



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA



Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante

MIRIAM PIRES DOS SANTOS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutor José Coelho
Doutora Rosalina Mata

Júri:

Presidente: Doutor Jaime Puna

Vogais:

Doutor Amin Karmali
Doutor António Velez
Doutor José Coelho

Dezembro 2014



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Extração e caracterização de extratos
de *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação
da sua atividade antimicrobiana e
antioxidante**

MIRIAM PIRES DOS SANTOS

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutor José Coelho
Doutora Rosalina Mata

Júri:

Presidente: Doutor Jaime Puna

Vogais:

Doutor Amin Karmali
Doutor António Velez
Doutor José Coelho

Dezembro 2014

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
1 Objetivos.....	2
2 Introdução.....	4
3 Revisão da Literatura.....	6
3.1 Plantas medicinais e as suas aplicações.....	6
3.1.1 Família das <i>Euforbiáceas</i>	9
3.1.2 Género <i>Jatropha L.</i>	11
3.1.3 Descrição botânica de <i>Jatropha gossypifolia L.</i>	14
3.1.4 Propriedades Medicinais de <i>Jatropha gossypifolia</i>	17
3.1.5 Constituintes químicos de <i>Jatropha gossypifolia</i>	18
3.2 Métodos usuais de extração e/ ou separação de compostos bioativos de plantas	21
3.2.1 Técnicas de extração sólido-líquido.....	21
3.2.2 Técnica de extração líquido-líquido	24
3.2.3 Cromatografia em coluna.....	25
3.2.4 Cromatografia de camada fina.....	27
3.2.5 Extração com fluidos supercríticos	29
3.3 Métodos de Análise	33
3.3.1 Testes fitoquímicos preliminares.....	33
3.3.2 Atividade antioxidante.....	34

3.3.3	Atividade antimicrobiana.....	38
4	Parte Experimental	42
4.1	Recolha, identificação e armazenamento das amostras vegetais de <i>Jatropha gossypifolia</i>	42
4.2	Determinação do teor de humidade das folhas de <i>Jatropha gossypifolia</i>	42
4.3	Preparação dos extratos de <i>Jatropha gossypifolia</i> por maceração e extração líquido-líquido.....	42
4.4	Testes fitoquímicos preliminares aos extratos de <i>Jatropha gossypifolia</i>	43
4.4.1	Operações preliminares.....	43
4.4.2	Teste para fenóis e taninos.....	43
4.4.3	Teste para flavonoides	43
4.4.4	Teste para esteroides e terpenos	44
4.4.5	Teste para saponinas	44
4.4.6	Teste para glicósidos cardíacos.....	44
4.4.7	Açúcares redutores.....	44
4.5	Fracionamento dos extratos de <i>Jatropha gossypifolia</i>	45
4.6	Breve análise e caracterização das frações de <i>Jatropha gossypifolia</i> por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC–MS)	47
4.6.1	Preparação das amostras para análise.....	47
4.6.2	Identificação e quantificação dos componentes por GC–MS	47
4.7	Extração supercrítica das folhas de <i>Jatropha gossypifolia</i> e a sua sucessiva maceração	48
4.8	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Jatropha gossypifolia</i> ..	51
4.8.1	Método do radical livre de DPPH•.....	51
4.8.2	Determinação do teor total em polifenóis.....	52
4.9	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Jatropha gossypifolia</i> 53	
4.9.1	Método de difusão de disco	54

4.9.2	Método da microdiluição em caldo.....	55
5	Resultados e discussão.....	56
5.1	Extratos de <i>J. gossypiifolia</i> obtidos por maceração e extração líquido-líquido	56
5.2	Análise dos testes fitoquímicos preliminares aos extratos de <i>J. gossypiifolia</i>	59
5.3	Breve análise à caracterização por GC–MS das frações de <i>J. gossypiifolia</i>	61
5.4	Extratos obtidos por extração supercrítica e sucessiva maceração de <i>J. gossypiifolia</i>	64
5.1	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i>	68
5.2	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i>	72
6	Conclusão e perspectivas futuras.....	82
7	Referências bibliográficas.....	84
8	Anexos.....	96
	Anexo A. Estruturas dos compostos isolados ou detetados na espécie <i>Jatropha gossypiifolia</i> L.....	96
	Anexo B. Teor de humidade das amostras de folhas de <i>Jatropha gossypiifolia</i> L..	100
	Anexo C. Preparação de reagentes para deteção de metabólitos secundários.....	100
	Anexo D. Fracionamento dos extratos de <i>Jatropha gossypiifolia</i>	101
	Anexo E. Cromatogramas obtidos por GC – MS para as diferentes frações dos extratos de <i>Jatropha gossypiifolia</i>	113
	Anexo F. Exemplo de curva de calibração de DPPH.....	118
	Anexo G. Curva de calibração de ácido gálico para determinação do teor total de polifenóis.....	119
	Anexo H. Preparação do padrão de turbidez 0.5 McFarland para preparação do inóculo.....	120
	Anexo I. Determinação da percentagem de inibição do crescimento microbiano com extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de microdiluição em caldo.....	121

Agradecimentos

Quando propus a realização desta dissertação nunca pensei que fosse um processo tão intenso, mas tive o apoio, motivação e inspiração de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer.

Ao meu orientador, Dr. José Coelho, quero agradecer o nível de exigência imposto por ele e pela cedência da sua sabedoria. Não esquecendo a sua simpatia e as histórias inspiradoras que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi que apesar de um trabalho não ser perfeito, não deixa por isso de ser valioso. À minha orientadora, Dr.^a Rosalina Mata, quero agradecer a oportunidade de trabalhar num dos seus projetos e reconheço com gratidão a confiança depositada em mim desde o início, mas também a sua orientação, motivação, incentivo perante todas as adversidades e a persistência para conclusão deste projeto.

À Faculdade de Ciências da Universidade Agostinho Neto de Luanda, em especial à Dr.^a Carmen Van-Dúnem agradeço a oportunidade, privilégio e a possibilidade de ingressar neste projeto, sendo o elo de ligação, e também à Dr.^a Joana Wanda, por me ter recebido e proporcionado as condições necessárias e um excelente ambiente de trabalho para elaboração do mesmo.

Ao responsável do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa Dr^o Amin Karmali, professores e funcionários, agradeço a colaboração, orientação, que elevaram os meus conhecimentos científicos e que foram indispensáveis para que este trabalho fosse concluído. Não posso deixar de mencionar que as palavras de apoio e incentivo foram essenciais. Neste laboratório percebi o quão árduo é trabalhar em Microbiologia!

Ao Dr^o António Velez Marques agradeço a sua disponibilidade para efetuar análise das minhas amostras por GC-MS.

Aos meus colegas de Laboratório, que além de alegrarem os meus dias de trabalho, partilharam o seu conhecimento, encorajaram-me sempre que era necessário e deram-me a sua amizade, são estes, Ana Margarida, Carla Rodrigues, Catarina Tula, Dorsaf Chamli, Emanuel Henriques, Evânia Finda e Rita Charneca.

Aos meus amigos estou grata pelo companheirismo, pelas vivências partilhadas e amizade sincera ao longo destes anos, pela cedência do vosso tempo quando precisava, pelos momentos de descontração, e mesmo com as minhas ausências pude contar sempre com o vosso apoio, sem vocês esta experiência teria sido muito mais difícil, são elas Carina Fernandes, Andreia Sobreiro, Joana Martins, Anabela Pinto, Silvina Pinto, Susana Gonçalves, Francisca Silva, Evaldina Mendes, Ana Marquês, Ahmed Napoleão, Tiago Gaspar, Eugénio Sebastião, Elson Oliveira, Nuno Varela, Hudson Cruz, Daniel Romão, Rafael Fernandes, Valter Teixeira. Um agradecimento especial à Dina Antunes e Andreia Pires, pois estiveram sempre presentes quando mais precisei, nunca me deixaram perder o foco, motivação e entusiasmo.

As minhas tias, Gertrudes e Edgarda, às minhas primas, Ana Sofia e Lina pela sua dedicação, carinho, afeto, e apoio em todas as etapas que percorri, a sua disponibilidade e preocupação diárias, os seus conselhos que influenciaram as minhas escolhas. Espero um dia poder recompensa-las tudo o que fizeram por mim.

À minha irmã pelo companheirismo, a vivência diária com momentos divertidos e discussões, pelas palavras de encorajamento que estavam sempre disponíveis quando mais precisei. Aos meus pais agradeço a orientação e amor incondicional que me deram, o sentido de responsabilidade que adquiri com eles, e que apesar da distância estavam sempre presentes nos momentos mais difíceis do meu percurso académico e pessoal e que sem eles a concretização de todas as etapas não seriam possíveis.

À minha avó Cecília agradeço o seu afeto que foi essencial para suportar a distância dos meus pais, e reconheço com gratidão todos os momentos que se dedicou a mim. Também agradeço ao estímulo que ela sempre me deu em querer que eu continuasse o meu percurso académico, o que me incentivou em querer saber sempre mais.

Este documento encontra-se escrito segundo o acordo ortográfico em vigor.

Resumo

Com o objetivo de desenvolver potenciais aplicações para novos fármacos e aumentar o conhecimento das propriedades terapêuticas das plantas da família das *Euforbiáceas*, foram efetuados estudos de extração com solventes convencionais e fluidos supercríticos em plantas do gênero *Jatropha*, tendo-se obtido diferentes extratos.

As extrações supercríticas dos compostos de *Jatropha gossypifolia* foram realizadas de forma sequencial em duas etapas, a uma temperatura de 313.15 K e a uma pressão de 300 bar (30 MPa). Utilizaram-se ainda dois co-solventes com o CO₂ supercrítico em proporção de 90:10, com o intuito de aumentar a polaridade do fluido supercrítico.

Os extratos obtidos a partir das folhas da planta em estudo foram analisados e iniciou-se a sua breve caracterização por GC-MS. Os testes fitoquímicos realizados permitiram detetar as principais classes de compostos químicos presentes nos extratos. Foram selecionados alguns dos extratos e avaliadas as suas capacidades antimicrobiana e antioxidante.

Do estudo fitoquímico preliminar aos extratos das folhas *Jatropha* foi possível detetar a presença de açúcares redutores, saponinas, fenóis e taninos, esteroides e terpenos e flavonoides, e não revelou a presença de glicósidos cardíacos.

Atendendo aos resultados da atividade antioxidante e comparando com o teor de fenóis totais, verificou-se que o extrato que apresentava maior poder antioxidante contém uma maior concentração em compostos fenólicos (Mac. MeOH) demonstrando uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Os extratos das folhas da *Jatropha* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e a *Bacillus subtilis*, uma vez que se verificou inibição do seu crescimento, durante os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, mas este efeito está dependente das características dos microrganismos e da composição dos extratos.

Foi demonstrado o interesse e importância de estudos futuros sobre as propriedades dos extratos de *Jatropha gossypifolia* apresentaram, bem como, uma melhor caracterização e identificação dos seus componentes.

Palavras-chave: *Jatropha gossypifolia* L; extração com solvente; ESC; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

Abstract

The principal aim of this work is to develop potential applications of new drugs and increase the knowledge of the therapeutic properties of plants of the family of *Euphorbiaceae*.

Conventional solvent and supercritical fluids extraction were carried out in plants of the genus *Jatropha*, obtaining different extracts. The supercritical extracts of *Jatropha gossypifolia* L. compounds were carried out in sequence in two steps, at 313.15 K and a pressure of 300 bar (30 MPa).

Two co-solvents were used with supercritical CO₂ in a ratio of 90:10, in order to increase the polarity of supercritical fluid. The extracts obtained from the leaves of the plant, were analysed and a brief characterization by GC-MS were performed.

Phytochemicals classes of chemical compounds present in the extracts were analysed. Some of the extracts were selected and their ability was assessed antimicrobial and antioxidant activity

The preliminary phytochemical study on extracts of *Jatropha gossypifolia* leaves was possible identify the presence of reducing sugars, saponins, phenols and tannins, terpenes and steroids and flavonoids, although the cardiac glycosides were not detected. Following the results of antioxidant activity and compared with the total phenol content of various extracts, it was found that the extract which featured greater antioxidant potency contains a greater concentration of phenolic compounds (Mac. MeOH) demonstrating a correlation between the content of phenolic compounds and antioxidant activity.

Extracts from the leaves of *Jatropha gossypifolia* showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, since it was found its growth inhibition, during the disk diffusion methods and microdilution, but this effect is dependent on the characteristics of microorganisms and the composition of the extracts.

It was demonstrated the interest and importance of future studies on these properties of extracts of *Jatropha gossypifolia* as well as a better characterization and identification of its components.

Key-words: *Jatropha gossypifolia* L.; solvent extraction; SFE; antioxidant activity; antimicrobial activity.

Lista de Abreviaturas e Siglas

OMS – Organização Mundial de Saúde

MTC – Medicina Tradicional Chinesa

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

CMI – Concentração Mínima Inibitória

GC–MS – Cromatografia gasosa com espectrometria de massa

DMSO – Dimetilsulfóxido

MeOH – Metanol

EtOH – Etanol

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

ESC – Extração Supercrítica

CO₂ – Dióxido de Carbono

Mac. – Maceração

CCF – Cromatografia em camada fina

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição

UV – Ultravioleta

FSC – Fluidos supercríticos

TR – Tempos de retenção

UFC/ mL – Unidade de formação de colónias por milímetro

Índice de figuras

Figura 1 – Espécies de grande valor económico da família das <i>Euforbiáceas</i> . (Legenda: a) <i>Manihot esculenta</i> (mandioca); b) <i>Hevea brasiliensis</i> (seringueira); c) <i>Ricinus communis</i> (mamona ou rícino); d) <i>Jatropha curcas</i> (pinhão manso); e) <i>Euphorbia esula</i>) (McMillian & Database, 2013) (Cappert & University, 2013) (Rickjpellleg, 2013) (Garland & Database, 2013) (Rees & Service, 2013).	10
Figura 2 – Distribuição geográfica do género <i>Jatropha</i> L. em 2013 (Discover Life, 2013).	11
Figura 3 – Algumas espécies do género <i>Jatropha</i> : a) <i>J. integerrima</i> ; b) <i>J. podagrica</i> ; c) <i>J. multifida</i> ; d) <i>J. macrorrhiza</i> . (Wikipedia: the free encyclopedia, 2014) (Sutheastern Arizona wildflowers, 2014) (Well grow horti trading, 2014).	12
Figura 4 – Propagação de <i>Jatropha gossypifolia</i> num terreno em Hodgson River, Australia (Cattle Producer, 2013).	14
Figura 5 – Distribuição geográfica da espécie <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Invasive Species Compendium, 2014).	15
Figura 6 – Arbusto (a), caule com latex (b), folhas (c), flores (d) e frutos (e) de <i>Jatropha gossypifolia</i> (Randall, <i>et al.</i> , 2009).	16
Figura 7 – Representação esquemática de uma cromatografia em coluna clássica (Study Everywhere, 2014).	27
Figura 8 – Representação esquemática de desenvolvimento de uma placa de cromatografia de camada de fina (CFF) (Abbott & Andrews, 1965).	29
Figura 9 – Diagrama de fases de pressão por temperatura de uma substância pura, com representação do ponto crítico (T_c , P_c). Legenda: T_c – temperatura crítica; P_c – pressão crítica (Riera, <i>et al.</i> , 2004).	30
Figura 10 – Representação esquemática dos extratos obtidos de <i>Jatropha gossypifolia</i> e o seu fracionamento.	46
Figura 11 – Esquema representativo do equipamento de extracção supercrítica (Legenda: C – compressor; E – extrator; S – separador; BP – regulador de pressão (“ <i>Back-Pressure</i> ”); MM – válvula micrométrica; MV – caudalímetro; Tot – totalizador; TI – indicador de temperatura; PT – manómetro) (Marques & Coelho, 2011).	48
Figura 12 – Cromatograma das frações EC ₄₋₅ obtidas por GC–MS, resultante da separação do extrato clorofórmio (EC), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (70:30).	61
Figura 13 – Cromatograma das frações EC ₁₅₋₂₁ obtidas por GC–MS, resultante da separação do extrato clorofórmio (EC), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (70:30).	61
Figura 14 – Estrutura do 3 β -Olean-12-en-3-ol (C ₃₀ H ₅₀ O; Mg=426.7 g).	63
Figura 15 – Estrutura do Olean-12-en-3-one (C ₃₀ H ₄₈ O; Mg=424.7 g).	63

- Figura 16 – Correlação entre o teor de polifenóis determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu* e a atividade antioxidante em IC₅₀ determinado pelo método de DPPH. 70
- Figura 17 – Efeito dos extratos de *J. gossypifolia* no crescimento de *Escherichia coli* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina..... 72
- Figura 18 – Efeito dos extratos de *J. gossypifolia* no crescimento de *Bacillus subtilis* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina..... 73
- Figura 19 – Efeito dos extratos de *J. gossypifolia* no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina..... 74
- Figura 20 – Efeito dos extratos de *J. gossypifolia* no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de difusão de disco, após 24h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+EtOH; C – ESC CO₂+MeOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina..... 76
- Figura 21 – Percentagem de inibição no crescimento de *Escherichia coli* pelo método de microdiluição em caldo, após 18h de incubação a 37°C, em função da concentração dos diferentes extratos de *J. gossypifolia*..... 79
- Figura 22 – Percentagem de inibição no crescimento de *Bacillus subtilis* pelo método de microdiluição em caldo, após 18h de incubação a 37°C, em função da concentração dos diferentes extratos de *J. gossypifolia*. 79

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Rendimento na extração por maceração e extração líquido-líquido de <i>J. gossypiifolia</i> , em termos de amostra de material vegetal inicial seca.....	57
Tabela 2 – Rendimentos para a extração líquido-líquido, em termos de extrato de metanol de <i>J. gossypiifolia</i>	57
Tabela 3 – Análise fitoquímica preliminar de diferentes extratos das folhas de <i>J. gossypiifolia</i>	59
Tabela 4 – Rendimentos obtidos, em termos de amostra de material vegetal inicial seca, para a extração supercrítica com CO ₂ , CO ₂ +Etanol e CO ₂ +Metanol (10%, v/v%) de <i>J. gossypiifolia</i> a uma temperatura de 313.15 K e pressão 300 bar.....	64
Tabela 5 – Comparação dos rendimentos obtidos para a extração por maceração de <i>Jatropha gossypifolia</i>	66
Tabela 6 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de radical livre expresso em IC ₅₀ médio em g extrato/mmol DPPH.....	68
Tabela 7 – Teor de fenóis totais nos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> expresso em mg EAG/mg extrato e por mg EAG/ 100 g material vegetal.....	69
Tabela 8 – Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de difusão em disco para a estirpe <i>Escherichia coli</i> , em termos de diâmetros de zona de inibição.....	73
Tabela 9 – Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de difusão em disco para a estirpe <i>Bacillus subtilis</i> , em termos de diâmetros de zona de inibição.....	74
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de difusão em disco para a estirpe <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , em termos de diâmetros de zona de inibição.....	75
Tabela 11 – Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>J. gossypiifolia</i> pelo método de difusão em disco para a estirpe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em termos de diâmetros de zona de inibição.....	77

1 Objetivos

Este trabalho pretende:

- i) Recolha e processamento de plantas do género *Jatropha*;
- ii) Obtenção de extratos utilizando diversas técnicas de extração;
- iii) Caracterização dos extratos através de testes fitoquímicos qualitativos para identificação de família de compostos, da planta em estudo;
- iv) Identificação prévia dos principais compostos presentes dos extratos por GC-MS;
- iii) Avaliação da capacidade antimicrobiana e antioxidante.

Espera-se com este trabalho potenciar as aplicações dos extratos da *Jatropha gossypifolia*, assim como o desenvolvimento de novos fármacos e aumentar o conhecimento das propriedades medicinais de plantas da família das Euforbiáceas.

2 Introdução

Nos últimos anos, diversas plantas medicinais têm sido utilizadas no combate de doenças tropicais, infecciosas e terminais. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% dos casos de febre em crianças possivelmente relacionados com a malária, em alguns países africanos, são tratados com ervas medicinais; além disso, nalguns países em desenvolvimento os pacientes com VIH usam medicamentos tradicionais para o alívio e combate de infeções; 89% dos pacientes que surgem no Brasil com cancro usam medicina tradicional como forma de tratamento.

Sensivelmente 25% dos fármacos produzidos são derivados, direta ou indiretamente, de plantas medicinais. Contudo, é necessário um estudo mais aprofundado destas plantas, devido aos seus potenciais riscos para a saúde humana (Robinson & Zhang, 2011).

O género *Jatropha* possui inúmeras espécies que são usadas como plantas medicinais, são fontes promissoras para a produção de novos fármacos e potenciais agentes de controlo biológico. De acordo com Devappa *et al.* (2010) e citado por Sabandar *et al.* (2013), os estudos efetuados aos extratos provenientes dos constituintes das plantas deste género (caule, semente, fruto, folha, raiz e fruto) permitiram o isolamento de vários compostos bioativos, como por exemplo os diterpenos, que apresentam uma forte atividade anti-malárica, anticancerígena, anti-tumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, inseticida e moluscicidas.

Mais especificamente, em relação a espécie *Jatropha gossypifolia*, Ogundare *et al.* (2007) e Seth & Sarin (2010) mostraram que os extratos de folhas desta mesma espécie permitiram a inibição do crescimento de certos fungos e bactérias, o que pode estar relacionado com o facto da mesma apresentar um grande número de constituintes químicos que podem ser responsáveis por muitas atividades farmacológicas. Existem outras partes desta planta que também apresentam propriedades medicinais. Panda, *et al.*, (2009) identificaram propriedades anti-inflamatórias e significativamente analgésicas no extrato de certas partes aéreas, dependendo da dose, por administração oral em animais saudáveis. Apu, *et al.* (2013), verificaram que o extrato de metanol provindo das frutas desta planta apresentam uma significativa atividade neuro-farmacológica, antidiarreica e analgésica. Contudo, são necessários mais estudos para isolar e identificar os princípios ativos responsáveis por estas atividades e os seus mecanismos de ação. A avaliação das propriedades pesticidas de *J. gossypifolia* foi realizada por Bullangpoti *et al.* (2011) através da determinação da atividade inseticida do extrato das

folhas desta espécie, obtido com acetato de etilo. Os resultados evidenciaram a capacidade de *J. gossypifolia* no controlo de pragas de *Spodoptera exigua*, sendo esta uma alternativa à utilização de inseticidas químicos.

O género *Jatropha* também é usado para fins ornamentais e energéticos (Sabandar, et al., 2013). Segundo Devappa et al., (2010a), durante as últimas duas décadas, foram realizados vários projetos para a produção de óleo de *Jatropha*, que pode ser usado como matéria-prima para a produção de biodiesel. O estudo levado a cabo por Oliveira et al. (2009) verificou que as propriedades físico-químicas desta espécie permitem a produção de biodiesel aceitável para uso em motores a *diesel*, mostrando ser uma matéria-prima de potencial exploração económica em regiões semiáridas.

Assim, é importante o estudo e investigação de extratos, bem como a análise dos componentes provenientes desta planta, para que se possa desenvolver e explorar o seu potencial fitoquímico, farmacológico, agrotóxico e energético (Devappa, et al., 2010; Devappa, et al., 2010a).

3 Revisão da Literatura

3.1 Plantas medicinais e as suas aplicações

Historicamente, o homem tem vindo a utilizar as plantas medicinais simultaneamente com a Medicina Tradicional como recurso terapêutico no tratamento e prevenção de várias doenças (Fabricant & Farnsworth, 2001; Okigbo, *et al.*, 2009).

A Medicina Tradicional refere-se a qualquer prática médica não ocidental (Fabricant & Farnsworth, 2001) e consiste em diferentes abordagens, conhecimentos e crenças (Kayombo, *et al.*, 2012) relativamente à saúde, associados a medicamentos fitoterápicos, preparações medicinais à base de plantas e ervas (na forma simples, ou seja, partes ativas da planta ou outros materiais vegetais, ou na forma mais complexa através infusões, cataplasmas, extratos em bruto ou combinação de ambas), e podem também incluir partes de animais e minerais. Assim apoiam, previnem e melhoram a saúde humana (Robinson & Zhang, 2011).

Esta prática de saúde é milenar, está dependente do contexto sociocultural de uma comunidade e pode ser diferente de comunidade para comunidade (Okigbo, *et al.*, 2009). Por vezes, as plantas utilizadas e informações são mantidas em segredo, havendo muitos poucos dados registados (Fabricant & Farnsworth, 2001). Contudo, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), com mais de 2500 anos, é um sistema mais definido e organizado e que tem sido utilizado com sucesso para diagnosticar, tratar e prevenir doenças (Fabricant & Farnsworth, 2001; Robinson & Zhang, 2011).

Estas técnicas continuam a ser usadas em todos os países do mundo, em que cerca de 70% a 95% dos habitantes dos países em desenvolvimento, “principalmente, na Ásia, África, América Latina e Médio Oriente”, utilizam-na para os cuidados de saúde primários, como apoio aos medicamentos tradicionais. Em alguns países desenvolvidos, o uso de medicação tradicional é igualmente significativa, sendo cada vez mais utilizados no tratamento, prevenção e manutenção da saúde pessoal, pois oferece benefícios terapêuticos e de tratamento mais acessíveis (Okigbo, *et al.*, 2009; Robinson & Zhang, 2011).

É difícil estimar um valor económico relativamente ao mercado das plantas medicinais e medicamentos tradicionais. Contudo entre os países Europeus, o valor das vendas em 2003 foi estimado em 3.7 biliões de euros. Este montante foi baseado em fabricantes e grossistas, não representando o custo real para o usuário final. Tendo o mesmo principio para o cálculo adjacente, o mercado mundial destes produtos foi estimado em

61.4 bilhões de euros em 2008, com uma taxa de crescimento exponencial nos anos seguintes (Robinson & Zhang, 2011). Este facto está relacionado com o desenvolvimento de vários medicamentos, fármacos e quimioterápicos a partir destas plantas (Okigbo, *et al.*, 2009).

As plantas medicinais podem ser caracterizadas de duas formas: plantas cujas propriedades terapêuticas e os seus constituintes foram estabelecidas cientificamente, e plantas que são consideradas medicinais, mas que ainda não foram submetidas a investigação detalhada (Okigbo, *et al.*, 2009). Assim, de acordo com a OMS, citado por Okigbo *et al.* (2009), uma planta medicinal é qualquer planta que apresente num ou em mais dos seus órgãos substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos ou que possam ser precursoras para a síntese de novos fármacos.

O termo “herbal drug” (medicamentos à base de plantas) é aplicado quando uma parte ou partes da planta são utilizadas para a preparação de medicamentos, nomeadamente, folhas, flores, sementes, raízes, cascas, caules (Okigbo, *et al.*, 2009). Estas podem ser submetidas a extração, fracionamento, purificação, concentração ou outros processos físicos ou biológicos para a sua utilização direta (estado bruto) ou como intermediário de produtos à base de plantas (formulações farmacêuticas) (Okigbo, *et al.*, 2009; Rates, 2001).

A recolha de plantas ocorre essencialmente em florestas tropicais, pois estas contêm uma grande variedade de espécies, que por vezes são endémicas (Balunas & Kinghorn, 2005). Na sua composição podem apresentar substâncias biologicamente ativas, tais como saponinas, taninos, óleos essenciais, flavonoides, alcaloides e outros compostos complexos, com propriedades curativas e que usualmente são encontrados nas mesmas como metabolitos secundários (Okigbo, *et al.*, 2009). Por este motivo, têm sido utilizadas como fontes de agentes terapêuticos através: a) do isolamento de compostos bioativos para o uso direto como drogas, como por exemplo a digoxina, taxol e a morfina; b) para a produção de compostos bioativos com diferentes estruturas que permitam a semi-síntese de compostos de entidades patenteáveis de maior atividade ou de menor toxicidade; c) para utilização como ferramentas farmacológicas; e d) aplicação da planta ou de algumas partes como um medicamento (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Segundo Fabricant & Farnsworth (2001) existem vantagens na utilização de plantas como ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos. Um aspeto vantajoso prende-se com o facto de se poder usar informação de plantas específicas para a utilização destas por seres humanos a longo prazo (etnomedicina). Além disso, os

compostos ativos isolados de plantas tendem a ser mais seguros do que os compostos ativos de plantas sem histórico de uso humano. Por outro lado, as plantas são consideradas fontes renováveis de matéria-prima e fornecem uma fonte ilimitada de novas e complexas estruturas. Por último, com a finalidade de assegurar patentes através do isolamento de princípios ativos de plantas, que apresentem novas estruturas e atividade biológica útil, a pesquisa de novos constituintes permite a produção de compostos sintéticos ou semi-sintéticos, com menor toxicidade e maior eficácia, sendo esta a futura tendência devido a competitividade industrial (Fabricant & Farnsworth, 2001; Balunas & Kinghorn, 2005).

Os mesmos autores relatam as desvantagens associadas ao uso de plantas que podem ir desde a sua seleção aleatória a regulamentações que protejam a diversidade biológica. Os países com uma vasta área de florestas tropicais, para a proteção e conservação da diversidade biológica e o para o uso sustentável dos recursos biológicos, estabeleceram regulamentos e acordos formais para recolha de amostras de materiais vegetais, que requer uma prévia planificação evitando assim a perda de habitats. Algumas destas restrições estão ligadas à preservação de material genético, a direitos de propriedade intelectual e compensação para as descobertas decorrentes dos seus recursos genéticos (Fabricant & Farnsworth, 2001; Balunas & Kinghorn, 2005).

As plantas medicinais bem como os medicamentos à base de plantas continuarão a ser utilizados pela população (etnomedicina) juntamente com a Medicina Tradicional, tanto nos países em desenvolvimento como nos industrializados (Okigbo, *et al.*, 2009; Robinson & Zhang, 2011). Devido ao seu impacto no sector da saúde e económico é necessário garantir continuamente medidas e políticas para regular a produção e utilização de tais produtos para que sejam cumpridos os critérios aceitáveis para serem considerados seguros e eficazes (Robinson & Zhang, 2011).

Existem informações sobre plantas medicinais que ainda são desconhecidas e sendo estas uma fonte de compostos bioativos para a produção de novos fármacos, é necessário investir na investigação e pesquisa para identificação destes constituintes ativos bem como o seu isolamento (etnofarmacologia) (Robinson & Zhang, 2011; Balunas & Kinghorn, 2005).

3.1.1 Família das *Euforbiáceas*

A família *Euphorbiaceae* é uma fonte de plantas medicinais. Também conhecida por *Spurge family*, em português *Euforbiáceas*, constituída por mais de 300 géneros e mais de 8000 espécies, é considerada uma das maiores famílias de plantas com flores. Os seus membros encontram-se distribuídos por todo o mundo, mas desenvolvem-se melhor e maioritariamente em regiões de climas tropicais e subtropicais. Na África Austral é a segunda maior família, com um pouco mais de 100 espécies de árvores nativas de grande importância (Mwine & Damme, 2011; Van & Van, 2009).

As espécies pertencentes a esta família apresentam estrutura vegetal e floral bastante variada e heterogénea, com plantas que podem ser grandes árvores lenhosas, lianas trepadeiras, arbustos e ervas daninhas ou perenes (Chauhan & Sood, 2013). A sua maioria pode ser reconhecida pelo seu latex (seiva) lacrimante e leitoso, que pode exibir cores apelativas, sendo contudo muito tóxico. Em contato com a pele esta seiva pode causar irritações e erupções cutâneas. Por sua vez, em contato com os olhos pode causar cegueira e quando ingerido provoca fortes diarreias (Infopédia, Dicionário Porto Editora, 2013; Van & Van, 2009).

De acordo com Cronquist (1981), citado por Duarte (2008), os géneros mais representativos, tendo em conta o número de espécies, são: *Euphorbia L.*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Acalypha*, *Macaranga*, *Antidesma*, *Drypetes*, *Tragia*, *Jatropha* e *Manihot*.

Esta família é composta por espécies de grande valor económico, das quais se destacam: *Manihot esculenta* (mandioca) (Figura 1 – a), importante espécie agrícola de cultura industrial, que constitui um alimento básico primário (folha e raiz) para as populações com baixo rendimento; *Hevea brasiliensis* (seringueira) (Figura 1 – b), a principal fonte de borracha natural; *Ricinus communis* (mamona ou rícino) (Figura 1 – c), oleaginosa usada na produção de óleo de rícino; *Jatropha curcas* (pinhão manso) (Figura 1 – d), oleaginosa com importante aplicação na produção de *fuel*, sabão e no uso medicinal; e *Euphorbia esula* (Figura 1 – e), erva daninha perene presente em prados e campos na América do Norte (Van & Van, 2009; Chauhan & Sood, 2013; Heller, 1996; Mwine & Damme, 2011).



Figura 1 – Espécies de grande valor económico da família das *Euforbiáceas*. (Legenda: a) *Manihot esculenta* (mandioca); b) *Hevea brasiliensis* (seringueira); c) *Ricinus communis* (mamona ou rícino); d) *Jatropha curcas* (pinhão manso); e) *Euphorbia esula* (McMillian & Database, 2013) (Cappert & University, 2013) (Rickjpellg, 2013) (Garland & Database, 2013) (Rees & Service, 2013).

As plantas da família *Euphorbiaceae* podem ser medicinais ou aromáticas e apresentam na sua composição compostos com atividade biológica, tais como, terpenos, alcaloides, flavonoides, fenóis, que podem ser encontradas nas folhas, caules, flores, casca, fruto ou semente (Mwine & Damme, 2011).

Embora a maioria das plantas possa ser classificada como venenosa, ainda hoje são usadas na medicina popular/ tradicional, devido às suas propriedades terapêuticas, contudo com dosagem e eficácia por vezes desconhecida, o que pode causar efeitos adversos. Segundo Mwine e Damme (2011), alguns extratos de membros da família *Euphorbiaceae* foram isolados e patenteados como precursores para síntese de alguns fármacos.

Estas plantas são atualmente alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fitoterápicos com aplicações para uso humana, animal ou pesticida (Okigbo, *et al.*, 2009; Mwine & Damme, 2011).

3.1.2 Gênero *Jatropha* L.

O gênero *Jatropha* é constituído por cerca de 175 espécies e pertence à família das *Euphorbiaceae*, subfamília *Crotonoideae* e tribo *Jatropeae* (Sujatha, *et al.*, 2013) (Bahadur, *et al.*, 2013). Estas plantas apresentam uma distribuição disjunta, encontrando-se maioritariamente nas Américas (Norte e Sul), de onde a maior parte é nativa. Existem entre 50 a 70 espécies em África, sendo uma endémica em Madagáscar; uma dúzia na Índia; e cerca de 50 espécies na Arábia (Murthy, *et al.*, 2013; Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008; Dehgan, 1982). Também é possível encontrar duas espécies no território Australiano (Randall, *et al.*, 2009).

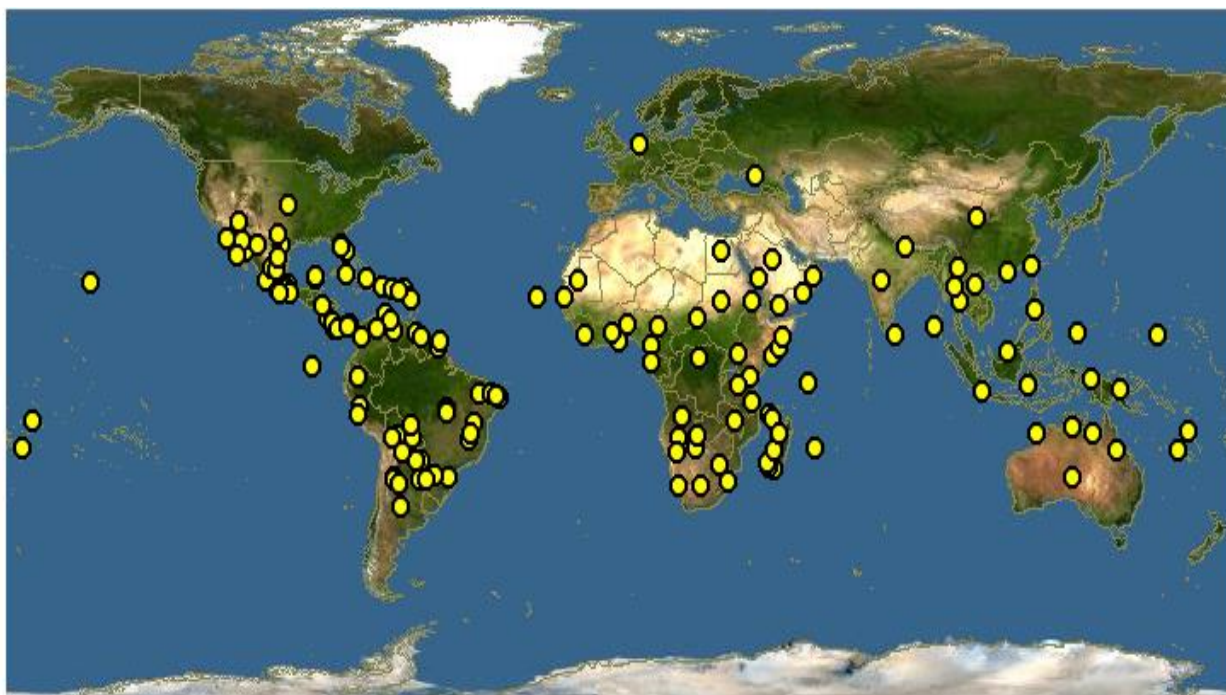


Figura 2 – Distribuição geográfica do gênero *Jatropha* L. em 2013 (Discover Life, 2013).

Dehgan e Webster (1979), baseando-se nas características da espécie *Jatropha curcas*, consideraram que as outras espécies evoluíram desta ou de uma outra forma ancestral, com algumas mudanças no seu hábito de crescimento e especialização na estrutura vegetativa (estruturas florais). Estas plantas foram provavelmente distribuídas por navegadores portugueses através das ilhas de Cabo Verde e pela Guiné – Bissau para os outros países (Heller, 1996).

Por ser um gênero de crescimento rápido, fácil propagação e adaptação, apresenta uma vasta distribuição (Dehgan, 1982). Este mesmo autor delimitou o gênero em dois subgêneros, *Jatropha* e *Curcas*, tendo por base as suas características anatómicas, morfológicas e citológicas. O subgênero *Jatropha* é o que apresenta maior distribuição, e abrange as espécies Africanas, Indianas, Norte americanas, Sul Americanas,

Antilhanas e das regiões Meso-Americanas. Este subgénero foi naturalizado na América do Sul e nas regiões Meso-Americanas, nomeadamente, México, Cuba, Peru, Bolívia, Costa Rica, Paraguai, Jamaica, Brasil, El-Salvador, Guatemala, Argentina, Republica Dominicana, Columbia, Nicarágua e nos estados do Arizona e Texas, América do Norte. O subgénero *Curcas*, a maioria das suas espécies estão restritas ao México e regiões contíguas e aos estados do Arizona e do Texas, nos desertos Sonoran e Chihuahuan, na América do Norte. Este subgénero também abrange uma espécie da Costa Rica, duas Africanas e uma Indiana (Sabandar, *et al.*, 2013; Heller, 1996).

Devido a esta distribuição, é um género morfológicamente diverso, composto por plantas herbáceas perenes, suculentas, facultativas anuais, geófitas, arbustos, subarbustos rizomatosos e árvores lenhosas, cada uma com uma região geográfica específica para o seu desenvolvimento. (Sujatha, *et al.*, 2013; Sabandar, *et al.*, 2013; Dehgan, 1982) Esta diversidade morfológica permitiu que várias espécies fossem cultivadas como plantas ornamentais, sendo duas das principais características as suas folhas e flores (Sujatha, *et al.*, 2013).



