

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
CITOGENOTÓXICA DE *Jatropha mollissima* (Pohl)
Baill.**

WELLINGTON LUÍS FONSÊCA DIAS

ORIENTADORA: PROF. DRA. FRANCIELLE ALLINE MARTINS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOAQUIM SOARES DA COSTA JÚNIOR

Teresina – PI
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOGENOTÓXICA DE *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.

WELLINGTON LUÍS FONSÊCA DIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Aline Martins

Teresina – PI

2018

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
CITOGENOTÓXICA DE *Jatropha mollissima* (POHL) BAILL**

WELLINGTON LUÍS FONSÊCA DIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química.

Aprovado em 03 de julho de 2018.

Membros da Banca:

Prof. Profa. Dra. Francielle Aline Martins
(Presidente da Banca – UESPI)

Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida
(Membro Titular – IFPI)

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior
(Membro Titular – UESPI)

Prof^a. Dr. José Luiz Silva Sá
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2018

Dedico esta dissertação à minha esposa Karlla, meus filhos (Layanna, Karlos Eduardo e Vitória Regia), meus pais: Francisco e Ivanilde e meus amigos: Fransuério e André, que me auxiliaram direta ou indiretamente em direção ao final satisfatório desta jornada.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus pela vida, saúde, proteção e orientação para a realização deste trabalho;
- ❖ A minha família, por toda a fraternidade durante a jornada;
- ❖ À minha orientadora Profa. Dra. Francielle Alline Martins do Departamento de Biologia da Universidade Estado do Piauí; aproveitando para expressar meus sinceros agradecimentos na orientação de minha pesquisa deixando registrado o respeito e admiração pela capacidade e experiência acadêmica da mesma;
- ❖ Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Junior do Departamento de Química do Instituto Federal do Piauí por suas sugestões e auxílio na realização deste trabalho;
- ❖ Ao Professor Dr. Pedro Marcos de Almeida pelas valiosas e pertinentes discussões e incentivos na produção do meu pensamento científico;
- ❖ Ao Professor Dr. João Marcelo da Universidade federal do Piauí/Picos, pelas inestimáveis contribuições ao presente trabalho e por ter aceitado convite para participar banca da qualificação;
- ❖ Aos colegas alunos e técnicos dos laboratórios, Geratec e Labgene da UESPI de Laboratório orgânica do IFPI, por todos os momentos de auxílio ao meu trabalho e fraterna convivência.
- ❖ A Universidade Estadual do Piauí, à coordenação do PPGQ, ao Instituto Federal do Piauí é aos demais professores(a) pelos valiosos auxílios a esta pesquisa.

*“Desejo que os homens recuperem o equilíbrio
entre os elementos,
E sejam mais veementes, incapazes de mentir,
Como o fogo.
Desejo que sejam fieis às próprias oscilações,
Como é a água,
Que passa por todos os estágios – sólido, líquido e
gasoso –
Sem perder a cabeça”.*

D.H Lawrence, *Elemental* (1929)

Resumo

DIAS, W.L.F. **Perfil fitoquímico, atividade antioxidante e citogenotóxica de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.** 2018. 47 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A diversidade da flora nacional é fonte de uma variedade considerável de componentes fitoquímicos com bioatividade diversificada. No Brasil são registrados, desde o período colonial, os benefícios terapêuticos das plantas medicinais. O uso deste conhecimento secular tem como base o empirismo popular, ligado a uma transmissão oral entre gerações, contribuindo de forma positiva com a divulgação dos efeitos curativos das plantas. Portanto as folhas, caule e raízes são fontes, popularmente conhecidas de substâncias com potenciais terapêuticos. A exemplo pode-se citar a espécie *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae), conhecida no nordeste brasileiro como pinhão-bravo ou pinhão-de-purga, usada na medicina popular como anti-inflamatória, antiofídica e antimicrobiana. Portanto, esse trabalho tem como objetivo a identificação das principais classes de metabólitos secundários e avaliar as atividades antioxidantes e citogenotóxicas das frações Hexânica (HE), Acetato de Etila (AE) e Metanólica (ME) do extrato etanólico das folhas da *J. mollissima*. Após a produção do extrato bruto das folhas, realizada por extração exaustiva a frio em etanol absoluto, durante 72 horas, foram realizadas as partições do extrato, segundo as polaridades crescentes dos solventes usados, a fim de obter as frações: HE, AE e ME. As atividades antioxidantes das frações foram determinadas pelo sequestro e eliminação do radical DPPH^{*} e pelo ensaio ABTS^{*+}. O método de Folin-Ciocalteu foi usado para analisar o teor de fenois totais e o efeito citogenotóxico foi avaliado pelo bioensaio *Allium cepa*. Sementes de cebola foram germinadas em placa de Petri, após atingir 2 cm foram transferidas para diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL) das frações em estudo. O Metil-Metano-Sulfonato 10 mg/L (MMS) foi utilizado como controle positivo e DMSO 1% como controle negativo. Após 24h de exposição, as raízes foram fixadas em Carnoy. A citogenotoxicidade foi avaliada pela contagem, em microscópio de luz (400 x), de 5.000 células meristemáticas (500 células/lâmina). Análises fitoquímicas revelaram a presença de triterpenos no HE, que também foram observados em conjunto com flavonóides no AE. Saponinas, catequinas, fenóis, taninos, flavonóides, flavonas, flavonóis e xantonas foram

encontradas no ME. O teor de fenóis totais mostrou que as frações são possuidoras de compostos fenólicos em diferentes quantidades, onde ME e HE possuem, respectivamente, o maior e menor valor. A ordem crescente da atividade antioxidante coincide com a polaridade molecular dos solventes usados para obtenção das frações pesquisadas. HE, AE e ME estão na ordem encontradas de eficácia na redução dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. As diluições testadas, exceto nas duas menores de ME, demonstraram significativo potencial citotóxico, enquanto os efeitos mutagênico e genotóxico foram observados apenas nas duas maiores concentrações de ME.

Palavras-chave: Bioatividade, *Allium cepa*, Pinhão-bravo

ABSTRACT

DIAS, W.L.F. **Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activity of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.** 2018. 47 p. Dissertation (Master in Chemistry) - State University of Piauí. Teresina.

National flora diversity is a source of a considerable variety on phytochemical components with a diversified bioactivity. In Brazil, the therapeutic benefits of medicinal plants have been registered since the colonial period. The use of this secular knowledge is based on popular empiricism, related to an oral transmission between generations, contributing positively to the dissemination of the plants' curative effects. Therefore, leaves, stems and roots are popular sources of substances with therapeutic potentials. For example, there are the pine *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae) species, known in northeast Brazil as “pinhão bravo” or “pinhão-de-purga”, used in popular traditional medicine as antifidic, anti-inflammatory and antimicrobial. Therefore, the objective of this work is to identify the main classes of secondary metabolites and to evaluate the antioxidant and cytogenotoxic activities of the Hexanic (HE), Ethyl Acetate (EA) and Metanolic (ME) fractions of the *Jatropha mollissima* leaves extracts. After producing the crude extract from the leaves by cold exhaustion in absolute ethanol for 72 hours, the extract was partitioned according to the increasing solvents polarities used, in order to obtain the HE, EA and ME fractions. The antioxidant activities of these fractions were determined by DPPH[•] free radical scavenging and the ABTS^{•+} assay. The total phenolic content of the extract was determined by the Folin–Ciocalteu method, and the cytogenotoxic effects was evaluated by the *Allium Cepa* bioassay. Onion seeds were germinated in Petri plate. After reaching 2 cm they were transferred to different concentrations (0,01, 0,1, 1 and 10 mg/mL) of the fractions under this study. Methyl Methane Sulfonate 10 mg/L (MMS) was used as a positive control and 1% DMSO as a negative control. After 24h of exposure, the roots were fixed in Carnoy's solution. The cytogenotoxicity activity was evaluated by counting of 5,000 meristematic cells (500 cells/slide), using a light microscope (400 x). Phytochemical analyses revealed the presence of triterpenes in the HE, which were also observed in conjunction with flavonoids in the EA. Saponins, catechins, phenols, tannins, flavonoids, flavones, flavonols and xanthenes were present in the ME. The total phenol content showed

that the fractions have phenolic compounds in different quantities, where ME and HE have the highest and lowest values, respectively. The increasing order of the antioxidant activity coincides with the molecular polarity of the solvents used to obtain the fractions studied. HE, EA and ME are in the effectiveness order in reducing the DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. The dilutions tested, except in the two smaller ME, demonstrated significant cytotoxic potential, while the mutagenic and genotoxic effects were observed only in the two highest concentrations of ME.

