VILLEGAS, L.; SALAS, M.; FERNÁNDEZ, I.; VAISBERG, A. **Cicatrización effect of *Jatropha curcas* latex (Angiospermae: Euforbiaceae),** Rev Biol Trop., 42(1-2):323-6, 1994.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA ROJAS, C. F. L. **Vegetação & Flora da Caatinga. Recife, Associação de Plantas do Nordeste (APNE).** Centro Nordestino de informações sobre plantas (CNPI), 1-176. 2002.

SANTOS, A. F., SANT'ANA, A. E. G. **Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl).** Phytotherapy Research. 13(8): 660-664, 1999.

SANTOS, N. de Q. **Uma Resistência bacteriana não Contexto da Infecção hospitalar.** *Contexto Texto - enferm.* [online]. vol.13, n.spe, pp 64-70. 2004. ISSN 0104-0707. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>.

SANTOS, N. Q. **Infecção hospitalar: uma reflexão histórico-crítica.** Florianópolis: Editora da UFSC; 1997.

SATIRO, L. N. AND ROQUE, N.. **A família euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, Ba, Brasil.** *acta bot. bras.* [online]. vol.22, n.1, pp. 99-118. 2008. issn 0102-3306.

SATURNINO, H. M. et al. **Implantação de unidades de validação de tecnologia pinhão-manso.** Nova Porteirinha, 2006. 5 p. Projeto de Pesquisa, Centro



Tecnológico do Norte de Minas Gerais, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Nova Porteirinha, 2006.

SCHAECHTER, M. **Microbiologia: Mecanismos de doenças infecciosas**. 3ed, Ed. Guanabara Koogan, São Paulo-SP, 2002.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D. **Avaliação da produtividade e teor de óleo de dez genótipos de mamoneira cultivados em altitude inferior a 300 metros**. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza-CE, v. 37, n. 2, p. 188-194, 2006.

SEVERINO, L. S.; MORAES, C. R. DE A.; GONDIM, T. M. DE S.; Cardoso, G. D.; Beltrão, N. E. de M. **Crescimento e produtividade da mamoneira influenciada por plantio em diferentes espaçamentos entre linhas**. Revista Ciência Agronômica, v.37, p.50-54, 2006.

SHETTY, S.; UDUPA, S. L.; UDUPA, A. L.; VOLLALA, V. R. **Wound healing activities of Bark Extract of Jatropha curcas Linn in albino rats**, Saudi Med. J., 27(10):1473-6, 2006.

SILVA, E. M. de P.; SAKATSUME, F. **A Política Brasileira de Biocombustíveis**. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STERHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5a ed. Porto Alegre. Ed. Universitária, UFRGS., 173 p., 1998.

SIMPSON, M. G. **Plant systematics**. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 2006.

SINCLAIR, T. R.; ALLEN JUNIOR, L. H. **Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown citrus trees**. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 33, p. 1166-1175, 1982.

SINDIGA, I.; NYAIGOTTI-CHACHA, C; KANUNAH, M. P. **Traditional Medicine in Africa Nairobi East African Educational Publishers**; 1995.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5º Ed., Ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER M. B.; KRUEGER, M. R. O.; Freitas, R. A.; Bella Cruz, R. C. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Ed. Univali; p.239. 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2006.

SRINISAVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P. L. **Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine.** Journal of Ethnopharmacology. v. 74, n. 3, p. 217–220, 2001.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.; *Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.*, 27, 116. 2009.

TAVARES, W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Rio de Janeiro, v.33, n.3, p.281-301,2000.Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n3/2477.pdf>>. Acesso em: 07 de out. 2013.

TAVARES, Walter. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2002, vol.35, n.4, pp. 409-409. ISSN 0037-8682.

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

THOMAS, O. O. **Re-examination of the antimicrobial activities of Xylopia aethiopica, Carica papaya, Ocimum gratissimum and Jatropha curcas.** *Fitoterapia*, v. 60, n. 2, p.147-155, 1989.

THOMAS, R.; SAH, N. K.; SHARMA, P. B. **Therapeutic biology of jatropha curcas: a mini review.** *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 9, p.315-324, 2008.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêuta.** Texto contexto – enfermagem. Florianópolis, v. 15, n.1, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L **Microbiologia.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p.827, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10ed. Porto Alegre: Artmed, p.934. 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CADEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3 ed. Atheneu: São Paulo, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, p.718. 2005.

VARALDO, P. E. **J. Antimicrob. Chemother.** 50, 1. 2002.

VARGAS, L.; FLECK, N. G. **Seletividade de herbicidas do grupo químico dos ariloxifenoxipropionatos a cereais de inverno.** *Planta Daninha*, v. 17, n. 1, p. 41-51, 1999.

VELÁZQUEZ, S. M. S. G. A cogeração de energia no segmento de papel e celulose: contribuição à matriz energética do Brasil. São Paulo, 205. 2000.

VENTURI, P.; VENTURI, G. **Analysis of energy comparison for crops in European agricultural systems**. Biomass & Bioenergy, Silver Spring, v. 25, p. 235-255, 2003.

VERGER, P. F., **Ewê: o uso das plantas medicinais na sociedade lorubá**. São Paulo: Companhia das Letras. 762 p, 1995.

VILLEGAS, L. F.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R., ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J. **Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru**. *Journal of Ethnopharmacology*, 55 (3), pp. 193-200. 1997.

VLIETINCK, A. J.; VAN DEN BERGHE, D. A. J. *Ethnopharmacol.*, 32, p.141, 1991.

WAGNER, H. e WISENAUER, M. **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2 ed. São Paulo. Pharmabooks, 2006.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. ASM Press: Washington, 2003. WALSH, C. T.; *Nat. Rev. Microbiol.* 1, p.65. 2003.

WALSH, C.; **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance**. *Nature* 406, 775-781 (17 August 2000)| doi:10.1038/35021219.

WESLEY A. S., NATHALLE C. A. F., CHIRLEY A. C., ANA CLÁUDIA M. S., PRÍMULA V.C., LOURDES S. F. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de são joão da ponte-mg**. *Revista de Biologia e Farmácia-BioFar*, ISSN 1983-4209 ,Volume 07, Número 01, 2012.

WILHELM, H, M; PORTELA, F. K; RAMOS, P.L; TULIO, L.; KEREZCZ, A. **Levantamento da viabilidade técnica, econômica e social para instalação de uma unidade produtora de biodiesel no Maranhão**. Curitiba: Lactec, 2008.

WORLD ENERGY COUNCIL. **“Focus on renewable energy — Biomass fuels shares of world total primary energy supply”**, 2004. Disponível em /<www.worldenergy.org>. Acesso em 21 jul., 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. Anti-infective drug resistance surveillance and containment. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/amr.html>> Acesso em 14 jul., 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional office for the Western Pacific. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila: WHO, 86p.1993.

YUNES RA, CALIXTO J. B. **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001.

ZACCHINO, S. **Estratégias para descobrir novos agentes antifúngicos**. IN: CALIXTO, J. B; YUNES, R. A. *Plantas Mediciniais sob a ótica da Moderna Química Medicinal*. (orgs)., p.1-13. 2003.

ZHANG M.; CHARLES A. P.; YING G.; LESLEY B.; YONGPING D. **Characterization of the microbial community structure in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected citrus plants treated with antibiotics in the field**. *BMC Microbiology* 2013.

ZHANG, S.; MA, K.; CHEN, L. **Response of photosynthetic plasticity of *Paeonia suffruticosa* to changed light environments**. *Environmental and Experimental Botany*, v. 49, p. 121-133, 2003.