Figura 3 – Algumas espécies do género *Jatropha*: a) *J. integerrima*; b) *J. podagrica*; c) *J. multifida*; d) *J. macrorhiza*. (Wikipedia: the free encyclopedia, 2014) (Sutheastern Arizona wildflowers, 2014) (Well grow horti trading, 2014).

O género *Jatropha* destacou-se nas últimas décadas, particularmente, pelo óleo proveniente das suas sementes, que é considerado uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel. A espécie *J. curcas* é a mais estudada do género por as suas sementes serem ricas em óleo e que levou nos últimos anos, ao aparecimento de vastas áreas de plantações da mesma em alguns país da Ásia, África e América do Sul (Devappa, *et al.*, 2010a; Oliveira, *et al.*, 2009).

O nome do género deriva do Grego, *iatrós* que significa “doutor” e *trophé* “comida ou nutrição”, que está relacionado com as suas propriedades medicinais. Durante muito tempo este género tem sido aplicado como planta medicinal (Devappa, *et al.*, 2010; Sabandar, *et al.*, 2013), e tem sido utilizada por 80% da população mundial na Ásia, América Latina e África. Existem várias espécies deste género que são usadas pelos seus usos medicinais, sendo as três mais importantes *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. multifida*. (Sabandar, *et al.*, 2013)

Este género é conhecido pelo seu pelo efeito purgativo do óleo proveniente das suas sementes que é usado para sintomas digestivos, diarreia, disenteria, vómitos, náusea e dor de estomago. Também as folhas de algumas de espécies apresentam semelhante efeito purgativo. Outras finalidades estão relacionadas com a cura de doenças de pele como o óleo da semente, látex, folha, casca do caule ou raiz são trituradas e aplicadas sobre a pele para tratar eczemas, coceiras, carbúnculos, bolhas na boca, feridas e inchaços.

É igualmente aplicado no tratamento de doenças venéreas e de foro urinária. As raízes de certas espécies, *J. gossypifolia* e *J. multifida*, são usadas no tratamento de lepra e gonorreia, respetivamente. O latex das espécies *J. curcas* e *J. mollissima* é usado para como antidoto do veneno de cobra, concentrado para o uso externo e diluído com água para uso interno. (Sabandar, *et al.*, 2013; Devappa, *et al.*, 2010a). O extratos aquosos e alcoólicos do caule e da casca da espécie *J. macaranta* são usados como estimulante sexual masculino. (Devappa, *et al.*, 2010)

A utilização de plantas do género *Jatropha* na etnomedicina desencadeou a pesquisa de moléculas bioativas, sendo possível o isolamento de alguns dos seus constituintes químicos, entre os quais, alcaloides, péptidos cíclicos, terpenos (mono-, di- e tri-), flavonoides, lignanas, cumarinas e ácidos gordos. (Devappa, *et al.*, 2010a; Devappa, *et al.*, 2010) Destes compostos, os que mais se destacaram foram os diterpenos, que são muito abundantes neste género e apresentam uma elevada bioatividade e toxicidade, sendo por isso potenciais matérias-primas para a síntese de novos compostos. A presença de diversos compostos com diferentes atividades biológicas, neste género, permite a utilização dos resíduos resultantes da extração do óleo das sementes como fertilizantes, apesar destes serem tóxicos devido a presença de ésteres de forbol, sendo necessária a extração dos mesmos. No entanto, é fundamental a realização de mais ensaios para verificar esta potencial aplicação, pois os esterres de forbol degradam-se no solo dependendo da temperatura e humidade do solo (Sabandar, *et al.*, 2013; Devappa, *et al.*, 2010a).

Nas últimas décadas, vários estudos foram efectuados a algumas espécies deste género, por análise da atividade dos seus óleos, extratos e dos constituintes químicos isolados, tais como anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-malarica, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, inibição de acetilcolinesterase, moluscicida, inseticida (Sabandar, *et al.*, 2013). Contudo, a presença de compostos tóxicos requer uma maior análise tanto para o tratamento tradicional, como para a aplicação em indústrias de diferentes áreas, como agro- farmacêutica ou de *biofuel*. (Devappa, *et al.*, 2010a) (Devappa, *et al.*, 2010).

3.1.3 Descrição botânica de *Jatropha gossypifolia* L.

A espécie *Jatropha gossypifolia* L (sinónimos: *Adenoropium gossypifolium* (L.) Pohl., *Jatropha elegans* (Pohl) Klotzsch) (Kumar & Singh, 2012) é uma das principais plantas medicinais do género *Jatropha*, secção *Jatropha*, família das *Euforbiáceas* (Sabandar, *et al.*, 2013; Heller, 1996) (Heller, 1996). O seu nome “*gossypifolia*” é uma combinação do Latim “*gossypium*”, que significando algodão, com “*folium*”, que sugere que as folhas são semelhantes às do algodoeiro (Parsons & Cuthbertson, 2001). Supõe-se que esta espécie seja nativa da América tropical e da região das Caraíbas, mas não se sabe o local exato da sua origem (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008; Randall, *et al.*, 2009).

Esta planta apresenta uma fácil adaptação, cresce naturalmente em quase todos os tipos de solo (areia bem drenada, solos arenosos e argilosos, pedregosos), em regiões com uma estação seca pronunciada, em pastagens e arbustos, próximo de zonas costeiras e lugares desérticos (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008; Randall, *et al.*, 2009). Também é possível encontrar-se em terrenos baldios, na beira de estradas, campos agrícolas mal cuidados, e áreas de transbordo dos rios (Kumar & Singh, 2012; Francis, 2001) (Figura 4).



Figura 4 – Propagação de *Jatropha gossypifolia* num terreno em Hodgson River, Australia (Cattle Producer, 2013).

A sua rápida propagação, através de sementes e partes vegetativas permitiu que a sua distribuição fosse muito além da original (Randall, *et al.*, 2009). Atualmente encontra-se naturalizada na maior parte dos países tropicais, em toda África tropical exceto nas regiões secas do sul (mas inclui a África do Sul), América do Norte (maioritariamente na Flórida e México) e Sul, Ásia, e a Austrália, sendo introduzida como planta medicinal e ornamental (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008; Randall, *et al.*, 2009).

Segundo, Holm *et. al.* (1979), citado por Prentis *et. al.* (2008), foi registada como uma espécie invasora nalgumas áreas, devido à sua rusticidade, resistência a longos períodos de seca, não ser atacada por pragas e doenças, bem como a sua adaptabilidade a condições de solo e climáticas muito diferentes, nomeadamente, na Austrália, no Sudeste Asiático, nas zonas costeiras da África Ocidental, na Índia, nas Ilhas do Pacífico, em algumas zonas da América do Sul e nas Antilhas.

Na África Ocidental esta espécie é ainda plantada em torno das aldeias para a proteção das casas contra o fogo, pois estas têm pouca tendência a inflamar, bem como para manter as cobras afastadas e como limitação da área. O óleo das suas sementes é utilizado como lamparina e combustível (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008).

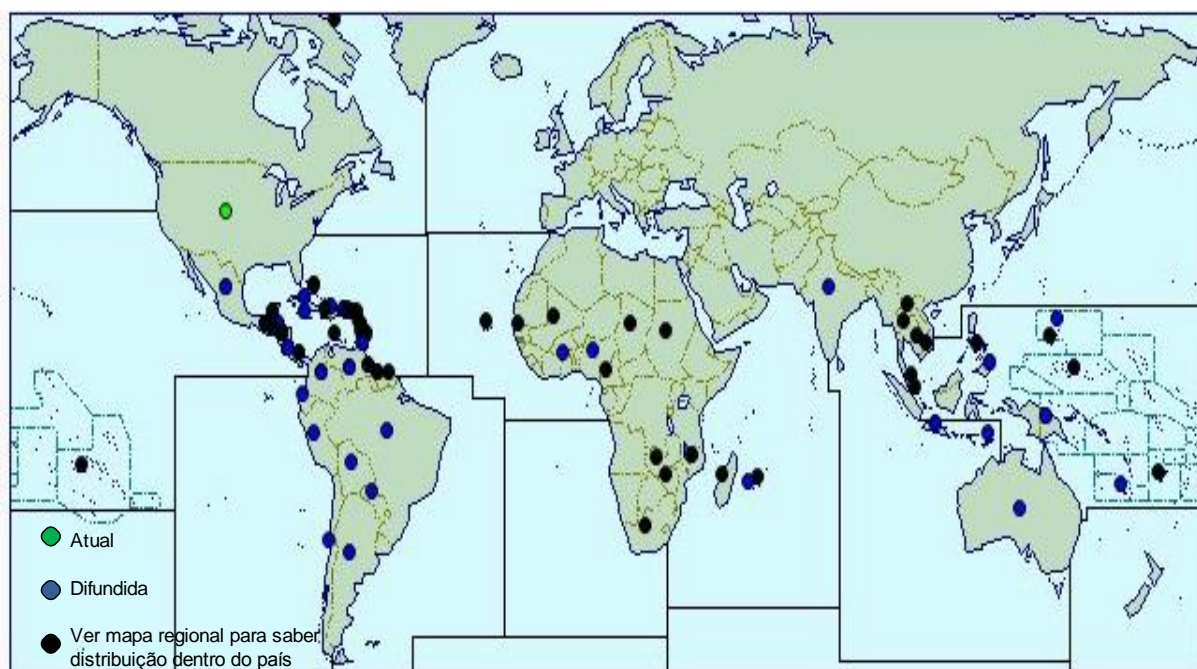


Figura 5 – Distribuição geográfica da espécie *Jatropha gossypifolia* L. (Invasive Species Compendium, 2014).

Burkill (1994), Howard (1989), Liogier (1988) e Parrotta (2001), citado por Francis (2001) e Kumar e Singh (2012), descrevem botanicamente a *Jatropha gossypifolia* como um arbusto perene muito ramificado de 0.5 a 3 m de altura e 1 a 3 cm de diâmetro basal e

dependendo do clima pode ser sempre verde ou caducifólio (Figura 6 – a). Este apresenta uma raiz principal curta, que não é normalmente muito enraizada, laterais robustas e muitas raízes terciárias finas. É constituída apenas por um caule lenhoso, ereto, cilíndrico, sólido e ramificado. O pequeno número de ramos presente é robusto, verde e semilenhoso. No interior dos caules e ramos existe um latex (seiva) espesso, branco ou amarelo, que é possível ver-se quando estes são cortados (Figura 6 – b). O caule, os ramos e as folhas apresentam na sua superfície pelos glandulares. As suas folhas são alternadas, opostas, caulinares ou ramais, podendo ter três ou cinco lóbulos. O seu comprimento e largura pode variar entre 3 a 13 por 3 a 19 cm, apresentam uma cor avermelhada ou arroxeadada quando jovens e verdes quando totalmente desenvolvidas (Figura 6 – c). As flores são pequenas, vermelhas ou roxas, nascem a diversos níveis da haste da planta e elevam-se à mesma altura, formando sucessivamente vários ramos que saem em posição oposta, corimbo cimeira terminal (Figura 6 – d). As pétalas podem também ser 5, de tonalidade rosa avermelhada ou roxa e com 0.5 cm de comprimento e 0.3 cm de largura. Os frutos são oblongos, cápsulas de três lóbulos, verdes quando jovens e castanhos-amarelados na maturidade (Figura 6 – e). No seu interior encontram-se três sementes de tonalidades cinza, castanha ou cinza-vermelho de 0.6 cm de comprimento, 0.3 centímetros de largura e 0.2 cm de espessura (Francis, 2001; Kumar & Singh, 2012).



Figura 6 – Arbusto (a), caule com latex (b), folhas (c), flores (d) e frutos (e) de *Jatropha gossypifolia* (Randall, *et al.*, 2009).

A floração, foliação e frutificação da planta inicia-se na época das chuvas, mas pode continuar durante todo o ano se a humidade do solo permanecer alta. Esta pode produzir sementes por autofecundação ou polinização cruzada, e muitos insetos, entre as quais

as abelhas, visitam as suas flores para recolher o néctar (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008).

3.1.4 Propriedades Medicinais de *Jatropha gossypifolia*

A espécie *J. gossypifolia* é conhecida pelas suas propriedades purgativas e é uma planta que tem sido usada para fins medicinais (Dehgan, 1982; Félix-Silva, *et al.*, 2014).

Algumas das propriedades medicinais são comuns a outras espécies do género *Jatropha*, e são atribuídas a toda planta ou a partes específicas da mesma, como folhas, caules, raízes, frutos, sementes e látex. Estas são preparadas de diversas formas, entre as quais, infusão, decocção, cinzas, extratos e podem ser utilizadas de formas distintas como oral, tópica, ou banhos (Félix-Silva, *et al.*, 2014).

O uso popular da planta de *J. gossypifolia* pode ser como analgésico (dores no corpo, cabeça e dente), anti-inflamatório, antidiarreico, antiofídico (picada de escorpiões e mordidas de cobras), antitérmico, anti-hipertensivo, antimicrobiano, anti-hemorrágica, anticoagulante, antipirético, diurético, anti convulsionante, antisséptico, anti-hipertensivo, anti hepatotóxico, e no tratamento da malária, diabetes, anemia, doenças de pele, cancro (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Misra & Misra, 2010). Esta planta também é utilizada no tratamento disфонia, eczemas, abscessos, cicatrização de feridas, disenteria, lepra, artrite, úlceras, otite, alopecia, regulador de menstruação, doenças venéreas, dores de estomago, obstruções do trato abdominal, reumatismo, mordida de animais venenosos (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008; Félix-Silva, *et al.*, 2014).

A utilização de *J. gossypifolia* como planta medicinal demonstra que esta apresenta um grande potencial como fonte de moléculas bioativas com relevância farmacológica ou biotecnológica. Contudo, é necessário conhecer os compostos realmente importantes e se o isolamento e purificação destes podem eliminar os efeitos tóxicos ou reduzir o valor medicinal da espécie, pois só desta forma é possível a utilização dos mesmos na produção de medicamentos a base de plantas ou de produtos bioativos naturais para a sua aplicação em medicina alternativa e complementar (Félix-Silva, *et al.*, 2014).

3.1.5 Constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia*

As plantas sintetizam uma ampla e diversificada variedade de compostos orgânicos. Alguns destes compostos estão presentes em todas as plantas e executam funções metabólicas, associadas à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento das mesmas. Estes representam os metabolitos primários, entre os quais, lípidos acilados, nucleótidos, aminoácidos e ácidos orgânicos (Dewick, 2002; Croteau, *et al.*, 2000; Crozier, *et al.*, 2006).

Existem outros fitoquímicos, estruturalmente diferentes, muitos dos quais encontram-se apenas numa espécie ou género, ou estão distintamente distribuídos em grupos taxonomicamente relacionados, designados metabolitos secundários (Crozier, *et al.*, 2006; Mazid, *et al.*, 2011; Croteau, *et al.*, 2000). A síntese dos mesmos pode ser ativada unicamente durante uma fase particular de crescimento ou fase de desenvolvimento, ou em épocas sazonais específicas, ou sob condições de disponibilidade de nutrientes ou *stress*, entre outros fatores (Verpoorte, *et al.*, 2002). A sua função está relacionada com a proteção das plantas contra predadores, como insetos, fungos e bactérias, bem como a sua repelência, em função da sua natureza tóxica, como atração de polinizadores e animais de dispersão de sementes, protetores UV e para a comunicação das plantas com outros organismos (Mazid, *et al.*, 2011; Verpoorte, *et al.*, 2002; Crozier, *et al.*, 2006). Alguns dos principais metabolitos secundários podem ser alcaloides, lignanas, esteroides, terpenos, flavonoides, fenóis e polifenóis, antocianinas, quinonas. (Verpoorte, *et al.*, 2002; Crozier, *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, estes compostos foram alvo de uma pesquisa de extrema relevância, dado que têm importantes aplicações comerciais como corantes, fibras, colas, ceras, óleos, agentes aromatizantes, perfumes, bem como fontes de potenciais fármacos naturais, antibióticos, inseticidas e herbicidas (Dewick, 2002; Verpoorte, *et al.*, 2002; Crozier, *et al.*, 2006).

Diversos compostos químicos, tais como, ácidos gordos, os açúcares, alcaloides, aminoácidos, esteroides, cumarinas, lignanas, flavonoides, proteínas, saponinas, taninos e terpenos, foram detetados na espécie *J. gossypifolia* (Félix-Silva, *et al.*, 2014).

Contudo, Félix-Silva, *et al.* (2014) mencionaram que os principais compostos bioativos desta espécie não estão totalmente explícitos, uma vez que são poucos os estudos que efetuem o isolamento e determinem a atividade biológica dos mesmos. Estes também referem o facto de existirem poucos estudos que utilizam água como solvente de extração de constituintes de *J. gossypifolia*, pois quando esta planta é usada para fins

medicinais é normalmente em forma de infusão ou decocção. Pouco se sabe sobre a constituição deste tipo de extrato, o que se traduz em poucos compostos polares identificados, como flavonoides, taninos e glúcidos. Normalmente, nestes estudos utilizam solventes ou misturas de solventes com características não polares, que contribui caracterização de compostos não polares, como os terpenos e lignoides (Félix-Silva, *et al.*, 2014).

Sendo os compostos terpénicos os que se encontram maioritariamente no género *Jatropha*, foi possível isolar monoterpenos, diterpenos e triterpenos nesta espécie (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013). Relativamente ao rizoma foi possível o isolamento do monoterpeno 1,4-Epoxi-p-mentano-2-ol (**1**). Os diterpenos foram isolados de diversas partes de *J. gossypifolia*, entre estes, o Citlaltiriona (**2**), que despertou interesse para a semi-síntese de agentes anticancerígenos, e Jatrofenona (**3**), que apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* comparativamente à penicilina de referência. Estes compostos foram isolados a partir do extrato de toda a planta diclorometano: metanol (1: 1, v / v) por cromatografia em coluna de sílica em gel (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Devappa, *et al.*, 2010). Um outro diterpeno, 12-deoxi-16-hidroxi-forbol (DHPB) (**4**), foi isolado a partir do extrato semente por cromatografia em contracorrente e possui atividade como promotor de tumores (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013). A partir do extrato das raízes, foi possível isolar Jatrofolona (Jatropholone) A e B (**5 e 6**), Faladona (Falodone) (**7**), Jatrofona (Jatrophone) (**8**), e os seus derivados naturais, 2 α -Hidroxi-jatrofona (**9**), 2 β -Hidroxi-jatrofona (**10**) e 2 β -Hidroxi-5,6-isojatrofona (**11**), que apresentam atividade citotóxica, anti proliferativa de células leucémicas e tumorais e atividade antibacteriana *in vitro* (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Devappa, *et al.*, 2010; Sabandar, *et al.*, 2013). Das folhas foi possível o isolamento de triterpenos, como (2 α , 13 α , 14 β , 20S)-2,24,25-Trihidroxilano-7-en-3-one (**12**) e (13 α , 14 β , 20S)-2,24,25-Trihidroxilano-1,7-dien-3-one (**13**), obtidos do extrato de etanol por procedimentos de partição sucessivos, cromatografia de sílica em gel e TLC (Félix-Silva, *et al.*, 2014) (Anexo A, Figura A1).

Outra classe encontrada e muito importante foi a dos lignoides, uma vez que apresentam muitas estruturas isoladas e identificadas, tais como, lignanas e as coumarino-lignanas (lignanas não convencionais). Entre os quais, Propacina (**14**), Gossipifana (**15**), Gossipilina (**16**), Jatrodieno (**17**), Gossipidieno (**18**), Cleomiscosina A (**19**), Isogadaina (**20**) e Prasantalina (Prasanthaline) (**21**), Gadaina (**22**) e Jatrofana (Jatrophan) (**23**) (Anexo A, Figura A2). (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013).

Também foram detetados e isolados alcaloides, como Ricinina **(24)**, Piperidina **(25)** e Jatrofina **(26)**. A identificação de flavonoides em diferentes extratos de etanol das folhas, nomeadamente, Apigenina **(27)**, Vitexina **(28)** e Isovitexina **(29)**, a quem são atribuídos a atividade antioxidante (Anexo A, Figura A3). Através do latex a presença de proteínas, péptidos cíclicos, como Ciclogossina A e B **(30 e 31)** (Anexo A, Figura A4). No extrato de éter de petróleo das sementes foram identificados ácidos gordos, tais como, ácido caprílico, ácido láurico, ácido lignocérico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido ricinoleico, ácido palmitoléico, ácido 12-hidróxi-cis -octadeca-9-enóico (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013; Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008).

3.2 Métodos usuais de extração e/ ou separação de compostos bioativos de plantas

A extração é uma etapa fundamental para obtenção de compostos químicos a partir das plantas ou das suas partes vegetais. A utilização de uma técnica de extração adequada é determinante para separação e/ou purificação, identificação e caracterização de compostos bioativos, e também evita a sua perda ou degradação (Sasidharan, *et al.*, 2011; Dai & Mumper, 2010; Gurib-Fakim, 2006).

Relativamente à seleção do solvente, a escolha do mais apropriado tem por base a sua seletividade em relação às substâncias a serem extraídas (Seidel, 2006). Segundo Seidel (2006), as extrações podem ser seletivas, quando um solvente de polaridade adequada é utilizado para extrair seletivamente os constituintes do material vegetal, ou totais, se um solvente orgânico polar (como metanol, etanol, ou mistura de álcool e água) é usado para facilitar e maximizar a extração de possíveis componentes a partir da amostra vegetal.

Existem diversas técnicas de extração, nomeadamente, as técnicas de extração convencionais ou tradicionais e as técnicas de extração não convencionais, todas com objetivos comuns, nomeadamente, i) extração de compostos bioativos a partir de amostras de plantas complexas; ii) aumento da seletividade dos métodos analíticos; iii) aumento da sensibilidade dos ensaios de atividade biológica por incremento da concentração dos compostos; iv) conversão de compostos bioativos de fácil deteção e separação; v) proporcionar um método robusto e reprodutível que seja independente das variações da matriz da amostra (Azmir, *et al.*, 2013). Assim, a aplicação de diferentes técnicas de extração permitirá estudar a seletividade dos compostos bioativos provenientes de diversas fontes naturais, e como tal escolher a melhor técnica de separação/ purificação para obtenção dos compostos desejados (Ibañez, *et al.*, 2012; Azmir, *et al.*, 2013).

3.2.1 Técnicas de extração sólido-líquido

As técnicas convencionais ou tradicionais de extração sólido-líquido consistem na separação de componentes solúveis, contidos numa matriz sólida, que se difundem no solvente quando este entra em contacto direto com a matriz (Theodore & Ricci, 2010; Dutta, 2007; Ignat, *et al.*, 2011). É uma operação unitária muito usada para recuperar diversos compostos ativos de plantas e das suas partes vegetais, bem como a preparação de extratos de origem vegetal, devido a sua fácil utilização (Ignat, *et al.*, 2011; Dai & Mumper, 2010).

Neste processo existem diversos fatores que afetam a eficiência de extração e o seu rendimento, entre os quais, o tamanho das partículas e a presença de substâncias interferentes na matriz (Theodore & Ricci, 2010; Dutta, 2007). Assim, o material vegetal antes de ser submetido ao processo de extração é moído, triturado ou pulverizado para aumentar a área de superfície e promover uma boa mistura com o solvente, o que facilita o processo de obtenção dos produtos naturais e aumenta a velocidade de extração. Por vezes, é sujeito previamente a processos de pré-tratamento, como a secagem, de modo a evitar a sua degradação por impurezas, microrganismos e exposição ao ar (Gurib-Fakim, 2006; Dai & Mumper, 2010; Bucar, *et al.*, 2013). A toxicidade, a volatilidade, viscosidade e pureza do solvente de extração também influenciam a eficiência de extração (Bucar, *et al.*, 2013). No estudo de plantas medicinais, a extração dos seus componentes ativos tem por base o seu uso medicinal, de modo a obter um extrato similar ao seu uso tradicional. A seleção do solvente depende da natureza dos compostos bioativos, sendo os mais usuais água, os solventes orgânicos e misturas de solventes, entre os quais, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, diclorometano e hexano (Sasidharan, *et al.*, 2011). A utilização de solventes clorados foi descontinuada por serem tóxicos e cancerígenos (Dutta, 2007). Outros fatores como temperatura, tempo de extração, proporção líquido-sólido, agitação, polaridade e estabilidade dos compostos a serem extraídos afetam igualmente esta operação de separação (Theodore & Ricci, 2010; Dutta, 2007; Bucar, *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas convencionais ou tradicionais de extração sólido-líquido, a maceração é uma das mais usuais por ser simples, económica e adequada a grandes escalas, permitindo a obtenção de óleos essenciais e produtos naturais a partir de materiais vegetais. Esta técnica consiste na imersão do material vegetal num solvente apropriado num recipiente fechado, à temperatura ambiente durante um longo período de tempo. Por se realizar à temperatura ambiente este processo é menos suscetível de provocar a degradação dos metabolitos termolábeis. Para além disso, também se pode efetuar agitação ocasional ou constante para aumentar a velocidade de extração de fitoquímicos. Este processo termina por separação do material vegetal residual (bagaço) por decantação, seguido de uma etapa de filtração para obtenção do filtrado (macerado). É comum após a maceração inicial, seguida de decantação, a adição de solvente fresco para garantir uma extração exaustiva e este passo pode ser repetido várias vezes. Quando o bagaço é demasiado fino (pó demasiado fino) pode recorrer-se a uma centrifugação para separação. As principais desvantagens desta técnica são: i) o tempo de duração da extração ser longo, podendo ser de horas até várias semanas; ii) a utilização da extração exaustiva pode consumir grandes volumes de solvente, o que

pode originar perda de metabolitos ou material vegetal; iii) e alguns compostos podem não ser extraídos de forma eficiente se não forem solúveis à temperatura ambiente no solvente. Este processo apresenta baixo rendimento comparativamente a outros processos de extração sólido-líquido, como a percolação (Azmir, *et al.*, 2013; Bucar, *et al.*, 2013; Seidel, 2006).

A percolação, técnica adequada para a utilização em larga escala, que tanto pode ser a quente como a fria. É uma extração exaustiva e caracteriza-se pela pré-imersão do material vegetal pulverizado num solvente inserido num coador ou aparelho percolador (recipiente cilíndrico ou cónico, com um filtro na saída do mesmo). Este apresenta uma válvula que permite a remoção constante e controlada do extrato pela base, e pelo topo efetua-se a adição do solvente fresco, acima do material vegetal, o que permite executar percolações executivas. Apesar de apresentar um elevado rendimento, este processo apresenta algumas desvantagens, tais como, i) o tamanho da partícula (que se for demasiado reduzido pode entupir o filtro do percolador, bem como outros produtos extraídos, como por exemplo as ceras); ii) o material vegetal, que deve ser distribuído de forma homogénea de maneira a que o solvente tenha acesso a toda a amostra; iii) a temperatura do solvente, que se for elevada pode degradar os metabolitos termolábeis; iv) consumos elevados de solventes; v) e elevados tempos de extração (Bucar, *et al.*, 2013; Seidel, 2006).

Existem outras técnicas de extração sólido-líquido similares à maceração, como a infusão que consiste na adição do solvente após ebulição ao material vegetal que é deixado a macerar, ou a decocção onde ocorre a ebulição do solvente com o material vegetal. O solvente utilizado é normalmente água e o tempo de duração destas técnicas pode ser alguns minutos a algumas horas e as soluções são posteriormente decantadas e filtradas (Gurib-Fakim, 2006; Bucar, *et al.*, 2013).

Uma outra técnica muito utilizada na extração de compostos bioativos a partir de plantas é a extração *Soxhlet*, que é frequentemente usada como referência para a avaliação de outros métodos de extração sólido-líquido ou novos métodos de extração não-convencionais. Esta técnica consiste na introdução de amostra de material vegetal seca pulverizada num cartucho de celulose, que é posteriormente colocado na câmara do extrator de *Soxhlet*, que será colocado num balão de fundo redondo que contém no seu interior o solvente de extração. No topo do extrator de *Soxhlet* é colocado um condensador. O solvente é aquecido sob refluxo e o seu vapor é condensado e goteja sobre a amostra preenchendo a câmara de extração até ao nível do tubo lateral, o sifão, que quando cheio descarrega para o balão a solução que transporta os componentes

solúveis da amostra (Azmir, *et al.*, 2013; Bucar, *et al.*, 2013; Seidel, 2006). A principal vantagem desta técnica é que é um processo contínuo, ou seja à medida que a solução saturada em metabolitos solubilizados é descarregado no balão, o solvente é recondensado e efetua a extração do material continuamente (Seidel, 2006).

É possível também a obtenção de metabolitos a partir de material vegetal usando a técnica de extração sob refluxo, que consiste na imersão da amostra num solvente, num balão de fundo redondo que tem um condensador ligado. Desta forma, o solvente é aquecido até atingir o ponto de ebulição e o vapor é condensado retorna ao balão (Gurib-Fakim, 2006; Seidel, 2006).

Assim, verifica-se que nestas duas técnicas é necessário um menor tempo de extração comparativamente à maceração e percolação, bem como um menor consumo de solvente, pois este é reutilizado durante o processo. No entanto, o extrato é constantemente aquecido no ponto de ebulição do solvente, o que pode degradar os compostos termolábeis ou favorecer formação de produtos indesejáveis (Seidel, 2006).

3.2.2 Técnica de extração líquido-líquido

O processo extração líquido-líquido (também designado como método de partição de solvente) é um processo de separação e/ ou purificação de componentes (solutos) de uma mistura líquida (solução), que se transferem para um líquido imiscível ou parcialmente miscível, o solvente, quando este entra em contacto direto com a mesma (solução) (Ignat, *et al.*, 2011; Dutta, 2007). O solvente é escolhido de modo a apresentar uma afinidade ou seletividade a um ou mais componentes da mistura ou solução e uma densidade diferente (Otsuka, 2006).

Os de extratos de plantas são misturas complexas de diferentes compostos com distintas propriedades físicas e químicas. Esta operação unitária permite a separação dos mesmos ou de outros produtos naturais, em várias frações de polaridade diferente com classes diversificadas de compostos químicos, através de extrações (ou partições) sequenciais com solventes imiscíveis de polaridade crescente. A água e os solventes orgânicos, entre os quais hexano, diclorometano, éter dietílico, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, butanol, são muito utilizados neste processo. O clorofórmio deixou de ser utilizado devido a sua toxicidade e por ser carcinogénico (Otsuka, 2006; Dai & Mumper, 2010).

Este é um método tradicional muito utilizado e relativamente fácil de executar, que permite trabalhar com grandes quantidades de amostras comparativamente a outras

técnicas, também permite a utilização de solvente comercialmente disponíveis com vasta gama de seletividade e solubilidade. A extração líquido-líquido é eficaz no uso como uma das primeiras etapas de separação de extratos de produtos naturais, permite obter informações preliminares sobre a polaridade e classes existentes dos componentes biologicamente ativos num extrato. Contudo, apresenta como desvantagens i) a utilização de grandes volumes de solventes; ii) as suas impurezas são concentradas sendo necessária a utilização de solventes com elevado grau de pureza; iii) necessita de etapas adicionais de evaporação para remover o excesso de solvente; iv) a determinação de um solvente adequado para cada amostra; v) elevada probabilidade de contaminação durante o processo; vi) elevados tempos de extração, principalmente quando se forma emulsões sendo difícil a separação das duas fases e possibilidade de degradação dos compostos mais sensíveis; e por fim vii) não é um método adequado para utilizar como etapa final de separação (Ajila, *et al.*, 2011; Otsuka, 2006; Garcia-Salas, *et al.*, 2010).

3.2.3 Cromatografia em coluna

A cromatografia é uma técnica que permite a separação de componentes de uma mistura complexa, como os extratos de produtos naturais, através da sua distribuição seletiva entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Nesta técnica a separação depende da diferença de afinidade dos componentes para com a fase estacionária e a fase móvel. Esta capacidade para separar os vários compostos de uma mistura, baseia-se na absorção seletiva e preferencial destes compostos na fase móvel (Shriner, *et al.*, 2004).

A cromatografia em coluna, dentre outras técnicas de cromatografia, é uma das formas mais frequentemente utilizadas para a separação e/ ou purificação de misturas. O seu princípio de separação baseia-se no processo de adsorção diferencial da substância pelo adsorvente, ou seja, a separação depende principalmente das diferenças de afinidades de adsorção entre as moléculas de analito pela superfície da fase estacionária, ficando as moléculas retidas pela sua interação com a superfície da fase estacionária (Houssen & Jaspars, 2006).

Nesta técnica, a fase estacionária é um sólido contido numa coluna de vidro, aço inoxidável, ou outro material inerte, enquanto a fase móvel é um líquido, como por exemplo, os solventes orgânicos. A mistura é aplicada no topo da coluna e a fase móvel passa através da coluna por gravidade, vácuo, ou pressão.

Para obtenção de uma separação ótima de componentes, a maximização de solutos e evitar a adsorção irreversível de solutos no material, é fundamental escolher uma fase estacionária e uma fase móvel adequada. Os adsorventes mais usuais para este tipo de cromatografia são sílica gel, alumina e poliestireno. A sílica gel é o adsorvente mais utilizado para a separação de produtos naturais e pode ser adquirido comercialmente sob diversas formas (Reid & Sarker, 2006) (Houssen & Jaspars, 2006).

Na cromatografia em coluna líquida clássica (também conhecida por cromatografia líquida convencional) as colunas são normalmente de vidro e apresentam na sua parte inferior uma válvula de vidro ou teflon que permite controlar o caudal (Figura 7). Por vezes, estas podem ter um filtro em disco de material vítreo poroso acima da válvula, para suportar a fase estacionária, sendo que na sua ausência é possível colocar lã de propileno, algodão ou lã de vidro no seu lugar (Shriner, *et al.*, 2004; Reid & Sarker, 2006).

Neste tipo de cromatografia de coluna a fase móvel é adicionada pelo topo da coluna e deixada fluir por ação da gravidade e a velocidade do caudal é controlada ajustando a válvula de saída. O adsorvente deve apresentar um tamanho de partícula superior a 60 µm, para que a fase móvel (eluente) possa atravessar a coluna a um caudal desejado.

A quantidade de fase estacionária requerida depende da quantidade de amostra a ser fracionada, podendo ser 100-500 g de material adsorvente, por grama de amostra (Reid & Sarker, 2006; Macek, *et al.*, 1975).

Relativamente ao modo de eluição, este pode ser isocrático ou em gradiente, i.e., no primeiro a eluição é feita apenas com um solvente ou com uma mistura de solventes mas sempre com composição constante; no segundo, a composição da fase móvel é variável.

A composição de solventes em gradiente deve ser adequadamente selecionada de acordo com a necessidade de polaridade, e assim obter um bom fracionamento dos compostos naturais. Os gradientes são constituídos por uma série de fases móveis compostas com solventes polares e não polares com razões variáveis.

A separação de extratos de produtos naturais por cromatografia em coluna permite a obtenção de várias frações discretas, com compostos de polaridades semelhantes, por eluição sucessiva. A recolha inicial das frações deve ser relativamente grosseira, para que os compostos fiquem em concentrações elevadas e para uma fácil deteção dos mesmos. Apesar de ser um método relativamente económico, é necessário ajustar o

tamanho da coluna com a quantidade da amostra a ser fracionada, o que se traduz numa separação muito lenta. Para além disso, uma pequena percentagem dos compostos pode reagir com a fase estacionária, comprometendo a eficácia da separação. Outro fator a ter em consideração é que a utilização de sílica gel como adsorvente não permite a separação de extratos aquosos, pois a água desativa a sua superfície (Reid & Sarker, 2006; Sarker, *et al.*, 2006).

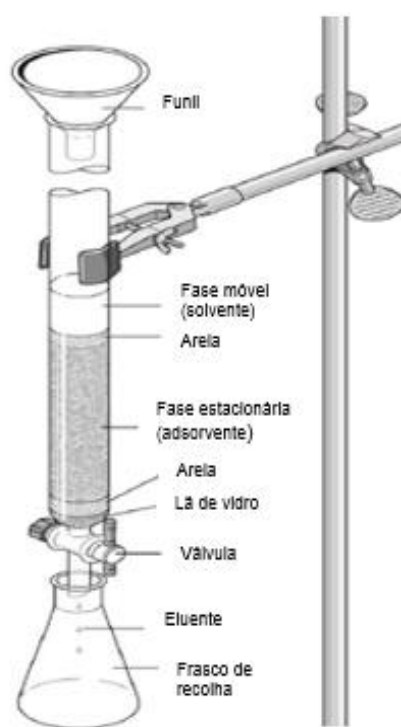


Figura 7 – Representação esquemática de uma cromatografia em coluna clássica (Study Everywhere, 2014).

3.2.4 Cromatografia de camada fina

A cromatografia em camada fina (CCF) é um método qualitativo, simples e económico, que permite a análise, monitorização, isolamento de produtos naturais e avaliação do grau de pureza de compostos orgânicos. Esta técnica utiliza placas de vidro, plástico ou alumina pré-revestidas com uma fina camada de um adsorvente de espessura variável, como gel de sílica ou alumina, que por sua vez é chamada de fase estacionária. As placas podem ser preparadas ou adquiridas comercialmente (Shriner, *et al.*, 2004; Gibbons, 2006). Neste processo a separação ocorre por mecanismos de adsorção, i. e., o composto é adsorvido mais fortemente pelo adsorvente do que os outros componentes presentes na mistura e por mecanismos de partição, que dependem da solubilidade relativa do composto e o adsorvente (fase estacionária) e o solvente (fase móvel). Os compostos que são mais solúveis na fase móvel irão migrar e percorrer a

placa, numa extensão maior do que os componentes que são mais solúveis na fase estacionária. No caso das placas revestidas com sílica ou alumina, os produtos naturais polares movem-se lentamente quando comparados com os não polares, durante a separação. Este método é bastante útil não só por permitir a análise de diversas amostras em simultâneo, mas também por possibilitar a separação de misturas complexas, como os extratos de plantas, que podem conter compostos termolábeis que podem degradar-se em outros processos de separação (Gibbons, 2006).

A separação de misturas é efetuada por aplicação das amostras cerca 2 cm acima da parte inferior da placa, sendo então colocada no interior de uma câmara de desenvolvimento que é fechada e onde se encontra a fase móvel líquida, o solvente adequado ou misturas de solventes (eluente). A fase móvel encontra-se abaixo do nível onde foram aplicadas as amostras (linha de origem), o suficiente apenas para molhar a borda inferior da placa. A frente do solvente migra para a placa e a medida que a atravessa separa os compostos da mistura de acordo com a polaridade dos mesmos, processo designado de desenvolvimento (Figura 8). A placa é retirada da câmara antes do eluente atingir o topo da placa de modo a ser possível a determinação da posição de cada mancha. A distância a qual o solvente move os compostos pela placa depende da capacidade deste para aderir a este sistema de adsorvente (Gurib-Fakim, 2006; Gibbons, 2006; Shriner, *et al.*, 2004).

Existem diversos solventes disponíveis para esta técnica e podem ser utilizadas misturas de dois ou mais solventes para desenvolvimento em separações cromatográficas, com composição constante ou em gradiente.

Um modo de quantificar a migração de um composto num adsorvente em particular e com sistema de solventes é a partir fator de retenção (R_f), que é definido como a distância percorrida pelo composto a partir da origem pela distância percorrida pelo sistema de solventes (Gibbons, 2006; Shriner, *et al.*, 2004).