Keywords: Bioactivity, *Allium cepa*, Pinhão-bravo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** *Jatropha mollissima*: a) Planta adulta; b) Folhas; c) Flores; d) Fruto17
- Figura 1.2** Células meristemáticas de *A. cepa*. (A) Intérfase; (A1) Micronúcleo, (A2) Broto nuclear, (B) Prófase, (B1) Prófase com micronúcleo, (B2) Prófase com broto nuclear, (C) metáfase, (C1) metáfase com aderência cromossômica, (C2) metáfase com Poliploide, (C3) C-metáfase, (D) anáfase, (D1 e D2) Anáfase com perda cromossômica, (D3) Anáfase com uma ponte cromossômica, (E1) Telófase com ruptura cromossômica, (E2) Telófase com ponte cromossômica, (E3) Telófase com quebra cromossômica20
- Figura 2.1** Fluxograma geral da metodologia do fracionamento do extrato bruto etanólico foliar da *J. mollissima*.....22
- Figura 2.2** Curva de calibração-resposta de inibição dos radical ABTS^{•+} frente ao padrão Trolox.....26
- Figura 2.3** Curva de calibração do padrão de referência ácido gálico.....27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1.** Classes de metabólitos secundários identificados nas frações: Hexânica (HE), Acetato de Etila (AE) e Metanólica (ME) do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima*.29
- Tabela 3.2.** Atividade antioxidante das frações do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima* no ensaio do DPPH:..... 31
- Tabela 3.3.** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) e conteúdo de fenóis totais das frações obtidos do extrato bruto etanólico das folhas da *J. mollissima*.....31
- Tabela 3.4.** Médias do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *A. cepa*, após a exposição por 24 h aos extratos das frações: hexânica, acetato de etila e metanólica de *J. mollissima* em diferentes concentrações.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UESPI - Universidade Estadual do Piauí;

CCN - Centro De Ciências da Natureza;

CCS- Centro De Ciências da Saúde;

HE - Fração Hexânica;

AE - Fração Acetato de Etila;

ME - Fração Metanólica;

SMART - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática

DPPH* - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil;

ABTS** - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico);

IPCS - Programa Internacional de Segurança Química;

WHO - Organização Mundial da Saúde;

UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas;

HAF - Herbários Afrânio Fernandes;

DMSO - Dimetilsulfóxido;

EAG - Equivalentes de ácido gálico;

Trolox - (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano);

MMS - Metil-Metano-Sulfonato;

pH - Potencial Hidrogeniônico;

CAET- Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox;

CP - Controle Positivo;

CN - Controle Negativo;

IM - Índice Mitótico;

MN - Micronúcleo;

BN - Broto Nuclear;

QC - Quebra cromossômica;

PC - Perda Cromossômica;

AM - Anáfases multipolares;

CB- Células binucleares;

PT - Ponte Cromossômica;

AC - Aderência Cromossômica;

CM - C-metáfase;

DNA - Ácido Desoxirribonucleico;

EC₅₀ - Concentração da amostra eficaz pra inibir 50% do radical ABTS^{•+};

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio;

AA% - Atividade Antioxidante porcentual.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	17
1.1 Plantas medicinais	17
1.2 A Família Euphorbiaceae	18
1.3 O Gênero <i>Jatropha</i>	19
1.4 <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill	20
1.5 Bioensaio <i>Allium cepa</i>	22
1.6 Objetivos..	24
1.6.1 Gerais	24
1.6.2 Específicos.....	24
CAPÍTULO 2 – METODOLOGIA EXPERIENTAL	25
2.1 Coleta e identificação do material Botânico.....	25
2.2 Extração e partição	25
2.3 Prospecções fitoquímica	26
2.3.1 Saponinas.....	26
2.3.2 Fenóis e Taninos	27
2.3.3 Catequinas.....	27
2.3.4 Flavonoides.....	27
2.3.5 Alcaloides.....	27
2.3.6 Açúcares redutores.....	27
2.3.7 Esteroides e triterpenos	27
2.3.8 Flavonas, Flavonóis e Xantonas.....	28
2.4 Avaliação da atividade antioxidante	258
2.4.1 Método DPPH (2,2 difenil – 1 – pirilidrazil).....	28
2.4.2 Método ABTS ⁺ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ...	29
2.4.3 Teor Fenólicos Totais	29
2.5 Ensaios <i>Allium cepa</i>	30
2.6. Análise Estatística	31
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	38

CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....39

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

A rica diversidade da flora nacional é fonte de uma variedade considerável de componentes químicos de atividades biológicas diversas¹. No Brasil os benefícios medicinais das plantas e o seu uso terapêutico são registrados na história colonial do país². O uso deste conhecimento tem como base o empirismo popular nacional que está ligado a uma transmissão oral entre gerações, que contribuem de forma positiva com a divulgação dos efeitos terapêuticos da flora³. Portanto, folhas, caules e raízes são por séculos fontes conhecidas de substâncias potencialmente farmacológicas⁴.

Em países em desenvolvimento a tradição no uso dos vegetais nas curas de males humanos é realizada como alternativa econômica aos medicamentos alopáticos, já nos países desenvolvidos o uso dos fitoterápicos são ditados pelo modismo do consumo de produtos naturais. Produzindo assim, a falsa ideia da inexistência de efeitos nocivos a saúde humana⁵.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e RDC (Resolução da diretoria colegiada) nº 48, de 16 de março de 2004, classificam o medicamento fitoterápico como aquele produzido exclusivamente com fitoquímicos ativos. Pesquisas científicas com o objetivo de identificar substâncias químicas produzidas pelas plantas ainda constituem um vasto campo de investigação pouco explorado⁶.

Plantas medicinais, preparações fitofarmacêuticas e produtos naturais produzem juntos um mercado mundial com movimento em bilhões de dólares⁷. Por não se ter dados oficiais atualizados sobre o mercado nacional de fitoterápicos, estima-se em torno de 544 milhões de reais o movimento anual⁸. Apesar dos países em desenvolvimento, como o Brasil, possuírem, aproximadamente, um terço da flora mundial é em nações desenvolvidas como USA, Japão e Europa que mais se produz e comercializa produtos naturais. Por questões econômicas a indústria de produtos

naturais brasileira teve uma retração na produção entre 2009 e 2015, com o fechamento de 15% das empresas do ramo de plantas medicinais e fitoterápicos⁹.

Um fator importante para o sucesso na procura de produtos naturais mundial é a eficácia comprovada dos metabólicos secundários biossintetizados pelo vegetal¹⁰, a exemplo da classe dos alcaloides usados como estimulantes, narcóticos e venenos¹¹. Outra classe de fitoquímico de uso terapêutico comum são os terpenoides, empregados como antidepressivos, anticonvulsivos e sedativos¹². Considerado como um dos maiores grupos entre os metabólicos secundários, os flavonoides possuem funções diversificadas nas plantas, desde pigmentação à proteção contra oxidação¹³. Para a indústria farmacêutica este grupo demonstra ter ação terapêutica no sistema imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso¹⁴.

1.2 A Família Euphorbiaceae

Dentre as Angiospermas da ordem Malpighiales, a família Euphorbiaceae é uma das mais diversificadas e complexas¹⁵ e possui mais de 300 gêneros e supera as 8000 espécies¹⁶. Família de plantas dicotiledôneas consideradas de importância econômica, apresentam flores díclinas e fruto geralmente capsular¹⁷. São herbáceas, arbóreas e arbustivas¹⁸, a maioria é venenosa e possui efeitos alucinógenos¹⁹. Os gêneros *Acalypha*, *Croton*, *Euphorbia*, *Macaranga*, *Jatropha*, *Phyllanthus* e *Mallotus* apresentam produção de um látex tóxico²⁰. Dentre os diferentes gêneros, *Jatropha* é o maior causador de intoxicação em humanos²¹, a exemplo da espécie *Jatropha curcas* L. que causa irritação na mucosa oral, vômito, mal-estar, diarreia, dor abdominal e dispnéia, por contato ou ingestão de folhas ou frutos¹⁹.

No Brasil ocorrem cerca de 1.000 espécies da família Euphorbiaceae em 63 gêneros distribuídas em todos os diferentes tipos de vegetação como cerrado, caatinga, florestas e campo rupestres. Só no estado da Bahia são encontrados 40 gêneros e 260 espécies²².

No país, a família possui uma diversidade de plantas de interesse econômico a exemplo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), usada na alimentação humana como fonte de carboidrato; a mamona (*Ricinus communis* L.) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) fontes de biodiesel e borracha natural, respectivamente^{23,24}. O pinhão-mansão (*J. curcas* L.) devido a rusticidade da espécie tem sido utilizado na

recuperação de áreas degradadas²⁵. As espécies *Croton L.*, *Cnidocolus Pohl.* e *Jatropha L* são marcadoras de ecossistemas secos como a caatinga, enquanto a *Alchornea Sw.* aparece em matas ciliares e campos rupestres^{26,23}.

