

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM/MESTRADO

PAULO SÉRGIO GOMES DA SILVA

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE DE EXTRATOS DA *Jatropha gossypifolia* L.: ESTUDO *IN VITRO*

MACEIÓ/AL
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM/MESTRADO

PAULO SÉRGIO GOMES DA SILVA

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE DE EXTRATOS DA *Jatropha gossypifolia* L.: ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGENF) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de concentração: Enfermagem no cuidado em saúde e na promoção da vida.

Linha de pesquisa: Enfermagem, ciência, tecnologia e inovação para o cuidado.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos

MACEIÓ/AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecário
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586a Silva, Paulo Sérgio Gomes da Silva.
Avaliação antimicrobiana e cicatrizante de extratos da *Jatopha gossypifolia* L.:
Estudo *in vitro*/ Paulo Sérgio Gomes da Silva. ó 2017.
77f. : il.

Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) ó Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem.
Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 62-73.
Anexos: f. 77.

1. Enfermagem. 2. Plantas medicinais ó atividade cicatrizante. 3. Citotoxicidade.
4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDU: 616-083:615.322

PAULO SÉRGIO GOMES DA SILVA

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E CICATRIZANTE DE EXTRATOS DA *Jatropha gossypifolia* L.: ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGENF) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de concentração: Enfermagem no cuidado em saúde e na promoção da vida.

Linha de pesquisa: Enfermagem, ciência, tecnologia e inovação para o cuidado.

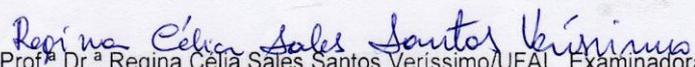
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos

Maceió/AL, 20 de março de 2017.


Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos/UFAL, Orientadora

BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a Dr.^a Círia Vieira Barbosa /UFAL, Examinadora Externa.


Prof.^a Dr.^a Regina Célia Sales Santos Veríssimo/UFAL, Examinadora Interna

MACEIÓ/AL
2017

Dedico esta vitória primeiramente à Deus todo Poderoso, Deus do impossível.

A minha família, começando pela minha mãe, formada com doutorado na vida, que enfrentou tantos obstáculos por mim.

A minha vizinha centenária Dona Olímpia (101 anos), a quem Deus permitiu essa dádiva na nossa família, e a minha tia, minha terceira mãe, exemplo de honestidade e dedicação pela família.

A minha amada esposa Danielle Medeiros a quem me dedica amor, que me possibilitou ser pai de três filhos maravilhosos, Paulinho, Giovanna e Gianna, a todos os meus familiares e amigos. Família e amigos bênçãos de Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo Poderoso por fazer milagres constantes na minha vida, por me capacitar em cada desafio que a vida oferece, por me provar que nunca é tarde para se realizar sonhos e evoluir como pessoa, como cristão e como profissional.

A minha Mãe Maria Dalva que mesmo diante de tanto sofrimento deu o seu sim por mim, me criou mesmo diante de tantas dificuldades. Utilizando de todas as suas forças, com amor e sabedoria de quem é formada nas melhores Universidades do mundo, a Vida. Mesmo com sua pouca leitura, foi mulher lutadora, forte e amorosa. Te amo minha Mãe e todo meu sucesso também é seu sucesso.

A minha Vozinha Olimpia, centenária, 101 anos de Vida-Dádiva de Deus para nossa família, sua lucidez, coragem e sua presença reflete todo amor de Deus.

A minha tia Maria José, também enfermeira, coração de ouro, que me ajudou durante toda a minha vida, a me criar, sustentar, orientar e cuidar. Obrigado tia, que Deus te abençoe!

A minha esposa amada, Danielle Medeiros por todo amor, compreensão e por ser canal de bênçãos na minha vida e por ter me proporcionado alegria imensurável de ser pai.

Aos meus filhos amados, Paulo Henrique (15a), Giovanna (10a) e Gianna (6 a), três bênçãos, a quem dedico todas as minhas forças, empenho e amor.

À professora Dra. Maria Lysete de Assis Bastos, minha orientadora, por todo ensino, paciência, compreensão das minhas limitações e por me fazer ir além. Muito obrigado professora, Deus lhe abençoe!

Aos professores Dr. João Xavier da Araújo Júnior e a Dra. Regina Célia Sales Santos Veríssimo, pelas orientações pertinentes ofertadas no exame de qualificação.

A todos os professores que fazem parte dessa Universidade, pelos ensinamentos ofertados, que contribuíram direta e indiretamente para essa conquista. Ao pessoal da Secretaria do Mestrado, especial agradecimento a Monique, por toda orientação e incentivo.

A professora Dra. Janylle Souza Ferro, pela disponibilidade, por ter ensinado e acompanhado com muita paciência os testes de cicatrização *in vitro* e ao Julianderson Oliveira que também foi essencial para realização destes testes.

Agradeço e tenho muito orgulho de ter sido ajudado, orientado e incentivado pelas minhas ex-alunas Talita Chaves e Cristhefany, muito obrigado e que Deus as abençoe poderosamente.