A visualização e deteção das manchas pode ser realizada por métodos não destrutivos, pois possibilita o isolamento de compostos puros a partir do adsorvente, como a deteção por luz de ultravioleta (UV), mas requer que o adsorvente apresente um indicador fluorescente, para que os compostos eluídos apareçam como manchas escuras, por bloquearem o indicador fluorescente; ou destrutivos através da pulverização com reagentes que contaminam os compostos e não permitem a recuperação dos mesmos, mas que podem possibilitar a identificação de diferentes classes de produtos químicos (Gibbons, 2006; Shriner, *et al.*, 2004). Contudo, não é um método de alta resolução,

podendo por isso compostos diferentes apresentarem o mesmo valor de R_f e estarem representados pela mesma mancha, bem como a recuperação dos compostos isolados não ser totalmente eficaz (Gibbons, 2006; Dinan, 2006).

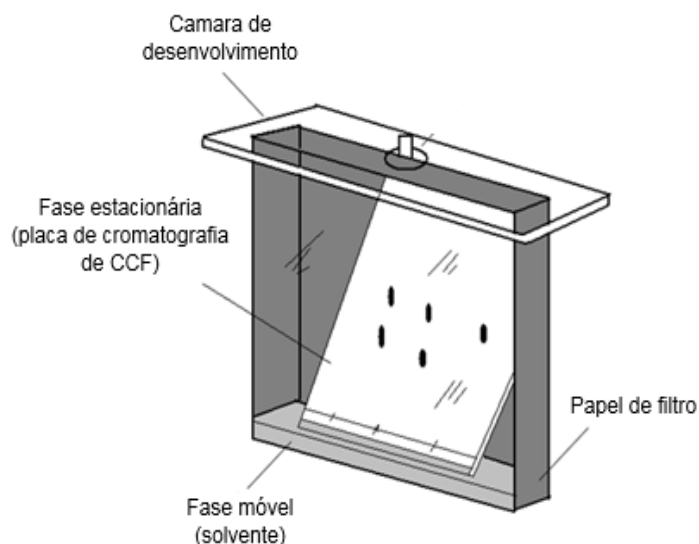


Figura 8 – Representação esquemática de desenvolvimento de uma placa de cromatografia de camada de fina (CCF) (Abbott & Andrews, 1965).

3.2.5 Extração com fluidos supercríticos

Nos últimos anos foram desenvolvidas alternativas às técnicas convencionais de extração com solvente, sólido-líquido ou líquido-líquido, que consomem grandes volumes de solventes, podem degradar compostos termolábeis e têm longos tempos de extração, por métodos mais ou ecológicos e com procedimentos de extração mais eficientes, como as tecnologias de extração com fluidos supercríticos (Ajila, *et al.*, 2011; Nahar & Sarker, 2006).

A capacidade dos processos de extração com fluidos supercríticos cumprirem tanto as exigências a nível ambiental como as especificações dos produtos para o consumo humano, suscitaram um grande interesse em diversas áreas industriais, como alimentar, farmacêutica, agro-farmacêutica e petroquímica (Azmir, *et al.*, 2013; Nahar & Sarker, 2006).

Os processos de extração supercrítica consistem na separação de substâncias solúveis de uma matriz sólida por contato com um solvente que se encontra a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico (Riera, *et al.*, 2004; Fontana, *et al.*, 2013).

O ponto crítico de uma substância pura é definido como o valor de pressão e temperatura a partir do qual uma substância pura pode existir em equilíbrio líquido-vapor

– região supercrítica do diagrama de fases – acima deste o composto não apresenta diferença entre um líquido e um gás, este é apenas um fluido homogêneo, o fluido supercrítico, FSC, Figura 9 (Nahar & Sarker, 2006; Ajila, *et al.*, 2011; Azmir, *et al.*, 2013).

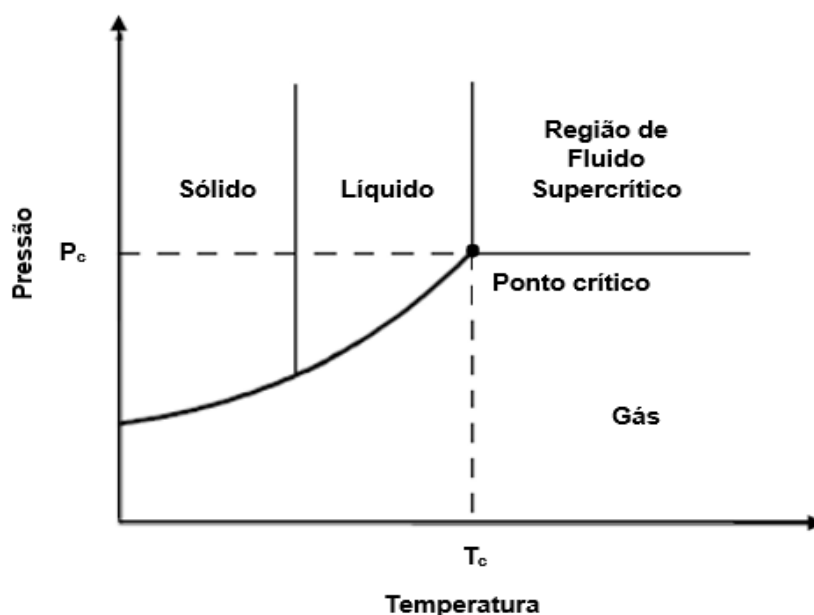


Figura 9 – Diagrama de fases de pressão por temperatura de uma substância pura, com representação do ponto crítico (T_c , P_c). Legenda: T_c – temperatura crítica; P_c – pressão crítica (Riera, *et al.*, 2004).

Estes fluidos exibem propriedades termofísicas intermédias entre um gás e um líquido, e são influenciadas por ligeiras variações de temperatura e/ou pressão. Desta forma, os FSC's apresentam características semelhantes às de um gás, como a compressibilidade, a elevada difusividade, a tensão superficial negligenciável e a baixa viscosidade, mas também propriedades similares às de um líquido, como a densidade e o elevado poder de solvatação, tal como os solventes orgânicos (Azmir, *et al.*, 2013; Ajila, *et al.*, 2011; Ignat, *et al.*, 2011; Nahar & Sarker, 2006; Capuzzo, *et al.*, 2013; Wijngaard, *et al.*, 2012).

Estas propriedades fazem com que os FSC's sejam considerados solventes eficientes e seletivos, por apresentarem um poder de dissolução equiparado ao dos solventes orgânicos líquidos, bem como propriedades de transporte de um gás comum, que favorece a extração dos compostos em tempos de extração menores, com rendimentos mais elevados (Nahar & Sarker, 2006; Ajila, *et al.*, 2011; Azmir, *et al.*, 2013; Riera, *et al.*, 2004).

Os FSC's podem ser produzidos por aquecimento e compressão de um fluido acima da sua temperatura e pressão crítica. Diversas substâncias foram utilizadas como FSC, nomeadamente, etano, propano, butano, pentano, óxido nítrico, amoníaco, éter

dimetílico, trifluorometano, água e CO₂ (Ajila, *et al.*, 2011; Nahar & Sarker, 2006). Destas substâncias, o CO₂ supercrítico é o fluido mais utilizado nos processos de extração supercrítica (ESC). Este apresenta constantes críticas ($T_c = 304,2 \text{ K}$; $P_c = 7,4 \text{ MPa}$) relativamente baixas quando comparadas com as de outros solventes supercríticos, o que permite a extração de compostos termolábeis com uma menor probabilidade de degradação, mas também compostos termicamente estáveis e de elevado ponto de ebulição (Azmir, *et al.*, 2013). A sua seleção também está associada por ser um fluido não inflamável, não tóxico, não corrosivo, relativamente inerte e disponível com elevada pureza a um baixo custo (Riera, *et al.*, 2004; Capuzzo, *et al.*, 2013)

O CO₂ supercrítico é também um solvente com carácter não polar, que o torna ideal para a extração de compostos lipofílicos e de substâncias não polares, mas inadequado para compostos polares. Assim, são frequentemente adicionadas pequenas percentagens (1-10%) de modificadores, também conhecidos como co-solventes, que permitem aumentar tanto a polaridade do CO₂ supercrítico como o seu poder de solvatação para os compostos de interesse, facilitando a extração de compostos com diferentes polaridades. Os modificadores mais usados são solventes polares, como metanol, etanol, acetato de etilo e acetona (Nahar & Sarker, 2006; Capuzzo, *et al.*, 2013; Ignat, *et al.*, 2011; Wijngaard, *et al.*, 2012; Ibañez, *et al.*, 2012).

Os processos de ESC recorrendo a tecnologias sofisticadas, especialmente os que utilizam CO₂ supercrítico, tornaram-se o método de escolha para o isolamento e a extração de uma variedade de compostos bioativos a partir de plantas medicinais e aromáticas (Nahar & Sarker, 2006). A utilização destes processos tecnológicos de ESC, comparativamente a outros métodos de extração convencionais, permite: i) a utilização de pequenas quantidades de amostra de planta para extração; ii) a aplicação de CO₂ supercrítico que não deixa resíduos prejudiciais no extrato; iii) necessita de pequenas quantidades de solventes orgânicos; iv) a utilização de temperaturas mais baixas e a ausência de ar possibilitam a conservação da estrutura dos compostos bioativos presentes na planta. Estes processos são reproduzíveis e automatizados e permitem o controlo preciso das alterações na temperatura e pressão. Deste modo, é possível a manipulação das propriedades do fluido, como a viscosidade e a densidade do FSC, aumentando os rendimentos de extração e diminuindo os tempos de extração. Também é fácil a recuperação do extrato através da despressurização do FSC, que pode ser reciclado ou reutilizado minimizando a geração de resíduos (Ajila, *et al.*, 2011; Ibañez, *et al.*, 2012; Nahar & Sarker, 2006; Ignat, *et al.*, 2011).

Contudo, o investimento de capital necessário para o estabelecimento deste método é elevado, pois requer equipamentos sofisticados e elevadas pressões de trabalho. Assim, de forma a evitar maiores custos e gastos de energia na produção do fluido supercrítico, é necessário um circuito elaborado de recirculação para a compressão do solvente (Azmir, *et al.*, 2013; Ajila, *et al.*, 2011).

Existem diversos parâmetros que influenciam eficiência de extração de compostos bioativos com fluidos supercríticos, e que necessitam de ser controlados, como por exemplo, a temperatura, a pressão, o tamanho de partícula, a quantidade da amostra para extração e a sua humidade, a percentagem e o tipo de modificador, proporção solvente em relação a amostra, caudal do solvente e a duração da extração (Nahar & Sarker, 2006; Ibañez, *et al.*, 2012)

3.3 Métodos de Análise

3.3.1 Testes fitoquímicos preliminares

Os testes fitoquímicos preliminares permitem detetar as principais classes de constituintes químicos normalmente presentes em diferentes espécies de plantas, através de reações entre os extratos provenientes destes materiais vegetais, com reagentes ou solventes específicos para cada classe (Jones & Kinghorn, 2006).

Estes métodos são realizados para diferentes classes de metabolitos secundários, entre as quais, esteroides, terpenos, taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, açúcares redutores, glicósidos cardíacos, fenóis e taninos, entre outros constituintes. Para além disso, estes testes são rápidos e de fácil execução e possibilitam uma análise qualitativa aos extratos antes e após a cromatografia em coluna líquida (o que permite evidenciar os compostos presentes em cada fração) ou em cromatografia de camada fina (por pulverização dos reagentes sobre as placas cromatográficas) (Jones & Kinghorn, 2006; Fabricant & Farnsworth, 2001). A presença ou ausência de um determinado metabolito poderá ser detetada através da mudança de coloração, por precipitação ou outro tipo de reação (como formação de espuma). Contudo, por vezes ocorrem falsos-positivos ou falsos-negativos o que torna difícil a avaliação dos mesmos. Assim sendo, uma reação positiva não deve ser assumida como prova da presença de um certo tipo de metabolito secundário devido a outros tipos de compostos que podem estar presentes e dar origem a reações falsas-positivas. Os falsos positivos geralmente ocorrem se qualquer um dos componentes do extrato tem a capacidade de interagir de forma não específica com o alvo molecular do ensaio. Do mesmo modo, alguns dos componentes inativos podem dar origem a resultados positivos através da interação com certos componentes do sistema de ensaio que não o alvo (Fabricant & Farnsworth, 2001; Okigbo, *et al.*, 2009; Jones & Kinghorn, 2006; Harborne, 1984).

Também é difícil relacionar uma determinada classe de constituintes químicos com atividades biológicas específicas, pois uma determinada classe pode ter uma vasta gama de propriedades biológicas, que geralmente não são previsíveis (Fabricant & Farnsworth, 2001).

Atualmente, estes testes têm sido substituídos por técnicas mais modernas, que possibilitam a identificação da natureza química dos compostos existentes nos extratos provenientes das plantas e monitorização da presença dos mesmos durante a fase de extração, separação e isolamento (Fabricant & Farnsworth, 2001; Okigbo, *et al.*, 2009; Jones & Kinghorn, 2006).

3.3.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos que retardam, inibem, ou previnem a oxidação de substâncias oxidáveis, por eliminação e/ou captura de radicais livres e diminuição do *stress* oxidativo (produção excessiva de espécies reativas de oxigênio como anião radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical de hidroxilo), que estão associados ao aparecimento de várias doenças degenerativas (envelhecimento, Alzheimer, doenças cardíacas e cancerígenas) nos seres humanos, bem como alterações organolépticas e nutricionais nos alimentos (Dai & Mumper, 2010; Shi, *et al.*, 2005; Bondet, *et al.*, 1997).

A produção e a aplicação de antioxidantes sintéticos, hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), em vários setores, como na agricultura e na indústria alimentar resultou no aparecimento de efeitos adversos, devido à toxicidade das mesmas e por serem cancerígenas. Assim, foram aplicadas restrições no uso destes produtos, o que originou uma tendência para substituí-los por antioxidantes naturais (Tongpoothorn, *et al.*, 2012; Velioglu, *et al.*, 1998; Lemus-Mondaca, *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, surgiu um grande interesse na pesquisa e identificação de possíveis fontes de antioxidantes naturais a partir de várias espécies de plantas para uso em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos. Dentre estas, as plantas medicinais, que apresentam na sua constituição uma diversidade de compostos bioativos, são atualmente alvo de estudo para avaliar as suas propriedades antioxidantes (Djeridane, *et al.*, 2006; Lemus-Mondaca, *et al.*, 2012; Saeed, *et al.*, 2012).

Embora não se saiba quais os compostos mais ativos das plantas, os antioxidantes naturais presentes nas plantas podem ser polifenóis, alcaloides, carotenoides ou vitaminas (ácido ascórbico ou tocoferol). Os polifenóis têm recebido cada vez mais atenção devido a algumas das suas atividades biológicas (Djeridane, *et al.*, 2006; Velioglu, *et al.*, 1998).

Os polifenóis são os metabolitos secundários mais abundantes e importantes no reino vegetal e as suas quantidades podem variar nas diferentes partes das plantas e incluem muitas classes de compostos, nomeadamente, ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoides, taninos, lignanas (Dai & Mumper, 2010; Ajila, *et al.*, 2011; Shi, *et al.*, 2005). Este conjunto de compostos fenólicos são essenciais e responsáveis pelo crescimento, reprodução e defesa das plantas (por conferir resistência a radiação UV, na defesa contra agentes patogénicos, predadores e parasitas), bem como a atribuição de cor, cheiro e odor (Dai & Mumper, 2010; Ajila, *et al.*, 2011). Estes também exibem uma

variedade de propriedades biológicas importantes como antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti trombótico, anti cancerígeno, anti envelhecimento, anti mutagenicidade, protetores cardíacos, efeito vasodilatador, que pode estar relacionado com a sua atividade antioxidante (Ajila, *et al.*, 2011; Velioglu, *et al.*, 1998).

Os polifenóis são caracterizados por possuírem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo e propriedades de oxidação-redução, que influenciam as suas propriedades antioxidantes, e assim podem atuar como agentes redutores ou doadores de elétrons ou hidrogénio. Além de inibirem e eliminarem os radicais livres, estes também interferem na complexação de iões metálicos e na oxidação de lípidos e de outras moléculas, atuando tanto na etapa de iniciação como na etapa propagação do processo oxidativo (Ajila, *et al.*, 2011; Velioglu, *et al.*, 1998).

Na identificação de espécies de plantas com potencial antioxidante, é difícil, caro e ineficiente separar, detetar e quantificar cada componente antioxidante individualmente, devido a complexidade da composição química das amostras vegetais e a diversidade de compostos fenólicos existentes. Também pode existir um efeito sinérgico entre os diferentes compostos antioxidantes presentes na amostra vegetal bem como a interferência de outras substâncias oxidadas. Desta forma, a determinação da atividade/capacidade antioxidante de um composto isolado poderá não refletir exatamente a sua ação antioxidante. Portanto, a atividade ou capacidade antioxidante total da amostra poderá ser maior do que a soma da atividade ou capacidade de cada composto, quando medido isoladamente (Lemus-Mondaca, *et al.*, 2012; Dai & Mumper, 2010; Apak, *et al.*, 2013).

Vários métodos analíticos têm sido utilizados para determinar e avaliar a atividade/capacidade antioxidante de compostos químicos específicos, como polifenóis, ou extratos de produtos naturais, como extratos vegetais, *in vitro*.

Dentre estes, o método do radical livre de 2,2 difenil-1- picrilhidrazil (DPPH•) é um dos mais utilizados, e permite a avaliação do poder redutor de antioxidantes (Brand-Williams, *et al.*, 1995; Apak, *et al.*, 2013; Prior, *et al.*, 2005). Este método baseia-se na capacidade de doação de elétrons ou hidrogénios de uma amostra com potencial antioxidante, na presença de moléculas de radicais livres estáveis, o DPPH•, em dissolução em metanol (Apak, *et al.*, 2013; Brand-Williams, *et al.*, 1995). O DPPH• encontra-se disponível comercialmente em forma de cristais e apresenta uma forte coloração violeta, tanto em sólido como em solução, e a sua exposição à luz deve ser a mínimo possível, de modo a evitar a sua degradação (Gibbons, 2006).

O efeito dos antioxidantes presentes na amostra no DPPH•, permite a sua neutralização para DPPH-H, ocorrendo uma mudança de coloração para amarelo. Esta mudança de coloração traduz-se num decréscimo da absorvância ao longo do tempo, normalmente 30 minutos, que é determinado por espectrometria a 517 nm (absorvância máxima) até a mesma ser constante. Quanto mais rápido diminuir a absorvância, maior será a atividade antioxidante, bem como a concentração das substâncias antioxidantes presentes na amostra (Saeed, *et al.*, 2012; Apak, *et al.*, 2013; Fontana, *et al.*, 2013). A atividade antioxidante pode ser determinada em termos de quantidade ou concentração de antioxidantes necessária para inibir 50% da concentração inicial de radicais livres de DPPH• em solução, IC₅₀, em g extrato/mmol de DPPH, através da percentagem de inibição, que é dada pela expressão (1):

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

No qual a A_{controle} é a absorvância de DPPH• no metanol e A_{amostra} é a absorvância de DPPH• na amostra com capacidade antioxidante (Veggi, *et al.*, 2011). Desta forma, uma atividade de eliminação de radicais DPPH elevada, está relacionado a um menor valor de IC₅₀, o que corresponde a uma elevada atividade antioxidante. O ácido ascórbico e o BHT são os compostos normalmente utilizados como antioxidantes de referência (Apak, *et al.*, 2013; Lemus-Mondaca, *et al.*, 2012; Mechergui, *et al.*, 2010; Saeed, *et al.*, 2012).

O método do radical livre de DPPH• é de fácil execução, muito reprodutível, permite a avaliação de várias amostras num curto período de tempo e é altamente sensível, pois permite detetar antioxidantes naturais mesmo a baixas concentrações. Também ao realizar-se à temperatura ambiente, elimina o risco de degradação térmica dos compostos antioxidantes. Os resultados obtidos em termos de avaliação da atividade antioxidante são comparáveis com outros métodos (Villaño, *et al.*, 2007; Fontana, *et al.*, 2013; Lemus-Mondaca, *et al.*, 2012; Bondet, *et al.*, 1997).

Uma das desvantagens deste método é o facto de o mesmo não ser seletivo, uma vez que a molécula de DPPH• tanto pode ser neutralizada por reações radicalares, como de oxidação-redução, bem como outro tipo de reações. Além disso, pelo facto das moléculas de DPPH• serem volumosas, e acessibilidade estereoquímica ser um dos fatores determinantes na reação, moléculas menores podem ter um maior acesso ao local do radical, apresentando uma melhor atividade do que as moléculas maiores (Prior, *et al.*, 2005; Saeed, *et al.*, 2012; Apak, *et al.*, 2013).

Outro método é o ensaio de *Folin-Ciocalteu*, também conhecido por ensaio de fenóis totais, que apesar de ser considerado um método de avaliação da capacidade antioxidante, é usado frequentemente na determinação do teor total de compostos fenólicos de uma amostra com potencial antioxidante (Prior, *et al.*, 2005; Dai & Mumper, 2010).

O ensaio de *Folin-Ciocalteu* é fácil de executar, sensível e reprodutível e tem sido amplamente utilizado para a quantificação de compostos fenólicos presentes em produtos naturais, como os extratos vegetais (Prior, *et al.*, 2005; Dai & Mumper, 2010).

Esta técnica tem como mecanismo base a reação de oxidação-redução durante um tempo definido, normalmente 30 minutos, em meio alcalino, entre o reagente de *Folin-Ciocalteu* de coloração amarela (mistura de complexos ácidos de fosfomolibdico/fosfotúngstico) que é reduzido e os polifenóis presentes no extrato vegetal que são oxidados, resultando na formação de complexos de cor azul (de fosfotúngstênio e fosfomolibdênio, $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})_4^-]$). A intensidade da cor é proporcional à concentração de compostos fenólicos presentes na amostra, sendo determinada por espectroscopia a 765 nm (absorvância máxima), e expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), composto de referência para comparação, por grama de extrato (Dai & Mumper, 2010; Blainski, *et al.*, 2013; Prior, *et al.*, 2005).

Contudo, o reagente de *Folin-Ciocalteu* por não ser específico apenas para compostos fenólicos, quando aplicado em amostras complexas pode reagir com outras substâncias redutoras, tais como açúcares, aminas aromáticas, vitaminas, metais para complexação ou metais possíveis de serem complexados, que poderão causar um efeito inibitório ou aditivo e assim influenciar a quantificação do teor de fenóis totais (Dai & Mumper, 2010; Saeed, *et al.*, 2012; Prior, *et al.*, 2005).

De modo a obter resultados fiáveis e previsíveis são estabelecidas algumas condições, entre as quais: i) volume adequado de reagente alcalino e do reagente de *Folin-Ciocalteu*; ii) tempo e temperatura ótima de reação para desenvolvimento da cor; iii) monitorização das absorvâncias a 765nm; iv) utilização do ácido gálico como padrão de referência de fenol (Prior, *et al.*, 2005).

3.3.3 Atividade antimicrobiana

Os antibióticos continuam a ser a principal terapia utilizada no tratamento de infecções microbianas, tanto bacterianas como fúngicas (Khan, *et al.*, 2009). No entanto, a sua utilização excessiva, indiscriminada e generalizada, nas últimas décadas, resultou no desenvolvimento e no aumento da resistência contra diversos grupos de microrganismos patogénicos, tornando-os cada vez menos eficazes (Bhalodia, *et al.*, 2011; Gaikwad, *et al.*, 2012). Este facto, associado a efeitos secundários resultantes da sua utilização, como por exemplo reações alérgicas, impulsionou a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas provenientes de várias fontes naturais (Pandey & Kumar, 2013; Ghosh, *et al.*, 2008).

As plantas medicinais são atualmente um dos maiores recursos naturais utilizados na síntese de novos agentes terapêuticos (Pandey & Kumar, 2013; Ríos & Recio, 2005). A diversidade de compostos biologicamente ativos presentes nestas plantas, representam uma alternativa promissora para a descoberta e o desenvolvimento de potenciais agentes antimicrobianos, com menores efeitos adversos, com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência e com novas estratégias de controlo de infecções microbianas (Pandey & Kumar, 2013; Gaikwad, *et al.*, 2012; Ghosh, *et al.*, 2008).

Deste modo, nos últimos anos, têm sido avaliadas as propriedades antibacterianas e antifúngicas de extratos das diferentes partes das plantas medicinais, bem como dos seus compostos bioativos isolados, através de ensaios de atividade biológica, como os testes de suscetibilidade antimicrobiana, que permitem a deteção destas substâncias biologicamente ativas mesmo que se encontrem em pequenas concentrações (Pandey & Kumar, 2013; Ríos & Recio, 2005; Hossain, *et al.*, 2012).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana permitem a determinação da eficácia de potenciais novos agentes antimicrobianos contra qualquer tipo de organismo patogénico, que contribua para um processo infeccioso, desde que seja assegurada a sua quimioterapia antimicrobiana e que a sua suscetibilidade seja desconhecida. Estes testes são adequados para organismos patogénicos que demonstrem resistência a agentes antimicrobianos normalmente utilizados. (CLSI, 2012; Pandey & Kumar, 2013).

Um dos testes de susceptibilidade antimicrobiana mais utilizados para a análise da atividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos naturais, como os extratos vegetais, é o método de microdiluição em caldo. Este método consiste na medição quantitativa da atividade de um agente antimicrobiano perante um organismo patogénico isolado *in vitro* (CLSI, 2012), baseando-se na determinação da concentração

mínima inibitória (CMI) que é definida como “A concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo por diluição em caldo num teste de suscetibilidade”, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012; CLSI, 2012a) e *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

Esta técnica é realizada em microplacas estéreis de 96 poços, disponíveis comercialmente, em que são adicionadas series de diluições com diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos, que são posteriormente inoculadas com uma suspensão padrão do microrganismo para teste. Após incubação das microplacas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante um tempo definido, a CIM pode ser determinada por espectrometria (CLSI, 2012), através da atividade antimicrobiana que pode ser determinada em termos de percentagem de inibição, que é dada pela expressão (2):

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle negativo}}}{A_{\text{controle positivo}}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

No qual a A_{amostra} é a absorvância do crescimento microbiano na presença do agente antimicrobiano, $A_{\text{controle negativo}}$ é a absorvância do agente antimicrobiano dissolvido no meio de cultura e $A_{\text{controle positivo}}$ que é a absorvância do inoculo normalizado em meio de cultura. Este resultado indica a percentagem de células microbianas que potencial agente microbiano testado poderá ser capaz de inibir (Talib & Mahasneh, 2010).

Este método é amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia e apesar de ser reprodutível é influenciado pela metodologia empregue (CLSI, 2012). A sua utilização permite a redução significativa das concentrações e quantidades de agente antimicrobiano e outros reagentes utilizados, bem como ensaio simultâneo de diversos agentes antimicrobianos. Contudo, os agentes antimicrobianos que não totalmente solúveis podem interferir na leitura da turbidez, como é o caso dos extratos vegetais, levando a uma interpretação difícil. Desta forma, é necessária a presença de um controle negativo, ou seja, de um extrato dissolvido em meio de cultura sem microrganismo (CLSI, 2012; Pandey & Kumar, 2013; Jorgensen & Ferraro, 2009; Sánchez & V. Kouznetsov, 2010).

Outro método muito utilizado é o da difusão de disco em agar que permite testar *in vitro* organismos patogénicos comuns de crescimento rápido, sendo aplicado habitualmente em muitos laboratórios de microbiologia. É um método reprodutível e facilmente empregue e baseia-se na presença e ausência de uma zona de inibição do crescimento

microbiano, considerando também o tamanho da zona de inibição (CLSI, 2012a; Bauer, *et al.*, 1966).

Esta técnica consiste na colocação de disco de papel de filtro estéreis na superfície de uma placa de agar, previamente inoculada com uma suspensão padrão do microrganismo teste. O agente antimicrobiano é posteriormente adicionado sobre os discos, e estes difundem-se para o agar inibindo o crescimento microbiano. Após a incubação, durante um tempo definido a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, a suscetibilidade do microrganismo é avaliada através do diâmetro das zonas de inibição de crescimento microbiano em torno de cada disco, que são medidos com uma régua ou craveira (CLSI, 2012a; Jorgensen & Ferraro, 2009).

As vantagens deste método são a sua facilidade de execução, fácil interpretação de resultados e o seu baixo custo. Contudo, este teste não é automatizado ou mecanizado e pode não ser adequado para organismos de crescimento lento (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Este teste nem sempre é indicado na determinação da atividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos naturais, como os extratos vegetais, principalmente os aquosos, ou óleos essenciais, por se tratarem de misturas complexas, sendo que os compostos podem apresentar diferentes polaridades e afetar deste modo a difusão dos mesmos para o meio de cultura. Assim, os compostos com menor polaridade podem difundir-se mais lentamente que os mais polares no agar. Este facto pode igualmente acontecer em antibióticos de referência ou outros compostos ou moléculas menos polares (Pandey & Kumar, 2013; Klancnik, *et al.*, 2010; Sánchez & V. Kouznetsov, 2010). Existem outros fatores que influenciam o resultados no método de difusão de disco em agar, entre os quais, i) o tipo de agar; ii) a presença de sais e a concentração dos mesmos; iii) temperatura de incubação; e iv) tamanho molecular dos componentes dos agentes antimicrobianos (Eloff, 1998).

Estes ensaios quando utilizados para avaliação de produtos naturais, extratos ou compostos isolados, não são quantitativos pois apenas indicam se existe inibição de crescimento microbiano. Para obtenção de resultados mais fiáveis neste teste, os diâmetros da zona de inibição podem ser associados com as concentrações inibitórias mínimas (MICs) com microrganismos conhecidos por serem suscetíveis ou resistentes a vários agentes antimicrobianos (CLSI, 2012a; Pandey & Kumar, 2013).

4 Parte Experimental

4.1 Recolha, identificação e armazenamento das amostras vegetais de *Jatropha gossypifolia*

Os ramos de *Jatropha gossypifolia* foram colhidos em Outubro de 2012 em Luanda pela Dr.^a Rosalina Mata, professora do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Agostinho Neto. A sua identificação foi realizada pela botânica Dr.^a Francisca Monteiro, professora do Departamento de Biologia da mesma instituição, que os caracterizou botanicamente como *Jatropha gossypifolia* L.

As folhas do material vegetal recolhido foram limpas e secas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz em local seco. Estas foram trituradas num moinho convencional até obtenção de pequenos fragmentos, sendo posteriormente armazenadas num recipiente fechado, ao abrigo de luz e humidade.

4.2 Determinação do teor de humidade das folhas de *Jatropha gossypifolia*

O teor de humidade das folhas trituradas de *J. gossypifolia* foi determinado pelo processo termogravimétrico utilizando uma balança eletrónica (*Kern MRS 120-3*), pela seleção do programa de aquecimento “*Standard*” a uma temperatura de 105°C. Realizaram-se três ensaios, e em cada um dos mesmos usaram-se folhas não processadas. (Anexo B, Tabela B1)

4.3 Preparação dos extratos de *Jatropha gossypifolia* por maceração e extração líquido-líquido

O material vegetal triturado (260.82 g) foi extraído por maceração duas vezes com 500 mL de metanol 99.9% (Merck) durante 20 dias (3 semanas). O extrato de metanol foi obtido após filtração das soluções e evaporação do solvente a vácuo num aparelho rota-vapor (Buchi rotavapor R-200; Buchi vacuum pump V-500; Buchi vacuum controller V-800) a 40°C até à *secura*.

Para uma separação prévia de compostos bioativos deste extrato, recorreu-se à técnica de extração líquido-líquido, de forma sequencial, com solventes de diferentes polaridades, nomeadamente, n-hexano 98.0% (Merck), clorofórmio 99.0 – 99.4% (Merck) e acetato de etilo 99.8% (Merck), sendo o extrato de metanol inicialmente dissolvido em metanol:água (90:10). Para obtenção dos extratos evaporaram-se a vácuo os solventes de cada fase num aparelho rota-vapor a 40°C até à *secura*.

4.4 Testes fitoquímicos preliminares aos extratos de *Jatropha gossypifolia*

Os extratos foram submetidos a testes fitoquímicos preliminares com reagentes apropriados para cada classe de compostos, preparados de acordo com *Matos, F.* (1997). (Matos, 1997) Os resultados foram classificados por avaliação qualitativa numa escala variável entre a ausência de compostos (-) e a presença de compostos (+).

4.4.1 Operações preliminares

Os extratos obtidos foram dissolvidos para uma concentração de 1 mg/ mL com metanol os extratos de metanol e acetato de etilo e clorofórmio os extratos de hexano e clorofórmio. As soluções foram colocadas em banho-maria até evaporação do solvente para metade do volume. Posteriormente, as soluções foram ajustadas para um pH 4.0 e depois filtradas. Tanto os filtrados como os resíduos insolúveis foram guardados até serem usados. Os filtrados foram distribuídos para diferentes tubos. Os tubos que sofreram este tipo de tratamento permitiram a identificação a presença dos seguintes compostos: flavonoides, saponinas, fenóis e taninos. Para a identificação da presença de açúcares redutores, esteroides e terpenos, e glicósidos cardíacos utilizaram-se entre 0.5 e 1 mg de extratos secos.

4.4.2 Teste para fenóis e taninos

Em tubos com cada uma das soluções de extratos, após o seu tratamento preliminar, juntaram-se três gotas de solução alcoólica (etanol) de cloreto de ferro III (FeCl_3) a 1% (Merck). Agitaram-se e observou-se que na presença destes compostos há o aparecimento de uma coloração entre azul e o vermelho, que indica a presença de fenóis, e de um precipitado azul e verde, que confirma a presença de taninos.

4.4.3 Teste para flavonoides

Em tubos com cada uma das soluções de extratos, que sofreram as operações preliminares, adicionou-se um pouco de magnésio em fita (Merck) e 0.5 mL de ácido clorídrico (HCl) 32% (Merck) concentrado. Esperou-se até ao final da reação que é caracterizada pela presença de efervescência e observou-se a mudança de coloração das soluções para vermelho indicando a presença destes constituintes.

4.4.4 Teste para esteroides e terpenos

Em tubos com diferentes tipos de extrato seco adicionaram-se 10 mL de clorofórmio, filtraram-se as soluções usando um funil tapado com algodão e coberto com alguns miligramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro (Merck). Em seguida adicionou-se 1 mL de anidrido acético ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) (Merck), agitaram-se suavemente as soluções e juntaram-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Merck), e foram novamente agitados. Observou-se o aparecimento de uma coloração azul seguido numa cor verde permanente, indicando a presença destes compostos.

4.4.5 Teste para saponinas

Os resíduos insolúveis obtidos na operação anterior, foram dissolvidos em 5 mL de água destilada e filtrados de seguida para um tubo de ensaio. O tubo foi agitado durante dois minutos e observou-se a formação de uma espuma persistente e abundante indicando a presença de saponinas.

Realizou-se o teste confirmatório adicionando 2 mL de ácido clorídrico (HCl) 32% (Merck) aos tubos que tinham o conteúdo anterior e foram colocados em banho-maria durante uma hora. Deixou-se arrefecer, neutralizou-se e agitou-se novamente. A ausência de espuma e a formação de precipitado confirmou a presença destes compostos.

4.4.6 Teste para glicósidos cardíacos

Em tubos com diferentes tipos de extrato seco adicionaram-se 5 mL de metanol e filtraram-se as soluções onde ocorreu precipitação. Em seguida adicionaram-se algumas gotas do reagente de *Keede* (modo de preparação encontra-se no Anexo C, ponto C1. Não se observou o aparecimento de nenhuma coloração roxa intensa, o que indicou a ausência destes compostos nos extratos.

4.4.7 Açúcares redutores

Em tubos com diferentes tipos de extrato adicionaram-se 5 mL de água destilada, filtraram-se as soluções onde ocorreu precipitação e adicionaram-se 4 mL de reagente de *Fehling* (o modo de preparação encontra-se no Anexo C, ponto C2. O aparecimento de uma cor vermelho tijolo indicou a presença de açúcares redutores.

4.5 Fracionamento dos extratos de *Jatropha gossypifolia*

O extrato n-hexano (EH) (6.88 g) foi separado numa coluna cromatográfica preenchida com sílica gel 13% em Sulfato de Cálcio (CaSO₄) (BDH Chemicals) e eluída com n-hexano 98.0% (Merck), tolueno 99.5% (Merck), acetato de etilo 99.8% (Merck) e metanol 99.9% (Merck), com combinações dos solventes de forma a obter diferentes polaridades e consequentemente melhores capacidades de separação e afinidades (Anexo D, Tabela D1).

Desta separação resultaram 60 frações finais de 250 mL cada (Anexo D, Tabela D1), que foram previamente concentradas num aparelho rota-vapor e sujeitas a cromatografia de camada fina (TLC) em placas de sílica gel submetidas a misturas de eluentes apropriadas (n-hexano 98.0% (Merck), tolueno 99.5% (Merck) e acetato de etilo 99.8% (Merck) e reunidas de acordo com os seus fatores de retenção. As placas de TLC (Macherey – Nagel, for TLC-Sheets, Pre-coated aluminium, layer:0.20 mm sílica gel 60 with fluorescent indicator UV₂₅₄) foram reveladas sob a luz fluorescente de UV₂₅₄ e por pulverização das mesmas com uma solução de ácido fosfomolibdico) (Fisher Scientific) (Anexo D, Figura D1).

As frações EH₃ e EH₄ eluídas com n-hexano: tolueno (7:3) e (5:5) respetivamente, foram submetidas a uma segunda cromatografia de coluna em sílica-gel com éter de petróleo 40 – 60°C (BDH Chemicals) e tolueno 99.5% (Merck) com diferentes composições Anexo D, Tabela D2 e D3). Destas separações resultaram 100 frações no primeiro caso (Anexo D, Tabela D2) e 113 no segundo caso (Anexo D, Tabela D3), ambas de 100 mL cada, sendo que as mesmas foram concentradas num aparelho rota-vapor e sujeitas a TLC em placas de sílica gel submetidas a misturas de eluentes apropriadas (n-hexano, tolueno e acetato de etilo) e reunidas de acordo com os seus fatores de retenção. As placas foram submetidas ao mesmo tipo de procedimento das placas de n-hexano (Anexo D, Figura D2 e D3).

O extrato clorofórmio (EC) (5.73 g) foi também separado numa coluna cromatográfica em sílica gel e eluída com diferentes proporções de éter de petróleo e tolueno (Anexo D, Tabela D4). Esta separação resultou em 176 frações de 100 mL cada (Anexo D, Tabela e D4), sujeitas ao mesmo tratamento das frações n-hexano, como descrito anteriormente (Anexo D, Figura D4).

Na Figura 10 encontra-se uma esquematização dos extratos obtidos e o seu fracionamento.