1.3 O Gênero *Jatropha*

Pertencente a subfamília Crotonoideae, tribo Jatrophaeae, o gênero *Jatropha L* encontra-se nos subgêneros: *Jatropha*, com uma distribuição geográfica mais abrangente, com espécies encontradas na África, Índia, América do Sul, Antilhas, América Central e Caribe e subgênero *Curcas* encontrado em regiões desérticas do Saara, Arizona e Texas, exceção à espécie *J. curcas* que é encontrada no México e regiões adjacentes²⁰. Apesar de encontradas em regiões extratropicais, as espécies de *Jatropha* tem distribuição predominantemente em regiões secas²⁷. Com cerca de 170 espécies, o gênero *Jatropha* tem se destacado como fitoterápico na medicina popular e ornamentação. O cultivo para fins da horticultura, bem como ornamentações de jardins tropicais é facilitado pela fácil propagação de suas sementes²⁰.

Na África, além do uso medicinal a exemplo do óleo das sementes da *J. curcas* usados como purgativo, a população usa como cercas-vivas as espécies: *J. gossypifolia L.*, *J. curcas L.* e *J. multifida L.* No Brasil, além destas espécies citadas é comum encontrar *J. mutabilis* e *J. ribifolia*, que são comercializadas com fins terapêuticos²⁸.

Pesquisas anteriores com *Jatropha*, já identificaram efeitos raticida, antifúngico²⁹, mitogênico, antibiótico, pró-inflamatório e antioxidante³⁰. O caule e a raiz da *J. gossypifolia* possuem ações citotóxica e anticancerígena³¹. Um conhecido larvicida o Cabraleadiol, um triterpeno, foi primeiramente isolado no gênero²⁹. Do óleo das sementes das espécies *J. podagrica*, *J. multifida*, *J. curcas* e *J. gossypifolia* já foram isolados ésteres diterpenos de caráter irritantes³⁰. Estudos recentes com o óleo da semente de *J. mollissima*, demonstraram potencial para uso como biocombustível¹⁶, lubrificantes, sabões, tinta e também como purgante veterinário³³. Na espécie *J. curcas* foram encontrados os peptídeos: jatrophidin, com ação antifúngica e a curcaciolina com propriedade antimalárica. Por possuir um alto conteúdo proteico nutricional, espécies do gênero têm sido usadas também na alimentação de ruminantes e peixes³⁴.

1.4 *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill

A espécie *J. mollissima* é conhecida popularmente no nordeste brasileiro como, pinhão-bravo ou pinhão-de-purga (Figura 1.1). A planta é perene e pode ser encontrada nas regiões centro-oeste, nordeste e sudeste do país³⁵. No Nordeste só não é encontrada no estado do Maranhão²⁰. A espécie é arbustiva com 2,0 à 3,0 m de comprimento, possui caule lenhoso, produtores de látex avermelhado. A espécie possui três sementes dentro de um fruto capsulado, com deiscência explosiva, folhas com pecíolos cilíndricos e lâminas pentalobadas. As Inflorescências são em corimbos, terminais, bracteados e nectaríferas²⁰. Flores masculinas, unissexuadas, pedunculadas e com 5 pétalas, de coloração vermelho-alaranjada que ao envelhecerem ficam amarelas ou brancas. O androceu é protegido pelos estames de anteras volumosas, o ovário volumoso encontra-se dividido em 3 lóculos³⁵. Como planta medicinal, a espécie apresenta potencial uso tanto em humanos como na agropecuária. Atividade antibacteriana no látex já foi relatada para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*³⁶. O extrato aquoso do caule apresentou efeito anti-helmíntico eficaz sobre o nematódeo *Haemonchus contortus*, importante parasita de pequenos ruminantes, gastrintestinais hematófagos cujos efeitos nos hospedeiros dependendo da idade, grau de resistência e nutrição, causam perda de peso, anemia e em alguns casos a morte³⁷. O extrato das folhas apresentou potencial uso como coadjuvante no tratamento de picadas de cobra *Bothrops erythromelas* e *B. jararaca*, ressaltando a inibição da inflamação e hemorragia¹.

Além do uso direto no tratamento de enfermidades, os extratos aquoso das folhas de pinhão bravo apresentam também atividade larvicida contra *Aedes aegypti*³⁸ e moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, agentes importantes na transmissão da dengue e esquistossomose, respectivamente³⁹.



Figura 1.1. *Jatropha mollissima*: a) Planta adulta; b) Folhas; c) Flores; d) Fruto. Fonte: próprio autor.

As atividades biológicas dos extratos de plantas medicinais são em geral atribuídas à composição química dos mesmos, sobretudo relacionada com a presença de metabólitos secundários específicos. A maior parte dos estudos fitoquímicos de *J. mollissima* limitam-se a preparações aquosas. Já foi relatada a presença de saponinas, compostos fenólicos e flavonoides, sendo estes indicados como componente majoritário das folhas¹. Na análise do óleo de *J. mollissima* foi encontrado ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico³². Em extratos alcoólicos, observa-se a presença de cumarinas, taninos, flavonoides (flavanóis, flavanonas), alcaloides e esteroides e elevada atividade antioxidante^{40, 41}.

Devido a seu potencial uso, estudos de avaliação da toxicidade de preparações e extratos de *J. mollissima* têm sido realizados. O teste de toxicidade

do extrato etanólico do caule para náuplios de *Artemia salina* revelou ser tóxico mesmo em baixas concentrações (0,66 mg/mL)³⁷. Já o extrato etanólico das folhas foi genotóxico em diferentes concentrações (0,01 e 0,1 mg/mL e 100 mg/mL) e mutagênico para 0,01 e 10 mg/mL no bioensaio *Allium cepa*⁴². Usando as mesmas concentrações e bioensaio, agora com o extrato foliar aquoso, citogenotoxicidade não foi observada¹⁰.

Utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, o extrato etanólico das folhas não foi mutagênico para as concentrações estudadas, sendo assim considerado um possível bioinseticida no combate ao *A. aegypti*⁴³.

Os trabalhos publicados com as folhas da *J. mollissima*, referentes a prospecção fitoquímica, encontram-se limitados aos extratos etanólico e aquoso. Sendo assim se faz necessária a realização de estudos mais específicos em frações destes e de outros extratos usando solventes com diferentes polaridades.

1.5 Bioensaio *Allium cepa*

Variados ensaios biológicos são utilizados com a finalidade de avaliar o potencial toxicológico de extratos ou substâncias em relação ao tempo de exposição a um agente tóxico a fim de produzir diferentes efeitos sobre os organismos⁴⁴.

Dentre esses, o teste do *A. cepa* (cebola) foi introduzido originalmente em 1938 por Levan⁴⁵, desde então, é frequentemente usado em ensaios toxicológicos, com o objetivo de analisar alterações macroscópicas no formato e tamanho da raiz e em aspectos microscópicos como alterações na divisão das células meristemáticas radiculares, e ocorrência de aberrações cromossômicas⁴⁶. O ensaio consiste na exposição dos organismos-teste a diferentes concentrações provenientes de substância pura ou mistura durante um período pré-determinado⁴⁷.

As células radiculares meristemáticas apresentam características que as tornam adequadas para estudos citogenéticos⁴⁸, como: células grandes com reduzido tempo de proliferação, numerosas divisões e poucos cromossomos ($2n = 16$)⁴⁹. Pesquisas anteriores usando este teste corroboram com sua utilização na avaliação de extratos e infusões de plantas medicinais⁵⁰. O programa internacional

de segurança química (IPCS, WHO) e o Programa ambiental das nações unidas (UNEP), validam o teste *A. cepa* como um bioensaio confiável para este propósito⁵¹.

Efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos causados pela ação de um ou mais componentes existentes no extrato vegetal podem ser avaliados através da inibição da divisão celular⁵². A genotoxicidade é analisada mediante as alterações cromossômicas encontradas nas células meristemáticas. Tais alterações são resultantes de efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações) ou efeitos aneugênicos (aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, células binucleadas, C-metáfases, dentre outras). Os micronúcleos podem ter origem tanto nos efeitos aneugênicos com clastogênicos⁵³ (Figura 1.2). A frequência com que ocorrem as divisões celulares é medida pelo índice mitótico, enquanto os micronúcleos, no interior das células meristemáticas são indicativos de mutagenicidade⁴⁷.