Aos mestrandos, doutorandos e estudantes do laboratório de Farmácia que acolheram com gentileza e solicitude, agradecimento especial ao Doutorando Adeilton e Mestrando Paulo Fernando, sempre orientando, discutindo e demonstrando o passo a passo no laboratório.

A todos que fazem parte do Laboratório de Pesquisa e Tratamento de Feridas (LpTF), por todo ensinamento e auxílio na realização da prática. Agradecimento especial às Mestrandas Maria Gabriela, Joice, Camila e Leticia. Ao enfermeirandos (Enfermeiros) Wanderley e Jeferson por toda a sua ajuda e tranquilidade nessa reta final.

Aos amigos do Hospital Universitário, a galera da Clínica cirúrgica e as meninas da Comissão de Feridas Lucy Kelly, Fabyanny e Hilma, que sempre me deram apoio e aguentaram minhas lamentações e cansaço. Agradecimento especial a Enfa. Karine Cavalcante que muito me ajudou, ouviu e me deu palavras de encorajamento e segurou a clínica nos meus momentos de ausência e a minha Amiga de coração e de profissão Silvana Barros, hoje minha coordenadora, obrigado pelo seu apoio, conselhos e amizade.

A minha turma de mestrado que me acolheu com muito carinho e respeito, agradecimento especial a Raquel Lopes e a todos que me ajudaram a superar os obstáculos, vocês são profissionais capacitados e comprometidos, obrigado por toda a ajuda.

Muito Obrigado!!!

Buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas.

Mateus 6,33

Tua vida, amor, vontades, planos e sonhos, devem começar **com Deus**.

“O valor do homem está na força do seu coração, na nobreza dos seus sonhos e na honestidade com que luta para os alcançar”.

RESUMO

As plantas vêm sendo utilizadas para o tratamento de doenças ao longo da existência humana e, culturalmente, constituíram as bases para tratamento de diversas doenças, tanto na forma tradicional, decorrente do conhecimento das propriedades de determinada planta, passado de geração a geração, quanto pela sua utilização, como fonte de moléculas bioativas, oriundas de pesquisas científicas. O objetivo do estudo foi investigar o potencial citotóxico, antimicrobiano e cicatrizante de extratos das folhas, galhos e caule da *Jatropha gossypifolia* L. As folhas, galhos e caules foram separados e secos em temperatura ambiente e os extratos obtidos por maceração em etanol, concentrados em evaporador rotatório e secos em dessecador à vácuo. Esses extratos foram submetidos ao fracionamento para obtenção das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. Em seguida foram realizados testes de prospecção fitoquímica; citotoxicidade pelo MTT; atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo; avaliação do potencial cicatrizante *in vitro* pelo método do *Scratch assay*, com fibroblastos 3T3. A prospecção fitoquímica identificou a presença de taninos, esteroides, flavonoides, flavonas, xantonas, cumarinas e antraquinonas. Os resultados indicaram que o extrato do caule apresentou viabilidade celular acima de 80% em todas as concentrações testadas, as folhas apresentaram-se moderadamente citotóxicas enquanto o extrato dos galhos nas concentrações de 62,5; 125 e 250 µg/mL exibiu uma citotoxicidade severa, inviabilizando o prosseguimento do estudo com essa parte da planta. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das folhas exibiu CIM de 500 µg/mL para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, e *P. aeruginosa*. Já, o extrato etanólico dos galhos expôs uma CIM de 1000, 500 e 250 µg/mL, concomitantemente. E para extrato etanólico do caule a CIM observada foi de 1000, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Observou-se também que, os extratos testados não foram capazes, em nenhuma das concentrações usadas, de promover a inibição do microrganismo *E. coli*. A CIM realizada com as frações oriundas dos extratos em etanol das folhas e caules não apresentaram atividade inibitória para estas bactérias. A avaliação cicatrizante pelo bioensaio *in vitro* com uso da técnica *Scratch assay*, evidenciou que a fração metanólica das folhas propiciou a migração celular em média de 45% a mais do que o controle. Estudos com esta espécie vegetal devem ser continuados para isolamento do princípio ativo visando a produção de um cicatrizante de feridas.

Palavras-chave: Citotoxicidade. *Jatropha gossypifolia* L. Cicatrização. Enfermagem.