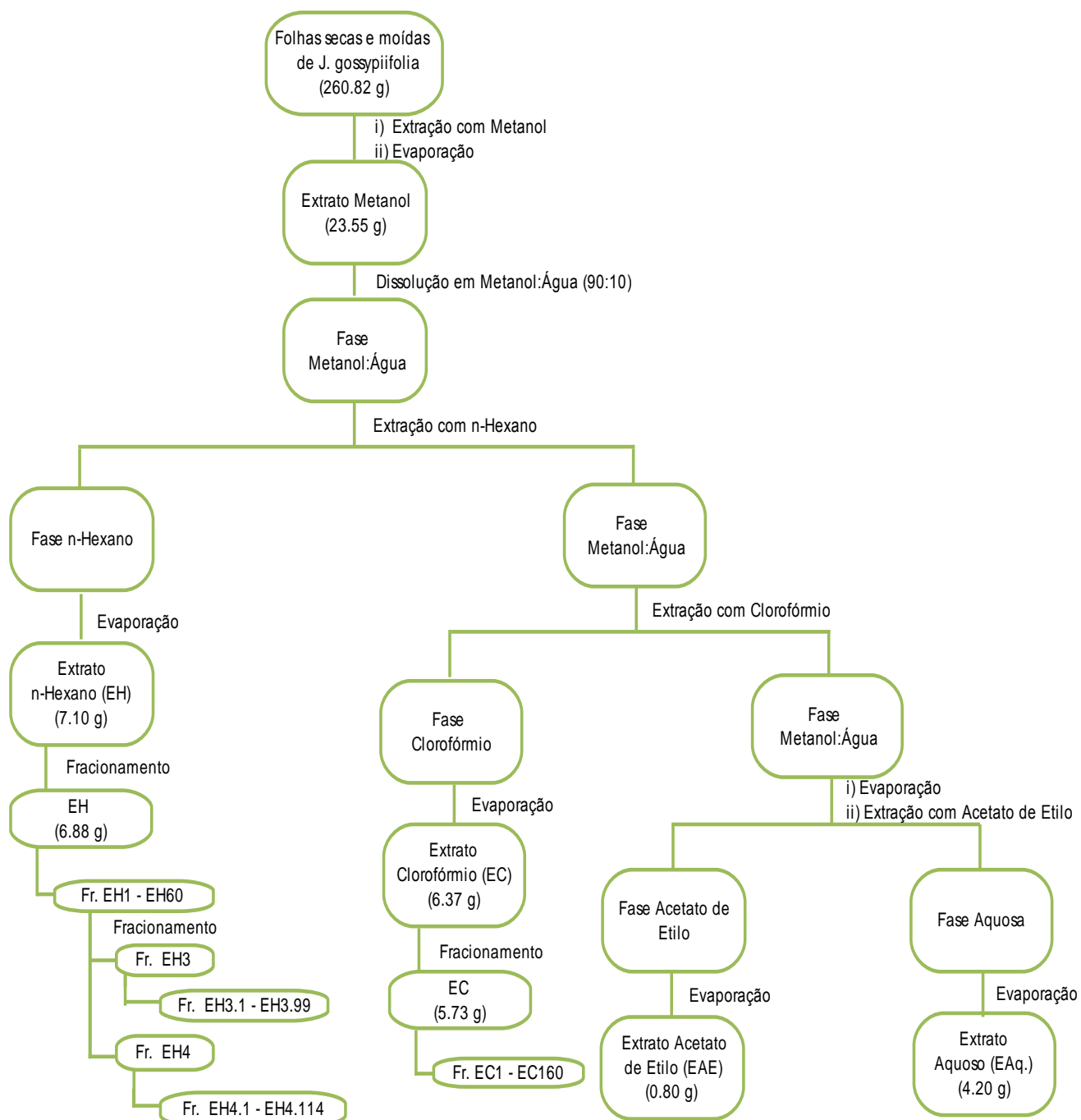


Figura 10 – Representação esquemática dos extratos obtidos de *Jatropha gossypifolia* e o seu fracionamento.

4.6 Breve análise e caracterização das frações de *Jatropha gossypifolia* por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (GC–MS)

4.6.1 Preparação das amostras para análise

As amostras das frações obtidas por cromatografia em sílica gel foram derivatizados com uma mistura de *N,O*-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA): trimetilclorosilano (TCMS) (99:1) (Supelco) antes de serem submetidas a análise por GC–MS. Desta forma, adicionaram-se 0.1 a 0.5 mL de reagente sililante para 10 a 50 mg de amostra e solvente (piridina). Aqueceu-se durante 20 minutos a uma temperatura compreendida entre 60 e 80°C.

4.6.2 Identificação e quantificação dos componentes por GC–MS

A identificação e quantificação dos componentes das frações e dos extratos obtidos por extração supercrítica e maceração sucessiva foram realizadas separadamente, por GC–MS e análise de GC-FID (Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama), respetivamente, num Thermo Trace Ultra Polaris Ion Trap GC–MS/FID, a partir de Thermo Finnigan (Austin, Texas).

Para a identificação dos analitos foi usado o programa de pesquisa de espetros de massa NIST/ EPA/ NIH Mass Spectral Library versão 2.0a de Setembro de 2001, do National Institute of Standards and Technology (NIST), assim como bibliotecas construídas com padrões de referência no laboratório

A separação dos compostos por cromatografia gasosa foi realizada numa coluna Phenomenex ZB-5HT (Inferno), 30 m, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.10 µm de película, com hélio como gás de transporte com uma taxa de fluxo constante de 1.0 mL/ min.

A técnica de injeção *split* e o forno do mesmo cromatógrafo foram programados com uma temperatura de 70°C, durante 1 min, 10°C/min a 100°C, 5°C/min até 350°C, durante 5 minutos. O injetor, o detetor FID e a interface GC–MS apresentavam temperaturas de 320°C, 320°C e 280°C, respetivamente (Wood, *et al.*, 2001).

4.7 Extração supercrítica das folhas de *Jatropha gossypifolia* e a sua sucessiva maceração

A extração supercrítica foi realizada no equipamento *Applied Separation Spe-ed SFE*, que efetua estudos com temperaturas até aos 120°C e pressões até 600 bar.

O forno do extrator tem capacidade para dois vasos extratores (células de extração) em linhas separadas, que por sua vez apresentam controladores de caudal independentes para cada uma das linhas, as válvulas micrométricas. Para uma melhor vedação do sistema foram colocados *O'Rings* no topo e na base dos vasos extratores. Estes também possuíam dois *frit's* de metal (filtro de 5 µm) em cada extremidade, para que não ocorresse retorno ou arrastamento do soluto que não se encontrasse dissolvido no solvente.

O esquema que se segue representa o princípio de funcionamento do equipamento de extração supercrítica à escala laboratorial.

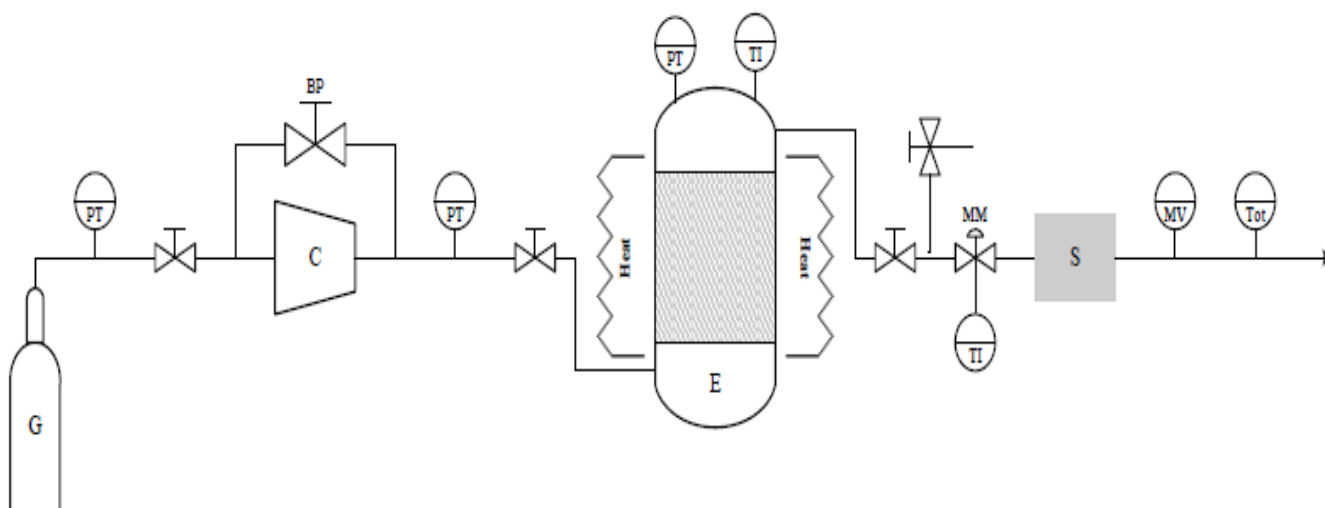


Figura 11 – Esquema representativo do equipamento de extração supercrítica (Legenda: C – compressor; E – extrator; S – separador; BP – regulador de pressão (“*Back-Pressure*”); MM – válvula micrométrica; MV – caudalímetro; Tot – totalizador; TI – indicador de temperatura; PT – manómetro) (Marques & Coelho, 2011).

O equipamento e os compressores foram ligados previamente, bem como impostas as condições de temperatura pretendidas.

Esperou-se até à estabilização da temperatura pretendida, depois de garantido que o sistema estava termicamente estável, impôs-se a pressão de trabalho na célula e deixou-se estabilizar cerca de 20 minutos, para uniformização das condições impostas.

O funcionamento do sistema descreve-se em três fases:

- Compressão do gás – Compressão inicial do fluido por meio de um compressor auxiliar da Jun-Air, modelo OF302, que eleva a pressão do gás até 7 bar para ativação do compressor (C) da Applied Separations, modelo Spe-ed SFE, (que só efetua compressões de gases acima dos 7 bar). Este último comprime o gás até a pressão desejada de funcionamento do extrator (E).
- Aquecimento – Após a compressão do gás até a pressão desejada, este segue para o extrator (E) da Applied Separation Spe-ed SFE, modelo Spe-ed SFE-2, onde será aquecido até a temperatura pretendida. A amostra a estudar é previamente introduzida na célula E, que posteriormente é colocada no interior do forno.
- Extração – Depois de o gás atingir as condições críticas de temperatura e pressão, este percorre a célula que contém a amostra e solubiliza-a, sendo a mesma posteriormente recolhida pela válvula micrométrica (MM). O separador (S) é um filtro da Applied Separations, modelo Spe-ed SFE phase extraction, que permite à saída, a recolha da amostra precipitada, enquanto o gás é enviado para o caudalímetro e medidor de gás total. O caudal e o volume total de CO₂ são medidos num equipamento da Alicat Scientific, modelo M-5SLPM-D, que tem como função de caudalímetro (MV), e possibilita a medição do caudal instantâneo e o volume total gasto de gás a ± 5 mL.

O vaso extrator foi preenchido previamente com lã de propileno em cada extremidade e amostra de folha triturada no centro (entre 11.0 e 13.0 g). Após o seu enchimento este foi montado no interior do forno, e de forma a facilitar a sua instalação foi fixada inicialmente a parte inferior e só depois a parte superior.

As extrações supercríticas foram realizadas de forma sequencial em duas etapas, a uma temperatura de 313.15 K e a uma pressão de 300 bar (30 MPa), inicialmente com CO₂ puro 99,995% fornecido pela Gasin (Matosinhos, Portugal), seguindo-se CO₂ com modificadores (co-solventes), CO₂+modificadores, primeiro com metanol p.a 99.8 % (Sigma Aldrich) e seguidamente com etanol p.a. 99.5 % (Panreac), ambos a 10% (v/v). O caudal instantâneo de CO₂ no decorrer das extrações foi de 1.0 dm³/min. Para a injeção dos co-solventes na célula de extração, o sistema apresenta uma bomba (HPLC PUMP K-501 Knauer), que permitiu a introdução dos co-solventes no extrato a uma pressão de 300 bar (30 MPa) e a um caudal entre 0.28-0.30 dm³/min. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Os extratos foram recolhidos num tubo em “U”, à pressão atmosférica e a uma temperatura controlada por meio de um banho de gelo.

O material vegetal que se encontrava no vaso extrator, após os ensaios de extração supercrítica com CO₂+modificadores, foi recolhido e extraído por maceração com 200 mL de metanol p.a 99.8 % (Sigma Aldrich) e etanol p.a 99.5 % (Panreac), durante 6 dias a temperatura ambiente.

Os extratos foram obtidos após filtração das soluções e evaporação do solvente a vácuo num aparelho rota-vapor a 40°C até à secura e em seguida secos sob azoto. A sua quantidade foi avaliada gravimetricamente com uma incerteza de ± 0.1 mg.

4.8 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Jatropha gossypifolia*

4.8.1 Método do radical livre de DPPH•

A atividade antioxidante dos cinco de extratos *J. gossypifolia* (obtidos previamente por extração supercrítica e maceração sucessiva), foi determinada através da reação destes com o radical livre estável de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo ao descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) e Mensor *et al.* (2001), no entanto com algumas adaptações.

Inicialmente, preparou-se uma solução-mãe de DPPH (Sigma Aldrich) em metanol p.a. 99.8% (Sigma Aldrich) de concentração de 100 µmol/L. Esta solução foi preparada diariamente. Desta solução fizeram-se diluições sucessivas para obtenção das concentrações finais de 20, 40, 60 e 80 µmol/L, sendo possível a construção de uma curva de calibração (concentração (µmol/L) em função da absorvância) (no Anexo G encontra-se um exemplo), através da leitura da absorvância das mesmas contra um branco, metanol, no espectrofómeto (Thermo Electron Corporation Evolution 300) a 517 nm.

Os extratos de *J. gossypifolia* foram dissolvidos em metanol p.a. 99.8 % (Sigma Aldrich) para preparação de pelo menos quatro soluções de concentrações diferentes.

Foram adicionados em tubos, 4 mL da solução-mãe de DPPH numa concentração de 100 µmol/L a 1 mL de soluções de extrato de *J. gossypifolia* de diferentes concentrações. Como controlo, foi preparado um tubo com 4 mL solução-mãe de DPPH de concentração 100 µmol/L e 1 mL de metanol. As misturas foram agitadas num vortex e as reações ocorreram num local escuro e a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Ao fim deste tempo, procedeu-se à leitura das absorvâncias das amostras num espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation Evolution 300) a 517 nm, contra os respetivos brancos, soluções de 4 mL de metanol e 1 mL das soluções dos extratos de *J. gossypifolia* de diferentes concentrações, previamente preparadas.

Os testes foram realizados em triplicado e a atividade antioxidante de cada amostra foi determinada em termos de IC₅₀ (percentagem de inibição) que corresponde à quantidade de extrato que inibe 50% do radical DPPH presente em solução, expresso em g extrato/mmol de DPPH, por meio da curva de calibração previamente construída e por regressão linear (percentagem de inibição em função da concentração de extrato).

Para avaliar a sensibilidade do método foi utilizado o ácido ascórbico (Panreac) e hidroxitolueno butilado (BHT) 99.0% (Sigma Aldrich) como referência e procedeu-se de igual forma como os extratos.

4.8.2 Determinação do teor total em polifenóis

A quantidade de fenóis totais dos cinco de extratos *J. gossypifolia* (obtidos previamente por extração supercrítica e maceração sucessiva), foi determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu* descrito por Mechergui *et al.* (2010), segundo Dorman *et al.* (2003).

Começou-se por preparar uma solução-mãe de ácido gálico (Sigma Aldrich) de concentração 5 g/L em metanol p.a. 99.8% (Sigma Aldrich), para ser usada como padrão e desta prepararam-se através de diluições sucessivas, soluções com concentrações de 500, 400, 300, 200, 100, 75, 50, 25, 12.5 mg/L, para construção de uma curva (concentração (mg/L) em função da absorvância), por medição da absorvância das mesmas a 765 nm usando um espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation Evolution 300) (Anexo H).

Os cinco extratos de *J. gossypifolia* foram dissolvidos em metanol p.a. 99.8 % (Sigma Aldrich) para obtenção de soluções com uma determinada concentração.

Em tubos colocaram-se 3.95 mL de água destilada, 250 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (Sigma Aldrich) e 50 µL de cada uma das soluções de extrato. Agitou-se suavemente e deixou-se em repouso durante 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 750 µL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Panreac) sobressaturada de concentração de 0.25 mg/L, previamente preparada. As misturas foram agitadas num vortex e as reações ocorreram em banho de água a 40°C durante 30 minutos.

Deixou-se arrefecer durante 5 minutos e a absorvância das amostras foi medida a 765 nm usando um espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation Evolution 300), contra um branco com 4 mL água destilada, 250 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, 750 µL de solução de carbonato de sódio da solução, que foi previamente colocado num banho de água a 40°C durante 30 minutos e arrefecido.

Os testes foram realizados em triplicado e a quantidade total de compostos fenólicos foi expressa em miligramas equivalente de ácido gálico (EAG) por miligrama de extrato de planta e por 100 g de material vegetal (mg EAG/ 100 g material vegetal).

4.9 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Jatropha gossypifolia*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos cinco de extratos *J. gossypifolia* (obtidos previamente por extração supercrítica e maceração sucessiva) testaram-se três espécies bacterianas *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Escherichia coli* HB 101, *Pseudomonas aeruginosa* L10 (estirpe mutante), e uma espécie levedura: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24860.

Os ensaios de suscetibilidade foram realizados de acordo ao estabelecido nas normas de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012; CLSI, 2012a) e *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002; NCCLS, 2004), mas com algumas adaptações.

Para os métodos de suscetibilidade usados neste trabalho o inóculo foi preparado pelo método de crescimento, que consistiu na seleção de uma colônia isolada de estirpes puras de cada um dos microrganismos, de uma placa de agar de crescimento com duração de 24 h. O material biológico selecionado foi posteriormente introduzido em tubos com 10 mL de meio de cultura estéril (Himedia) para bactérias e extrato de levedura estéril (Biokar) para a levedura. Seguiu-se a incubação overnight destes tubos com os meios de culturas a 37°C para as bactérias e 25°C para as leveduras, até se exceder a turbidez de um padrão 0.5 McFarland.

O ajuste do crescimento nos tubos, de modo a obter-se uma turbidez equivalente ao de um padrão 0.5 McFarland (o modo de preparação encontra-se no Anexo H), foi realizado por adição de meio de cultura ou extrato de levedura estéreis, resultando numa suspensão de aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL para as bactérias e 1 a 5×10^6 UFC/mL para as leveduras. Esta etapa foi executada com auxílio de um espectrofotómetro a 655 nm para as bactérias e a 550 nm para a levedura para se obter uma maior precisão.

Desta forma, foi possível obter-se o inóculo final para utilizar nos métodos de difusão de disco e da microdiluição em caldo.

As soluções cuja composição se alterava com tratamento térmico utilizaram-se filtros (Milipore).

4.9.1 Método de difusão de disco

Para aplicação do método de difusão de disco em agar teve-se por base o método de Bauer *et al.* (1966) e as normas: i) M02-A11 (CLSI, 2012); e ii) M44-A (NCCLS, 2004).

Inicialmente, foram preparados os inóculos com uma turbidez de 0.5 McFarland. Cerca de 15 minutos após o ajuste de turbidez da suspensão mergulhou-se um cotonete estéril, para remoção do excesso de fluido do mesmo, e inocularam-se as superfícies secas de placas de petri com ágar nutriente e ágar de extrato de levedura, para as bactérias e leveduras respetivamente. Antes de aplicar os discos, esperaram-se alguns minutos para que o excesso de humidade presente na superfície do ágar fosse absorvida.

Os discos de papel de filtro (*Whatman* Grade 1) de diâmetro de 6 mm, previamente esterilizados foram dispostos uniformemente sobre a superfície de ágar inoculada e adicionados 15 µL de cada solução de extrato em cada disco, de controlo positivo e de controlo negativo. Os extratos *J. gossypifolia* foram dissolvidos em dimetilsulfóxido 99.9% (DMSO) (Merck) de forma a obter uma concentração final de 60 mg/mL. Os controlos positivos utilizados foram a Ampicilina (Sigma Aldrich) com uma concentração de 75 µg/mL para a *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, Gentamicina (Sigma Aldrich, 10.5% água, 660 µg Gentamicina base/mg) com uma concentração de 330 µg/mL para a *Pseudomonas aeruginosa* e Ciclohexamida (Sigma Aldrich, 98%) com uma concentração de 330 µg/mL para a *Saccharomyces cerevisiae*. O solvente de dissolução dos extratos, o DMSO foi usado como controlo negativo. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 18h para as bactérias e de 24h para a levedura.

O teste de cada microrganismo foi realizado em triplicado e o diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetros, incluindo o diâmetro do disco, com a caixa de petri invertida em cima de um fundo preto e com luz a refletir.

4.9.2 Método da microdiluição em caldo

Para aplicação do método da microdiluição em caldo teve-se por base o método de Ljubiša *et al.* (2009) e as normas: i) M07-A9 (CLSI, 2012) e iii) M27-A2 (NCCLS, 2002).

Em microplacas de 96 poços estéreis distribuíram-se 160 µL de meio de cultura estéril (Himedia) para bactérias ou extrato de levedura estéril (Biokar) para a levedura em cada poço com uma micropipeta multicanal, 20 µL de extrato de planta e 20 µL de inóculo, previamente ajustado com uma turbidez de 0.5 McFarland.

Adicionalmente, adicionaram-se as placas um controlo negativo composto por 160 µL de meio de cultura para bactérias ou extrato de levedura para a levedura, 20 µL de extrato de planta e 20 µL de DMSO; e um controlo positivo constituído por 160 µL de meio de cultura para bactérias ou extrato de levedura para a levedura, 20 µL de inóculo e 20 µL de DMSO.

Os extractos *J. gossypifolia* foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9% (Merck) para uma concentração final de 5 mg/mL e procedeu-se a diluições sucessivas de 1:2 dos mesmos, através da adição de DMSO até a concentração final de 0.08 mg/mL, obtendo-se assim uma gama de concentrações entre 5 mg/mL a 0.08 mg/mL.

O teste de cada microrganismo perante a presença do extrato foi realizado em triplicado. Para evitar que as placas secassem, estas foram tapadas e seladas e postas a incubar a 37°C para as bactérias e 25°C para as leveduras, por um período compreendido entre 18h a 24h.

O crescimento microbiano foi determinado por um espectrofotómetro (Bio-Rad Model 680 microplate reader) ao comprimento de onda de 655 nm para as bactérias e a 550 nm para a levedura. A CIM foi determinada como sendo a menor concentração de cada extrato que inibe o crescimento de microrganismos, e foi expressa em mg/mL.

5 Resultados e discussão

5.1 Extratos de *J. gossypiifolia* obtidos por maceração e extração líquido-líquido

A amostra de folhas de *Jatropha gossypiifolia* apresentava um teor em humidade de 10.790 (± 0.207) % (Anexo B, Tabela B1). E a extração dos constituintes das folhas de *Jatropha gossypiifolia* por maceração, usando como solvente de extração o metanol, permitiu a obtenção de um rendimento global (em base seca) de 10.12%, em termos de amostra de material vegetal inicial (Tabela 1). Este valor foi calculado como a razão percentual entre a massa de extrato de metanol e a massa de material vegetal utilizado para o processo extrativo.

Segundo Bucar *et al.* (2013) a utilização de maceração para extração de produtos naturais origina rendimentos baixos, como se constata neste trabalho. Desta forma, para melhorar a eficiência do processo extrativo a adição de agitação ocasional ou constante permitiria aumentar a solubilidade dos constituintes da amostra vegetal, com o consequente aumento do rendimento. Também o aumento de volume de solvente, bem como a realização de várias extrações exaustivas com solvente fresco poderia garantir maximização da extração de possíveis componentes (como metabólitos secundários) a partir da amostra vegetal. Contudo, apesar dos baixos rendimentos resultantes desta técnica de extração, a seleção da mesma permite evitar a degradação dos possíveis compostos termolábeis existentes na amostra vegetal inicial, pois o processo ocorre a temperatura ambiente (Seidel, 2006). Em relação ao solvente de extração selecionado, como mencionado na introdução deste trabalho, a escolha de um solvente polar como o metanol permite facilitar e maximizar a extração de uma variedade de componentes a partir da amostra vegetal (Jones & Kinghorn, 2006; Seidel, 2006).

Após a realização da extração por maceração recorreu-se à técnica de extração líquido-líquido sequencial com solventes de diferentes polaridades (n-hexano, clorofórmio e acetato de etilo), de forma a separar o extrato de metanol em diferentes frações com diferentes classes de compostos químicos (Otsuka, 2006).

O extrato metanol foi inicialmente dissolvido em metanol:água numa proporção de 90:10 e posteriormente extraído com n-hexano, o que permite a obtenção de uma fração constituída por compostos não polares, como óleos e ceras, alcanos de cadeia longa, carotenoides, clorofilas, e outros componentes não polares como os triterpenóides – este processo é muitas vezes referido como “desengorduramento”. A adição de água

em pequenas proporções ao metanol possibilita o aumento da imiscibilidade entre metanol e o n-hexano para obtenção de duas fases distintas, apesar destes dois solventes não serem completamente miscíveis. Seguiu-se a extração com clorofórmio para os componentes menos polares, e posteriormente com acetato de etilo para os compostos com maior polaridade (Otsuka, 2006; Jones & Kinghorn, 2006).

Após os processos de extração líquido-líquido descritos, os rendimentos obtidos em relação ao extrato de metanol são os apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimento na extração por maceração e extração líquido-líquido de *J. gossypifolia*, em termos de amostra de material vegetal inicial seca.

Extratos de <i>J. gossypifolia</i>	Rendimento (% base seca)
Metanol	10.12
n-Hexano	3.05
Clorofórmio	2.74
Acetato de Etilo	0.34
Aquoso	1.81

De igual forma, na Tabela 2 apresenta-se os valores dos rendimentos em relação ao extrato de metanol.

Tabela 2 – Rendimentos para a extração líquido-líquido, em termos de extrato de metanol de *J. gossypifolia*.

Extratos de <i>J. gossypifolia</i>	Rendimento (%)^a
n-Hexano	30.96
Clorofórmio	27.78
Acetato de Etilo	3.49
Aquoso	18.32

^a rendimento w/ w

É possível constatar-se que os componentes da mistura apresentaram maior afinidade, seletividade ou solubilidade preferencial para os solventes apolares, verificando-se que existe uma diferença pouco significativa entre o rendimento do extrato n-hexano e o extrato clorofórmio.

Em relação ao solvente polar, constata-se que o solvente acetato de etilo apresentou uma baixa solubilidade e seletividade para os constituintes da mistura, verificando-se uma diferença bastante significativa entre o rendimento do extrato acetato de etilo e o extrato do resíduo aquoso, supondo-se que a maioria dos constituintes polares poderão ter ficado no resíduo aquoso.

Este facto poderá estar associado com a presença de uma diversidade de compostos no extrato, alguns dos quais bastante complexos, com propriedades físicas e químicas diferentes, como polaridades muito distintas entre os componentes do mesmo, o que dificulta a recuperação e separação de todos estes compostos de forma adequada e eficaz através desta técnica de extração. Contudo, este facto pode igualmente contribuir para uma melhor separação (Chaimbault, 2014; Otsuka, 2006).

Alguns dos rendimentos mais baixos dos solventes apolares poderão resultar de uma ineficiente separação de fases durante a execução desta técnica, uma vez que os solventes são passíveis de formar emulsões, favorecendo a solubilidade dos compostos existentes no extrato. Outro fator será a possibilidade de ter ocorrido contaminações durante a execução da técnica de extração líquido-líquido.

5.2 Análise dos testes fitoquímicos preliminares aos extratos de *J. gossypiifolia*

O estudo fitoquímico preliminar ao extrato de metanol das folhas *J. gossypiifolia* revelou a presença de vários compostos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise fitoquímica preliminar de diferentes extratos das folhas de *J. gossypiifolia*.

	Extratos das folhas de <i>J. gossypiifolia</i>			
	Metanol	n-Hexano	Clorofórmio	Acetato de Etilo
Flavonoides	+	-	+	+
Esteroides e terpenos	+	+	+	-
Saponinas	+	-	+	+
Fenóis e taninos	+	-	+	+
Açúcares redutores	+	+	+	+
Glicósidos cardíacos	-	-	-	-

Ausência de compostos (-) / Presença de compostos (+)

Estes resultados podem ter sido influenciados pela técnica de separação empregue, pelos solventes utilizados e a sua polaridade, bem como a dos compostos e a complexidade dos mesmos, não esquecendo das suas propriedades físicas e químicas (Chaimbault, 2014; Jones & Kinghorn, 2006).

Assim, através deste estudo foi possível constatar-se no extrato clorofórmio, a presença da maior parte dos compostos (tanto polares como não polares) com atividade biológica, existentes igualmente no extrato metanol, revelando a afinidade dos respetivos compostos com o clorofórmio.

Também deve-se ter em consideração, como referido na introdução desta dissertação, que ausência ou presença destes compostos testados pode ser resultante de interações entre constituintes da amostra de extrato ou a presença de um certo constituinte pode anular a presença de outro, dando origem a reações (ou resultados) falso-positivos ou falso-negativos (Jones & Kinghorn, 2006).

A ausência de glicósidos cardíacos nos extratos *J. gossypiifolia* pode dever-se a degradação destes compostos durante os processos de extração líquido-líquido ou processamento das amostras, ou pode estar relacionado com a justificação supra mencionada.

Em qualquer um dos casos seria desejável a realização de mais testes e utilização de outros reagentes para reduzir o risco de resultados falsos-positivos e falso-negativos de forma a confirmar os resultados obtidos.

Estes testes fitoquímicos preliminares não foram realizados ao extrato do resíduo aquoso, pois o mesmo sofreu um longo processo de separação, o que pode ter dado origem a eventuais degradações. Além disso, pelo ponto de ebulição da água ser relativamente alto, a concentração deste extrato foi difícil, o que pode ter aumentado a probabilidade de ter ocorrido a formação de produtos indesejáveis, bem como a decomposição ou isomerização de compostos presentes no mesmo (Jones & Kinghorn, 2006).

De acordo com Félix-Silva *et al.* (2014), estes metabolitos secundários já foram previamente detetados e identificados por testes fitoquímicos qualitativos ou análises qualitativas em extratos de folhas de *J. gossypifolia*, inclusive os glicósidos cardíacos. Contudo em alguns casos utilizam outras técnicas e/ou solventes de extração, ou os mesmos não são especificados.

5.3 Breve análise à caracterização por GC-MS das frações de *J. gossypifolia*

Iniciou-se a análise das diferentes frações obtidas no processo de extração e separação referidas na secção 4.5, nomeadamente do diagrama simplificado da Figura 10. Nas Figuras 12 e 13 estão representados os cromatogramas obtidos por GC-MS para as frações EC₄₋₅ e EC₁₅₋₂₁.

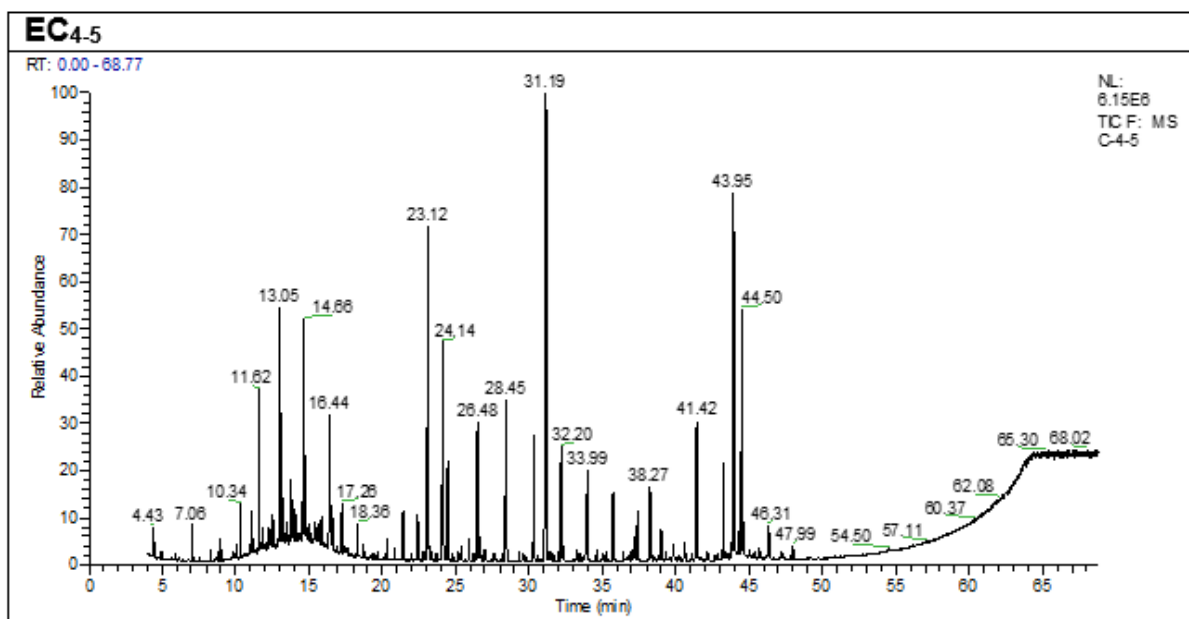


Figura 12 – Cromatograma das frações EC₄₋₅ obtidas por GC-MS, resultante da separação do extrato clorofórmio (EC), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (70:30).

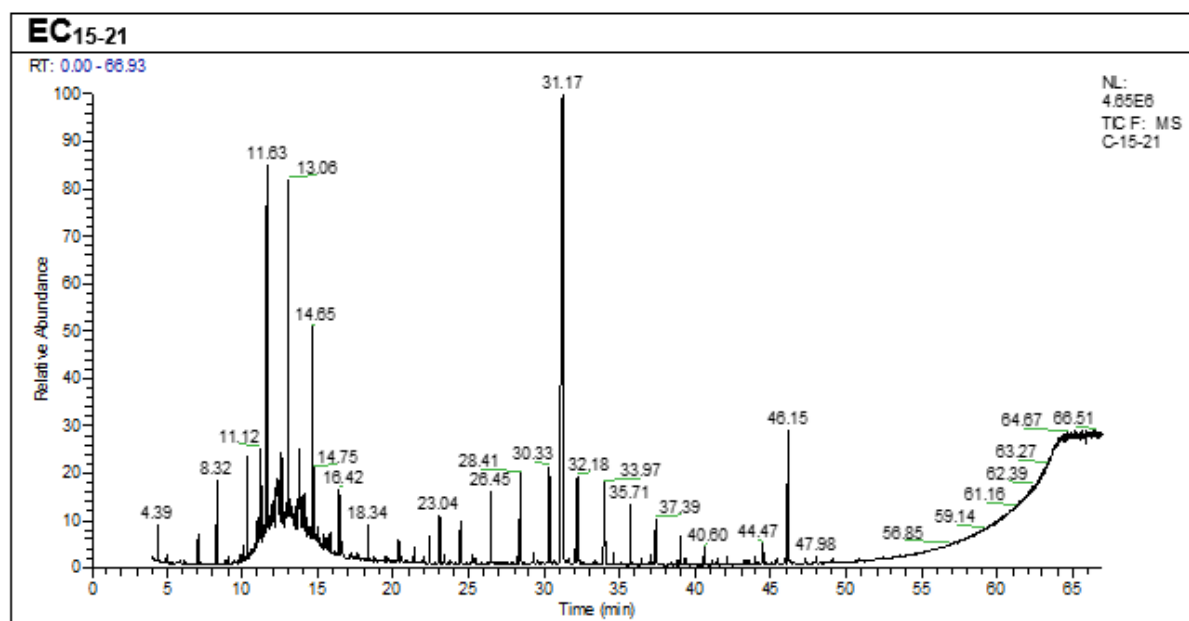


Figura 13 – Cromatograma das frações EC₁₅₋₂₁ obtidas por GC-MS, resultante da separação do extrato clorofórmio (EC), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (70:30).

A análise das frações EC₅₆₋₈₀ e EC₁₂₇₋₁₃₀ não foi conclusiva, não sendo possível assim obter uma correta identificação sem a repetição da análise das mesmas.

Em relação às restantes frações analisadas (EH₈; EH₂₄₋₂₆; EH₃₇; EH₃₈; EH_{4.2-4}; EH_{4.6}; EH_{4.8-10}; EH_{4.14-18} e EH_{4.19-20}) são apresentadas no Anexo E.

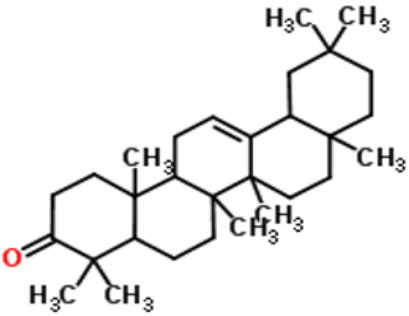
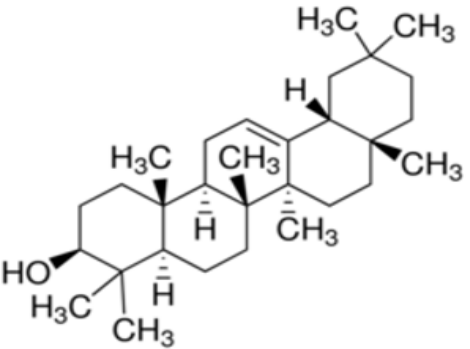
Da análise efetuada aos resultados obtidos verifica-se a existência de cromatogramas semelhantes, com picos a tempos característicos. Do estudo efetuado por MS pode-se constatar que o pico ao tempo de retenção, TR, 31.17 minutos, é indicado como um ftalato. Este pico repete-se em maior ou menor percentagem em todas as amostras analisadas. Considerando que os ftalatos são compostos sintéticos produzidos e utilizados na indústria dos plásticos e em laboratórios, pode-se inferir a existência de qualquer contaminação de solventes ou material utilizado no processo de extração.

Com maior intensidade ou menor para os diferentes tempos de retenção os cromatogramas começam por apresentar dois componentes que são identificados como o ácido benzoico (TR≈8.34 min) e glicerol (TR≈8.94 min).

Para os TR de aproximadamente 10.34 até 37.5 minutos os picos foram identificados com uma série de hidrocarbonetos saturados que pode começar no dodecano (C₁₂H₂₆), para o tempo de retenção mais baixo, até ao hexacosano (C₂₆H₅₄). Contudo, esta identificação não é viável utilizando exclusivamente os picos de massa, considerando que as fragmentações são iguais para estes compostos e serie de compostos, pelo que será necessário a utilização de padrões para encontrar correspondência para os tempos de retenção.

Para TR superiores, isto é, a partir de 39 e até 48 minutos foram identificados alguns triterpenoides ou pelo menos alguma correspondência em termos de espectros de massa.

Assim, ao TR = 43.95 minutos foi identificado C₃₀H₄₈O; Mg=424.7 g; Olean-12-en-3-one (4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,2,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one), cuja estrutura se encontra na Figura 14. Para o TR de 44.50 minutos, foi identificado o C₃₀H₅₀O; Mg=426.7 g, a 3β)-Olean-12-en-3-ol ou com a designação de β-amirina, cuja estrutura se encontra na Figura 15.

	
<p>Figura 14 – Estrutura do Olean-12-en-3-one ($C_{30}H_{48}O$; Mg=424.7 g).</p>	<p>Figura 15 – Estrutura do 3β-Olean-12-en-3-ol ($C_{30}H_{50}O$; Mg=426.7 g).</p>

Estes compostos são usualmente sintetizados a partir do esqualeno, que também foi identificado nas amostras analisadas. Para além deste composto para os TR de 21.41 e 23.12 minutos foram identificados em quantidade significativa os ácidos gordos: C16:0 palmítico e C18:1, ácido oleico respetivamente.

Esta análise dos extratos não foi continuada, considerando a necessidade de se ter padrões de hidrocarbonetos e triterpenoides para melhor identificação.