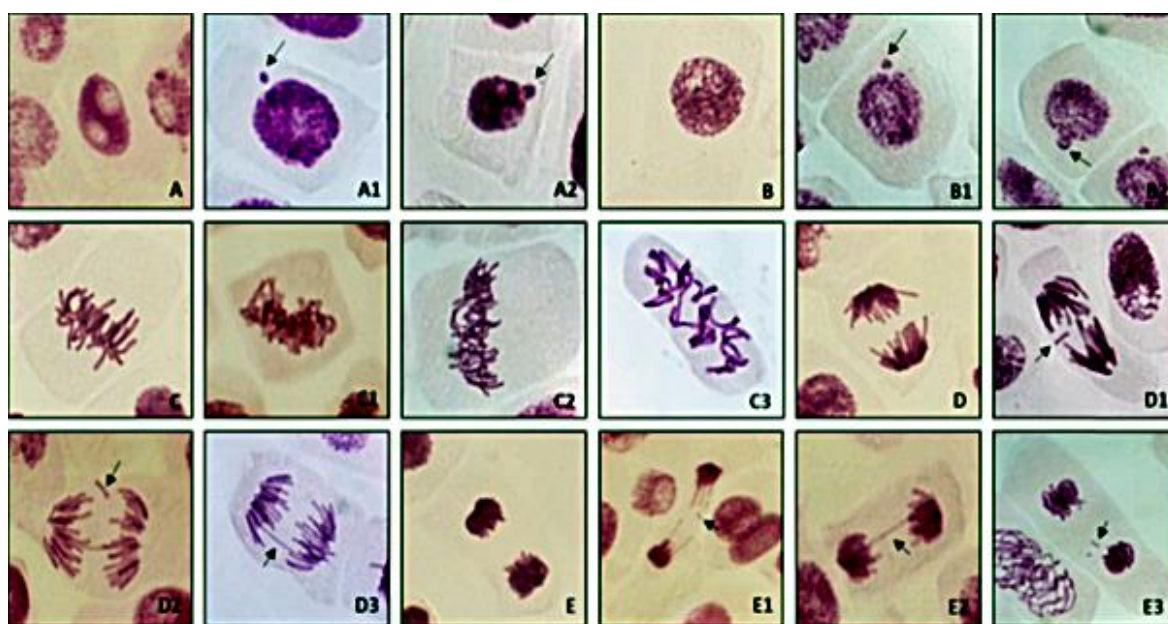


Figura 1.2 Células meristemáticas de *A. cepa*. a) Intérfase; a1) Micronúcleo (seta), a2) Broto nuclear (seta), b) Prófase, b1) Prófase com micronúcleo (seta), b2) Prófase com um broto nuclear (seta), c) metáfase, c1) metáfase com aderência cromossômica, c2) metáfase com Poliploide, c3) C-metáfase, d) anáfase, d1) e d2) Anáfase com perda cromossômica (seta), d3) Anáfase com uma ponte cromossômica, e) telófase, e1)Telófase com ruptura cromossômica (seta), e2) Telófase com ponte cromossômica, e3) Telófase com quebra cromossômica (seta)⁵⁴.

Nesse contexto, dada à importância da *J. mollissima* no cenário das plantas medicinais brasileiras e os escassos estudos científicos acerca de sua composição fitoquímica e citogenotoxicidade é que o objetivo deste estudo foi realizar a

prospecção fitoquímica, citogenotóxica e avaliar potencial antioxidativo das frações hexânica, acetato de etila e metanólica do extrato foliar da espécie.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

Identificar as principais classes de metabólitos secundários e avaliar as atividades antioxidantes, a citotoxicidade e genotoxicidade das frações Hexânica, Acetato de etila e Metanólica do extrato etanólico das folhas da *J. mollissima*.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Identificar os principais metabólitos secundários presentes nas frações Hexânica (HE), Acetato de etila (AE) e Metanólica (ME) do extrato etanólico das folhas da *Jatropha*;
- Quantificar o teor de fenóis totais das frações HE, AE e ME;
- Analisar pelos métodos de DPPH[•] e ABTS^{•+} a capacidade antioxidativa das frações;
- Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxico das frações estudadas em células meristemáticas de *A. cepa*.

Capítulo 2

Metodologia Experimental

2.1 Coleta e Identificação do Material Botânico

Folhas de *J. mollissima* foram coletadas no mês de junho de 2016 na cidade de Luís Correia - PI, (Nordeste do Brasil, coordenadas geográficas 2°88'01.1"S 41°66'39.2"W). Após coleta, as folhas foram devidamente armazenadas e transportadas para ao Laboratório de Genética da Universidade Estadual do Piauí no Campus Poeta Torquato Neto em Teresina (LABGENE/UESPI). Folhas danificadas ou que apresentaram alguma alteração macroscópica foram descartadas. As folhas saudáveis foram limpas e desidratadas em estufa a 45°C por 72h. Exemplos completos da planta foram enviados ao Herbário Afrânio Fernandes da UESPI, Teresina – PI e identificados e depositados sob número de voucher HAF 03111.

2.2 Extração e Partição

As folhas desidratadas foram trituradas em liquidificador doméstico até a obtenção de 550g do material pulverizado, que em seguida, foi submetido à extração exaustiva a frio em etanol absoluto, durante 72 horas. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura de aproximadamente 45°C e armazenado em frasco de vidro âmbar sob refrigeração. Em balão de decantação, a uma amostra de 20g do extrato bruto foram adicionados 200 mL de água e 3 volumes de 100 mL de Hexano (300 mL), agitando-se por 5 minutos, a cada volume adicionado (Figura 2.1). Depois da decantação, a fração hexânica (HE) foi rotoevaporada para remoção do solvente, enquanto na fração residual I foram adicionados 300 mL de Acetato de Etila, também em três volumes. Após decantação, a fração Acetato de Etila (AE) foi obtida e o mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da fração metanólica (ME) a partir da fração residual II produzindo também uma fração residual final que foi descartada. As frações obtidas

foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas na capela até completa secagem do material e em seguida armazenadas em ambiente refrigerado.

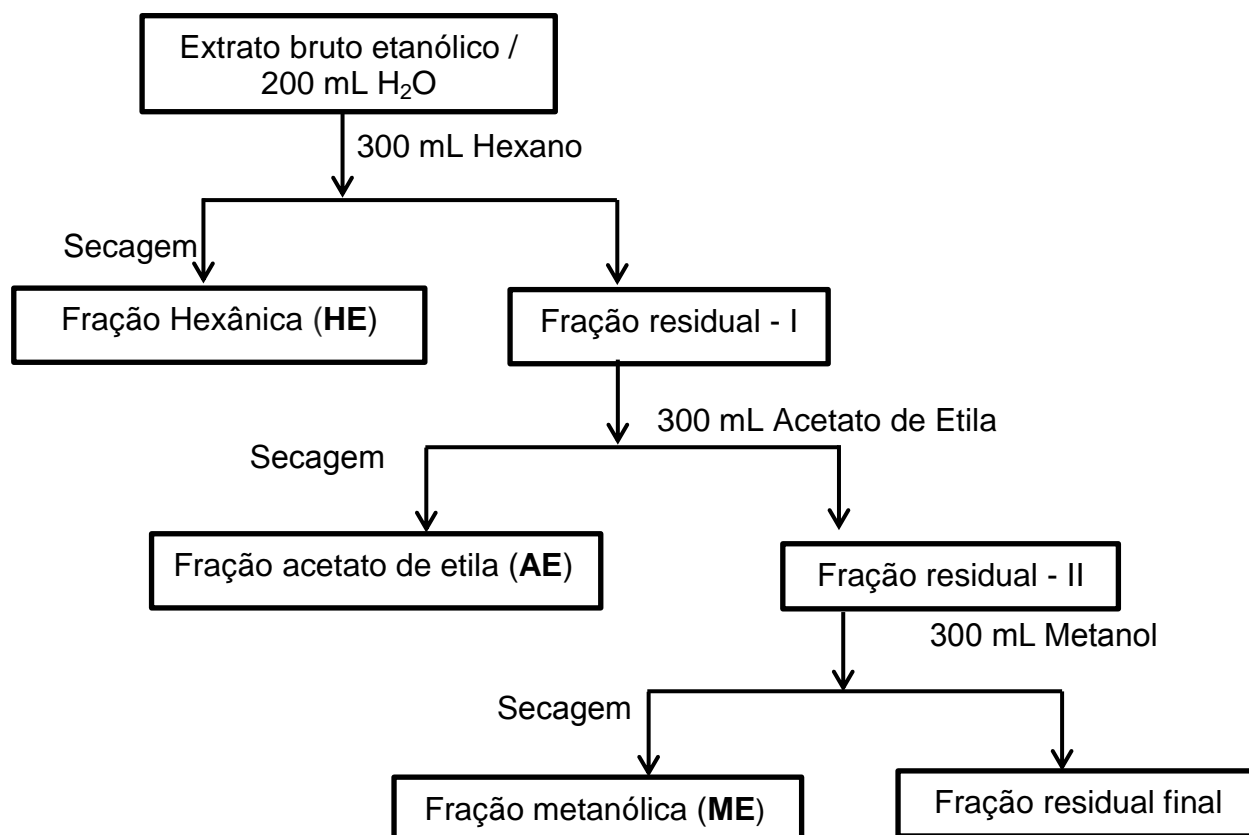


Figura 2.1: Fluxograma geral da metodologia do fracionamento do extrato bruto etanólico foliar da *J. mollissima*.