ABSTRACT

Plants have been utilized for treatment of diseases throughout human existence and, culturally have been the bases for treatment of several diseases, both in traditional way, due to knowledge of the certain plant properties, passed from generation to generation, as well as by the its use as a source of bioactive compounds, derived from scientific research. The present study aimed to investigate cytotoxicity, antimicrobial and wound healing potential of leaves, twigs and stem extracts of *Jatropha gossypifolia* L. Leaves, twigs and stems were separated and dried at room temperature and the extracts were obtained by maceration in ethanol, concentrated on a rotary evaporator and dried in a vacuum desiccators. These extracts were submitted to fractionation to obtain hexane, chloroform, ethyl acetate and methanolic fractions. Phytochemical screening were performed; the citotoxicity were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay; Antimicrobial activity by Broth Microdilution Method; Evaluation of in vitro healing potential by the Scratch Assay method, with 3T3 fibroblasts. Phytochemical screening identified the presence of tannins, steroids, flavonoids, flavones, xanthones, coumarins and anthraquinones. The results indicated that the stem extract presented cell viability above 80% in all tested concentrations; the leaves presented moderated cytotoxicity while twig extract at the concentrations of 62.5, 125 and 250 µg/mL exhibited a severe cytotoxicity, hindering the continuation of the study with this part of the plant. Antimicrobial activity evaluation of leaves extract presented MIC of 500 µg/mL to *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*. Already, twig ethanolic extract exposed a MIC of 1000, 500 and 250 µg/mL, concomitantly. And for stem ethanolic extract a MIC of 1000, 500 e 1000 µg/mL was observed, respectively. It was also observed that the extracts tested were not capable at any of tested concentrations, of promoting the inhibition of *E. coli* microorganism. The MIC performed with the fractions from leaves and stems ethanolic extracts did not present inhibitory activity for these bacteria. In vitro assay for healing evaluation was performed utilizing the Scratch assay, and evidenced that methanolic fraction of the leaves favoured cell migration in an average of 45% more than the control. Studies with this plant species should be continued for isolation of the active principle aiming the production of a wound healing. **Keywords:** Citotoxicity. *Jatropha gossypifolia* L. Wound healing. Nursing.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1- | Fases do processo cicatricial. | 20 |
| Figura 2- | <i>Jatropha gossypifolia</i> L. | 24 |
| Figura 3- | Etapas da produção dos extratos. | 29 |
| Figura 4A- | Esquema para obtenção das frações da folha. | 30 |
| Figura 4B- | Esquema para obtenção das frações do caule. | 31 |
| Figura 5- | Esquema geral da partição e separação dos prováveis e principais metabólitos secundários presentes nos extratos da planta. | 32 |
| Figura 6- | Placa de 12 poços com cultura de fibroblastos. | 41 |
| Figura 7- | Esquema da técnica ensaio dos arranhões (<i>Scratch assay</i>). | 41 |
| Figura 8A- | Triagem Fitoquímica para taninos. | 43 |
| Figura 8B- | Triagem fitoquímica para esteroides. | 44 |
| Figura 9- | Manejo da Triagem Fitoquímica das frações da <i>J. gossypifolia</i> L. | 45 |
| Figura 10- | Viabilidade celular dos extratos etanólicos de <i>J. gossypifolia</i> L. | 47 |
| Figura 11- | Viabilidade celular das frações do caule. | 49 |
| Figura 12- | Viabilidade celular das frações das folhas. | 50 |
| Figura 13- | Efeito das frações das folhas na migração dos fibroblastos. | 52 |
| Figura 14- | Análise da taxa de migração. | 53 |
| Figura 15- | Efeito das frações do caule na migração dos fibroblastos. | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1- | Rendimentos dos extratos etanólicos da <i>J. gossypiifolia</i> L. e suas frações. | 46 |
| Tabela 2- | Percentual das células viáveis por concentrações dos EEF, EEC e EEG no ensaio MTT. | 46 |
| Tabela 3- | Efeito das frações dos extratos das folhas e caules da <i>J. gossypiifolia</i> L. na viabilidade celular dos fibroblastos 3T3. | 48 |
| Tabela 4- | Concentração inibitória mínima dos extratos da <i>J. gossypiifolia</i> L. | 50 |
| Tabela 5- | Concentração inibitória mínima das frações da <i>J. gossypiifolia</i> L. | 51 |
| Tabela 6- | Efeito da fração metanólica das folhas na migração fibroblastos. | 52 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 1- | Categorização dos estudos segundo ação da <i>J. gossypiifolia</i> L. | 25 |
| Quadro 2- | Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis. | 35 |
| Quadro 3- | Triagem fitoquímica com Extratos Etanólicos das folhas (EEF), galhos (EEG) e Caule (EEC) da <i>J. gossypiifolia</i> L. | 43 |
| Quadro 4- | Triagem fitoquímica das frações do Caule (EEC) e das folhas (EEF) da <i>J. gossypiifolia</i> L. | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|--|
| ATCC | American Type Cell Collection |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| °C | Graus Celsius |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CE | Controle esterilidade |
| C₄H₆O₃ | Anidrido acético |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CN | Controle negativo |
| CP | Controle positivo |
| DMEM | Dulbecco/Vogt modified Eagle's Minimal Essential Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EE | Extrato etanólico |
| EEC | Extrato etanólico do caule |
| EEF | Extrato etanólico das Folhas |
| EEG | Extrato etanólico dos galhos |
| FeCl₃ | Cloreto Férrico |
| H₂SO₄ | Ácido Sulfúrico |
| L | Litro |
| ML | Mililitro |
| MAC | Medicina Alternativa e Complementar |
| MEC | Matriz extracelular |
| MeOH | Metanol |
| MMPs | Metaloproteinases |
| MT | Medicina Tradicional |
| MTT | Metiltetrazólio |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PNPIC | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde |

| | |
|----------------|--|
| PNPMF | Programa Nacional Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| PPPM | Programa de pesquisa de plantas medicinais |
| RENISUS | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS |
| SF | Soro fisiológico |
| TTC | Cloreto 2,3,5 trifenil tetrazolium |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1- INTRODUÇÃO | 15 |
| 2- REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 FERIDAS: PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO | 17 |
| 2.2 PLANTAS MEDICINAIS..... | 21 |
| 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>JATROPHA GOSSYPIIFOLIA</i> L..... | 23 |
| 3- OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 29 |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 TIPO DE ESTUDO:..... | 30 |
| 4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO | 30 |
| 4.3 ETAPAS DO ESTUDO | 30 |
| 4.3.1 <i>Material vegetal</i> | 30 |
| 4.3.2 <i>Obtenção do Extrato etanólico e seu fracionamento</i> | 30 |
| 4.3.3 <i>Prospecção Fitoquímica</i> | 34 |
| 4.3.4 <i>Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT</i> | 39 |
| 4.3.5 <i>Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro</i> | 40 |
| 4.3.6 <i>Potencial cicatrizante in vitro utilizando Scratch assay</i> | 42 |
| 5 - RESULTADOS | 45 |
| 5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA | 45 |
| 5.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E SUAS FRAÇÕES..... | 47 |
| 5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT..... | 48 |
| 5.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)..... | 52 |
| 5.5 - POTENCIAL CICATRIZANTE IN VITRO UTILIZANDO SCRATCH ASSAY | 53 |
| 6 - DISCUSSÃO | 57 |
| 7- CONCLUSÃO..... | 63 |
| REFERÊNCIAS | 65 |
| ANEXOS..... | 77 |
| ANEXO A - DECLARAÇÃO DO IMA | 77 |

1- INTRODUÇÃO

O homem tem usado as plantas para o tratamento de doenças ao longo dos milênios de sua existência, gerando conhecimento do senso comum, que culturalmente ao longo dos séculos, esses produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diversas doenças, tanto na forma tradicional, decorrente do conhecimento das propriedades de determinada planta, passado de geração a geração, quanto pela utilização de espécies vegetais, como fonte de moléculas ativas, oriundas de pesquisas científicas (PIRIZ et al., 2014).

Em todo mundo há uma grande tendência para o aproveitamento de recursos naturais na saúde, por apresentarem vantagens econômicas, eficiência e menores efeitos colaterais quando comparados à produtos alopáticos (CRUZ, 2013). Porém, existe a necessidade de que o uso empírico das plantas tenha sua comprovação científica, para cumprimento dos critérios de segurança e eficácia. Para tanto, pesquisadores de várias áreas do conhecimento, inclusive da enfermagem, vêm investigando essas propriedades (SANTOS et al., 2013). É neste contexto, que as plantas medicinais podem atuar como novas formas de tratamento de infecções bacterianas, por se tratar de produtos com menos elaboração química, menor custo e possibilidade de menores danos ao organismo, comparado aos antibióticos convencionais (FIRMO et al., 2012).

Estudo que investigou o uso de várias plantas medicinais para cicatrização de feridas em portadores de diabetes mellitus concluiu que os fitoterápicos oriundos destas plantas aceleraram a cicatrização e combateram a infecção, apresentando também, propriedades pró-cicatrizantes e curativas, sendo utilizados com comprovada eficácia e redução dos efeitos secundários causados por muitos produtos químicos (PIRIZ et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde revela que cerca de 25% das mortes no mundo são decorrentes de doenças infecciosas e que 45% dessas acontecem em países subdesenvolvidos, estando associados ao surgimento de microrganismos resistentes a diversas drogas, relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos e à terapêutica inadequada, diminuindo com isso as alternativas para tratamento efetivo (TINTINO et al., 2015). Da mesma forma o uso indiscriminado dos antimicrobianos contribuiu para o aumento no número de pacientes com feridas colonizadas e/ou infectadas, dificultando o tratamento e conseqüentemente

retardando a cicatrização (WANNMACHER, 2004; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O cuidado com as feridas faz parte das atribuições da assistência prestada pela enfermagem, sendo grande o número de estudos publicados com esta temática, demonstrando o importante papel e responsabilidade do (a) enfermeiro (a) nesse processo e na busca de novas maneiras de cuidar, estando atento às inovações de cuidado nesta área, visando à melhoria da qualidade da assistência (FERREIRA et al., 2013). Na equipe de saúde o profissional que tem maior contato com os pacientes e suas lesões tegumentares é o (a) enfermeiro (a), portanto o seu papel é relevante no tratamento, orientação, acompanhamento da evolução do processo cicatricial, bem como na avaliação de novos produtos que surgem no mercado (CARNEIRO; SOUZA; GAMA, 2010).