5.4 Extratos obtidos por extração supercrítica e sucessiva maceração de *J. gossypiifolia*

As extrações supercríticas dos constituintes das folhas de *Jatropha gossypiifolia* foram realizadas de forma sequencial em duas etapas, a uma temperatura de 313.15 K e a uma pressão de 300 bar (30 MPa). Estas são as condições usualmente utilizadas nos processos de extração supercrítica para obtenção de extratos biologicamente ativos, com compostos bioativos como os caratenoides ou polifenóis ou outros metabólitos secundários, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Wijngaard, *et al.*, 2012).

A primeira etapa de extração utilizou-se como fluido supercrítico CO₂ (CO₂ supercrítico), sendo este um solvente apolar (ou de baixa polaridade) possibilita a separação dos constituintes apolares (como lípidos, gorduras, óleos), de baixa polaridade, ou moderadamente polares e outros componentes mais voláteis da amostra de material vegetal (Capuzzo, *et al.*, 2013; Wijngaard, *et al.*, 2012; Azmir, *et al.*, 2013). Com a unidade de extração ainda em funcionamento segue-se a segunda etapa de extração, à qual foram adicionados co-solventes orgânicos (10%, v/v), metanol e etanol, para aumentar significativamente a polaridade e poder de solvatação do CO₂, possibilitando a extração de constituintes mais polares ou de polaridade intermédia da matriz vegetal, como os polifenóis e outros metabólitos secundários (Ajila, *et al.*, 2011; Capuzzo, *et al.*, 2013).

O rendimento dos extratos foi determinado como a razão percentual entre a massa de extrato obtido no final da extração e a massa de material vegetal que se encontrava no vaso extrator utilizado no processo extrativo. Na Tabela 4 encontra-se resumido estes rendimentos, assim como as condições de ensaio.

Tabela 4 – Rendimentos obtidos, em termos de amostra de material vegetal inicial seca, para a extração supercrítica com CO₂, CO₂+Etanol e CO₂+Metanol (10%, v/v%) de *J. gossypiifolia* a uma temperatura de 313.15 K e pressão 300 bar.

Ensaio Nº	Fluido de extração	Tempo extração (h)	V _{total} CO ₂ gasto (dm ³)	Rendimento (% base seca)
1	CO ₂	1.6	97.020	1.45
	CO ₂ + MeOH	1.7	99.500	1.20
2	CO ₂	1.2	75.220	1.45
	CO ₂ + MeOH	1.9	101.059	1.73
3	CO ₂	1.2	75.335	1.61
	CO ₂ + EtOH	1.7	113.797	1.30
4	CO ₂	1.4	75.043	1.35
	CO ₂ + EtOH	1.9	106.520	1.40

Analisando os ensaios 1 e 2 é possível constatar, que no caso CO₂ supercrítico, o aumento do tempo de extração não garante uma maior extração dos componentes do material vegetal, para melhoria do rendimento, mas sim um gasto desnecessário de CO₂. Em relação ao CO₂+MeOH supercrítico verifica-se que neste caso, o aumento do tempo de extração, permite aumentar a extração dos constituintes da amostra vegetal significativamente, conseguindo-se assim aumentar a percentagem de rendimento como desejado.

Nos ensaios 3 e 4 diminui-se o tempo de extração e tentou-se gastar aproximadamente o mesmo volume de CO₂ que no ensaio 2. Comparando todas as extrações com este fluido verifica-se que um aumento do tempo de extração, não garante globalmente, uma maior extração dos componentes do material vegetal nem um melhor rendimento. Os maiores valores de rendimento podem estar relacionados com a afinidade ou seletividade do fluido de extração com determinados componentes da amostra do material vegetal, bem como a composição da amostra para as condições de funcionamento estabelecidas.

Para CO₂+EtOH supercrítico aumentar o tempo de extração permite um ligeiro aumento na extração dos constituintes da planta e conseqüente aumento do rendimento.

Também é possível constatar que a utilização de metanol como co-solvente permite melhores rendimentos de extração e menores gastos de CO₂, do que apenas utilizar-se CO₂ ou adicionar como co-solvente o etanol. Desta forma verifica-se que na extração supercrítica o rendimento aumenta diretamente com a polaridade do solvente de extração utilizado (Garcia-Salas, *et al.*, 2010).

A adição de co-solventes poderá representar um aumento nos custos da extração, visto ser necessário a adição de uma etapa de recuperação do solvente, contudo a sua adição permite uma maior obtenção de constituintes da amostra vegetal (Veggi, *et al.*, 2011).

Após as etapas de extração supercrítica, sucedeu-se a maceração da amostra de material vegetal que se encontrava no vaso extrator, para remoção dos restantes constituintes que não foram extraídos nos primeiros processos. Estes materiais vegetais são considerados subprodutos (ou resíduos) da extração (Wijngaard, *et al.*, 2012).

Os resultados dos valores de rendimento (em base seca) encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação dos rendimentos obtidos para a extração por maceração de *Jatropha gossypifolia*.

Extratos de <i>J. gossypifolia</i>	Rendimento (% base seca)
Metanol	11.40
Etanol	2.63

Destas extrações verifica-se que a utilização de metanol como solvente de extração permite uma maior solubilidade dos constituintes da amostra vegetal e assim um maior rendimento comparativamente a utilização do etanol, pois quando maior for a polaridade do solvente maior a solubilidade dos componentes da amostra vegetal. Tal como mencionado na secção 4.1 deste trabalho, para melhorar a eficiência do processo extrativo podia-se ter adicionado agitação ocasional ou constante, bem como a realização de extrações exaustivas. Também a otimização das condições de funcionamento do processo de extração supercrítica, como pressão e temperatura, poderia aumentar o poder de solvatação do fluido supercrítico para maior recuperação de constituintes nestas etapas de processo.

A adição de co-solventes pode trazer uma melhor eficiência na extração supercrítica, sobretudo quando o mesmo é o metanol. Este solvente tanto na maceração como na extração supercrítica apresentou melhores resultados na obtenção dos extratos (rendimento), o que significa que talvez o mesmo tenha uma melhor seletividade e melhor afinidade aos constituintes da planta em estudo.

A aplicação da técnica de extração supercrítica para obtenção dos restantes constituintes (subproduto da extração), que só foram obtidos por maceração, ou que provavelmente ainda ficaram retidos na amostra vegetal, necessita de mais estudos relativamente às condições de funcionamento da unidade de extração, para recuperação dos mesmos, ou utilização de outros métodos de extração mais ecológicos (Wijngaard, *et al.*, 2012).

Relativamente, às condições de pressão e temperatura utilizadas neste estudo, apesar de serem as que usualmente são utilizadas para obtenção de extratos com constituintes potencialmente bioativos, não são as que provavelmente permitem a obtenção de maior

rendimento, tanto na utilização de CO₂ supercrítico com e sem modificador, assim é necessário mais estudos para otimização do funcionamento da unidade de extração.

Além disso, para obtenção de extrações mais económicas deve-se considerar não só as condições de pressão e temperatura, mas também o menor tempo de extração e a menor quantidade de fluido supercrítico utilizado, com e sem adição de co-solvente, e se o mesmo for adicionado deve-se saber qual a quantidade adequada, para que permita a maior extração dos constituintes do material vegetal, para uma determinada quantidade de amostra.

Desta forma, cada parâmetro do processo supercrítico deve ser otimizado a fim de obter uma melhor eficiência de extração dos constituintes do material vegetal, bem como a seleção de um solvente adequado.

5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *J. gossypiifolia*

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos das folhas *J. gossypiifolia* obtidos por extração supercrítica e maceração sucessiva foi determinada pelo método de radical livre de DPPH•.

Todos os extratos exibiram atividade antioxidante e esta foi apresentada em termos de valor de IC₅₀, que variou entre 0.321 ± 0.007 (Mac. MeOH) e 16.85 ± 0.67 (ESC CO₂) g extrato/mmol de DPPH (Tabela 6).

Tabela 6 – Atividade antioxidante dos extratos de *J. gossypiifolia* pelo método de radical livre expresso em IC₅₀ médio em g extrato/mmol DPPH.

Extratos de <i>J. gossypiifolia</i>	C_{Extrato} (mg/mL)	IC₅₀ (g/mmol DPPH)
ESC CO ₂	30.5	16.85 ± 0.67
ESC CO ₂ +EtOH	7.9	13.43 ± 0.31
ESC CO ₂ +MeOH	7.9	10.16 ± 0.04
Mac. EtOH	4.9	3.935 ± 0.22
Mac. MeOH	4.9	0.321 ± 0.007
Antioxidantes Comerciais de referência		
Ac. Ascórbico	1.0	1.117 ± 0.04
BHT	10.1	32.13 ± 1.00

Salienta-se que quanto menor o valor de IC₅₀, maior o poder antioxidante do extrato (Mechergui, *et al.*, 2010). Assim, considerando os antioxidantes comerciais, o ácido ascórbico e o BHT, cujo os valores de IC₅₀ são 1.117 ± 0.04 e 32.13 ± 1.00 g/mmol de DPPH respectivamente, verifica-se que o extrato Mac. MeOH tem um valor de IC₅₀ inferior, apresentando por isso um poder antioxidante superior aos dois antioxidantes comerciais referidos. Também pode-se constatar que os restantes extratos apenas apresentaram uma atividade antioxidante superior ao antioxidante comercial BHT (Tabela 6).

Os extratos Mac. EtOH e Mac. MeOH demonstraram uma atividade antioxidante muito superior aos extratos obtidos por extração supercrítica.

O extrato que apresentou menor capacidade antioxidante foi o de ESC CO₂, sendo que para a determinação do seu IC₅₀ foi necessária uma solução deste extrato com uma concentração inicial de 30.5 mg/mL, obtendo-se um valor de 16.85 ± 0.67 g/mmol de DPPH (Tabela 6). Assim, o seu valor de IC₅₀ mais elevado indica um poder antioxidante

inferior, sendo necessária uma concentração de extrato mais elevada para inibir ou eliminar 50% da concentração inicial de radicais livres de DPPH em solução.

O teor de fenóis totais dos extratos das folhas de *J. gossypifolia* (obtidos por extração supercrítica e maceração sucessiva) foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu* e expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de extrato (mg EAG/ mg extrato) e por 100 g de material vegetal (mg EAG/ 100 g material vegetal) (Tabela 7).

Tabela 7 – Teor de fenóis totais nos extratos de *J. gossypifolia* expresso em mg EAG/ mg extrato e por mg EAG/ 100 g material vegetal.

Extratos de <i>J. gossypifolia</i>	C_{EAG} (mg/mL)	mg EAG/ mg extrato	mg EAG/ 100 g material vegetal (% base seca)
ESC CO₂	134.4 ± 2.9	0.421 ± 0.009	3.951 ± 0.086
ESC CO₂+EtOH	148.5 ± 5.6	1.891 ± 0.071	17.99 ± 0.68
ESC CO₂+MeOH	192.4 ± 5.3	2.451 ± 0.067	24.36 ± 0.67
Mac. EtOH	280.3 ± 4.7	5.675 ± 0.095	56.04 ± 0.94
Mac. MeOH	474.1 ± 5.5	38.39 ± 0.45	403.4 ± 4.7

Verificou-se que a adição de 10% (v/v) em co-solventes mostrou um efeito positivo na extração de polifenóis, visto os extratos ESC CO₂+EtOH e ESC CO₂+MeOH apresentarem uma concentração de compostos fenólicos superiores ao do extrato ESC CO₂. A baixa concentração em polifenóis do extrato ESC CO₂ pode estar relacionada com o solvente de extração utilizado para a obtenção deste extrato, CO₂ supercrítico, que apresenta uma característica não polar, não sendo por isso adequado para a extração da maior parte de compostos fenólicos, que são maioritariamente polares (Garcia-Salas, *et al.*, 2010).

Além disso, o teor de polifenóis dos extratos obtidos por maceração, nomeadamente Mac. MeOH e Mac. EtOH é superior ao dos extratos obtidos por extração supercrítica, neste caso ESC CO₂, ESC CO₂+EtOH e ESC CO₂+MeOH. Deste trabalho constatou-se que a remoção dos componentes apolares e polares em duas etapas sequenciais de extrações supercríticas, seguido de maceração é mais eficiente para recuperação de compostos polifenólicos deste material vegetal considerado subproduto (Wijngaard, *et al.*, 2012).

Considerando os resultados da atividade antioxidante e comparando com o teor de fenóis totais, constata-se que o extrato que apresentava maior poder antioxidante contém uma maior concentração em compostos fenólicos (Mac. MeOH) evidenciando-se uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Assim, conclui-se que quanto maior o teor em polifenóis maior a atividade antioxidante (Mechergui, *et al.*, 2010), como se verifica na Figura 16.

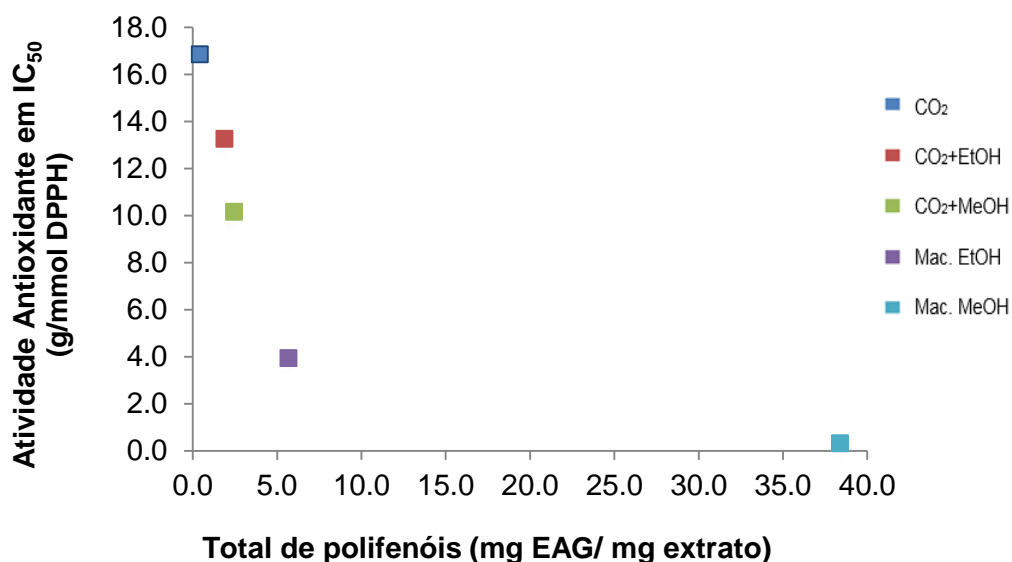


Figura 16 – Correlação entre o teor de polifenóis determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu* e a atividade antioxidante em IC₅₀ determinado pelo método de DPPH.

Assim, como anteriormente referido, a adição de 10% em co-solvente permitiu aumentar o teor em polifenóis dos extratos CO₂+MeOH e CO₂+EtOH, menores valores de IC₅₀ e conseqüentemente melhoria da atividade antioxidante comparativamente ao extrato CO₂. Os extratos obtidos por maceração apresentam um teor em polifenóis superior aos restantes extratos e por sua vez uma elevada atividade antioxidante, sobretudo o extrato Mac. MeOH.

Desta forma, verifica-se que os extratos de *J. gossypifolia* são potenciais antioxidantes naturais com elevadas concentrações em polifenóis, especialmente o extrato Mac. MeOH, pois demonstraram a sua eficácia na inibição ou captação de radicais livres sintéticos, nomeadamente o DPPH. Contudo, apesar de o poder antioxidante estar diretamente relacionado com o teor em polifenóis, não é possível afirmar que a inibição do radical livre de DPPH foi realizada única e exclusivamente por estes compostos, pois sabe-se o método de *Folin-Ciocalteu* não inclui todos os outros antioxidantes naturais

existentes na amostra vegetal. A presença de outras moléculas com grupos funcionais, estruturas e polaridades diferentes e biologicamente ativos no extrato poderão atuar de forma sinérgica e assim influenciar a atividade antioxidante do extrato (Tongpoothorn, *et al.*, 2012; Mechergui, *et al.*, 2010).

Também a polaridade do solvente de extração, o tipo de extração utilizada e a adição de co-solvente (e a sua polaridade) permite aumentar o rendimento de extração de compostos fenólicos, bem como de outras moléculas bioativas. Todavia, como a polaridade dos compostos fenólicos variam significativamente é difícil a realização de apenas de um método para extração eficaz para recuperação de todos os antioxidantes, como os polifenólicos da amostra vegetal (Garcia-Salas, *et al.*, 2010; Wijngaard, *et al.*, 2012; Tongpoothorn, *et al.*, 2012).

Analisando estes resultados verifica-se que quanto maior a polaridade do solvente maior a extração de compostos fenólicos, devido a sua capacidade para solubilizar os polifenóis do material vegetal (Garcia-Salas, *et al.*, 2010; Wijngaard, *et al.*, 2012; Tongpoothorn, *et al.*, 2012).

Desta forma, considera-se eficiente a prévia remoção dos componentes apolares e polares em duas etapas por extrações supercríticas sequenciais, pois permite a obtenção de compostos bioativos com uma atividade antioxidante superior, através de uma extração sólido-líquido (maceração) dos subprodutos provenientes das extrações anteriores (Wijngaard, *et al.*, 2012).

Outro fator bastante importante é o solvente utilizado no processo de extração e o co-solvente, pois influenciam na extração dos compostos fenólicos e por sua vez a sua quantificação. A utilização de metanol possibilita a obtenção de melhores resultados em termos de rendimento de extração de componentes antioxidantes, neste caso os polifenóis, e por sua vez maior atividade antioxidante. Contudo não se pode esquecer da toxicidade do mesmo, sendo por isso inadequado para utilizar-se em muitas áreas, como por exemplo a área alimentar. Desta forma forma, considera-se o etanol como co-solvente e solvente de extração a melhor opção (Garcia-Salas, *et al.*, 2010; Wijngaard, *et al.*, 2012; Tongpoothorn, *et al.*, 2012).

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *J. gossypiifolia*

A suscetibilidade antimicrobiana dos diferentes extratos (obtidos por extração supercrítica e maceração sucessiva) das folhas de *J. gossypiifolia* foi avaliada pelo método de difusão de disco em agar, utilizando diferentes estirpes microbianas, nomeadamente, três espécies bacterianas *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Escherichia coli* HB 101, *Pseudomonas aeruginosa* L10 (estirpe mutante), e uma espécie levedura: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24860.

A análise do potencial antimicrobiano dos extratos foi baseada no diâmetro da zona de inibição (DZI) (em milímetros) de crescimento microbiano em torno do disco, que se encontrava impregnado com uma determinada concentração de extrato, neste caso 60 mg/mL. No caso da não existência de uma zona de inibição, foi assumido que os extratos não apresentavam suscetibilidade ao agente antimicrobiano testado. A atividade dos diferentes extratos foi comparada com a presença de um controlo negativo, o solvente utilizado para diluição dos extratos, o DMSO, e um controlo positivo, o antibiótico de referência para cada estirpe microbiana. Assim, foi possível averiguar a sensibilidade do método em cada ensaio, e o mesmo só é válido se o controlo positivo não mostrar crescimento microbiano e o controlo negativo mostrar crescimento (Andrews, 2001).

Para a *Escherichia coli* verifica-se que todos os extratos mostraram um efeito inibitório em torno dos discos. Apesar de algumas zonas de inibição apresentarem uma geometria irregular, foi possível a sua medição e o diâmetro das mesmas variou entre 8.0 ± 1.4 e 12.0 ± 0.0 mm (Figura 17).

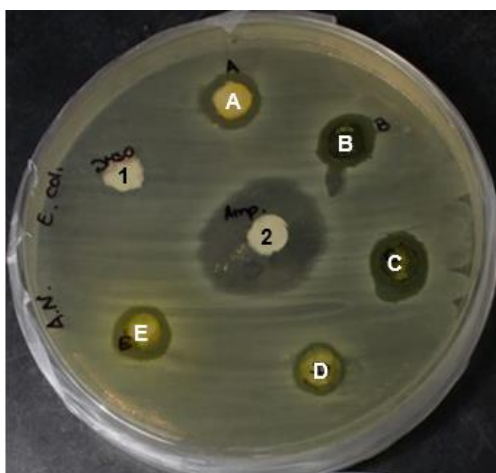


Figura 17 – Efeito dos extratos de *J. gossypiifolia* no crescimento de *Escherichia coli* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina.

O DMSO (controlo negativo) não mostrou nenhuma ação inibitória no crescimento desta bactéria, enquanto a ampicilina (controlo positivo), presente numa concentração de 75 µg/mL, demonstrou ação inibitória, com um diâmetro de zona de inibição de 22.0 ± 0.0 mm. Analisando os resultados, verifica-se que *Escherichia coli* apresentou uma maior suscetibilidade antimicrobiana no ESC. CO₂+EtOH, exibindo por isso o maior diâmetro de zona de inibição de 12.0 ± 1.4 mm. Seguem-se os extrato ESC. CO₂ Mac. MeOH CO₂+MeOH e por fim o extrato Mac. EtOH a qual a bactéria demonstrou menor suscetibilidade com um diâmetro de zona de inibição de 8.0 ± 1.4 mm (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. gossypiifolia* pelo método de difusão em disco para a estirpe *Escherichia coli*, em termos de diâmetros de zona de inibição.

Microorganismo Teste	Extratos de <i>J. gossypiifolia</i>					DMSO (Controlo Negativo)	Ampicilina Antibiótico de referência (Controlo Positivo)
	ESC			Maceração			
	CO ₂	CO ₂ +EtOH	CO ₂ +MeOH	EtOH	MeOH		
	DZI (mm)			DZI (mm)		DZI (mm)	
<i>Escherichia coli</i>	11.0 ± 0.0	12.0 ± 1.4	8.5 ± 2.1	8.0 ± 1.4	9.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição (mm) incluindo o disco de 6 mm

Em relação a *Bacillus subtilis*, todos os extratos exibiram efeito inibitório no crescimento em torno dos discos (Figura 18). Algumas zonas de inibição apresentaram uma geometria irregular, mas foi possível a determinação do diâmetro das mesmas, e este variou entre 8.0 ± 1.4 e 11.0 ± 1.4mm.

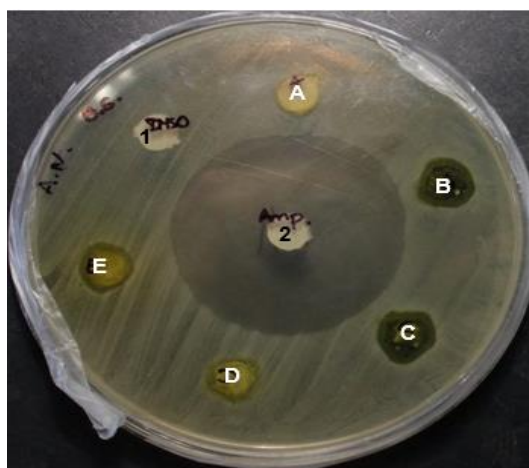


Figura 18 – Efeito dos extratos de *J. gossypiifolia* no crescimento de *Bacillus subtilis* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina.

O DMSO (controlo negativo) não mostrou nenhuma ação inibitória no crescimento perante a bactéria em estudo, enquanto a ampicilina (controlo positivo), presente numa concentração de 75 µg/mL, exibiu um diâmetro de zona de inibição de 40.5 ± 2.1 mm, demonstrando assim a sua ação inibitória. Com este estudo foi possível constatar que *Bacillus subtilis* apresentou maior suscetibilidade antimicrobiana ao extrato CO₂+MeOH, com um diâmetro de zona de inibição de 11.0 ± 1.4 mm. Segue-se o extrato CO₂ com um diâmetro de zona de inibição de 10.0 ± 0.0 mm. Esta bactéria apresentou a mesma suscetibilidade aos extratos Mac. MeOH e CO₂+EtOH, com um diâmetro de zona de inibição de 9.5 ± 0.7 mm. Com o extrato Mac. EtOH, a bactéria apresentou a menor suscetibilidade com um diâmetro de zona de inibição de 8.0 ± 1.4 mm (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. gossypiifolia* pelo método de difusão em disco para a estirpe *Bacillus subtilis*, em termos de diâmetros de zona de inibição.

Microrganismo Teste	Extratos de <i>J. gossypiifolia</i>					DMSO (Controlo Negativo)	Ampicilina Antibiótico de referência (Controlo Positivo)
	ESC			Maceração			
	CO ₂	CO ₂ +EtOH	CO ₂ +MeOH	EtOH	MeOH		
	DZI (mm)			DZI (mm)		DZI (mm)	
<i>Bacillus subtilis</i>	10.0 ± 0.0	9.5 ± 0.7	11.0 ± 1.4	8.0 ± 1.4	9.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	40.5 ± 2.1

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição (mm) incluindo o disco de 6 mm

Quanto a estirpe *Pseudomonas aeruginosa*, os extratos apresentaram inibição no crescimento desta bactéria em todos os discos (Figura 19). Apesar de nem todas as zonas de inibição apresentarem uma geometria regular, foi possível a determinação do seu diâmetro, que variou entre 9.5 ± 0.7 e 13.5 ± 0.7 mm.

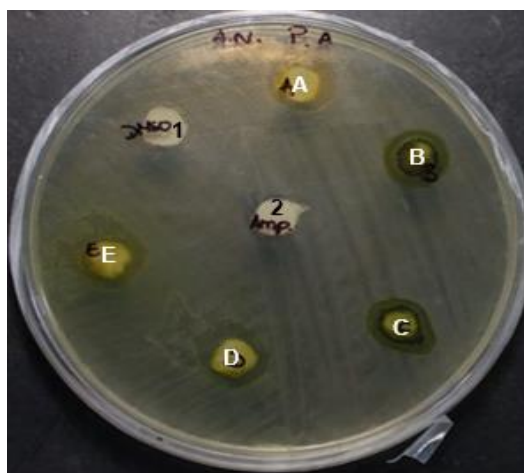


Figura 19 – Efeito dos extratos de *J. gossypiifolia* no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de difusão de disco, após 18h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+MeOH; C – ESC CO₂+EtOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina.

Neste ensaio, tanto o DMSO (controlo negativo) como a ampicilina (controlo positivo), numa concentração de 75 µg/mL, não exibiram nenhuma ação inibitória no crescimento desta bactéria. A *Pseudomonas aeruginosa* apresentou maior suscetibilidade aos extrato Mac. MeOH e CO₂, exibindo um diâmetro de zona de inibição de 13.5 ± 0.7 e 12.0 ± 1.4 mm respetivamente. Seguem-se os extratos CO₂+MeOH, Mac. EtOH e por fim CO₂+EtOH (Tabela 10).

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. gossypifolia* pelo método de difusão em disco para a estirpe *Pseudomonas aeruginosa*, em termos de diâmetros de zona de inibição.

Microrganismo Teste	Extratos de <i>J. gossypifolia</i>				DMSO (Controlo Negativo)	Ampicilina Antibiótico de referência (Controlo Positivo)	
	ESC		Maceração				
	CO ₂	CO ₂ +EtOH	CO ₂ +MeOH	EtOH	MeOH		
	DZI (mm)			DZI (mm)		DZI (mm)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.0 ± 1.4	9.5 ± 0.7	11.0 ± 0.0	10.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição (mm) incluindo o disco de 6 mm

Apesar da ampicilina não ter apresentado efeito inibitório no crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, segundo Andrews (2001), esta pode ser utilizada como antibiótico referência a uma concentração superior a 128 mg/L. No entanto durante a fase experimental a concentração utilizada foi muito inferior (75 µg/mL), ainda que a utilização da concentração recomendada possa não assegurar a inibição do crescimento.

Como tal foram realizados ensaios, em que se utilizava como antibiótico de referência a gentamicina com uma concentração de 0.33 mg/mL, utilizando-se os mesmos procedimentos no ensaio anteriormente mencionado. Contudo após a incubação verificou-se que os extratos não apresentaram qualquer efeito inibitório contra a *Pseudomonas aeruginosa*, constatando-se que os extratos perdem a sua ação antibacteriana após várias manipulações.

Para realização do teste de difusão em disco para a *Saccharomyces cerevisiae*, baseou-se na norma *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002), que descreve um método para testar a susceptibilidade dos agentes antifúngicos para leveduras que causam infecções invasivas, que inclui diversas espécies de *Cândida*, entre as quais a *Candida glabrata*. Esta espécie é a mais próxima da *Saccharomyces cerevisiae* (Roetzer, *et al.*, 2011).

Neste ensaio verifica-se que todos os extratos mostraram a efeito inibitório a volta do disco. Apesar de algumas zonas de inibição apresentarem uma geometria irregular, foi possível a sua medição e o diâmetro das mesmas variou entre 10.0 ± 0.6 e 11.7 ± 0.5 mm (Figura 20).

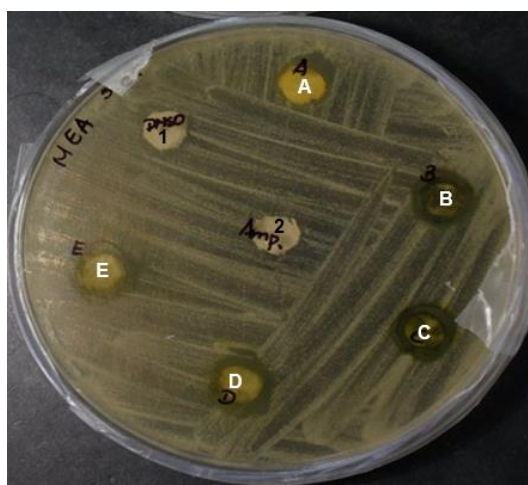


Figura 20 – Efeito dos extratos de *J. gossypifolia* no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de difusão de disco, após 24h de incubação a 37°C. Legenda: A – ESC CO₂; B – ESC CO₂+EtOH; C – ESC CO₂+MeOH; D – Mac. EtOH; E – Mac. MeOH; 1 – DMSO; 2 – Ampicilina.

Além disso, o DMSO (controlo negativo) revelou crescimento microbiano em torno do disco, com um diâmetro de zona de inibição de 7.0 ± 0.0 mm, mostrando ação inibitória no crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. Como controlo positivo, utilizou-se ampicilina numa concentração de 75 µg/mL, não exibindo nenhuma ação inibitória no crescimento desta bactéria.

A *Saccharomyces cerevisiae* apresentou maior suscetibilidade antimicrobiana aos extratos Mac. EtOH, CO₂ + MeOH e CO₂. Seguem-se os extratos CO₂ + EtOH e o extrato Mac. MeOH (Tabela 11).

Tabela 11 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. gossypiifolia* pelo método de difusão em disco para a estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, em termos de diâmetros de zona de inibição.

Microrganismo Teste	Extratos de <i>J. gossypiifolia</i>					DMSO (Controlo Negativo)	Ampicilina Antibiótico de referência (Controlo Positivo)
	ESC			Maceração			
	CO ₂	CO ₂ +EtOH	CO ₂ +MeOH	EtOH	MeOH	DZI (mm)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11.3 ± 0.2	10.4 ± 0.0	11.5 ± 0.9	11.7 ± 0.5	10.0 ± 0.6	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição (mm) incluindo o disco de 6 mm

Apesar de ser uma substância relativamente tóxica, o DMSO foi selecionado como solvente de dissolução dos extratos devido a sua estabilidade e as suas excepcionais propriedades de solvente, sendo a opção mais adequada para agentes antimicrobianos que não são dissolvidos em água, como é o caso dos extratos de *J. gossypiifolia* utilizados neste estudo. Contudo, segundo Randhawa (2006) os fungos apresentam uma ligeira suscetibilidade antifúngica a este solvente, pois este afeta o seu crescimento. Desta forma, o DMSO pode ter potenciado a ação antifúngica dos extratos através de efeito sinérgico entre estes agentes em estudo e o solvente selecionado. Para inibir este efeito antifúngico do DMSO, este poderia ser diluído a 50% em meio de cultura (Randhawa, 2006; Hazen, 2013).

Relativamente a ampicilina sabe-se que este é um antibiótico de referência para bactérias, pois inibem o processo de síntese de determinados componentes da parede celular das mesmas, que os fungos não possuem, não sendo por isso adequado para *Saccharomyces cerevisiae* (Madigan, *et al.*, 2004).

Foram realizados ensaios, em que se utilizava como antibiótico de referência a ciclohexamida com uma concentração de 0.33 mg/mL e como controlo negativo o DMSO diluído a 50% em meio, utilizando-se os mesmos procedimentos no ensaio anteriormente mencionado. Contudo após a incubação verificou-se que os extratos não apresentaram qualquer efeito inibitório contra a *Saccharomyces cerevisiae*, constatando-se que os extratos perderam a sua ação antibacteriana após várias manipulações.

No final desta seção pode-se concluir que os ensaios realizados para a *Pseudomona aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* não podem ser considerados aceitáveis, dado que a escolha dos controlos positivos e negativos não permitiram uma comparação válida.

Considerando todos os ensaios efetuados verifica-se que em nenhum deles, o diâmetro da zona de inibição dos extratos foi superior ao diâmetro de zona de inibição do controle positivo, antibiótico de referência. Assim, o efeito antimicrobiano (ou atividade antimicrobiana) dos extratos de *Jatropha gossypifolia* contra os microrganismos de teste é pouco significativo quando comparado com o antibiótico de referência.

Eventualmente, para obtenção de um maior diâmetro da zona de inibição dos extratos para as estirpes em estudo ter-se-ia de aumentar a concentração dos mesmos, dado que estes extratos podem ter algum potencial como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos.

A eficácia dos extratos também depende da constituição da parede celular dos diferentes microrganismos utilizados, uma vez que alguns destes possuem barreiras seletivas a diferentes solutos (Liang, *et al.*, 2008).

Também se pode concluir que não é possível correlacionar a atividade antimicrobiana dos extratos com o teor em polifenóis, apesar destes apresentarem propriedades antimicrobianas e exibirem efeitos inibitórios contra diversos microrganismos (Cowan, 1999), devido à presença de substâncias interferentes nos extratos.

No método de microdiluição em caldo, a atividade antimicrobiana foi avaliada tendo por base a concentração de extrato de *J. gossypifolia* (mg/mL) mais baixa que inibiu 90% do crescimento microbiano, ou seja, CIM₉₀ (concentração inibitória mínima) (Abdel-Massih, *et al.*, 2010).

Considerando as várias estirpes anteriormente referidas efetuaram-se vários ensaios com diferentes valores de concentração (0.08; 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; 5 mg/L) dos extratos obtidos. Estes ensaios permitiram determinar as correspondentes percentagens de inibição utilizando a expressão (2) da introdução deste trabalho.

De modo a validar este método, o controle positivo (constituído por meio de cultura ou extrato de levedura, inoculo e DMSO) deve apresentar crescimento microbiano e o controle negativo (que consiste no meio de cultura ou extrato de levedura, extrato de planta e DMSO) a sua ausência. Para efeitos de cálculo utilizou-se um valor médio das absorvâncias para o controle positivo e para o controle negativo os respetivos valores de absorvância de cada concentração. Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se no Anexo I.

Nas Figuras 21 e 22 estão representadas as percentagens de inibição em função das concentrações dos diferentes extratos de *J. gossypifolia* para a estirpe de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, respetivamente.

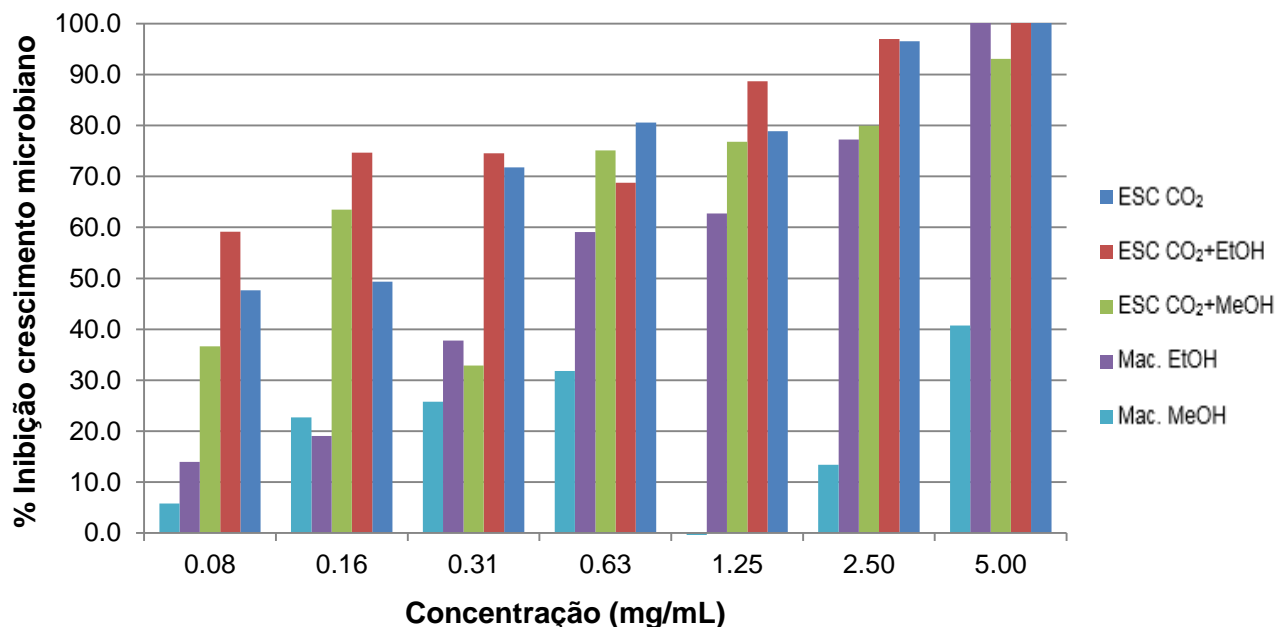


Figura 21 – Percentagem de inibição no crescimento de *Escherichia coli* pelo método de microdiluição em caldo, após 18h de incubação a 37°C, em função da concentração dos diferentes extratos de *J. gossypifolia*.

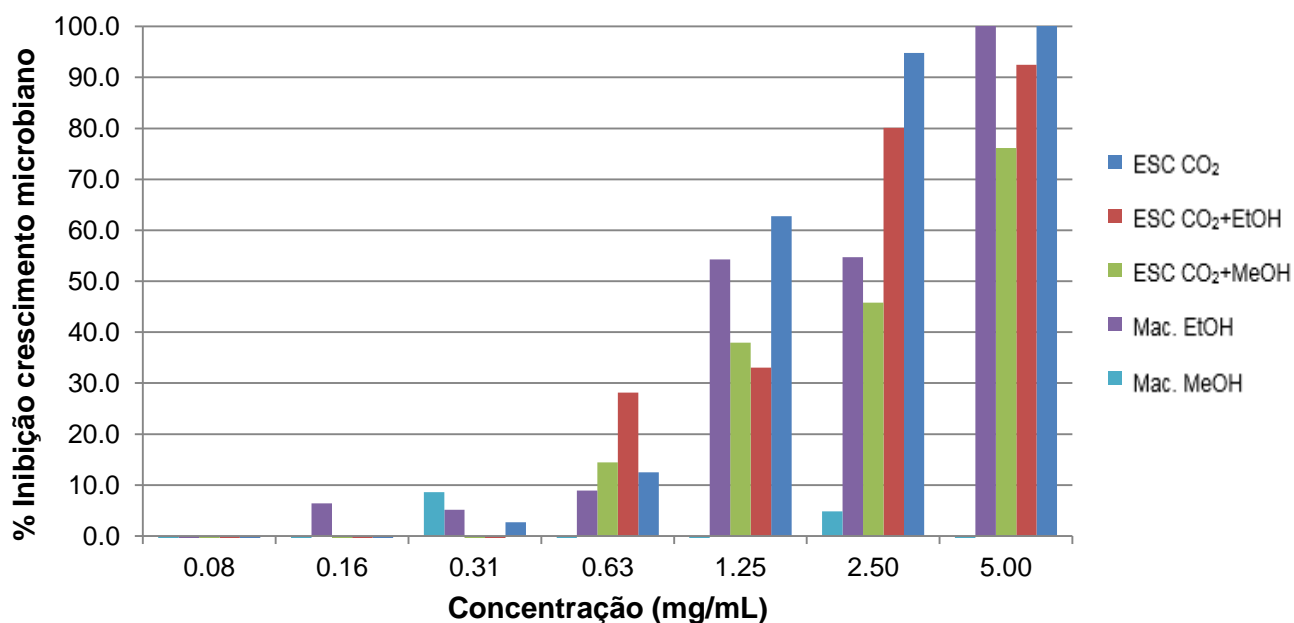


Figura 22 – Percentagem de inibição no crescimento de *Bacillus subtilis* pelo método de microdiluição em caldo, após 18h de incubação a 37°C, em função da concentração dos diferentes extratos de *J. gossypifolia*.