2.3 Prospecção fitoquímica

A caracterização qualitativa dos grupos fitoquímicos presentes nas frações de *J. mollissima* foi realizada conforme descrito por Barbosa et al. (2017), com adaptações. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.3.1 Saponinas

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em 20 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente durante 5 minutos em tubo de ensaio fechado. A permanência de uma camada de espuma estável por mais de meia hora foi considerado positivo para saponinas.

2.3.2 Fenóis e Taninos

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em 5 mL de água destilada, em seguida adicionou-se 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. A mudança na coloração ou formação de precipitado indicou reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de FeCl_3).

2.3.3 Catequinas

Uma alíquota do extrato seco foi solubilizada em 3 mL de metanol, em seguida adicionou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indicou reação positiva.

2.3.4 Flavonoides

Uma alíquota do extrato seco foi dissolvida em 10 mL de metanol P.A, adicionando, em seguida, 5 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado e algumas raspas de Magnésio. Considerou-se a reação positiva quando a coloração rósea apareceu na solução.

2.3.5 Alcaloides

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em 5 mL de solução de HCl a 5%. Em tubo de ensaio, a 1 mL da solução anterior foi adicionado 6 gotas do reativo de Dragendorff. O resultado foi considerado positivo para o metabólico quando observado um precipitado vermelho tijolo.

2.3.6 Açúcares redutores

Uma alíquota do extrato seco foi dissolvida em 5 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição durante 5 min. A observação de um precipitado vermelho tijolo, indica presença do metabólico.

2.3.7 Esteroides e triterpenos

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em 10 mL de Clorofórmio P.A em seguida, a solução foi filtrada na presença de carvão ativado transferindo o filtrado

para um tubo de ensaio completamente seco. Adicionou-se 1 mL de Anidrido Acético P.A e agitou-se suavemente e acrescentou-se 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se suavemente novamente. O resultado foi considerado positivo quando observou-se a coloração azul de existência rápida ao verde persistente.

2.3.8 Flavonas, Flavonóis e Xantonas

Uma alíquota do extrato seco foi diluída em 10 mL de água destilada e em seguida fracionada em três tubos de ensaio. Um dos tubos foi acidulado com HCl concentrado a um pH 3, os outros dois restantes foram alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 8,5 e 11. O resultado foi considerado positivo quando observou-se o aparecimento da coloração amarela em um dos tubos.

2.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

2.4.1 Método DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

Para a realização das análises, adicionou-se 1,5 mL da solução estoque etanólica do radical DPPH[•] (6x10⁻⁵M) em uma alíquota de 0,5 mL preparada com 25 mg de cada fração diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 5%. As concentrações usadas nos testes para as frações HE e AE foram 23,4; 46,8; 93,7; 187 e 375 µg/mL enquanto para ME foram 5,85; 11,7; 23,4; 46,8 e 93,7 µg/mL.

Após 30 minutos do início da reação, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm. As determinações foram feitas em triplicata acompanhadas de um controle negativo e dois controles positivos (ácido ascórbico e Trolox). A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (somente o radical DPPH[•]), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical conforme fórmula a seguir^{57,58,59}.

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}^{\bullet} = \frac{[(\text{Abs controle} - \text{Abs amostras}) / \text{Abs controle}] \times 100}{\text{Abs} - \text{absorvância}}$$

A partir do percentual de inibição, a concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH[•] (CE₅₀) foi estimada por meio de um modelo de regressão linear simples.

2.4.2 Método ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

Adicionalmente, a atividade antioxidante das frações do extrato etanólico das folhas foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* realizada por meio do sequestro de cátion radical - ABTS^{•+} de acordo com Rufino et al. (2007). A partir dos extratos obtidos em cada fração, foram preparadas cinco diferentes concentrações em triplicata. O composto Trolox (Sigma) foi utilizado como antioxidante de referência e o álcool etílico como branco para calibração do espectrofotômetro.

O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, sendo reservados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas. Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol PA até obter-se uma solução com absorvância de 0,70 (\pm 0,01). Adicionou-se 40 μ L das amostras diluídas (em etanol) a 1960 μ L da solução contendo o radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro a 734 nm, após 30 minutos de reação^{58,60}. Assim, quanto maior o potencial oxidativo, menor é o valor da absorvância observado, ou mais clara a coloração da reação. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em CAET – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (mM de trolox por grama de amostra) e CE₅₀ (concentração da amostra eficaz pra inibir 50% do radical ABTS^{•+}).

2.4.3 Teor Fenólicos Totais

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Swain e Hills (1959). As amostras foram solubilizadas em água destilada com auxílio de 5% de DMSO em concentrações de 250 μ g/mL. Das soluções preparadas foram retirados uma alíquota de 0,5 mL e transferidos para tubos de ensaio, adicionado 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteau 20% (v:v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador tipo vórtex, após 3 minutos, acrescido 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20% (m:v) e após 1h em banho-maria a 37 °C foram realizadas as

leituras das densidades óticas em espectrofotômetro à 720 nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico marca Sigma, nas concentrações de 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL para construção da curva de calibração (Figura 2.3). A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em EAG (equivalente ao ácido gálico)/mg de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

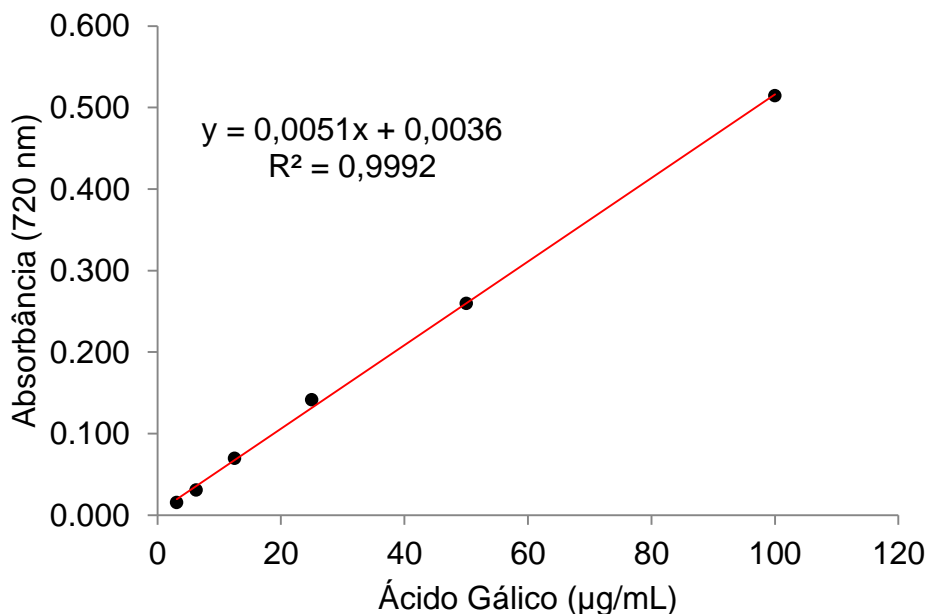


Figura 2.3 Curva de calibração do padrão de referência ácido gálico.

2.5 Ensaio *Allium cepa*

Sementes de *Allium cepa* IPA-11 foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo água destilada, à temperatura ambiente por cerca de 4 dias até atingirem por volta de 2 cm de comprimento. Em seguida, para os ensaios de citogenotoxicidade, 30 raízes foram transferidas para 4 diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1 e 10 mg/mL) das frações das HE, AE e ME de *J. mollissima*. Metil-Metano - Sulfonato –10mg/L(MMS), uma substância de ação clastogênica⁶³ foi utilizado como controle positivo, e DMSO 1% como controle negativo.

Após 24h de exposição às frações, as raízes foram fixados em Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético; v:v) e estocadas na geladeira, até o momento da

preparação das lâminas segundo a metodologia de Guerra e Souza (2002).

A citogenotoxicidade foi avaliada pela contagem, em microscópio de luz (aumento de 400 x), de 5.000 células meristemáticas (500 células/lâmina; total de 10 lâminas analisadas) para cada tratamento e para os controles (negativo e positivo). Foram avaliados: índice mitótico (citotoxicidade); o índice de mutagenicidade (micronúcleos) e índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade).