Deste modo o uso de outras terapias, que não a convencional, como o uso de fitoterápicos, extratos ou ainda, de plantas medicinais *in natura*, para a cicatrização de feridas tem sido incrementado nos últimos anos com a busca de princípios ativos, isolados de plantas, que apresentem efetivo papel no processo de cicatrização da ferida (ALMEIDA et al., 2012).

A espécie escolhida *Jatropha gossypifolia* L. é conhecida, popularmente, como pião roxo, batata-de-teú, erva-purgante, jalapão, mamoinha, raiz-de-teú, peão-roxo, pinhão-roxo e jalapa. Várias partes da planta têm sido usadas na medicina popular, para o tratamento de úlceras pépticas, diabetes, neoplasias, diarreias e ainda como cicatrizante e diurético (MARIZ, 2007). Muitas das propriedades citadas já foram demonstradas cientificamente, inclusive, a ação relaxante vascular do extrato etanólico da *J. gossypifolia* em artéria mesentérica de ratos, confirmando, portanto, que a planta contém princípio(s) ativo(s) com atividade relaxante vascular, no entanto, algumas propriedades, ainda, não foram totalmente comprovadas, necessitando de mais estudos (VALE et al., 2006).

Esta espécie, também produz um látex pegajoso, ao qual são atribuídos distúrbios gastrointestinais, vômito, epigastria, diarreia; quando ingerida pode provocar distúrbios cardiovasculares e depressores do sistema respiratório (MARIZ et al., 2006). Por isso a necessidade de maiores estudos sobre esta espécie para gerar mais conhecimento que evidencie seu uso terapêutico.

Por estar incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS/RENISUS (BRASIL, 2009) e por haver a possibilidade de desenvolvimento de

um bioproduto com ação antimicrobiana contra microrganismo patogênicos em humanos e cicatrizante de feridas, surgiu o interesse em realizar este estudo cujo objeto está direcionado às propriedades biológicas da espécie vegetal *Jatropha gossypifolia* L. no que se refere as suas atividades: antimicrobiana, citotóxica e cicatrizante.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Feridas: Processo de cicatrização

Ferida é compreendida do ponto de vista biológico como uma agressão sofrida pelo tegumento, uma imperfeição na qual há a quebra de sua integridade, afetando camadas superficiais ou mais profundas podendo atingir até os órgãos. O processo cicatricial surge a partir dessa injúria com o objetivo principal de restaurar/cicatrizando esse rompimento da continuidade, sendo este um processo dinâmico, complexo, no qual a sua resposta está diretamente ligada às condições gerais do indivíduo (CARVALHO, 2012).

Embora esse processo ocorra de forma dinâmica e possui fases sobrepostas no tempo, sendo essa sobreposição conhecida como cascata da cicatrização e apresenta fases com limites não muito distintos. Para facilitar com isso o entendimento desse processo foi adotada didaticamente três fases distintas: fase inflamatória, proliferativa e remodelação. (ISAAC et al., 2010).

Desencadeada após a injúria inicia-se a fase Inflamatória quando ocorre a ativação do sistema de coagulação, a promoção do desbridamento e defesa da ferida contra agentes externos que pode levar 48 a 72 horas. Tem por finalidade controlar a agressão celular sofrida, a perda sanguínea e a higiene do leito da ferida favorecendo o processo cicatricial. Essa fase é conhecida como fase reativa ou defensiva ou exsudativa, manifestada pelos sinais clínicos de dor, calor, rubor e edema (CARVALHO, 2012).

Inicialmente ocorre a vasoconstrição e permanece por algumas horas, mediada por componentes vasoativos como as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) provocando uma diminuição do aporte sanguíneo no local da lesão limitando dessa forma a hemorragia e o subsequente extravasamento de fluidos e proteínas na intenção de diminuir as perdas (ARAÚJO, 2010). Enquanto que

com o extravasamento do sangue no local, é gerada sinalização de início dos processos de agregação celular gera a ativação das plaquetas e fatores de coagulação, seguido da formação de coágulos evidenciando com isso a hemostasia, constituída por uma agregação de trombócitos e plaquetas (GONZALEZ et al., 2016).

Com essa agregação plaquetária, a formação de coágulo de células e fibrina cria-se um selo temporário sobre o sitio da injúria prevenindo a eventual entrada de microrganismos. As células contidas nos coágulos estimulam a resposta inflamatória por meio da liberação de vasodilatadores e substâncias quimiotáxicas (CARVALHO, 2012). O coágulo é constituído de colágeno, plaquetas e trombina que serve como reservatório protéico para síntese de fatores de crescimento e citocinas, que estimulam a migração dos neutrófilos para a lesão, cuja função é eliminar as bactérias e outros agentes estranhos da ferida através da liberação de enzimas por fagocitose. Os neutrófilos são as primeiras células ativadas e recrutadas que desempenham o papel da limpeza do tecido e contribuem para a morte dos agentes invasores. (SCHULTZ; LADWIG; WYSOCKI, 2005).