Analisando a Figura 21 pode-se concluir que a CIM₉₀ do extrato CO₂ e CO₂+EtOH se encontra entre 1.25 e 2.5 mg/mL. Para os extratos CO₂+MeOH e Mac. EtOH CIM₉₀ varia entre 2.5 e 5 mg/mL e para o Mac. MeOH apenas para concentrações superiores 5 mg/mL.

Analisando a figura 22 conclui-se que o extrato CO₂ a CIM₉₀ encontra-se entre 1.25 e 2.5 mg/mL. Para os extratos CO₂+EtOH e Mac. EtOH esse valor esta entre 2.5 e 5 mg/L. Para valores superiores a 5 mg/mL é possível encontrar a CIM₉₀ para os extratos CO₂+MeOH e Mac. MeOH.

Para determinação da CIM₉₀ utilizando os extratos Mac. MeOH para a *Escherichia coli* e CO₂+MeOH e Mac. MeOH para *Bacillus subtilis* seria necessário aumentar a concentração dos mesmos.

Os ensaios realizados para a *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* não foram conclusivos, uma vez que o controlo positivo (constituído por inoculo, DMSO e meio de cultura) não apresentou crescimento como seria esperado. Os resultados obtidos nestes ensaios encontram-se no Anexo I.

A ausência de crescimento destes microrganismos pode estar relacionada com a presença de DMSO. Este solvente apresenta um efeito antifúngico perante a *Saccharomyces cerevisiae*, tal como mencionado anteriormente no teste do disco. Para *Pseudomonas aeruginosa* este pode ter agido com um agente bacteriostático, inibindo assim o seu crescimento (Ansel, *et al.*, 1969). Desta forma para não ocorrer este efeito inibidor poder-se-ia diluir o DMSO a 50% em meio de cultura.

Tal como no método de difusão no disco, o maior ou menor valor de CIM de cada extrato, pode estar associado às características intrínsecas dos microrganismos testados, que estão relacionados com a permeabilidade da sua superfície celular para com os extratos e a sua composição (Talib & Mahasneh, 2010).

6 Conclusão e perspectivas futuras

A eficácia na obtenção de extratos das folhas de *J. gossypiifolia* depende da técnica de separação/ e ou extração aplicada, dos solventes e da sua polaridade, assim como dos constituintes extraídos, como a complexidade e as propriedades físicas e químicas dos mesmos.

Do estudo fitoquímico preliminar aos extratos das folhas *J. gossypiifolia* obtidos por maceração e extração líquido-líquido foi possível detetar a presença açúcares redutores, saponinas, fenóis e taninos, esteroides e terpenos e flavonoides, e a ausência de glicósidos cardíacos. A análise fitoquímica aos extratos metanol e clorofórmio indicaram que estes aparentam ter a mesma composição em compostos bioativos, supondo que o solvente de separação clorofórmio apresente maior afinidade para maior parte destes compostos. Seria aconselhável a realização de testes complementares, de forma a confirmar estes resultados e reduzir o risco de resultados falsos-positivos e falso-negativos.

Da breve análise e caracterização dos cromatogramas das frações de *J. gossypiifolia* obtidas por GC-MS foi possível a identificação de ftlatos (TR = 31.17 min) (um possível contaminante), o ácido benzoico (TR≈8.34 min), glicerol (TR≈8.94 min). Também identificou-se hidrocarbonetos saturados ($C_{12}H_{26}$ a $C_{26}H_{54}$), para o tempo de retenção mais baixo, até ao hexacosano ($C_{26}H_{54}$) ($10.34 < TR < 37.5$ minutos). Outros compostos identificados foram ácidos gordos: C16:0 palmítico (21.41 min) e C18:1 ácido oleico (23.12 min). Por fim foram identificados os triterpenoides Olean-12-en-3-one ($C_{30}H_{48}O$; Mg=424.7 g) (TR =43.95 min) e 3β -Olean-12-en-3-ol ($C_{30}H_{50}O$; Mg=426.7 g) (TR =44.50 min). Contudo, estas análises necessitam de ter padrões de hidrocarbonetos e triterpenoides para melhor identificação.

A facilidade de extração de certos componentes do material vegetal, nomeadamente os polifenóis pela técnica ESC está diretamente relacionada com afinidade ou seletividade do componente com o fluido de extração, tal como a composição da amostra e/ou as condições de funcionamento estabelecidas para unidade de extração. Isto também é válido para o rendimento total do processo.

Outro ponto de interesse avaliado é a adição de co-solvente, que demonstrou ser eficaz por aumentar o poder de extração, assim como a atividade antioxidante dos extratos, embora isso possa representar aumento dos custos do processo, assim como operações adicionais, como a remoção posterior do co-solvente (ex: metanol e etanol).

A utilização de metanol apresentou melhores rendimentos como co-solvente, no entanto devido o seu grau de toxicidade torna-se menos vantajoso comparativamente ao etanol.

Uma alternativa eficiente é a utilização da extração supercrítica (sem e com co-solvente) seguido de maceração do resíduo do extrator, com um solvente como etanol, pois possibilita a obtenção de extratos com diferentes compostos bioativos apresentando atividade antioxidante e microbiana diferenciada, como foi verificado no estudo. Finalmente, para obtenção de melhores rendimentos, assim como um grau de pureza elevado dos compostos desejados cada parâmetro do processo supercrítico deve ser otimizado.

Os extratos das folhas de *J. gossypifolia* mostravam atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e a *Bacillus subtilis*, uma vez que se verificou inibição do seu crescimento, durante os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, mas este efeito está dependente das características dos microrganismos e da composição dos extratos. Seria recomendável associar os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo para concentrações mais elevadas de extrato para comprovar este efeito antimicrobiano.

Para estudos futuros, é essencial a comparação de todos os extratos obtidos neste trabalho, tanto a nível da composição química, aliando outras técnicas mais eficientes como por exemplo HPLC, como da atividade antioxidante e antimicrobiana. Sugeriu-se também o isolamento e identificação dos compostos ativos destes extratos e determinação das atividades biológicas dos mesmos.

7 Referências bibliográficas

- Abbott, D. & Andrews, R. S., 1965. *An Introduction to chromatography*. 1^o ed. London: Longman.
- Abdel-Massih, R., Baydoun, E. & Daoud, Z., 2010. Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli. *Journal of Botany*, Volume 2010, pp. 1-8.
- Ajila, C.M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Tyagi, R. D.; Godbout, S; Valéro, J. R., 2011. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, Volume 31(3), pp. 227-249.
- Andrews, J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 48(1), pp. 5-16.
- Ansel, H. C., Norred, W. P. & Roth, I. L., 1969. Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 58(7), p. 836–839.
- Apak, Reşat; Gorinstein, Shela; Böhm, Volker; Schaich, Karen M.; Özyürek, Mustafa; Güçlü, Kubilay, 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*, Volume 85(5), pp. 957-998.
- Apu, Apurba Sarker; Hossain, Faruq; Rizwan, Farhana; Bhuyan, Shakhawat Hossan; Matin, Maima; Jamaluddin, A.T.M, (2013). Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, Volume 4(1), pp. 20-24.
- Azmir, J. ; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M. ; Sharif, K.M. ; Mohamed, A. ; Sahena, F. ; Jahurul, M.H.A. ; Ghafoor, K. ; Norulaini, N.A.N. ; Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, Volume 117, pp. 426–436.
- Bahadur, B., Pullaiah, T. & Murthy, G. V. S., 2013. Systematics of Indian *Jatrophas*. Em: *Jatropha, challenges for a new energy crop: genetic improvement and biotechnology*. New York: Springer, pp. 153-186.
- Balunas, M. J. & Kinghorn, A. D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, Volume 78, pp. 431 – 441.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. & Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. of Clin. Pathol.*, Volume 45, pp. 493-496.
- Bhalodia, N. R., Nariya, P. B. & Shukla, V. J., 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. *J Adv Pharm Technol Res.*, Volume 3(1), pp. 160-168.

Blainski, A., Lopes, G. C. & de Mello, J. C. P., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L.. *Molecules*, Volume 18(6), pp. 6852-6865.

Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH • free radical method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, Volume 30(6), pp. 609-615.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, Volume 28, pp. 28-35.

Bucar, F., Wube, A. & Schmid, M., 2013. Natural product isolation: how to get from biological material to pure compounds. *Natural product reports*, Volume 30(4), pp. 525-545.

Bullangpoti, Vasakorn; Khumrungsee, Nutchaya; Pluempanupat, Wanchai; Kainoh, Yooichi; Saganpong, Unchalee, (2011). Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*, Volume 36(2), pp. 260–263.

Burkill, H., 1994. *The useful plants of west tropical Africa*. 2^o ed, Volume 3, United Kingdom: Royal botanic gardens Kew.

Cappert, D. & University, M. S., 2013. *Forestry Images*. [Online] Available at: www.britannica.com/EBchecked/topic/442351/rubber-tree [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Capuzzo, A., Maffei, M. E. & Occhipinti, A., 2013. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, Volume 18, pp. 7194-7238.

Cattle Producer, 2013. *Cattle Producer*. [Online] Available at: <http://cattleproducer.wordpress.com/2013/07/09/farmers4enviro/> [Acedido em 16 Setembro 2014].

Chaimbault, P., 2014. The modern art of identification of natural substances in whole plants. Em: C. Jacob, Claus; Kirsch, Gilbert; Slusarenko, Alan; Winyard, Paul G.; Burkholz, Torsten. edits. *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: from basic chemistry to widespread applications in medicine and agriculture*. Netherlands: Springer, pp. 31-94.

Chauhan, R. S. & Sood, A., 2013. Comparative genomics in Euphorbiaceae. Em: B. Bahadur, M. Sujatha & N. Carels, edits. *Jatropha, challenges for a new energy crop: geneticimprovement and biotechnology*. New York.(B. Bahadur, , Sujatha e M., Carels,): Springer New York, pp. 351-374.

CLSI, 2012a. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eleventh*, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI, 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *American Society for Microbiology*, Volume 12(4), pp. 564–582.
- Cronquist, A., 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G., 2000. Natural products: secondary metabolites. Em: B. Buchanan, . W. Grissem & R. Jones, edits. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. s.l.:American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. & Clifford, M. N., 2006. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford : Blackwell Publishing Ltd.
- Dai, J. & Mumper, R. J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, Volume 15, pp. 7313-7352.
- Dehgan, B., 1982. Novel *Jatropha*s for Florida Landscapes. *Proc. Fla. State Hort*, Volume 95, pp. 277-280.
- Dehgan, B. & Webster, G. L., 1979. *Morphology and infrageneric relationships of the genus Jatropha (Euphorbiaceae)*. California: University of California Press.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S. & Becker, K., 2010a. *Jatropha* Toxicity—A Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Volume 13 (6), pp. 476 — 507.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S. & Becker, K., 2010. *Jatropha* Diterpenes: a Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 88(3), pp. 301-322.
- Dewick, P. M., 2002. *Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach*. 2^o ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Dhale, D. A. & Birari, A. R., 2010. Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* Linn.. *Recent Research in Science and Technology*, Volume 2(7), pp. 24-28.
- Dinan, L., 2006. Dereplication and Partial Identification of Compounds. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, pp. 297-321.
- Discover Life, 2013. *Jatropha* L.. [Online] Available at: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Jatropha> [Acedido em 14 Dezembro 2013].
- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, Volume 97(4), pp. 654-660.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M. J., 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs.. *Food. Chem.*, Volume 83, pp. 255–262.

Duarte, N. M. d. S. D., 2008. *Structural characterization and biological activities of terpenic and phenolic compounds isolated from Euphorbia lagascae and Euphorbia tuckeyana*, Lisboa: Tese de doutoramento em Farmácia (Química Farmacêutica), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

Dutta, B. K., 2007. *Principles of mass transfer and separation process*. New Delhi: Prentice-Hall of India Pvt.Ltd.

Eloff, J. N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*, Volume 64(8), pp. 711-713.

Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, Volume 109(1), pp. 69-75.

Félix-Silva, Juliana; Giordan, Raquel Brandt; Silva-Jr, Arnóbio Antonio da; Zucolotto, SilvanaMaria; Fernandes-Pedrosa, Matheus de Freitas, 2014. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2014, pp. 1-32.

Fontana, A. R., Antonioli, A. & Bottini, R., 2013. Grape Pomace as a Sustainable Source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 61(38), pp. 8987-9003.

Francis, J. K., 2001. *Jatropha gossypifolia* L. red physic nut Euphorbiaceae, Calle Ceiba, San Juan PR: Research Forester, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, Jardín Botánico Surin in cooperation with the University of Puerto Rico, Río Piedras,

Gaikwad, Rajesh S.; Kakde, Rajendra B. ; Kulkarni, Anil U. ; Gaikwad, Deepmala R. ; Panchal, V.H., 2012. In vitro antimicrobial activity of crude extracts of *Jatropha* species. *Current Botany*, Volume 3(3), pp. 9-15.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero , A. & Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, Volume 15, pp. 8813-8826.

Garland, M. A. e USDA-NRCS Plants Database, 2013. *Jatropha Curcas* L. [Online] Available at: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=JACU2> [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Garland, M. A. & Database, U.-N. P., 2013. *Jatropha Curcas* L.. [Online] Available at: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=JACU2> [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Ghosh, Anupam; Das , Bidus Kanti ; Roy , Arup; Mandal , Biplab ; Chandra , Goutam, 2008. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*, Volume 62(2), pp. 259-262.

Gibbons, S., 2006. An Introduction to Planar Chromatography. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural products isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 77-177.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 27, pp. 1–93.

Harborne, J. B., 1984. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2^o ed. London: Chapman and Hall.

Hazen, K. C., 2013. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 75, pp. 60–63.

Heller, J., 1996. *Physic nut. Jatropha curcas L: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 1*, Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Hossain, M. A., Shah, M. D., Sang, S. V. & Sakari, M., 2012. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oils and crude extracts of *Merremia borneensis*. *Journal of King Saud University - Science*, Volume 24(3), pp. 243-249.

Houssen, W. E. & Jaspars, M., 2006. Isolation of Marine Natural Products. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 353-390.

Howard, R. A., 1989. *Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands*. Jamaica Plain: Arnold Arboretum, Harvard University.

Hyde, M.A., Wursten, B.T., Ballings, P., Dondeyne, S. & Coates Palgrave, M., 2015. Flora of Mozambique: Species information: individual images: *Jatropha gossypifolia*.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A. & Castro-puyana, M., 2012. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and , micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. Em: M. Hayes, ed. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Boston, MA: Springer US, pp. 55-99.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A. & Castro-Puyana, M., 2012. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. Em: M. Hayes, ed. *Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications*. Boston, MA: Springer US, pp. 55-99.

Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, Volume 126(4), pp. 1821-1835.

Infopédia, Dicionário Porto Editora, 2013. *Euforbiáceas*. [Online] Available at: [http://www.infopedia.pt/\\$euforbiaceas](http://www.infopedia.pt/$euforbiaceas) [Acedido em 9 Julho 2013].

Invasive Species Compendium, 2014. *Jatropha gossypifolia*. [Online] Available at: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/28394> [Acedido em 4 Setembro 2014].

Jones, W. P. & Kinghorn, D., 2006. Extraction of Plant Secondary Metabolites. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 323-351.

Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, Volume 49(11), pp. 1749-1755.

Kayombo, E. J., Uiso, F. C. & Mahunnah, R. L., 2012. Experience on healthcare utilization in seven administrative regions of Tanzania. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Volume 5, pp. 1-8.

Khan, Rosina; Islam, Barira; Akram, Mohd; Shakil, Shazi; Ahmad, Anis; Ali, S Manazir; Siddiqui, Mashiatullah; Khan, Asad U, 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, Volume 14(2), pp. 586-597.

Kinsey, B., 2014. *Sutheastern Arizona Wildflowers: Jatropha macrorhiza*. [Online] Available at: <http://www.fireflyforest.com/flowers/1310/jatropha-macrorhiza-ragged-nettlespurge/> [Acedido em 30 Agosto 2014].

Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B. & Mozina, S. S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts.. *Journal of microbiological methods*, Volume 81(2), pp. 121-126.

Kumar, A. & Singh, N., 2012. *Jatropha gossypifolia* L.: a potential genetic resource for herbal dye. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Volume 59(5), pp. 949-954.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. & Ah-Hen, K., 2012. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, Volume 132(3), pp. 1121-1132.

Liang, Ming-Tsai; Yang, Cheng-Hong; Li, Shun-Tai; Yang, Cheng-San; Chang, Hsueh-Wei; Liu, Ching-Shen; Cham, Thau-Ming; Chuang, Li-Yeh, 2008. Antibacterial and antioxidant properties of *Ramulus Cinnamomi* using supercritical CO₂ extraction. *European Food Research and Technology*, Volume 227(5), pp. 1387-1396.

Liogier, H. A., 1988. *Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent islands, Spermatophyta*. Río Piedras: Editorial de la Universidad de Puerto Rico.

Ljubiša, Šarić Ć.; Ivana, Čabarkapa S.; Bojana, Beljkaš M.; Aleksandra, Mišan Ć.; Marijana, Sakač B.; Dragana, Plavšić V., 2009. Antimicrobial activity of plant extracts from Serbia. *Quality and Safety*, Volume 1-2, pp. 1-5.

- Macek, K., Deyl, Z. & Janák, J., 1975. *Liquid column chromatography: a survey of modern techniques and application*. 1^o ed. New York: Elsevier Science.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 2004. *Microbiologia de Brock*. 10^a ed. Brasil: Prentice Hall.
- Marques, A. J. V. & Coelho, J. A. P., 2011. Determination of fat contents with supercritical CO₂ extraction in two commercial powder chocolate products: Comparison with NP-1719. *J. Food Process Eng.*, Volume 34, pp. 1597-1608.
- Matos, F. J. A., 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2^o ed. Fortaleza: Edições UFC.
- Mazid, M., Khan, T. A. & Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants *Mazid. *Biology and Medicine*, Volume 3(2), pp. 232-249.
- McMillian, J. & Database, U.-N. P., 2013. *Manihot esculenta Crantz – Cassava, plant guide*. [Online] Available at: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=MAES#> [Acedido em 5 Dezembro 2013].
- Mechergui, Kaouther; Coelho, José A.; Serra, Maria C.; Lamine, Sassia B.; Boukhchina, Sadok; Khouja, Mohamed L., 2010. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *J Sci Food Agric 2010*, Volume 90, pp. 1745–1749.
- Mensor, Luciana L.; Menezes, Fábio S.; Leitão, Gilda G.; Reis, Alexandre S.; Santos, Tereza C. dos; Coube, Cintia S.; Suzana, G. Leitão, 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, Volume 15, pp. 127-130.
- Misra, M. & Misra, A. N., 2010. *Jatropha: the biodiesel plant biology, tissue culture and genetic transformation – A Review*. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, Volume 1(1), pp. 11-24.
- Morris, P. & London, A., 2013. *Rubber tree, Hevea brasiliensis*. [Online] Available at: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/442351/rubber-tree> [Acedido em 5 Dezembro 2013].
- Murthy, G. V. S., Chamundeswari, E., Goverdhen, S. & Bahadur, B., 2013. Fruit, Seed and Seedling Characters in *Jatropha* L.. Em: *Jatropha, challenges for a new energy crop: genetic improvement and biotechnology*. New York: Springer New York, pp. 95-118.
- Mwine, J. T. & Damme, P. V., 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants?: a review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*, Volume 5(5), pp. 652-662.
- Nahar, L. & Sarker, S. D., 2006. Supercritical Fluid Extraction. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 47-77.

NCCLS, 2002. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition*, Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NCCLS, 2004. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*, Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Oduola, T., Awwiuro, O. & Ayanniya, T., 2005. Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. *African Journal of Biotechnology*, Volume 4(7), pp. 679-681.

Oduola, T. ; Popoola, G. B. ; O. G. , Awwiuro; Oduola, T. A.; Ademosun, A.A. ; Lawal, M. O., 2007. Use of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent: how safe is it?. *Journal of Medicinal Plants research*, Volume 1 (1), pp. 14-17.

Ogundare, A. O., (2007). Antimicrobial effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* leaf extracts. *Trends in Applied Sciences Research*, Volume 2(2), pp. 145-150.

Okigbo, R. N., Anuagasi, C. L. & Amadi, E., 2009. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*, Volume 3(2), pp. 86-95.

Oliveira, Jefferson S. de; Leite, Polyanna M.; Souza, Lincoln B. de; Mello, Vinícius M.; Silva, Eid C.; Rubim, Joel C.; Meneghetti, Simoni M.P.; Suarez, Paulo A.Z., 2009. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *biomass and bioenergy*, Volume 33, pp. 449–453.

Otsuka, H., 2006. Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural products isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 269-273.

Panda, B.B.; Gaur, Kalpesh; Kori, M.L.; Tyagi, L.K.; Nema, R.K.; Sharma, C.S.; Jain, A.K., 2009. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. *Global Journal of Pharmacology*, Volume 3(1), pp. 1-5.

Pandey, A. K. & Kumar, S., 2013. Perspective on plant products as antimicrobials agents: a review. *Pharmacologia*, Volume 4(7), pp. 469-480.

Parrotta, J. A., 2001. *Healing plants of Peninsular India*. UK and New York: CABI Publishing.

Parsons, W. T. & Cuthbertson, E. G., 2001. *Noxious weeds of Australia*. 2^o ed. Melbourne: Csiro Publishing.

Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, Volume 53, pp. 4290-4302.

Randall, A., Campbell, S. & Vogler, W., 2009. *Bellyache bush (Jatropha gossypifolia): Control options and management case studies from across Australia*, Queensland: Department of Employment, Economic Development and Innovation.

Randhawa, M. A., 2006. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Jpn. J. Med. Mycol.*, Volume 47(4), pp. 313-318.

Rates, S., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Volume 39, pp. 603–613.

Rees, N. E. & Service, U. A. R., 2013. *Euphorbia esula* L. [Online] Available at: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=0025062>; [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Reid, R. G. & Sarker, S. D., 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, pp. 117-157.

Rickjpellag, 2013. *Castor-oil plant, Ricinus communis*. [Online] Available at: www.britannica.com/EBchecked/topic/98764/castor-oil-plant [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Riera, E.; Golás, Y.; Blanco, A.; Gallego, J. A.; Blasco, M. ; Mulet, A., 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 11, pp. 241-244.

Ríos, J. L. & Recio, M. C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, Volume 100, pp. 80-84.

Robinson, M. M. & Zhang, X., 2011. *The world medicines situation: Traditional medicines : global situation, issues and challenges*. 3^o ed. Geneva: World Health Organization.

Roetzer, A., Gabaldón, T. & Schüller, C., 2011. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 314, pp. 1-9.

Routledge, R. & College, S., 2013. *Euphorbia esula* L. [Online] Available at: www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5473513 [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Ruijter, A. e PROTA Network Office Europe, 2013. *Ricinus communis* L.. [Online] Available at: http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?ac=qbe_query&bu=http://database.prota.org/search.htm&tn=protab~1&qb0=and&qf0=Species+Code&qj0=Ricinus+communis&rf=Webdisplay [Acedido em 5 Dezembro 2013].

Sabandar, C. W., Ahmat, N., Mohd Jaafar, F. & Sahidin, I., 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha*. *Phytochemistry*, Volume 85, pp. 7-29.

Saeed, N., Khan, M. R. & Shabbir, M., 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L.. *BMC complementary and alternative medicine*, Volume 221, pp. 1-12.

Sánchez, J. G. B. & V. Kouznetsov, V., 2010. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 41, pp. 270-277.

Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I., 2006. Natural Product Isolation: an overview. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, edits. *Natural Product Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 1-25.

Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D. ; K.M. , Sundram; Latha, L. Yoga, 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, Volume 8(1), pp. 1-10.

Schmelzer, G. H. & Gurib-Fakim, A., 2008. *Plant Resources of Tropical Africa 11(1). Medicinal plants*. Wageningen, Pays-Bas: Fondation PROTA.

Seidel, V., 2006. Initial and Bulk Extraction. Em: S. D. Sarker, Z. Latif & S. D. Sarker, edits. *Natural Products Isolation*. 2^o ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 27-46.

Seth, R. & Sarin, R., 2010. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L.. *Archives of Applied Science Research*, Volume 2 (5), pp. 285-291.

Shi, John; Nawaz, Haseeb; Pohorly, Joseph; Mittal, Gauri; Kakuda, Yukio; Jiang, Yueming, 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods—engineering and technology. *Food Reviews International*, Volume 21(1), pp. 139-166.

Shriner, Ralph L; Hermann, Christine K F; Morrill, Terence C; Curtin, David Y; Fuson, Reynold C, 2004. *The Systematic Identification of Organic Compounds*. 8^o ed. Danvers: Wiley.

Study Everywhere, 2014. Quizlet. [Online] Available at: <http://quizlet.com/29272145/lab-exam-2-flash-cards/> [Acedido em 16 Novembro 2014].

Sujatha, M., Bahadur, B. & Reddy, T. P., 2013. Interspecific Hybridization in the Genus *Jatropha*. Em: *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: genetic improvement and biotechnology*. New York: Springer, pp. 423-443.

Talib, W. H. & Mahasneh, A. M., 2010. Antimicrobial, Cytotoxicity and Phytochemical Screening of Jordanian Plants Used in Traditional Medicine. *Molecules*, Volume 15, pp. 1811-1824.

Theodore, L. & Ricci, F., 2010. *Mass transfer operations for the practicing engineer*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc..

Tongpoothorn, Wimonrat; Chanthai, Saksit; Sriuttha, Manop; Saosang, Kanda; Ruangviriyachai, Chalerm, 2012. Bioactive properties and chemical constituents of methanolic extract and its fractions from *Jatropha curcas* oil. *Industrial Crops and Products*, Volume 36(1), pp. 437-444.

Van, B. W. & Van, P. W., 2009. *Field guide to trees of Southern Africa*. 12^o ed. Cape Town: Struik Nature.

Veggi, P. C., Cavalcanti, R. N. & Meireles, M. A. A., 2011. Modifier effects on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of some Brazilian plants: antioxidant activity and economical evaluation. *Procedia Food Science*, Volume 1, pp. 1717-1724.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, Volume 46(10), pp. 4113-4117.

Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, Volume 1, pp. 13–25.

Villaño, D; Fernández-Pachón, M S; Moyá, M L; Troncoso, A M; García-Parrilla, M C, 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, Volume 71, pp. 230-235.

Well grow horti trading, 2014. *Jatropha podorica*. [Online] Available at: <http://www.wellgrowhorti.com/Page/LandscapePlants/ShrubImageList/Shrub%20Images%20J.htm> [Acedido em 30 Agosto 2014].

Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K. & Brunton, N., 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, Volume 46(2), pp. 505-513.

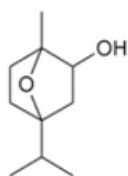
Wikimedia Commons, t. f. m., 2014. *Jatropha integerrima e Jatropha multifida*. [Online] Available at: http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Jatropha_multifida [Acedido em 30 Agosto 2014].

Wood, K. V., Bonham, C. & Jenks, M. A., 2001. The effect of water on the ion trap analysis of trimethylsilyl derivatives of long-chain fatty acids and alcohols. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, Volume 15, pp. 873–877.

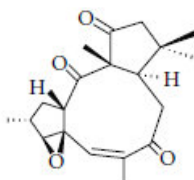
8 Anexos

Anexo A. Estruturas dos compostos isolados ou detetados na espécie *Jatropha gossypifolia* L

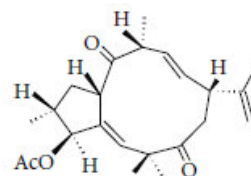
A1. Estruturas de terpenos isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*



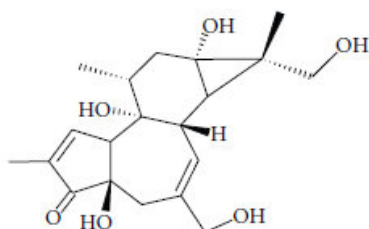
(1)



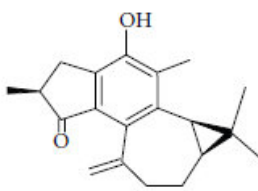
(2)



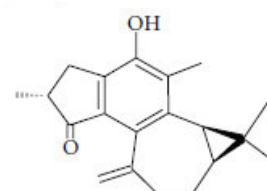
(3)



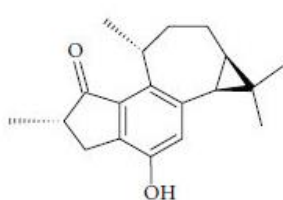
(4)



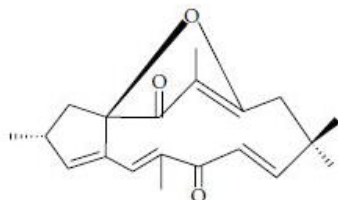
(5)



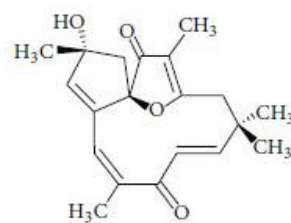
(6)



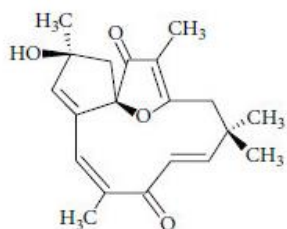
(7)



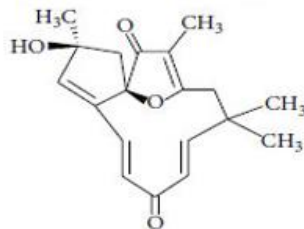
(8)



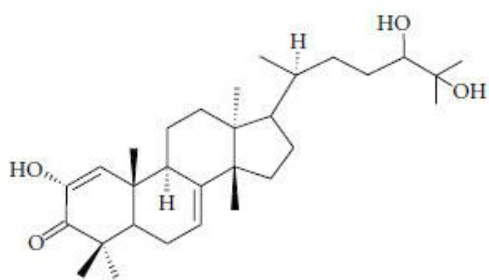
(9)



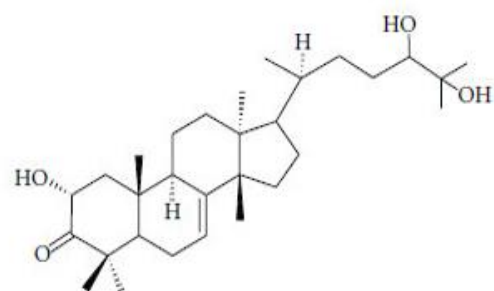
(10)



(11)



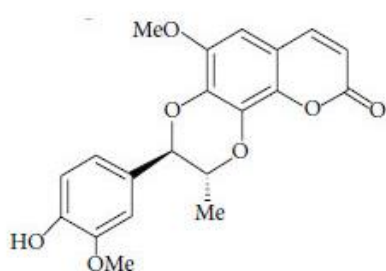
(12)



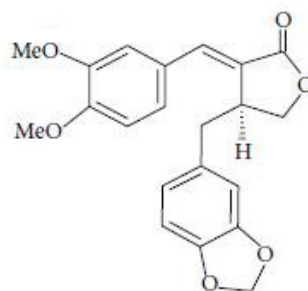
(13)

Figura A1 – Terpenos isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*. Legenda: **1)** 1,4-Epoxi-p-mentano-2-ol, **2)** Citralitrona, **3)** Jatrofenona, **4)** 12-deoxi-16-hidroxi-forbol (DHPB), **5)** Jatrololona (Jatropholone) A, **6)** Jatrololona (Jatropholone) B, **7)** Faladona (Falodone), **8)** Jatrofeno (Jatrophone), **9)** 2 α -Hidroxi-jatrofeno, **10)** 2 β -Hidroxi-jatrofeno, **11)** 2 β -Hidroxi-5,6-isojatrofeno, **12)** (2 α , 13 α , 14 β , 20S)-2,24,25-Trihidroxilanost-7-en-3-one, **13)** (13 α , 14 β , 20S)-2,24,25-Trihidroxilanosta-1,7-dien-3-one (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Devappa, *et al.*, 2010; Sabandar, *et al.*, 2013).

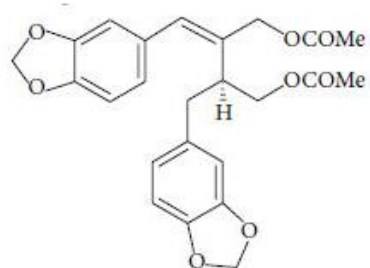
A2. Estruturas de lignoides isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*



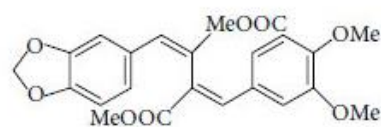
(14)



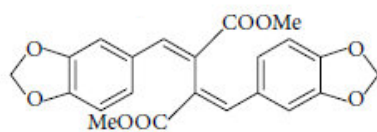
(15)



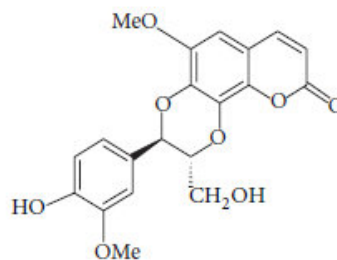
(16)



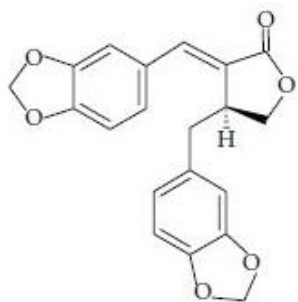
(17)



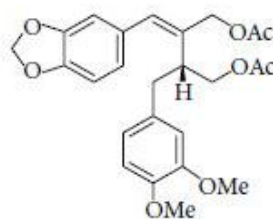
(18)



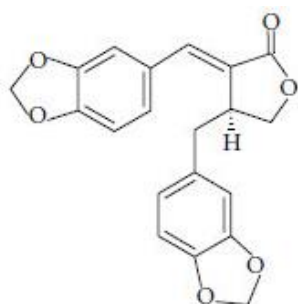
(19)



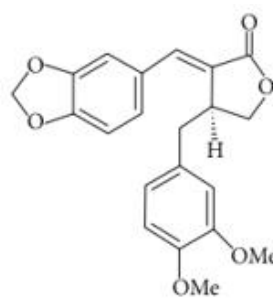
(20)



(21)



(22)



(23)

Figura A2 – Lignoides isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*. Legenda: **14)** Propacina, **15)** Gossipifana, **16)** Gossipilina, **17)** Jatrodieno, **18)** Jatrodieno, **19)** Cleomiscosina A, **20)** Isogadaina, **21)** Prasantalina (Prasanthaline), **22)** Gadaina, **23)** Jatrofana (Jatrophan) (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013).

A3. Estruturas de alcaloides e flavonoides detetados e isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*

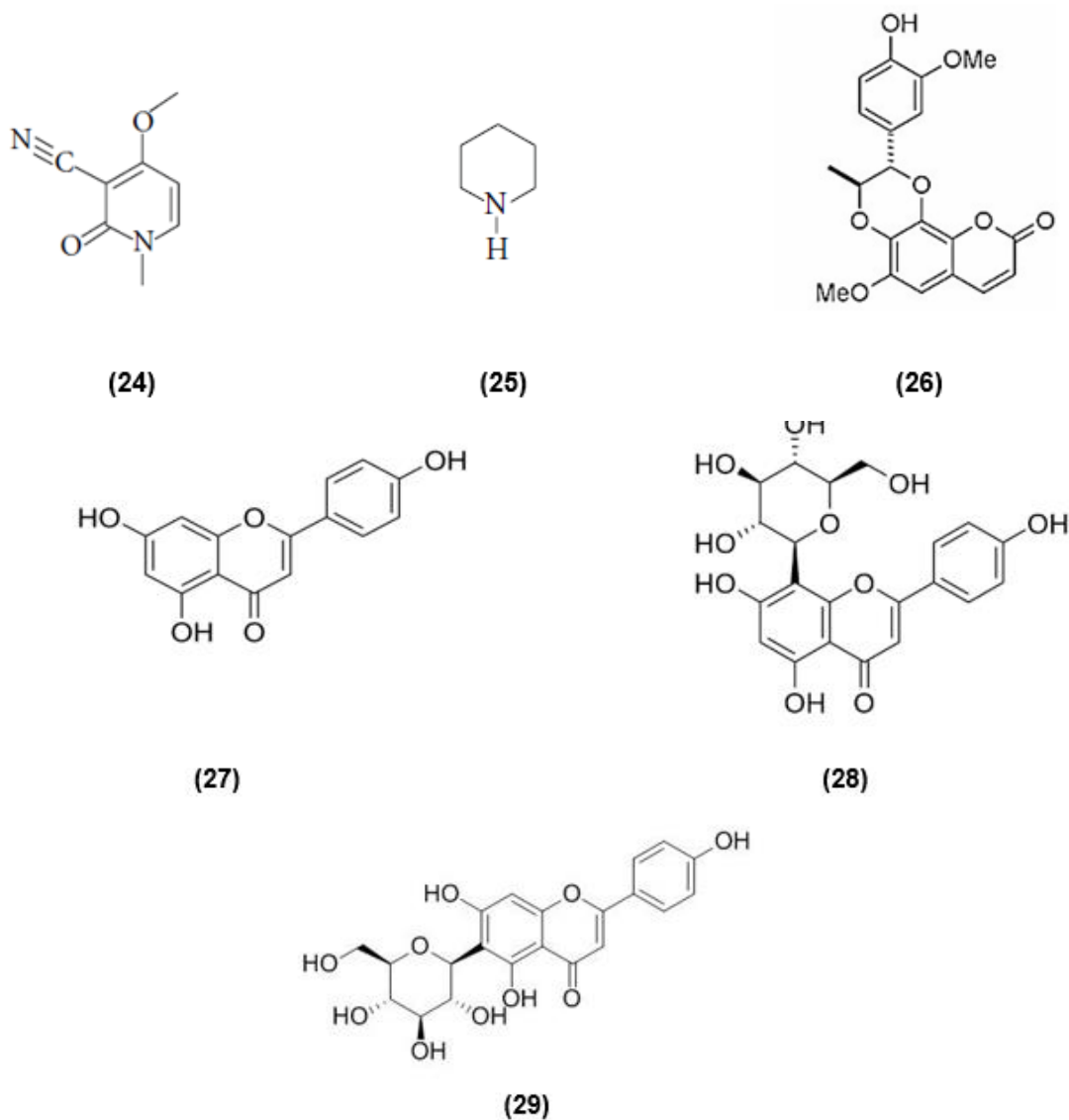


Figura A3 – Alcaloides e flavonoides isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*. Legenda: **24)** Ricinina, **25)** Piperidina, **26)** Jatrofina, **27)** Apigenina, **28)** Vitexina, **29)** Isovitexina (Félix-Silva, *et al.*, 2014).