Dados sobre a multiplicação celular foram fornecidos pelo índice mitótico, usando-se a relação entre as células em divisão e o total de células observadas, segundo a fórmula:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número total de células em divisão} \times 500}{\text{Total de células observadas}}$$

O índice de mutagenicidade foi obtido por meio da frequência de células com micronúcleos (MN):

$$\text{Índice de mutagenicidade} = \frac{\text{Número total de células com MN} \times 500}{\text{Total de células observadas}}$$

Já o quociente entre o número de células portadoras de alterações cromossômicas (broto nuclear, quebra cromossômica, perda cromossômica, anáfases multipolares, células binucleares, ponte cromossômica, aderência cromossômica, C-metáfase) e o total de células observadas, forneceu a genotoxicidade:

$$\text{Índice de alterações cromossômicas} = \frac{\text{Número total de células alteradas} \times 500}{\text{Total de células observadas}}$$

2.6 Análise Estatística

Os dados citogenotóxicos foram expressos em média e desvio padrão e avaliados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), no programa BioEstat 5.3⁶³

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este estudo procurou avaliar o potencial antioxidativo e fazer a triagem fitoquímica da HE, AE e ME obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima*, bem como avaliar a citogenotoxicidade, *in vivo*, através do teste de *A. cepa*. Estudos desta natureza são importantes para conhecer os constituintes químicos e ação toxicológica dos metabólitos que compõem as frações, agregando informação etnofarmacológica à ciência⁶⁴.

A quantidade em gramas e o rendimento percentual obtido a partir de 20g do pó das folhas de *J. mollissima* para cada uma das frações foi: HE - 1,75 g (8,75%), AE - 1,52 g (7,6%) e ME - 2,31 g (11,55%).

Avaliação fitoquímica das frações possibilitou a análise qualitativa dos seus metabólitos secundários (Tabela 3.1). A partir dos resultados obtidos, pode-se evidenciar na HE a presença de esteroides e tripterpenos. Os mesmos foram observados na AE juntamente com os flavonoides. Já na ME observou-se a ocorrência de saponina, catequinas, fenóis e taninos, flavonoides e flavonas, flavonóis e xantonas.

Tabela 3.1. Classes de metabólitos secundários identificados nas frações: Hexânica (HE), Acetato de Etila (AE) e Metanólica (ME) do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima*.

	Metabólitos							
	Saponinas	Fenóis e Taninos	Catequinas	Flavonoides	Alcaloides	Açúcares redutores	Esteroides e triterpenos	Flavonas, Flavonóis e Xantonas
HE	-	-	-	-	-	-	+	-
AE	-	-	-	+	-	-	+	-
ME	+	+	+	+	-	-	-	+

(+) Presença de compostos; (-) Ausência de metabólito

Na fração ME além das saponinas foi evidenciada a ocorrência de várias classes de compostos fenólicos, tais como taninos, catequinas e flavonoides. Os flavonoides foram descritos como componentes majoritários do extrato aquoso das folhas de *J. mollissima*, confirmando a presença de isoorientina, orientina, vitexina, e isovitexina¹. A presença de flavonoides juntamente com os taninos foi observada também no extrato etanólico para esta e outras espécies de *Jatropha*^{40, 65,66}.

Os flavonoides têm uma estrutura geral que possui um esqueleto difenilpropano (C₆C₃C₆), isto é, dois anéis benzênicos unidos por um heterociclo que contém um átomo de oxigênio. O estado de oxidação e a presença de grupos funcionais cetônico e/ou hidroxila no heterociclo influenciam diretamente na polaridade do flavonoide⁶⁷, assim os mesmos podem ser observados em extratos a partir de solventes de diferentes polaridades por isso foi possível evidenciar a presença desses compostos também na AE, embora esse solvente seja mais apolar quando comparado aos solventes alcoólicos. A presença de flavonoides na fração acetato de etila foi evidenciada também para *J. podagrica*, *J. integerrima*, *J. curcas* e *J. isabellei*^{68,66}.

Outra classe de compostos importantes com atividade biológica bastante conhecida identificada nas AE e HE são os triterpenos. Esses são os principais compostos já isolados de *Jatropha*⁶⁹. A estrutura dessa classe de compostos é formada pelo arranjo linear de unidades de isopreno seguidas de ciclização e rearranjos do esqueleto de carbono com uma característica empírica conhecida como regra de isopreno⁷⁰, conferindo a molécula o caráter apolar.

Na análise dos resultados da atividade antioxidante percentual (AA%) frente ao radical DPPH[•], considerou-se como valor de referência a CE₅₀ de 22,72 ± 0,13 µg/mL do ácido ascórbico e CE₅₀ de 14,92 ± 0,41 µg/mL do Trolox, ambos os controles positivos para comparar com a atividade antioxidante das frações do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima*, pois os mesmos são bastante utilizados como padrão para a atividade antioxidante neste tipo de estudo⁷¹.

Observou-se em todas as concentrações avaliadas das frações a inibição do radical DPPH[•]. Dentre as amostras avaliadas, a ME apresentou o menor CE₅₀ de 47,78 ± 1,93, ou seja, maior potencial antioxidativo, seguida pela AE (CE₅₀ de 192,1 ± 2,03) e por último a HE (CE₅₀ de 349,5 ± 2,29) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Atividade antioxidante das frações do extrato etanólico das folhas de *J. mollissima* no ensaio do DPPH.

AMOSTRAS	CE ₅₀ ± DP (µg/mL)	IC 95%
HE	349,5 ± 2,29	343,9 – 355,2
AE	192,1 ± 2,03	187,1 – 197,2
ME	47,78 ± 1,93	42,98 – 52,58
Acido Ascórbico	22,72 ± 0,13	22,39 – 23,04
Trolox®	14,92 ± 0,41	13,89 – 15,94

CE₅₀: concentração eficiente; DP: desvio padrão da média, n = 3; IC: Intervalo de confiança; HE: fração hexânica; AE: fração acetato de etila; ME: fração metanólica.

No ensaio antioxidante com o ABTS⁺⁺ observou-se que a fração com maior capacidade antioxidativa foi ME (CAET de 1,21 ± 0,02 mM Trolox/mg), seguida pela EA e HE que apresentaram CAET iguais a 0,438 ± 0,00 e 0,148 ± 0,01mM Trolox/mg, respectivamente. Os resultados no ensaio DPPH^{*} e ABTS⁺⁺ foram concordantes, em ambos observou-se que a atividade antioxidante aumentou com o aumento da polaridade do solvente utilizado.

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos revelou que a ME é a que apresenta maior teor de fenólicos totais, expresso em EAG /mg de amostra, seguida da AE e da HE (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) e conteúdo de fenóis totais das frações do extrato etanólico das folhas da *J. mollissima*.

AMOSTRAS	Ensaio ABTS ⁺⁺		Fenóis Totais	
	mM Trolox/mg de amostra	IC 95%	µg EAG/mg de amostra	IC 95%
HE	0,148 ± 0,01	0,11 – 0,18	28,78 ± 0,79	26,83 – 30,73
AE	0,438 ± 0,00	0,43 – 0,45	103,30 ± 4,6	91,81 – 114,8
ME	1,21 ± 0,02	1,16 – 1,26	245,10 ± 3,38	236,7 – 253,5

DP: desvio padrão da média, n=3. Intervalo com 95% de confiança (IC 95%). HE – fração hexânica da *J. mollissima*; AE – fração acetato de etila da *J. mollissima*; ME – fração metanólica da *J. mollissima*; IC- intervalo de confiança; EAG - equivalentes de ácido gálico;

As diferenças nas atividades antioxidantes observadas para as frações em estudo podem ser atribuídas à presença e a concentração de compostos fenólicos pertencentes à classe dos taninos e flavonoides verificados, sobretudo na ME, cujas ações antioxidantes são bem conhecidas⁷². Como se observou a ME

apresentou $245,10 \pm 3,38$ μg EAG/ mg de amostra, aproximadamente 2,5 vezes mais que a quantidade de fenóis totais da AE ($103,30 \pm 4,6$) e 8,5 vezes a quantidade estimada para a HE. Esses valores mostram uma relação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante, esta correlação também foi observada para o extrato de *J. isabellei*⁶⁶.

A atividade antioxidante desses compostos fenólicos tem sido atribuída à presença de hidroxilas fenólicas e as suas propriedades de oxirredução, pois agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres⁷².

A atividade antioxidativa do extrato metanólico das folhas e parte aérea de *J. mollissima* foi quantificada por Melo et al. (2016) por meio do ensaio com DPPH que estimou a CE_{50} igual a $54,0 \pm 4,36$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. A diferença na quantificação da atividade antioxidante pode ser atribuída à forma de obtenção do extrato, além das diferenças sazonais que podem influenciar diretamente na constituição química da planta⁷⁶. Quando comparados os resultados da atividade antioxidante de outras espécies de *Jatropha* observa-se que o potencial antioxidativo não é exclusivo de *J. mollissima*. Estudos relatam atividade antioxidante satisfatória para o extrato etanólico das folhas de *J. curcas* ($79,57 \pm 7,6$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *J. gossypifolia* ($31,31 \pm 7,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)⁷⁴.