Durante esse processo de limpeza há um aumento da permeabilidade vascular favorecendo o influxo de leucócitos, mastócitos e células de Langerhans que por sua vez secretam quimiocinas e citocinas. A partir de 48 horas do início do processo cicatricial se intensifica a migração de monócitos de vasos vizinhos e a partir de um novo perfil de expressão gênica, diferenciando-se em macrófagos, estes por sua vez produzem e liberam citocinas, fatores pró-angiogênicos, inflamatórios, prostaglandinas, radicais livres e secretam fatores quimiotáticos (GONZALEZ et al., 2016).

Portanto essa é uma fase primordial no processo de cicatrização de feridas, porém sua duração é variável, atrelada à extensão da lesão e à presença de algumas patologias que causam cronicidade. Resultando, com isso uma fase inflamatória prolongada, com intensa presença de neutrófilos, impedindo ou dificultando a formação dos fibroblastos, essenciais para a formação do tecido novo, transformando a ferida de cicatrização aguda em uma lesão processo cicatricial complexa ou mais comumente chamada de crônica, este prolongamento de sua duração apresenta células de baixa atividade mitótica, diminuição dos fatores de crescimento e baixa resposta celular (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A segunda fase, denominada como proliferativa inicia-se por volta do terceiro dia após a injúria, podendo se desdobrar até para o 14º dia após o início da lesão. Sua

principal função é a diminuição da área lesionada por meio da contração e fibroplasia. Caracterizada pela proliferação de fibroblastos, neoangiogênese, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e contração da ferida. (GONZALEZ et al., 2016).

Os fibroblastos têm como função primordial a síntese de colágeno e constituem uma das maiores fontes de proteínas da matriz extracelular. Essa rede capilar que se forma é exuberante, responsável pela nutrição do novo tecido, favorecendo o crescimento de tecido granular vermelho, brotos endoteliais conhecidos como tecido de granulação que migram no sentido da periferia para o centro da lesão, e são essenciais ao processo de reparação. Durante essa fase inicial do reparo há predomínio do colágeno tipo III sintetizados pelos fibroblastos no tecido de granulação. (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; IRION, 2012).

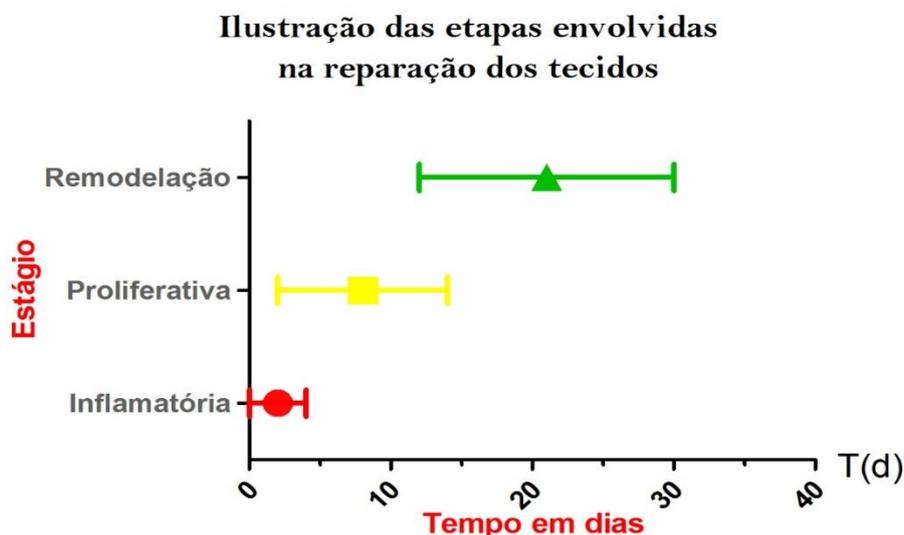
A terceira e última fase do processo cicatricial é a maturação ou remodelagem que tem início duas a três semanas semana após a injúria e pode estender por um longo período, dependendo da extensão, profundidade e localização da lesão. Essa fase caracterizada pela diminuição da vascularização e redução dos fibroblastos, ocorre ainda um aumento força tênsil e reordenamento de fibras de colágeno. Progressivamente vai diminuindo a força de contração, o volume da cicatriz e ocorre a alteração da cor que vai passando de vermelha para róseo de epitelização (CARVALHO, 2012)

Ocorre a substituição do tipo de colágeno, do tipo III para tipo I, bem como alteração em sua organização de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de stress (GONZALEZ et al., 2016). Essa reordenação ocorre graças à ação de enzimas (colagenases) produzidas pelos fibroblastos e leucócitos, que promovem a lise da matriz antiga. Tardamente essa cicatriz é considerada avascular e sua força tênsil pode chegar até 80% da pele normal, no término da primeira semana após a lesão ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra, na terceira semana perfazendo cerca de 30% e aos três meses chegando a 80% da força fisiológica anterior a ferida, entretanto nunca atingirá 100% (ISAAC et al., 2010).