A4. Estruturas de péptidos cíclicos isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*

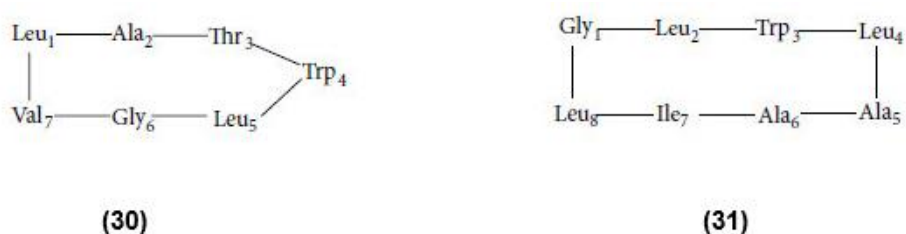


Figura A4 – Péptidos cíclicos isolados na espécie *Jatropha gossypifolia*. Legenda: **30)** Ciclogossina A, **31)** Ciclogossina B (Félix-Silva, *et al.*, 2014; Sabandar, *et al.*, 2013).

Anexo B. Teor de humidade das amostras de folhas de *Jatropha gossypifolia* L

Tabela B1 – Percentagem de humidade das folhas de *Jatropha gossypifolia*.

Ensaio	Peso Húmido (g)	Tempo (min)	Peso Seco (g)	Peso Residual (g/g)	% Humidade
1	1.454	5.30	1.300	0.8944	10.560
2	1.467	5.00	1.308	0.8915	10.850
3	1.462	4.60	1.302	0.8904	10.960
Média ± σ	1.461 ± 0.007	4.97 ± 0.35	1.303 ± 0.004	0.8921 ± 0.0021	10.790 ± 0.207

Anexo C. Preparação de reagentes para deteção de metabólitos secundários

C1. Preparação do reagente de *Keede* para deteção de glicósidos cardíacos

1. Preparar uma solução de ácido 3,5-dinitrobenzóico (Merck) dissolvendo 2 g deste composto em 50 mL de metanol (Sigma Aldrich).
2. Preparar uma solução de 5.7 g de hidróxido de potássio (Merck) em 100 mL de metanol.
3. Juntar as soluções e agitar.

C2. Preparação do reagente de *Fehling* para deteção de açúcares redutores

1. Preparar uma solução dissolvendo 34.65 g de sulfato de cobre (II) (CuSO_4) (Merck) em 500 mL de água destilada.
2. Preparar uma solução com 173 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck) e 125 g de permanganato de potássio (KMnO_4) (Merck) em 500 mL de água destilada.
3. Juntar as soluções e agitar.

Anexo D. Fracionamento dos extratos de *Jatropha gossypifolia*

D1. Fracionamento do extrato n-hexano (EH)

O extrato n-hexano (EH) (6.88 g) foi cromatografado numa coluna de sílica gel e eluído com n-hexano e misturas de n-hexano (n-Hex)/tolueno (Tol), tolueno (Tol)/ acetato de etilo (AcEt) e tolueno (Tol)/ metanol (MeOH) (Tabela D1).

Tabela D1 – Frações cromatográficas do extrato n-hexano (EH).

Fração	Eluente	Massa (mg)	Observações
EH ₁	n-Hexano	160	óleo amarelado
EH ₂	n-Hex / Tol (8:2)	90	"
EH ₃	n-Hex / Tol (7:3)	1890	óleo esverdeado
EH ₄	Tol / AcEt (7:3)	2800	sólido verde
EH ₅₋₆	Tol / AcEt (7:3)	840	"
EH ₇	Tol / AcEt (5:5)	420	"
EH ₈	Tol / AcEt (5:5)	770	óleo acastanhado
EH ₉	Tol / MeOH (9:1)	100	óleo amarelado
EH ₁₀	Tol / MeOH (8:2)	70	sólido esverdeado
EH ₁₁	Tol / MeOH (8:2)	1300	sólido esverdeado
EH ₁₂₋₁₅	Tol / MeOH (8:2)	160	óleo esverdeado
EH ₁₆	Tol / MeOH (8:2)	10	"
EH ₁₇	Tol / MeOH (8:2)	40	"
EH ₁₈	Tol / MeOH (8:2)	30	"
EH ₁₉	Tol / MeOH (8:2)	80	"
EH ₂₀	Tol / MeOH (8:2)	130	"
EH ₂₁₋₂₃	Vários	80	"
EH ₂₄₋₂₆	Tol / MeOH (78:22)	40	"
EH ₂₇₋₂₈	Tol/MeOH (78:22)	80	óleo amarelado
EH ₂₉	Tol/MeOH (78:22)	70	óleo acastanhado
EH ₃₀₋₃₁	Vários	70	óleo amarelado
EH ₃₂₋₃₄	Tol / MeOH (75:25)	340	óleo acastanhado
EH ₃₅	Tol / MeOH (75:25)	60	"
EH ₃₆	Tol / MeOH (70:30)	80	"
EH ₃₇	Tol / MeOH (70:30)	80	"
EH ₃₈	Tol / MeOH (70:30)	10	óleo esverdeado
EH ₃₉	Tol / MeOH (68:32)	220	óleo acastanhado

Tabela D1 – Frações cromatográficas do extrato n-hexano (EH). (continuação)

EH ₄₀	Tol / MeOH (65:35)	20	óleo amarelado
EH ₄₁	Tol / MeOH (65:35)	120	"
EH ₄₂₋₄₃	Tol / MeOH (65:35)	270	óleo acastanhado
EH ₄₄	Tol / MeOH (65:35)	40	"
EH ₄₅	Tol / MeOH (60:40)	20	óleo amarelado
EH ₄₆₋₄₉	Vários	240	"
EH ₅₀	Tol / MeOH (55:45)	200	"
EH ₅₁	Tol/MeOH (50:50)	140	"
EH ₅₂	Tol/MeOH (48:52)	50	"
EH ₅₃₋₆₀	Vários	1780	sólido acastanhado

Os perfis cromatográficos das frações do extrato n-hexano (EH) obtidos por CCF, usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo, e revelados sob ação de luz de UV₂₅₄ e após pulverização das placas com uma solução de ácido dodecamolibdofosfórico estão representados na Figura D1.



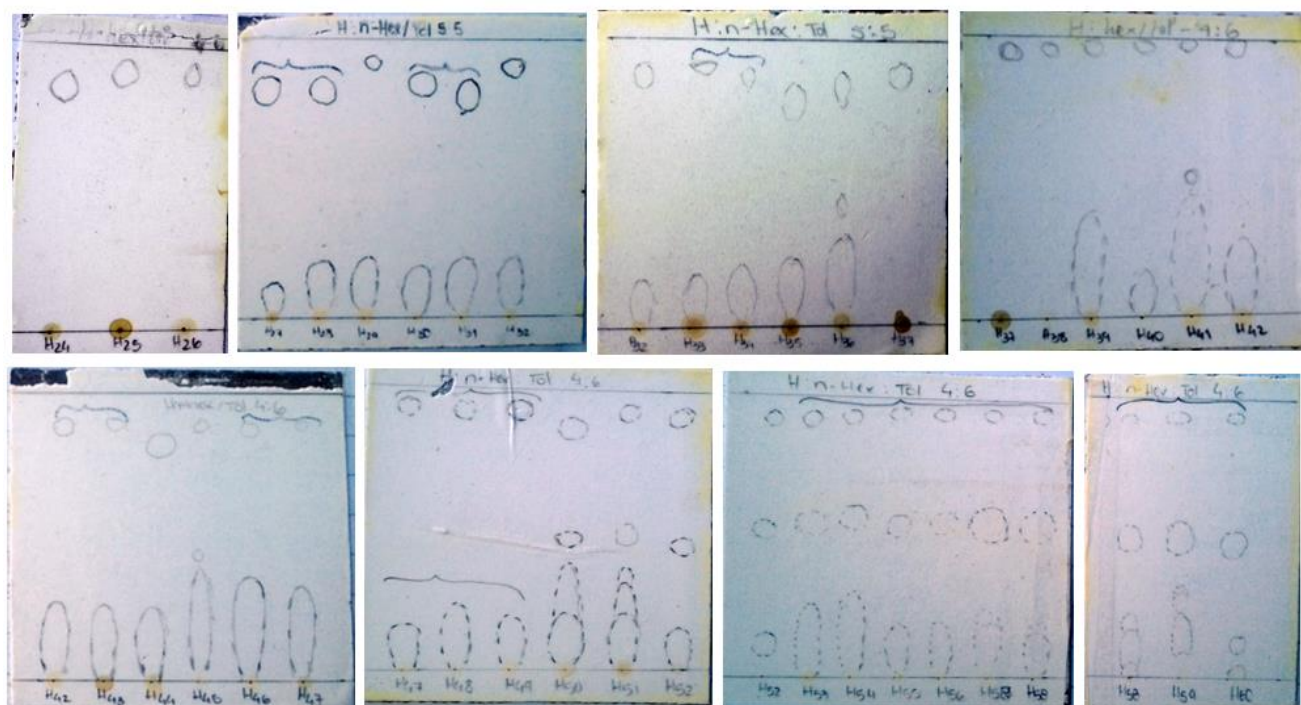


Figura D1 – Perfis cromatográficos, obtidos por CCF, das frações cromatográficas do extrato n-hexano (EH), usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo.

D2. Fracionamento das frações EH₃ e EH₄

As frações EH₃ e EH₄ resultantes da cromatografia do extrato n-hexano (EH) foram re-cromatografadas, em coluna de sílica gel e eluída com n-hexano e misturas de n-hexano (n-Hex)/tolueno (Tol), Éter de petróleo (Éter de petrol)/ tolueno (Tol) (Tabela D2 e D3).

Tabela D2 – Frações cromatográficas da fração EH₃.

Fração	Eluente	Massa (mg)	Observações
EH _{3.1}	n-Hexano	310	óleo amarelado
EH _{3.2}	n-Hex / Tol (98:2)	550	"
EH _{3.3}	n-Hex / Tol (95:5)	40	sólido branco
EH _{3.4 - 7}	Éter de petrol / Tol (95:5)	120	sólido acastanhado
EH _{3.8 - 14}	Éter de petrol / Tol (85:15)	70	sólido branco
EH _{3.15}	Éter de petrol / Tol (85:15)	30	"
EH _{3.16}	Éter de petrol / Tol (80:20)	20	"
EH _{3.17 - 25}	"	240	"
EH _{3.26 - 31}	"	140	"

Tabela D2 – Frações cromatográficas da fração EH₃. (continuação)

EH _{3.32} - 38	"	140	sólido branco
EH _{3.39}	"	20	"
EH _{3.40} - 41	"	60	sólido incolor
EH _{3.42} - 52	"	170	óleo incolor
EH _{3.53} - 55	"	90	óleo amarelado
EH _{3.56}	Éter de petróleo / Tol (75:25)	10	sólido incolor
EH _{3.57} - 67	"	290	"
EH _{3.68}	"	10	"
EH _{3.69} - 71	"	30	óleo amarelado
EH _{3.72} - 73	"	30	sólido incolor
EH _{3.74} - 92	Éter de petróleo / Tol (70:30)	350	óleo amarelado
EH _{3.93} - 98	Éter de petróleo / Tol (65:35)	80	sólido amarelado
EH _{3.99}	Éter de petróleo / Tol (65:35)	70	óleo amarelado

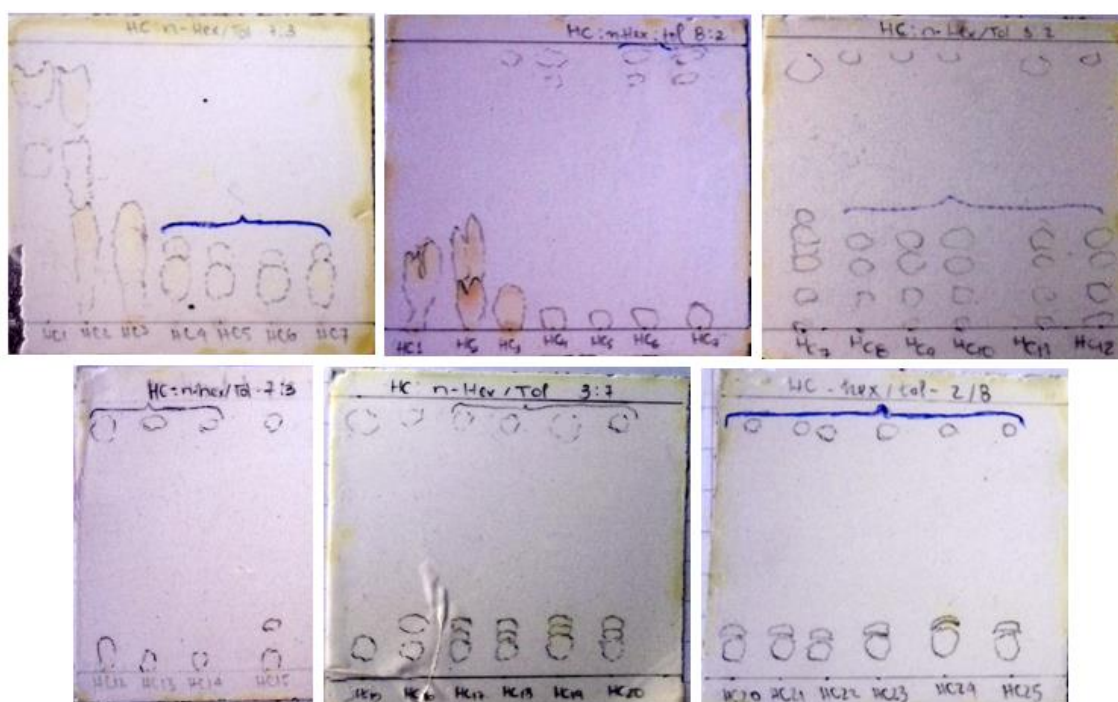
Tabela D3 – Frações cromatográficas da fração EH₄.

Fração	Eluente	Peso (mg)	Observações
EH _{4.1}	n-Hexano	180	sólido acastanhado
EH _{4.2} - 4	Éter de petróleo / Tol (90:10)	90	sólido branco
EH _{4.5}	"	10	sólido incolor
EH _{4.6}	Éter de petróleo / Tol (80:20)	30	sólido esverdeado
EH _{4.7}	Éter de petróleo / Tol (75:25)	10	"
EH _{4.8} - 10	"	30	"
EH _{4.11} - 13	Vários	40	"
EH _{4.14} - 18	Éter de petróleo / Tol (65:35)	50	sólido branco
EH _{4.19} - 20	"	20	"
EH _{4.21}	"	10	"
EH _{4.22}	"	10	sólido incolor
EH _{4.23}	"	10	"
EH _{4.24} - 27	"	50	"
EH _{4.28} - 33	"	230	"
EH _{4.34} - 38	"	110	"
EH _{4.39} - 43	"	140	"
EH _{4.44} - 45	"	100	óleo amarelado

Tabela D3 – Frações cromatográficas da fração EH₄. (continuação)

EH _{4.46} - 48	"	160	óleo amarelado
EH _{4.49} - 50	"	50	"
EH _{4.51} - 54	"	110	"
EH _{4.55} - 56	"	110	"
EH _{4.57} - 69	"	200	sólido branco
EH _{4.70} - 73	Éter de petról / Tol (60:40)	100	óleo amarelado
EH _{4.74} - 80	"	90	mistura (óleo incolor e sólido amarelado)
EH _{4.81}	"	10	sólido amarelado
EH _{4.82} - 84	"	30	"
EH _{4.85} - 88	"	30	"
EH _{4.89}	"	20	"
EH _{4.90} - 108	Vários	280	sólido amarelado
EH _{4.109} - 113	Éter de petról / Tol (40: 60)	20	"
EH _{4.114}	Éter de petról / Tol (40: 60)	10	"

Os perfis cromatográficos das frações resultantes de EH₃ e EH₄ obtidos por CCF, usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo, e revelados sob ação de luz de UV₂₅₄ e após pulverização das placas com uma solução de ácido dodecamolibdofosfórico estão representados na Figura D2 e D3.



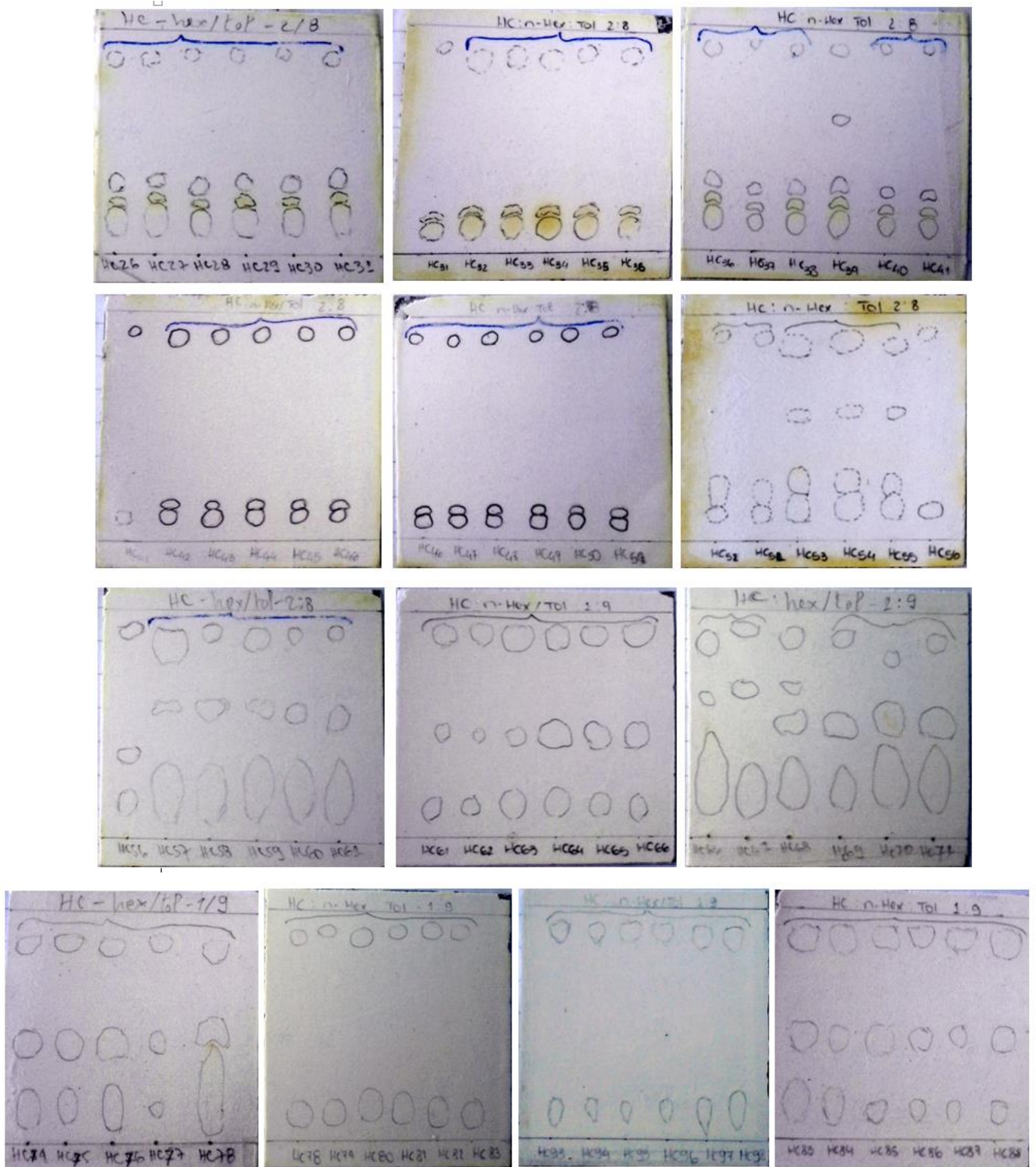
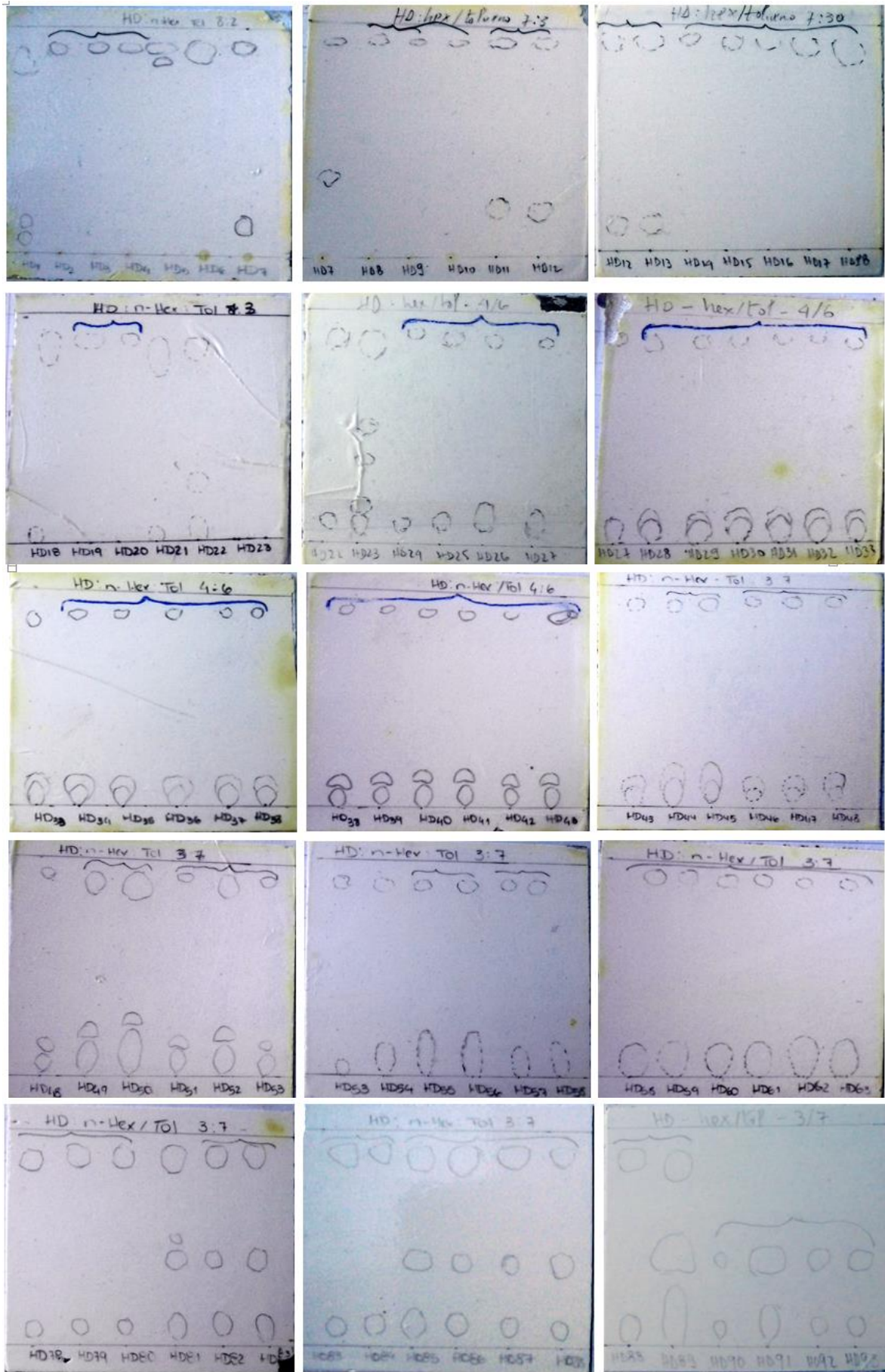


Figura D2 – Perfis cromatográficos, obtidos por CCF, das frações cromatográficas resultantes de EH₃, usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo.



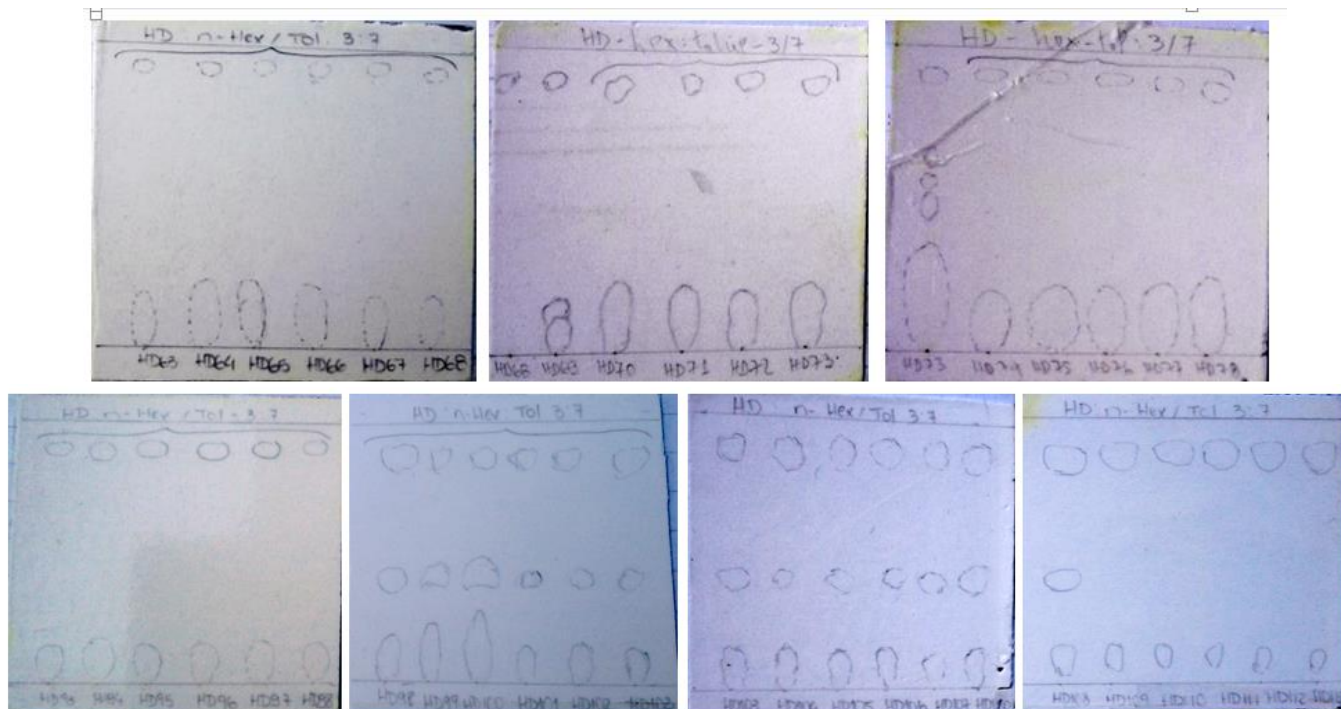


Figura D3 – Perfis cromatográficos, obtidos por CCF, das frações cromatográficas resultantes de EH₄, usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo.

D4. Fracionamento do extrato clorofórmio (EC)

O extrato clorofórmio (EC) (5.73 g) foi cromatografado numa coluna de sílica gel e eluído com n-hexano e misturas de n-hexano (n-Hex)/tolueno (Tol), tolueno (Tol)/ acetato de etilo (AcEt) e tolueno (Tol)/ metanol (MeOH) (Tabela D4).

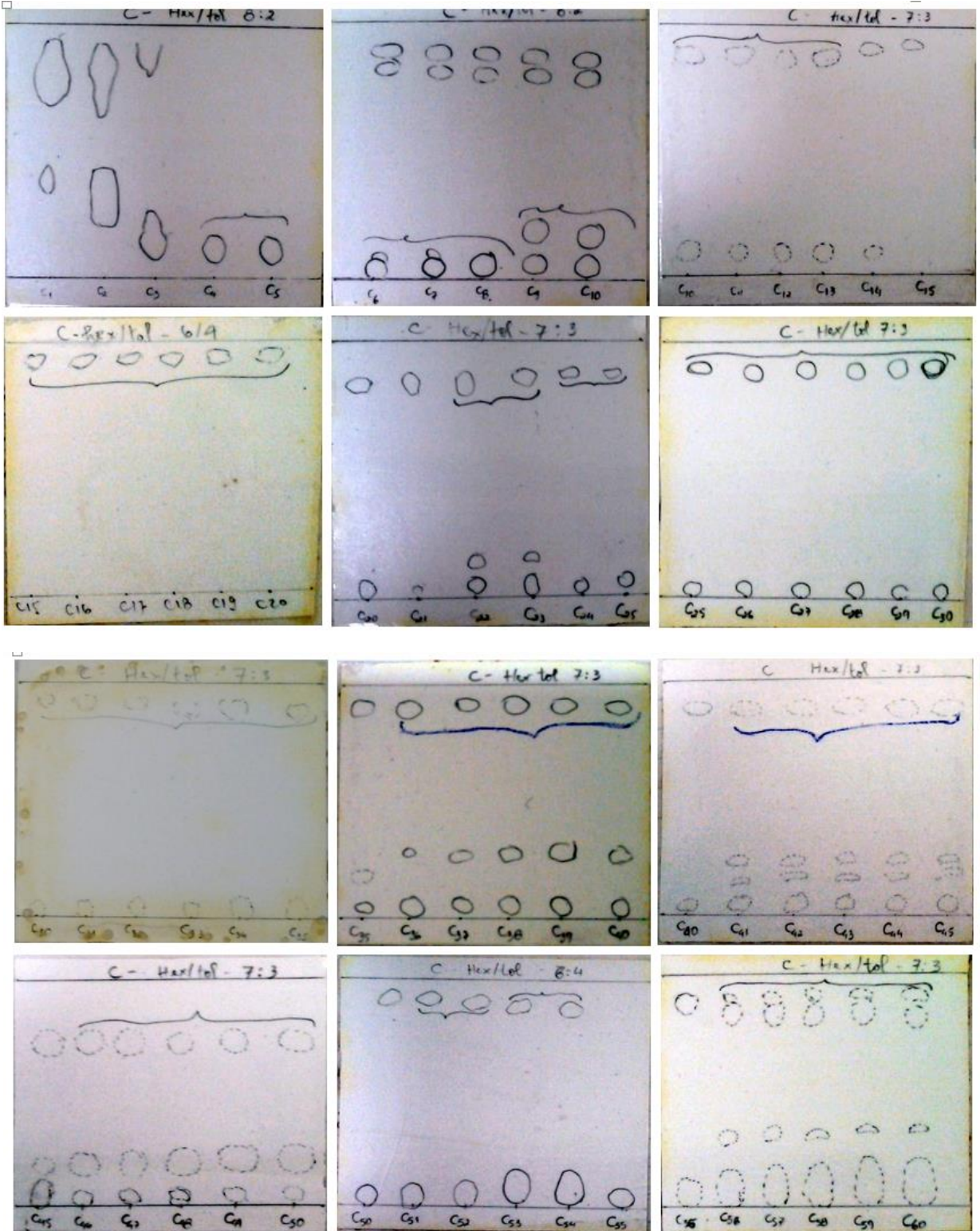
Tabela D4 – Frações cromatográficas do extrato n-hexano (EC).

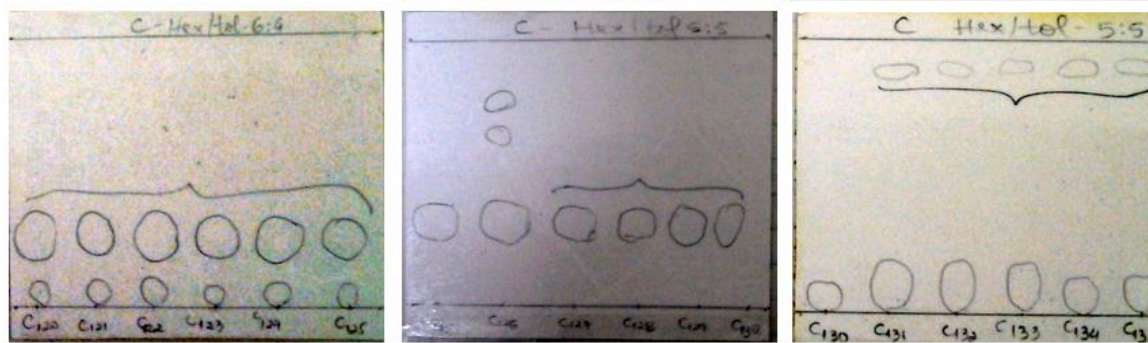
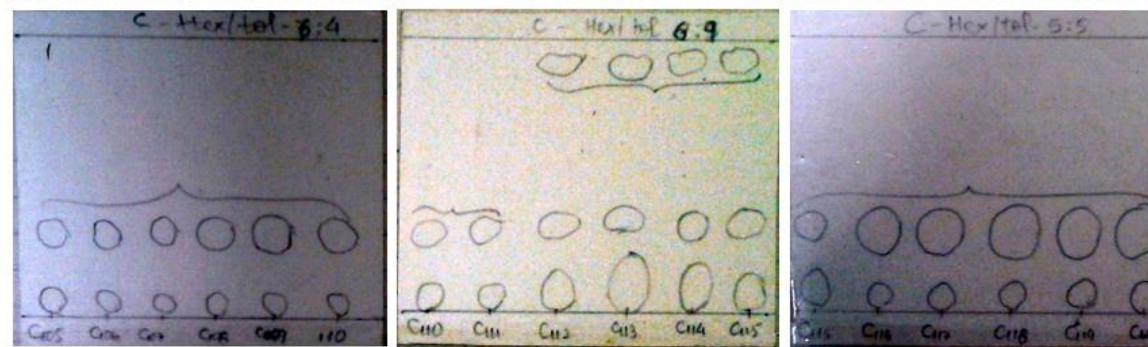
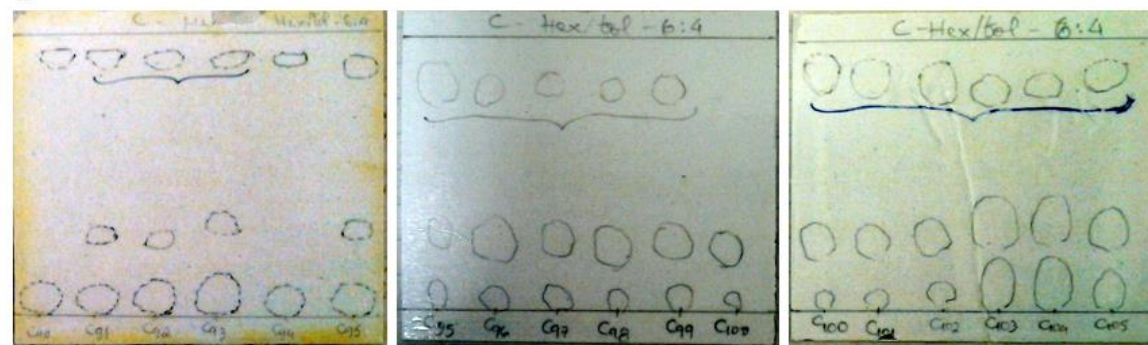
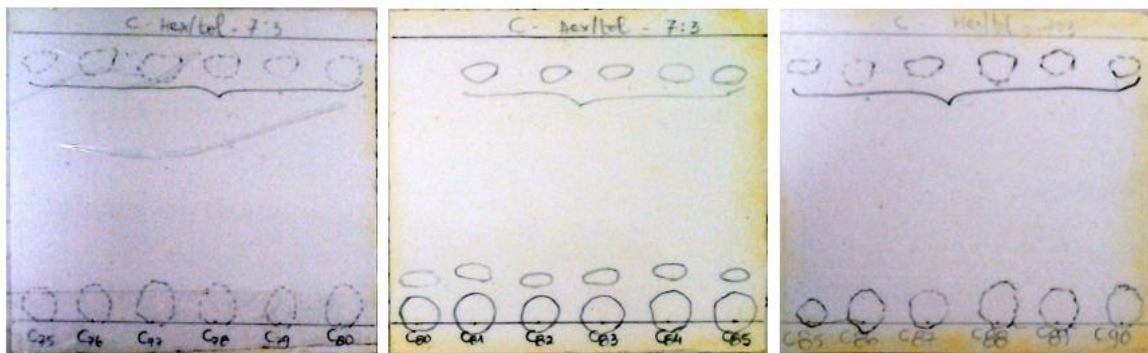
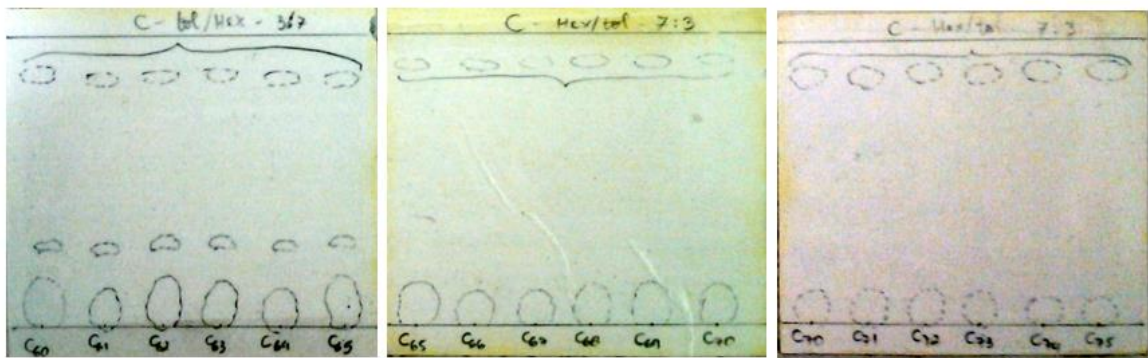
Fração	Eluente	Peso (mg)	Observações
EC ₁	Éter de petróleo / Tol (97:3)	231	sólido branco
EC ₂	Éter de petróleo / Tol (70:30)	115	"
EC ₃	"	29	"
EC ₄₋₅	"	23	"
EC ₆₋₈	"	18	"
EC ₉₋₁₃	"	46	"
EC ₁₄	"	6	"
EC ₁₅₋₂₁	"	48	"
EC ₂₂₋₂₃	"	7	"
EC ₂₄₋₃₅	"	108	"

Tabela D4 – Frações cromatográficas do extrato n-hexano (EC). (continuação)

EC ₃₆₋₄₀	"	45	sólido branco
EC ₄₁₋₄₅	"	57	"
EC ₄₆₋₅₀	"	73	óleo amarelado
EC ₅₁₋₅₂	"	54	"
EC ₅₃₋₅₄	"	95	"
EC ₅₅	"	76	"
EC ₅₆₋₈₀	"	985	mistura (óleo amarelado e sólido branco)
EC ₈₁₋₉₀	Vários	18	óleo amarelado
EC ₉₁₋₉₃	Éter de petróleo / Tol (65:35)	24	"
EC ₉₄	"	102	"
EC ₉₅₋₉₉	"	584	"
EC ₁₀₀₋₁₁₁	"	781	mistura (óleo amarelado e sólido branco)
EC ₁₁₂₋₁₂₅	Vários	253	óleo amarelado
EC ₁₂₆	Éter de petróleo / Tol (60:40)	14	"
EC ₁₂₇₋₁₃₀	"	66	"
EC ₁₃₁₋₁₃₅	"	85	sólido branco
EC ₁₃₆₋₁₄₀	"	91	"
EC ₁₄₁₋₁₄₂	Éter de petróleo / Tol (40:60)	30	"
EC ₁₄₃₋₁₄₅	"	55	"
EC ₁₄₆	"	13	"
EC ₁₄₇₋₁₅₀	"	48	"
EC ₁₅₁₋₁₅₄	Éter de petróleo / Tol (30:70)	134	"
EC ₁₅₅₋₁₆₀	Vários	281	óleo amarelado

Os perfis cromatográficos das frações do extrato cloroformio (EC) obtidos por CCF, usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo, e revelados sob ação de luz de UV₂₅₄ e após pulverização das placas com uma solução de ácido dodecamolibdofosfórico estão representados na Figura D4.