No ensaio *A. cepa*, o MMS, utilizado como CP, foi citotóxico e induziu níveis significativos na média total de alterações cromossômicas, como observados na literatura⁷⁵. Efeito citotóxico foi observado em todas as frações avaliadas. Para a HE observou-se a diminuição do índice mitótico em todas as concentrações, assim como para a AE, enquanto para a ME foi observado o aumento no número de células em divisão apenas nas maiores concentrações (1 e 10 mg/mL) (Tabela 3.4).

A redução do índice mitótico nas células meristemáticas de *A. cepa* em todas as concentrações da HE e AE mostra que os fitoquímicos presentes nessas frações interferiram no processo de síntese de DNA ou no bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, não permitindo a entrada das células em divisão⁷⁶. A presença de triterpenoides em ambas as frações pode estar associada com a inibição de topoisomerase II e com a citotoxicidade como previamente relatado por Almeida et al. (2016).

Já para as células de *A. cepa* expostas a ME observou-se o aumento significativo do índice mitótico (IM) nas maiores concentrações (10 e 1 mg/ mL), ou seja, a indução da proliferação celular. Contudo o aumento significativo do IM em relação ao CN é também considerado citotóxico, levando a uma progressão do ciclo celular desordenada, o que poderia resultar na formação de tecidos tumorais⁷⁸. Portanto, os fitoquímicos presentes na ME de forma sinérgica e/ou isolados desregularam o ciclo celular nas maiores concentrações, assim como o aumento da atividade proliferativa observado para o extrato metanólico de *J. mollissima* no ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] contra células tumorais de laringe (HEp-2)⁴¹.

Em termos genotóxicos, a média total das alterações cromossômicas foi significativa apenas nas maiores concentrações (10 e 1 mg/mL) da ME. Provavelmente, os danos genotóxicos podem estar associados com a variação de fitoquímicos e a quantidade dos mesmos nas concentrações citadas. Possivelmente a intensa produção de espécies reativas de oxigênio causadas pelos flavonoides pode ter causado danos ao DNA e originou diferentes alterações cromossômicas^{61,76}.

A presença significativa de MN evidencia o efeito mutagênico (alterações não passíveis de reparo) da fração ME (10 e 1 mg/mL). Os MN são alterações resultantes de perdas cromossômicas, quebras cromossômicas e/ou brotos nucleares⁶¹. Sendo assim, é possível que os MN significativos nas concentrações (10 e 1 mg/mL) da ME tenham sido originados a partir de brotos nucleares, uma vez que a ocorrência dos mesmos foram significativos. No entanto, a origem desses MN para as demais amostras mutagênicas não foi possível ser identificada.

Tabela 3.4 Médias do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *A. cepa*, após a exposição por 24 h aos extratos das frações: hexânica, acetato de etila e metanólica de *J. mollissima* em diferentes concentrações.

Tratamentos	IM	Alterações Cromossômicas									Média ± DP
		MN	BN	QC	PC	AM	CB	PT	AC	CM	
CN	310,80±57,63	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,62	0,00±0,00	0,00±0,00	0,54±0,87	0,00±0,00	0,00±0,00	0,74±0,96
CP	152,69±45,70**	11,24±6,88**	1,89±2,82*	0,37±0,48	0,00±0,00	0,29±0,47	0,09±0,29	0,46±0,49	0,54±0,47	0,82±1,17	15,70±7,31**
HE 0.01	163,91±43,88**	0,43±0,60	0,10±0,31	0,00±0,00	0,10±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,77±1,84	0,10±0,31	0,10±0,31	1,60±2,41
HE 0.1	228,72±59,15*	0,83±1,56	0,18±0,56	0,36±0,86	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,10±0,30	0,09±0,28	0,09±0,27	1,65±1,95
HE 1.0	181,05±55,79**	0,97±1,03	0,39±0,68	0,26±0,84	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,30±0,66	0,09±0,28	2,01±1,86
HE 10	131,48±39,16**	0,76±1,25	0,48±1,22	0,28±0,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,52±2,41
AE 0.01	121,75±28,34*	0,65±2,07	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,90±0,96	0,00±0,00	0,00±0,00	2,55±2,12
AE 0.1	98,86±19,44**	0,62±0,74	0,64±0,91	0,00±0,00	0,09±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±1,13	0,00±0,00	0,16±0,51	2,84±1,87
AE 1	75,34±9,05**	0,25±0,40	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,26	0,00±0,00	0,00±0,00	0,72±0,83	0,00±0,00	0,0±0,00	1,05±0,89
AE 10	43,91±4,85**	0,17±0,55	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,55
ME 0.01	357,48±44,09	1,04±1,97	0,26±0,81	0,00±0,00	0,44±0,83	0,19±0,39	0,00±0,00	0,89±1,59	0,00±0,00	0,00±0,00	2,82±2,53
ME 0.1	326,94±34,42	1,19±1,22	0,09±0,28	0,29±0,91	0,19±0,40	0,09±0,30	0,00±0,00	0,09±0,28	0,00±0,00	0,00±0,00	1,94±1,68
ME 1	370,04±21,04*	2,91±1,42**	1,98±2,07**	0,00±0,00	0,09±0,30	0,10±0,30	0,00±0,00	0,09±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	5,17±2,70**
ME 10	376,21±36,61*	4,01±1,59**	1,96±1,62**	0,30±0,95	0,00±0,00	0,09±0,29	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,37±2,49**

CN Controle Negativo (água destilada); **CP**: Controle Positivo (MMS -10mg/L); **HE**: Fração hexânica; **AE**: Fração acetato de etila; **ME**: Fração metanólica; **IM**: Índice Mitótico; **MN**: Micronúcleo; **BN**: Broto Nuclear; **QC**: Quebra cromossômica; **PC**: Perda Cromossômica; **AM**: anáfases multipolares; **CB**: células binucleares; **PT**: Ponte Cromossômica; **AC**: Aderência Cromossômica; **CM**: C-metáfase; **DP**: Desvio-Padrão; *Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (* p < 0,05; ** p < 0,01). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

Capítulo 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo e as considerações que deles puderam ser estabelecidas permitiram concluir que:

- ✓ Na avaliação do perfil fitoquímico da folha de *J. mollissima* foi possível verificar a presença das seguintes classes de metabólitos secundários em suas, respectivas, frações: esteróides e triterpenos (HE e AE); Flavonóides (AE e ME); saponinas, fenóis, taninos, catequinas, flavonas, flavonóis e xantonas (ME);
- ✓ A quantificação do teor de fenóis totais mostrou que as frações testadas, apresentaram compostos fenólicos em diferentes quantidades onde em ME e HE possuem o maior e menor valor ($28,78 \pm 0,79$ e $245,10 \pm 3,38$ μg EAG/mg de amostra), respectivamente;
- ✓ O estudo constatou que fração ME apresenta a maior atividade antioxidante (CAET $1,21 \pm 0,02$ mM Trolox/mg e CE_{50} de $47,78 \pm 1,93$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) entre as testadas e HE a menor (CAET $0,148 \pm 0,01$ mM Trolox/mg e CE_{50} de $349,5 \pm 2,29$ $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- ✓ Os dados obtidos com a triagem fitoquímica, nos testes de antioxidação e na análise de teor de fenóis totais das frações estudadas, evidenciaram que extratos com alto teor fenólico apresentam melhores respostas no sequestro e redução de radicais DPPH[•] e ABTS^{•+};
- ✓ O bioensaio demonstrou significativo potencial citotóxico das frações nas diluições testadas exceto nas duas menores (0,01 e 0,1 mg/mL) de ME. Enquanto os efeitos mutagênico e genotóxico foram observados apenas nas duas maiores (1 e 10 mg/mL) concentrações de ME.

REFERÊNCIAS

1. GOMES J. A. S, FÉLIX-SILVA J, FERNANDES J.M, AMARAL J.G, LOPES N.P, SILVA-JÚNIOR A.A, ZUCOLOTTO S.M, FERNANDES-PEDROSA. M. F Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail decreases local effects induced by *Bothropic* venom. **BioMed Res**, p. 1 -13, 2016.
2. BADKE, M. R. et al. Saber popular: Uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde. **R Enferm UFSM**, v. 6, n. 2, p. 225-234, 2016.
3. BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **CS Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.
4. BARBOSA, H. M. et al. Abordagem fitoquímica de metabólitos secundários em *Solanum acanthodes* (Solanaceae) Hook. **SAJ BET Technol**, v. 4, n. 1, p. 30-41, 2017.
5. VEIGA JR. V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Q Nova**, p. 519-528, 2005.
6. CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**, v. 141, p. 975–981, 2012.
7. LIMA- SARAIVA, S. R. G et al A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **ReviPI**, v.1, n.1, 2015
8. BORGES, F. V.; SALES, M.D.C. Políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no brasil: sua história no sistema de saúde. **PA Manhuaçu**, v. 16, n. 1, p. 13-27, 2018
9. HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **CS coletiva**, v. 22, n .8, 2017
10. ARAÚJO, C. R. R. Estudos Fitoquímicos, Biológicos e Avaliação da Radiação Gama na Descontaminação Microbiana e na Integridade dos Princípios Ativos da Casca do Caule de *Luehea ochrophylla* MART. Tese doutorado Universidade Federal de Minas Gerais, p. 12, 2016
11. ZIEGLER, J.; FACCHINI, P. J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. **ARP Biology**, v. 24, n.4, p.738–739, 2008.
12. PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central. **RBBJ Pharmacognosy**, v. 1, n. 19, p. 140-149, 2009.

13. LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **BC Desenvolvimento**, v.17, n.1, p.18-22, 2010.
14. GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients** v.6, n.1, p. 391- 415, 2014.
15. CREPALDI, C. G. et al. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **SAJ Botany** v. 102, n.2 p. 157-165, 2016.
16. MARCONDES, T. H. et al. Avaliação do potencial antirradicalar e determinação do teor de flavonoides totais das frações acetato de etila e n-butanol das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) coletadas em Havana, Cuba. **RCF Aplicada**, v. 37, supl. 1, 2016.
17. COELHO, M.; WAECHTER, J. L.; MAYO, S. J. Revisão taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção Urospadix subseção Flavescentiviridia). **IPJ Botânico**, v.60, n.4, p.799- 864, 2009.
18. JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. (Ed). Nacional. P. 777, 2002
19. BALTAR, S. L. S. M. A. et al. Aspectos botânicos e clínicos das intoxicações por plantas das Famílias Araceae, Euphorbiaceae e Solanaceae no Estado de Pernambuco. **R Fitos**, v.11, n.2, p. 119-249, 2017.
20. LEAL, C. K. A.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **AF Bonaerense**, v. 24, n.1, p. 5-13, 2005.
21. ARRUDA, F. P. et al. Cultivo de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordeste. **RBO Fibras**, v.8, n.1, p. 789- 799, 2004.
22. CORDEIRO, I. et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: **J Botânico** RJ, p. 28, 2018.
23. SOUZA, C. V.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II. **I Plantarum** p.124, 2012.
24. ALMEIDA, P. M. Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). Tese doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, p.19, 2014.
25. LEITE, L. F. C. et al. Variabilidade espacial das frações da matéria orgânica do solo em área degradada sob recuperação. **RBEA Ambiental**, v. 19, n. 4, p 394 – 401, 2015.
26. HEYWOOD, V. M. et al. Flowering Plant Families of the World. **F Books**, v.12, n. 1 p. 424, 2007.

27. SABANDAR, C. W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae). **R Phytochemistry**, v.85, n.1, p. 7-29, 2013.
28. PIMENTEL, L. A. et al. Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 587-591, 2012.
29. BATISTA, P. H. et al. Terpenoides e cumarinas de *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. **Q Nova**, v.37, n. 6, 2014.
30. SOUZA, M. V. S. et al. Efeito citoprotetor de 4,8mg/mL de *Jatropha curcas* sobre células de sangue periférico exposto ao etanol. **RIT Ciências**, v. 1, n. 1, p. 251-255, 2015.
31. NAZEEMA, T. H. GIRIJA, S. Characterisation of the active antiproliferative principles of *Jatropha curcus* and *Jatropha gossypifolia* on Hela cell lines. **IJP Pharm Sci**, v. 5, p. 346-355, 2013.
32. HIROTA, B. C. K. et al. Fitoquímica e Atividades Biológicas do Gênero. **V Acadêmica**, v.11, n.2, 2010.
33. GOMES, J. A. S. Inibição dos efeitos locais induzidos pelas peçonhas das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca* pelo extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.
34. DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: **RJAF Chemistry** v. 58, n. 11, p. 6543-6555, 2010.
35. MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N. Manual de identificação de plantas infestantes hortifrúti. P. 396-398, 2011.
36. ROCHA, F. A. G.; DANTAS, L. I. S. Atividade antimicrobiana in vitro do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, v. 4, p. 3-11, 2009.
37. RIBEIRO, A. R. C. et al. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **PV Brasileira**, v. 34, p. 1051 – 1055, 2014.
38. ARAÚJO, J. R. S. et al. Larvicidal, cytotoxic and genotoxic effects of aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill, **ASB Sciences**, v. 40, p. 3-7, 2018.
39. SANTOS E. A et al. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. **Hindawi**, v. 2, p 3-5, 2012.

40. BRAQUEHAIS, I. D. et al. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **RBPM Campinas**, v. 18, n. 2, p. 582-587, 2016.
41. MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, n.1, p. 8534-8542, 2010.
42. MORAIS, J. G. S. et al. Citogenotoxicidade e mutagenicidade das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill em *Allium cepa* e *Mus musculus* L. **RIC Saúde** p. 271-273, 2017
43. SANTOS, C. M. et al. Efeito modular de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. sobre a mutagenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **RIC Saúde** p. 281-282, 2017.
44. BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* como bioindicador. Ambiente & Água-An. **IJA Science**, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015.
45. NIELSEN M. H, RANK, J., Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. **Hereditas**. p 249-254, 1994
46. KLEIN, T.; LONGHINI, R. ; BRUSCHI, M.L. ; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **JBAP Science**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
47. FARIA, L. C. et al. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, Estado de Rondônia, em células de *Allium cepa* Manoelina. **G Scientia**, v. 11, n. 2, p. 104-114, 2017.
48. ATEEQ, B. et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by. **MRGTE Mutagenesis**. v. 514, p. 105-113, 2002.
49. BARBÉRIO, A. BARROS L, VOLTOLINI JC, MELLO M.L.S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **BJ Biology**. v.39 n. 3, 2009.
50. TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. **IOA Publisher**, v. 6, p.138- 139, 2012.
51. CIAPPINA, A. L. et al. Toxicity of *Jatropha curcas* l. latex in *Allium cepa* test. **B Journal**. v. 33, n. 5, p. 1295-1304, 2017.
52. FRESCURA, V. D. S. Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade federal de Santa Maria p. 23, 2012.
53. CARVALHO L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **R. Biologia**. v. 17, p.1-5, 2017.

54. SOMMAGGIO, L. R. D. et al. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **EE Safety**. v. 147, n. 2, p. 550–557, 2018.
55. BRAND-WILLIAMS W. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – FS Technology**, v. 28, n. 1, p.25-30.
56. VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **RB Fruticultura**. v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.
57. RE R. et al. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic.* **FRB Medicine**, v. 29, n. 9, p. 1231-123, 1999.
58. RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutos pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza: **EMBRAPA**, 2007.
59. TORRES, P. B et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS em microplaca. **I Biociências**, p. 2-3, 2017.
60. SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I-quantitative analysis of phenolics constituintes. **JSF and agriculture**, v. 19, p.63-68, 1959.
61. FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **EE Safe**, v. 72, p. 1680-1686, 2009.
62. GUERRA, M. & SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: **Funpec**, p.131, 2002.
63. AYRES, M. et al. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Bioestat. Belém , 2007.
64. SILVA, J. F. et al. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. **Hindawi**. p. 2-32, 2014
65. ALMEIDA P. M. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. **GM Research** v. 15, p. 1-8 2016.
66. FRÖHLICH J. K et al. Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Mull. Arg. **NP Research**. v. 27, n. 12, p.1049–1059, 2013.
67. GOMES, S. M. C. Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica. Dissertação Mestrado. Universidade de Coimbra p.7-13, 2010.
68. RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; RANGHOO-SANMUKHIYA, V. A comparison of polyphenolic content, antioxidant activity and insecticidal

- properties of *Jatropha* species and wild *Ricinus communis* L. found in Mauritius. **APJT Medicine**, p. 380-383, 2014.
69. ZHANG, X. et al. Chemical Constituents of the Plants from Genus *Jatropha*. **C Biodiversity**. v. 6, p. 2167-2181, 2009.
70. DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: **RJAOC Society**, v. 88, n.1, p. 301-322, 2011.
71. VERGAUWEN, H. et al. Trolox and Ascorbic Acid Reduce Direct and Indirect Oxidative Stress in the IPEC-J2 Cells, an In Vitro Model for the Porcine Gastrointestinal Tract. **Plos One**. v.10 n. 3 p. 1-15, 2015.
72. RODRIGUES, O. G. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton heliotropifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares. **ACSA**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2016.
73. ROBERTO M. M, et al. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. **GM Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.
74. ROFIDA, S. Antioxidant activity of *Jatropha curcas* and *Jatropha gossypifolia* by DPPH method. **Farmasains**, v. 2, n. 6, p. 281-284, 2015.
75. ALMEIDA, P. M. et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. **GM Research** v. 15, p. 1-8, 2016.
76. BIANCHI, J.; MONTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **JE Sciences**, v. 16, n. 1, p. 102-111, 2015.
77. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring. **M Research**. v. 682, n. 5, p. 71–81, 2009.