É importante salientar que, o processo cicatricial é um processo biológico dinâmico e complexo, que se encontra diretamente relacionado com as condições do indivíduo envolvido, de seus fatores intrínsecos (estado nutricional, circulação, tabagismo, comorbidades, etc.) e extrínsecos (infecção, corpo estranho, uso de

medicamentos, stress etc.) podendo retardar ou dificultar esse processo cicatricial. Seus eventos são inflamação, proliferação e remodelação (CARVALHO, 2012). A Figura 1 mostra as fases do processo cicatricial.

Figura 1. Fases do processo cicatricial.



Fonte: Autor 2016, adaptação GONZALEZ et al., 2015

Embora existam grandes avanços tecnológicos no que se refere às coberturas, o desenvolvimento de novas tecnologias e estudos que compreendam processos cicatriciais das diversas fases da reparação tissular, e que simultaneamente muito se tenha investido nessas pesquisas para o desenvolvimento dessas tecnologias com o objetivo de favorecer esses processos, a incidência e prevalência de úlceras crônicas são ainda extremamente altas. Segundo Ministério da Saúde (2011), essa prevalência de úlceras crônicas varia de acordo com as condições e complicações que causaram a úlcera. Dos pacientes com diabetes, 15% são propensos a desenvolver úlceras nos pés em algum momento da vida (BRASIL, 2011).

Repercutindo com isso em maiores custos para setor saúde como aumento de internações e procedimentos, e em consequências muitas vezes irreversíveis para a população, tais como sequelas e amputações de membros e até mesmo a morte.

A utilização de plantas medicinais trata-se de um importante alternativa no tratamento de feridas, o desenvolvimento de tecnologias mais simples e com preço acessível, com eficiência comprovada, aproveitando matérias primas encontrada nas

regiões (PIRIZ, 2014). Diante desse fato, nota-se a importância do emprego das plantas medicinais, como uma terapia alternativa para o tratamento e cicatrização de feridas, haja visto o seu uso datar de épocas remotas (NÓBREGA; AGRA; ALBUQUERQUE, 2011).

2.2 Plantas medicinais

Desde o início da história da humanidade as plantas medicinais foram utilizadas no tratamento da maioria das enfermidades era a única alternativa existente para tratar e ou prevenir essas doenças (CRUZ et al., 2015). Na busca de descobrir soluções para suas necessidades básicas, as suas experiências e observações das civilizações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de ferimentos ou doenças através do uso das plantas e ervas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Uma das principais utilizações de plantas era no tratamento das feridas, com a utilização de extratos e macerados das folhas para estancar as hemorragias e favorecer o processo cicatricial (PIRIZ et al., 2015).

Os primeiros registros do uso plantas no tratamento de doenças datam 3.000 anos a.C. na China com a catalogação de 365 plantas - ervas medicinais, a qual foi reconhecida como primeiro herbário do mundo. No Brasil essa prática está enraizada nas culturas indígenas com os seus curandeiros, pajés, também muito influenciada pelos povos africanos e portugueses (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

É importante ressaltar que esse conhecimento foi adquirido de geração em geração, uma herança dos antepassados sobre as espécies vegetais, seus usos e indicações, reforçando a importância do conhecimento popular e a necessidade de interligar ao conhecimento científico para gerar evidências, descobrir novas utilizações, comprovar e ou descartar a sua eficácia (NÓBREGA; AGRA; ALBUQUERQUE, 2011).

As plantas medicinais são atualmente um dos maiores recursos naturais utilizados na síntese de novos agentes terapêuticos. A diversidade de compostos biologicamente ativos presentes nestas plantas, representam uma alternativa promissora para a descoberta e o desenvolvimento de potenciais agentes antimicrobianos, possivelmente com menores efeitos adversos, com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência e com novas estratégias de controle de infecções microbianas (SANTOS, 2014).

O nosso país tem como ponto facilitador o uso de fitoterápicos graças a nossa biodiversidade, o baixo custo associado à sua terapêutica, a facilidade de obtenção das plantas e a tradição do uso de plantas medicinais. Outros fatores têm colaborado para a utilização destas, tais como, as baixas condições socioeconômicas da população, altos custos dos fármacos industrializados e difícil acesso da população a assistência à saúde (FIRMO et al., 2012).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados de saúde. Muito dessa utilização foi desvalorizada devido ao desenvolvimento da medicina convencional, na qual, os profissionais de saúde consideram os medicamentos industrializados mais seguros (CRUZ et al., 2015). O estudo das plantas medicinais por vários grupos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento tem levado à descoberta de compostos bioativos de aplicação no desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, somente 1% destas espécies vegetais foi estudada fotoquimicamente (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Cerca de 30% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas. Aproximadamente 50% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais. Além de ser culturalmente aceita, esta prática torna-se comum e acessível uma vez que as plantas podem estar disponíveis no próprio domicílio e são de baixo custo (KOEHN; CARTER, 2005).

A fim de normatizar a prática da medicina tradicional na população brasileira e, atender a recomendação da OMS, a partir de 2006 foi implementada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que trouxe diretrizes e ações para inserção de serviços e produtos pertinentes à medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia e plantas medicinais e fitoterapia no âmbito do Sistema Único de Saúde/SUS (BRASIL, 2012).