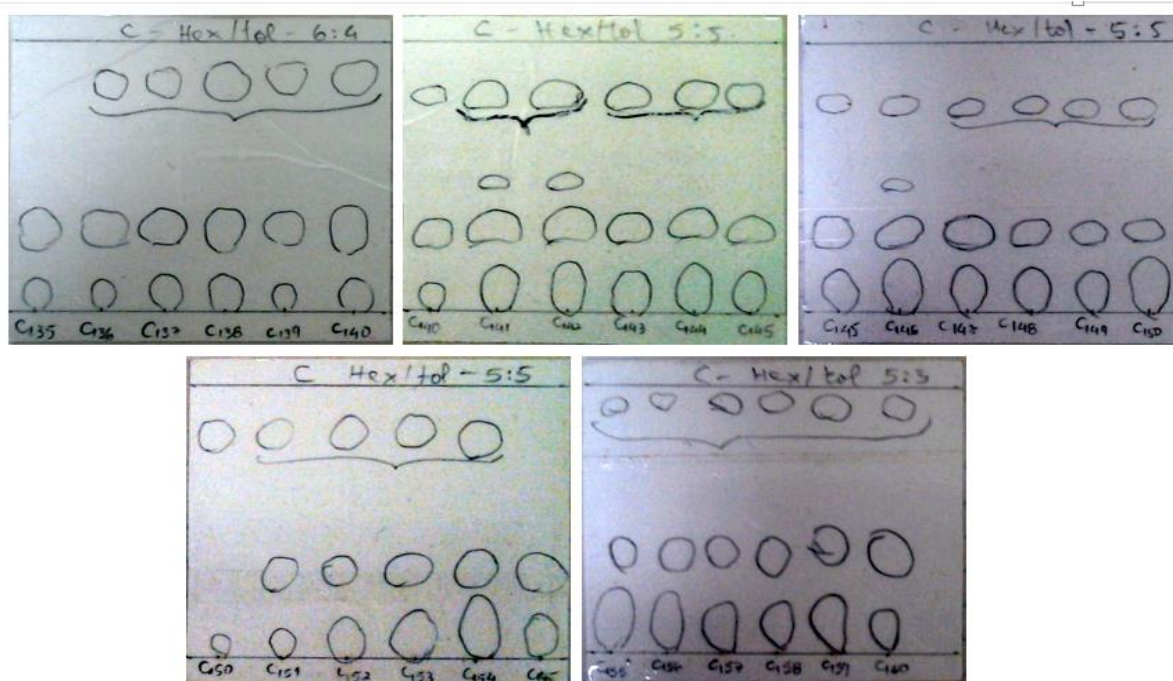


Figura D4 – Perfis cromatográficos, obtidos por CCF, das frações cromatográficas do extrato clorofórmio (EC), usando mistura de eluentes de n-hexano, tolueno e acetato de etilo.

Anexo E. Cromatogramas obtidos por GC – MS para as diferentes frações dos extratos de *Jatropha gossypifolia*

Nas figuras E1 e E2 estão representados os cromatogramas obtidos por GC–MS para as frações EH₁₈, EH₂₄₋₂₆, EH₃₇ e EH₃₈ resultantes da separação do extrato hexano (EH) em cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (80:20), (78:22) e (70:30), respectivamente.

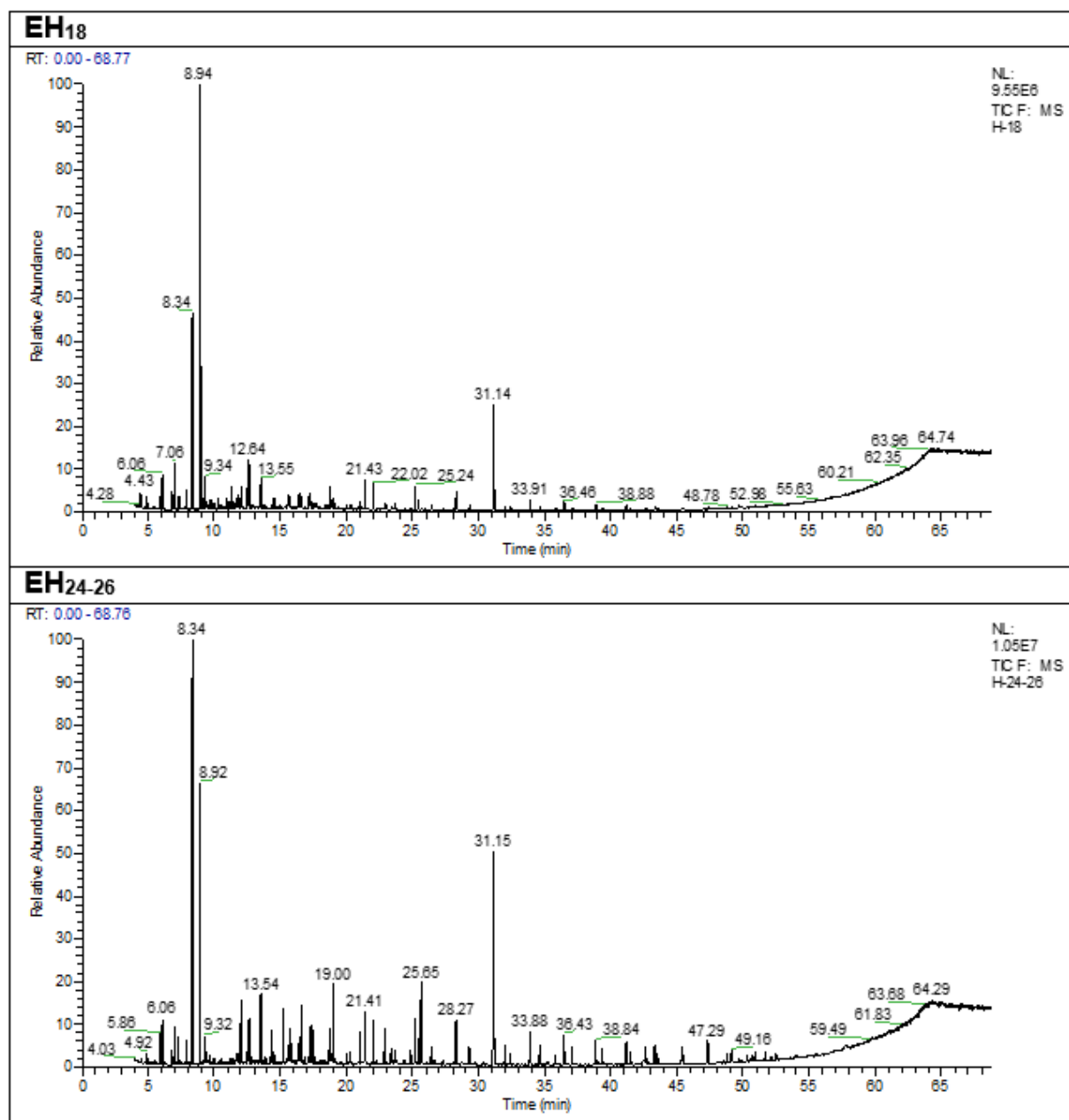


Figura E1 – Cromatogramas obtidos por GC–MS das frações EH₁₈ e EH₂₄₋₂₆, resultante da separação do extrato hexano (EH), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (80:20) e (78:22) respectivamente.

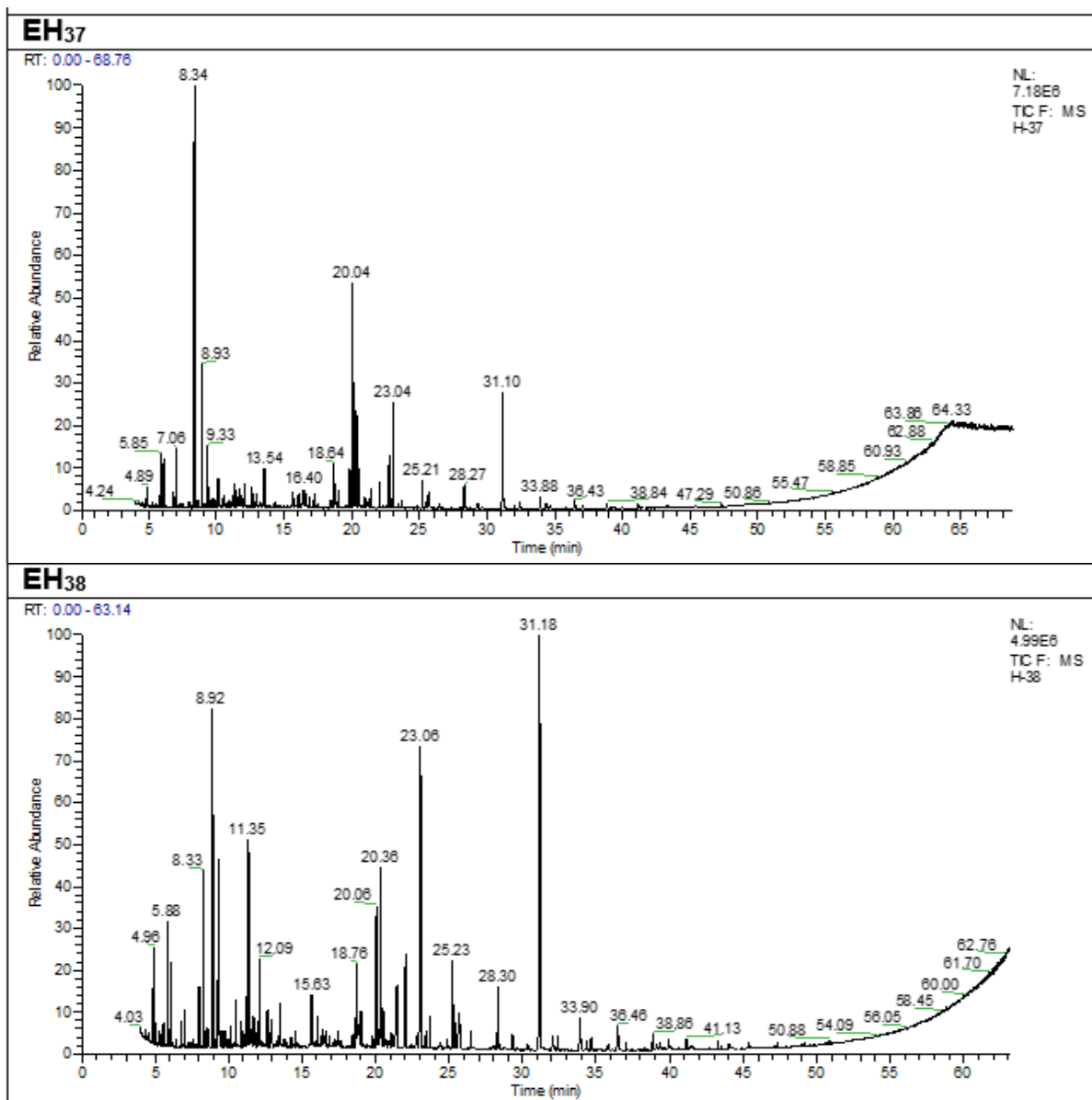


Figura E2 – Cromatogramas obtidos por GC-MS das frações EH₃₇ e EH₃₈, resultante da separação do extrato hexano (EH), por cromatografia em coluna em sílica gel, usando como eluente tolueno/metanol (70:30) e (78:22).

Na figura E3 e E4 estão representados os cromatogramas obtidos por GC – MS para as frações EH_{4.2-4}, EH_{4.6}, EH_{4.8-10} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (90:10), (80:20) e (75:25), respectivamente.

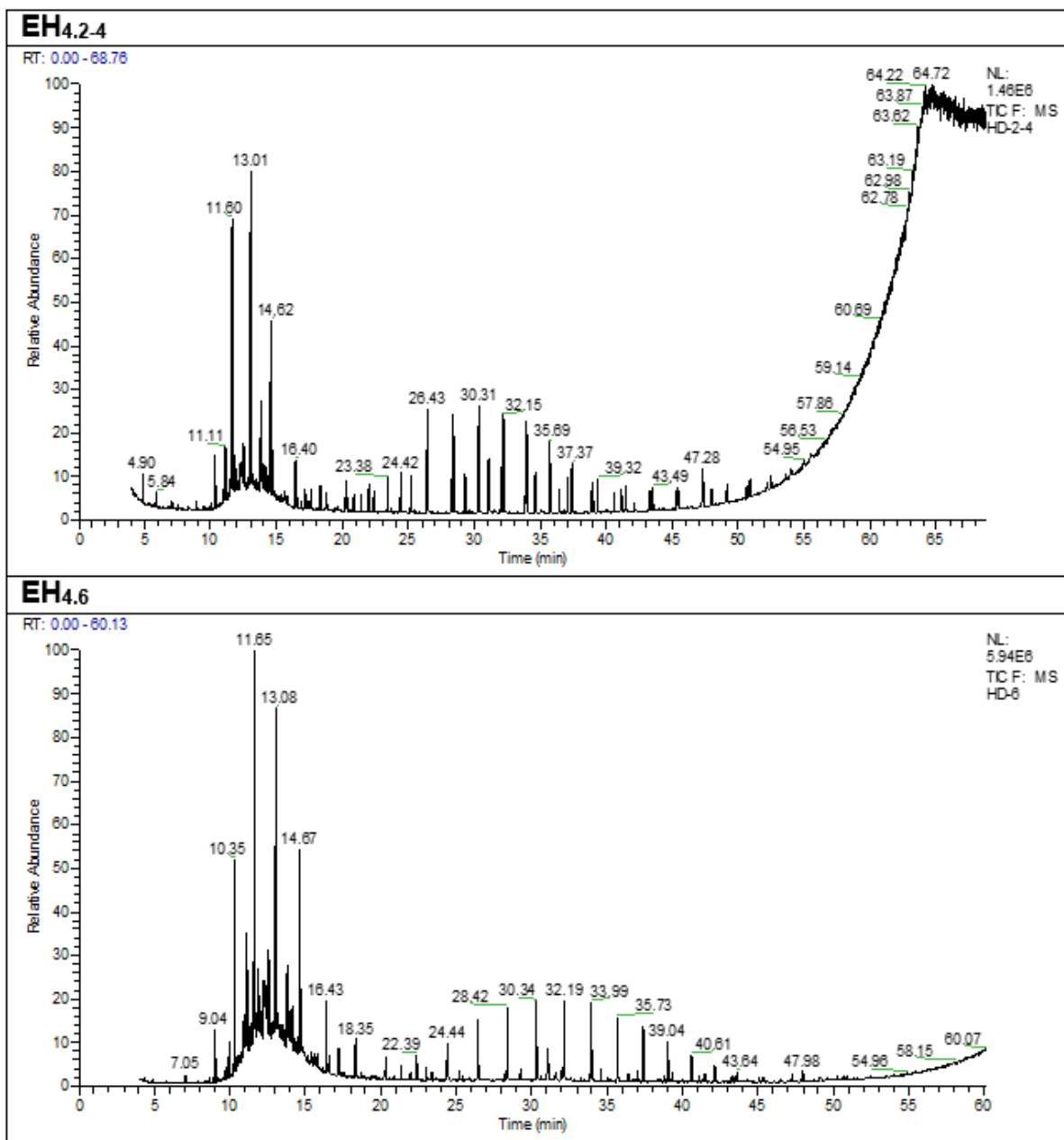


Figura E3 – Cromatogramas obtidos por GC – MS das frações EH_{4.2-4}, EH_{4.6} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (90:10), (80:20), respectivamente.

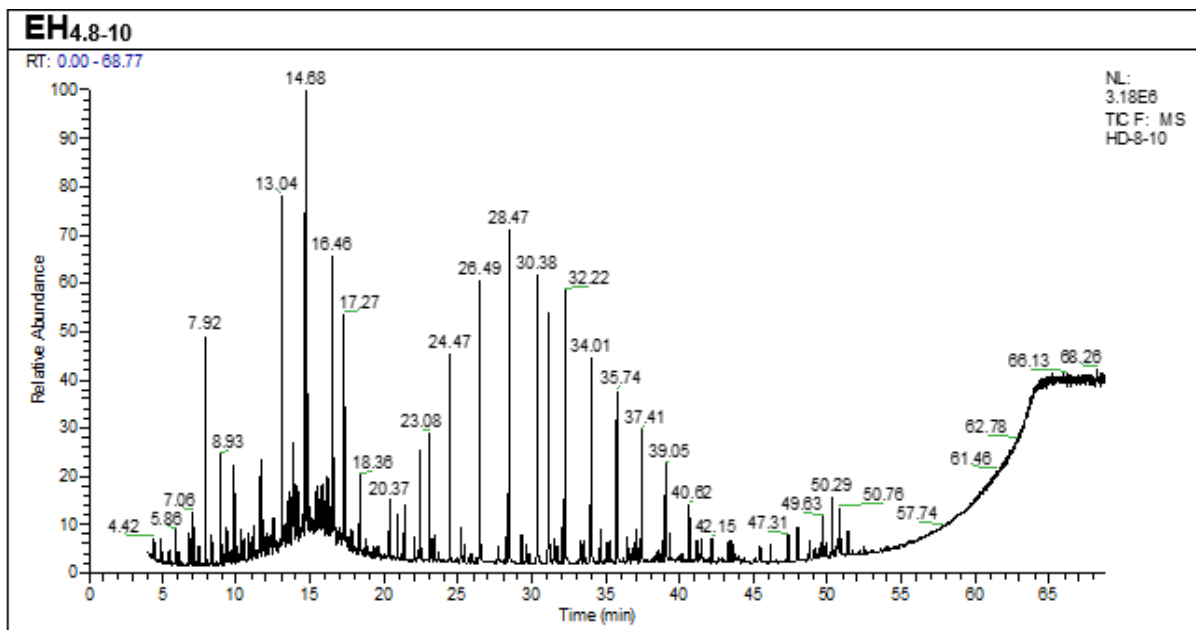


Figura E4 – Cromatogramas obtidos por GC–MS da fração EH_{4.8-10} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (75:25).

Na figura E5 e E6 estão representados os cromatogramas obtidos por GC – MS para as frações EH_{4.14-18}, e EH_{4.19-20} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (65:35).

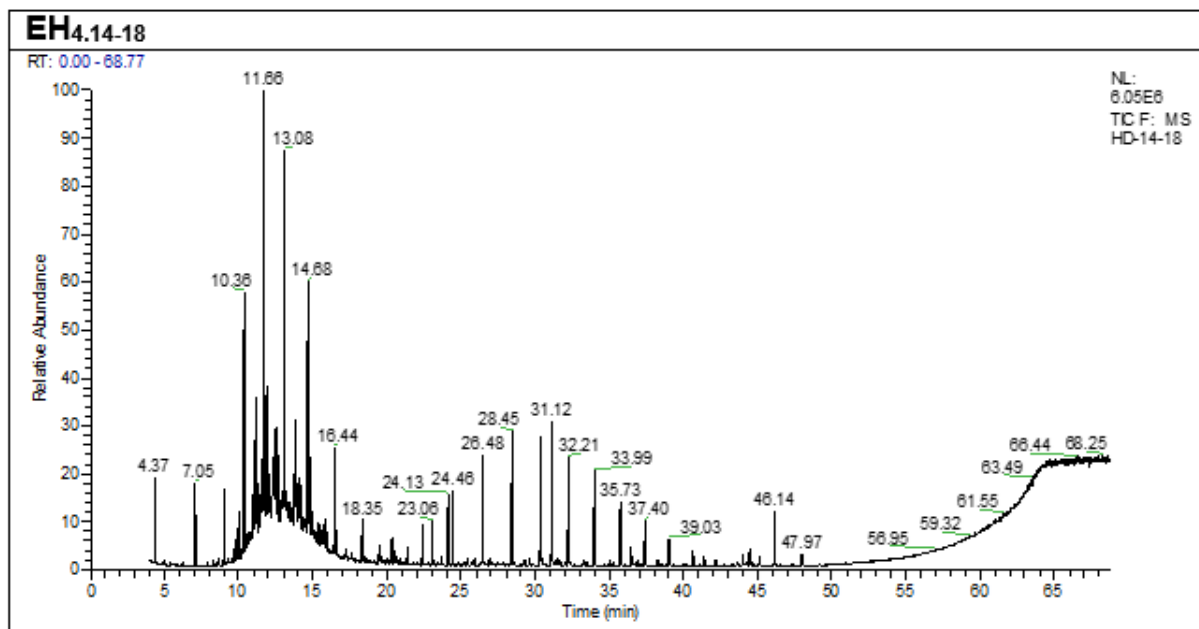


Figura E5 – Cromatogramas obtidos por GC–MS da fração EH_{4.14-18} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (65:35).

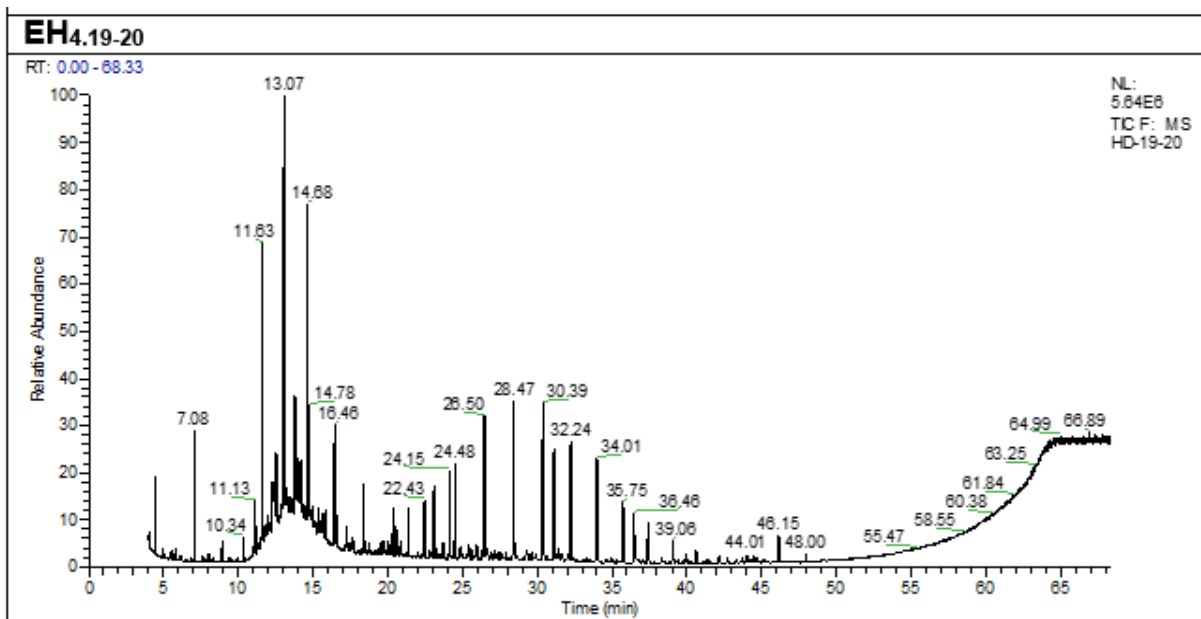


Figura E6 – Cromatogramas obtidos por GC-MS da fração EH_{4.19-20} resultantes de uma re-cromatografia em coluna sílica gel da fração EH₄ usando como eluente éter de petróleo/tolueno (65:35).

Anexo F. Exemplo de curva de calibração de DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de radical livre de DPPH• foi necessário a utilização de uma curva de calibração para cada um dos ensaios realizados, com uma solução de DPPH preparada diariamente com concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{mol/L}$ em função da absorvância das mesmas a 517 nm. A figura F1 apresenta uma curva de calibração normalmente obtida para determinar a concentração de DPPH.

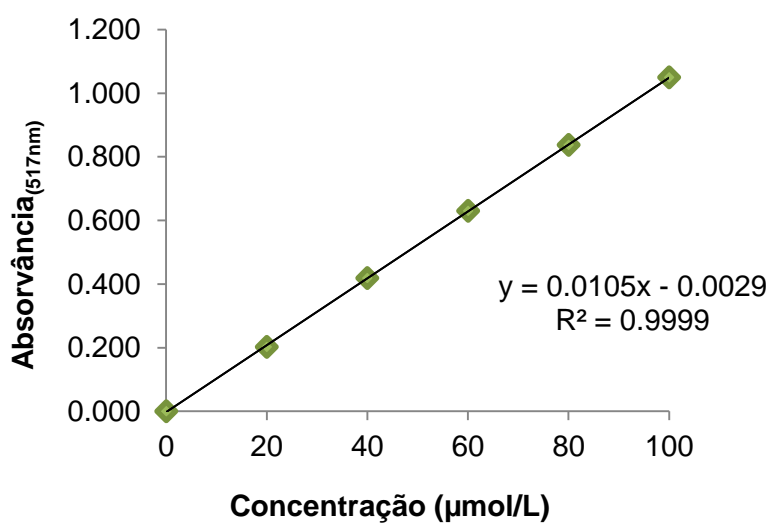


Figura F1 – Curva de Calibração típica para determinação da concentração de DPPH.

Anexo G. Curva de calibração de ácido gálico para determinação do teor total de polifenóis

Para a determinação do teor total de compostos fenólicos pelo método de *Folin-Ciocalteu* recorreu-se a uma curva de calibração de ácido gálico, preparada com soluções deste composto a diferentes concentrações 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 mg/mL em função da absorvância das mesmas a 765 nm. A figura G1 apresenta a curva de calibração obtida para a determinação do teor total de compostos fenólicos dos extratos de *J. gossypifolia*.

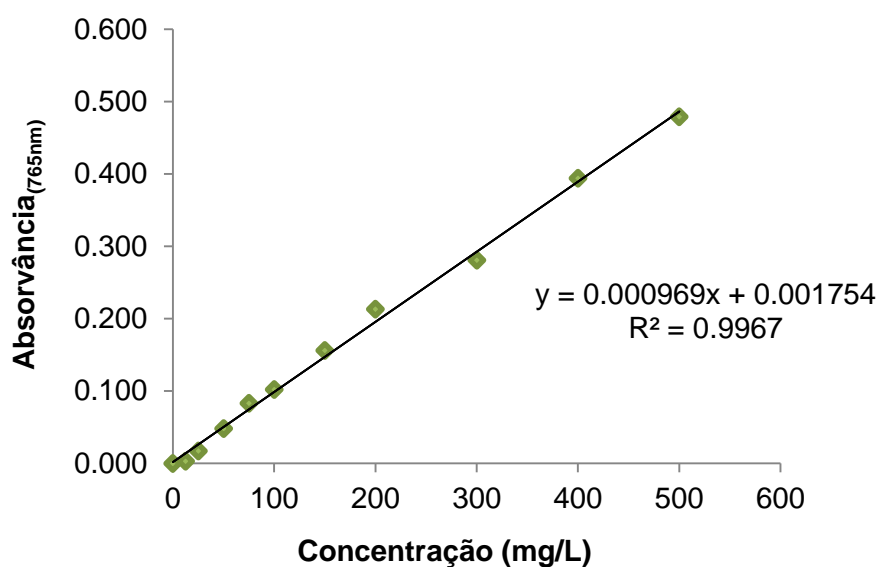


Figura G1 – Curva de calibração de ácido gálico utilizada na determinação do teor de polifenóis nos extratos de *J. gossypifolia* obtidos previamente por extração supercrítica e sucessiva maceração.

Anexo H. Preparação do padrão de turbidez 0.5 McFarland para preparação do inóculo

1. Preparar uma solução de *stock* de 0.048 mol/L de cloreto de bário (BaCl_2) (Merck) (1.175% v/v de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
2. Preparar uma solução de *stock* 0.18 mol/L (0.36 N) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck) (1% v/v).
3. Com agitação constante para manter uma suspensão, adicionar 0.5 mL da solução de BaCl_2 , a 99.5 mL da solução de H_2SO_4 .
4. Verificar a densidade correta da turbidez do padrão, através da medição da absorção utilizando um espectrofotômetro de luz de caminho de 1 cm e cuvetes combinadas. A absorvância a 625 nm deve ser entre 0.08-0.13 para o padrão 0.5 McFarland.
5. Transferir a suspensão de sulfato de bário em alíquotas de 4 a 6 ml em tubos com tampa de rosca do mesmo tamanho que os usados para padronizar o inóculo bacteriano.
6. Selar firmemente os tubos e armazenar no escuro à temperatura ambiente.
7. Agitar vigorosamente o padrão de turbidez de sulfato de bário num vortex antes de cada utilização e averiguar uma aparência uniformemente turva. Substitua o padrão se aparecer grandes partículas. Misture suspensões de partículas de látex, invertendo suavemente, e não num vortex.
8. Os padrões de sulfato de bário devem ser substituídos ou suas densidades verificadas mensalmente. (CLSI, 2012) (NCCLS, 2002).

Anexo I. Determinação da percentagem de inibição do crescimento microbiano com extratos de *J. gossypifolia* pelo método de microdiluição em caldo

I1. Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* com extratos de *J. gossypifolia*

Para determinação da percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* com extratos das folhas de *J. gossypifolia* utilizou-se a expressão (2), considerando-se para efeitos de cálculo o valor médio das absorvâncias do controlo positivo e para o controlo negativo os respetivos valores de absorvância de cada concentração.

O valor médio do controlo positivo estimado para os extratos CO₂, CO₂+EtOH e CO₂+MeOH, tabelas I1, I2 e I3 respetivamente, foi de 0.209.

Tabela I1 – Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂ de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESS CO ₂ (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$	% Inibição
5.00	0.236	0.209	100.0
2.50	0.170	0.178	96.5
1.25	0.196	0.243	78.9
0.63	0.183	0.226	80.5
0.31	0.127	0.189	71.8
0.16	0.121	0.233	49.3
0.08	0.123	0.239	47.7

Tabela I2 – Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂+EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESS CO ₂ +EtOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$	% Inibição
5.00	0.349	0.322	100.0
2.50	0.184	0.191	97.0
1.25	0.204	0.229	88.7
0.63	0.166	0.235	68.8
0.31	0.110	0.166	74.5
0.16	0.098	0.154	74.7
0.08	0.101	0.191	59.1

Tabela I3 – Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂+MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESC CO₂+MeOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$	% Inibição
5.00	0.336	0.351	93.1
2.50	0.179	0.223	79.9
1.25	0.180	0.231	76.8
0.63	0.137	0.192	75.1
0.31	0.093	0.241	32.9
0.16	0.079	0.160	63.5
0.08	0.072	0.212	36.7

Para os Mac. EtOH e Mac. MeOH, tabelas I4 e I5, o valor médio do controlo positivo estimado foi de 0.183

Tabela I4 – Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações de extrato de Mac EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CMac EtOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$	% Inibição
5.00	0.372	0.337	100.0
2.50	0.172	0.214	77.3
1.25	0.144	0.212	62.7
0.63	0.123	0.198	59.1
0.31	0.087	0.201	37.8
0.16	0.071	0.219	19.1
0.08	0.054	0.212	14.0

Tabela I5 – Percentagem de inibição do crescimento de *Escherichia coli* a diferentes concentrações de extrato de Mac MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CMac MeOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$	% Inibição
5.00	0.067	0.176	40.7
2.50	0.057	0.216	13.4
1.25	0.052	0.236	0.0
0.63	0.050	0.175	31.8
0.31	0.041	0.177	25.8
0.16	0.039	0.181	22.7
0.08	0.036	0.209	5.8

12. Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* com extratos de *J. gossypiifolia*

Na determinação da percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* com extratos das folhas de *J. gossypiifolia* utilizou-se a expressão (2), considerando-se para efeitos de cálculo o valor médio das absorvâncias do controlo positivo e para o controlo negativo os respetivos valores de absorvância de cada concentração.

O valor médio do controlo positivo estimado para os extratos CO₂, CO₂+EtOH e CO₂+MeOH, tabelas I6, I7 e I8 respetivamente, foi de 0.102.

Tabela I6 – Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂ de folhas de *J. gossypiifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESS CO ₂ (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A}_{\text{controlo amostra}}$	% Inibição
5.00	0.147	0.209	100.0
2.50	0.121	0.178	94.8
1.25	0.149	0.243	62.8
0.63	0.176	0.226	12.5
0.31	0.190	0.189	2.7
0.16	0.227	0.233	0.0
0.08	0.169	0.239	0.0

Tabela I7 – Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂+EtOH de folhas de *J. gossypiifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESS CO ₂ +EtOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A}_{\text{controlo amostra}}$	% Inibição
5.00	0.286	0.294	92.5
2.50	0.143	0.163	80.1
1.25	0.092	0.160	33.1
0.63	0.068	0.141	28.2
0.31	0.045	0.184	0.0
0.16	0.050	0.169	0.0
0.08	0.032	0.160	0.0

Tabela I8 – Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* a diferentes concentrações de extrato de ESC CO₂+MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESC CO₂+MeOH (mg/mL)	<i>A</i> _{controlo negativo}	<i>A</i> _{controlo amostra}	% Inibição
5.00	0.276	0.300	76.2
2.50	0.142	0.197	45.8
1.25	0.084	0.147	38.0
0.63	0.059	0.146	14.4
0.31	0.043	0.161	0.0
0.16	0.036	0.146	0.0
0.08	0.035	0.172	0.0

Para os extratos Mac. EtOH e Mac. MeOH, tabelas I9 e I10, o valor médio do controlo positivo estimado foi de 0.115

Tabela I9 – Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* a diferentes concentrações de extrato de Mac EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo positivo e absorvância da amostra.

CMac EtOH (mg/mL)	<i>A</i> _{controlo negativo}	<i>A</i> _{controlo amostra}	% Inibição
5.00	0.325	0.323	100.0
2.50	0.144	0.196	54.7
1.25	0.142	0.195	54.3
0.63	0.102	0.207	8.9
0.31	0.105	0.214	5.1
0.16	0.056	0.164	6.4
0.08	0.045	0.161	0.0

Tabela I10 – Percentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* a diferentes concentrações de extrato de Mac MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CMac MeOH (mg/mL)	<i>A</i> _{controlo negativo}	<i>A</i> _{controlo amostra}	% Inibição
5.00	0.039	0.193	0.0
2.50	0.041	0.150	4.8
1.25	0.045	0.172	0.0
0.63	0.046	0.222	0.0
0.31	0.043	0.148	8.6
0.16	0.038	0.161	0.0
0.08	0.034	0.162	0.0

I3. Percentagem de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* com extratos de *J. gossypifolia*

Como no ensaio para determinação da percentagem de inibição do crescimento *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* com extratos das folhas de *J. gossypifolia* o controlo positivo não apresentou crescimento como seria esperado, apenas se apresentam os resultados obtidos.

O valor médio do controlo positivo estimado para os extratos CO₂, CO₂+EtOH e CO₂+MeOH para a *Pseudomonas aeruginosa*, tabelas I11, I12 e I13 respetivamente, foi de 0.068.

Tabela I11 – Resultados obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentrações de extrato de CO₂ de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CEC CO ₂ (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$
5.00	0.174	0.285
2.50	0.141	0.175
1.25	0.191	0.191
0.63	0.154	0.155
0.31	0.101	0.110
0.16	0.094	0.107
0.08	0.098	0.123

Tabela I12 – Resultados obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentrações de extrato de CO₂+EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CEC CO ₂ +EtOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A_{\text{controlo amostra}}}$
5.00	0.423	0.501
2.50	0.184	0.223
1.25	0.184	0.202
0.63	0.147	0.130
0.31	0.092	0.095
0.16	0.093	0.078
0.08	0.081	0.067

Tabela I13 – Resultados obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentrações de extrato de CO₂+MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CESC CO ₂ +MeOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$A_{\text{controlo amostra}}$
5.00	0.303	0.309
2.50	0.153	0.204
1.25	0.154	0.166
0.63	0.122	0.119
0.31	0.074	0.087
0.16	0.064	0.075
0.08	0.044	0.064

Para os extratos Mac. EtOH e Mac. MeOH, tabelas I14 e I15, o valor médio do controlo positivo estimado foi de 0.050

Tabela I14 – Percentagem de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentrações de extrato de Mac EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

C _{Mac EtOH} (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$A_{\text{controlo amostra}}$
0.230	0.345	0.376
0.141	0.229	0.247
0.125	0.147	0.160
0.107	0.113	0.128
0.080	0.084	0.106
0.070	0.076	0.092
0.063	0.085	0.094

Tabela I15 – Percentagem de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentrações de extrato de Mac MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo positivo e absorvância da amostra.

C _{Mac MeOH} (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$A_{\text{controlo amostra}}$
5.00	0.044	0.092
2.50	0.046	0.076
1.25	0.058	0.071
0.63	0.061	0.048
0.31	0.053	0.046
0.16	0.054	0.048
0.08	0.052	0.045

O valor médio do controlo positivo estimado para os extratos CO₂, CO₂+EtOH e CO₂+MeOH no ensaio da *Saccharomyces cerevisiae*, tabelas I16, I17 e I18 respetivamente, foi de 0.068.

Tabela I16 – Resultados obtidos para *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de extrato de CO₂ de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CEC CO ₂ (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A}_{\text{controlo amostra}}$
5.00	0.150	0.144
2.50	0.094	0.110
1.25	0.158	0.166
0.63	0.140	0.134
0.31	0.102	0.100
0.16	0.097	0.093
0.08	0.102	0.101

Tabela I17 – Resultados obtidos para *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de extrato de CO₂+EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CEC CO ₂ +EtOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A}_{\text{controlo amostra}}$
5.00	0.284	0.303
2.50	0.170	0.182
1.25	0.181	0.172
0.63	0.132	0.130
0.31	0.093	0.085
0.16	0.084	0.074
0.08	0.073	0.063

Tabela I18 – Resultados obtidos para *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de extrato de CO₂+MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controlo negativo e absorvância da amostra.

CEC CO ₂ +MeOH (mg/mL)	$A_{\text{controlo negativo}}$	$\overline{A}_{\text{controlo amostra}}$
5.00	0.281	0.284
2.50	0.140	0.169
1.25	0.144	0.137
0.63	0.099	0.098
0.31	0.068	0.073
0.16	0.056	0.058
0.08	0.049	0.049

Para os extratos Mac. EtOH e Mac. MeOH, tabelas I14 e I15, o valor médio do controle positivo estimado foi de 0.050

Tabela I19 – Percentagem de inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de extrato de Mac EtOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controle negativo e absorvância da amostra.

C_{Mac EtOH} (mg/mL)	<i>A</i> _{controle negativo}	\overline{A} _{controle amostra}
5.00	0.216	0.230
2.50	0.134	0.141
1.25	0.143	0.125
0.63	0.115	0.107
0.31	0.093	0.080
0.16	0.076	0.070
0.08	0.071	0.063

Tabela I20 – Percentagem de inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de extrato de Mac MeOH de folhas de *J. gossypifolia* e absorvância do controle negativo e absorvância da amostra.

C_{Mac MeOH} (mg/mL)	<i>A</i> _{controle negativo}	\overline{A} _{controle amostra}
5.00	0.051	0.092
2.50	0.054	0.071
1.25	0.063	0.068
0.63	0.065	0.059
0.31	0.056	0.055
0.16	0.050	0.056
0.08	0.049	0.051