Ambas políticas lançadas no ano de 2006, visaram estimular o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais, para o cuidado em saúde, de forma eficaz e segura. Outras publicações relevantes são a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS, difundida em 2009, contendo 71 plantas medicinais

que devem ser objeto de pesquisa e implementação dos setores e serviços de saúde pública (BRASIL, 2009).

Entretanto, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, do ano de 2010, traz um elenco de 66 plantas medicinais com evidências satisfatórias de atividade de cura de doenças, dentre estas, várias espécies são apontadas para o processo de cicatrização, o que implica em progresso da assistência à saúde no âmbito da atenção primária, dentro do contexto brasileiro, que começa a valorizar a utilização de novas terapias fundamentadas nas plantas medicinais (PIRIZ et al., 2014).

2.3 Considerações sobre a espécie *Jatropha gossypifolia* L.

A família Euphorbiaceae, segundo sistema de classificação proposto por Webster (1994) é representada por mais de 8.000 espécies distribuídas em 317 gêneros, que estão entre as famílias de maior importância econômica entre angiosperma, situadas em todo o planeta nas regiões de clima tropical e subtropical.

O nome do gênero deriva do latim *jatrós* que significa “doutor” e *trophé* “comida”, indicando suas propriedades medicinais. *Gossypium* é um nome dado pelo botânico Caio Plínio ao algodoeiro (*Gossypium herbaceum*), como o pião roxo se assemelha à *G. herbaceum*, foi adotado por esta planta o prefixo (*gossypii*), e *folium*, que significa folha, vez que o seu formato é semelhante à folha do algodoeiro. É importante destacar que destas 175 espécies de *Jatropha* existentes no mundo, nove destas estão distribuídas no Brasil são elas: *Jatropha curcas* L., *Jatropha elliptica* (Pohl) Oken, *Jatropha gossypifolia* L., *Jatropha molissima* L., *Jatropha multifida* L., *Jatropha mutabilis* Benth., *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill., *Jatropha urens* L. e *Jatropha weddeliana* Baill (TRINDADE, 2015).

Sua distribuição geográfica é diversificada por ser um gênero de crescimento rápido, de fácil propagação e adaptação, devido à sua resistência a longos períodos de secas, a pragas, rusticidade e adaptabilidade a condições climáticas de várias regiões (VERONA, 2010). Seu crescimento ocorre de forma natural e se adapta a maioria dos solos, em regiões com uma estação seca, em pastagens e arbustos, próximo de zonas costeiras e lugares desérticos (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008).

A espécie alvo do nosso estudo é a *Jatropha gossypifolia* L. (Figura 2), da família da Euphorbiaceae (Euforbiáceas) do gênero *Jatropha* que possui de 165 a 175

espécies distribuídas nos países de climas tropical, subtropical e tropical seco da África, Américas, Índia e no Caribe.

Figura 2 - *Jatropha gossypifolia* L.



Fonte: Autor, 2016.

Caracteriza-se como arbustos com várias ramificações, podendo atingir 4 metros de altura quando em condições favoráveis. Seu caule possui elevado teor de látex e suas sementes de óleo. Possuem inflorescência cimosa, monóica, isto é, em cada eixo é possível encontrar uma flor, e os ramos laterais crescem mais que o eixo central. O eixo principal termina em uma flor, que é a primeira a se abrir, denominadas de flores pentâmeras, pistiladas e estaminadas do tipo prato e produtoras de néctar e frutos do tipo esquizocárpicos, secos, com três cocas globosas de deiscência explosiva, portanto com dispersão primária por autocoria (NEVES et al., 2010).

O uso dessas espécies no país (Quadro 1) vai desde a utilização medicinal como cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, purgante, moluscida, analgésico, antimicrobiano e anticoagulante, do uso ornamental, como cercas vivas, utilizada também para ritos religiosos e como biodiesel a partir das sementes (HELLER, 1996). Seu extrato alcóolico em estudo *in vitro* comprovaram a eficácia contra células tumorais de nasofaringe (carcinoma), revelando com isso sua atividade citotóxica e inibidora crescimento tumoral (MARANGUELI et al., 2015). Muitos desses usos são compreendidos devido a diversas substâncias presentes em sua constituição química,

tais como alcaloides, diterpenos, esteroides, flavonoides, taninos e lignanas dentre outros (MARIZ et al., 2006).

Quadro 1 - Categorização dos estudos segundo ação da *J. gossypiifolia* L.

| Ação | Referência |
|---|---|
| Atividade cicatrizante | SERVIN et al., (2006); SANTOS et al., (2006); AQUINO et al., (2006); VALE et al., 2006 e MARIZ et al., (2010) |
| Atividade anti-inflamatória | SERVIN et al., (2006); SILVA (2014); BHAGAT (2013) |
| Atividade anticoagulante e antioxidante | FÉLIX-SILVA et al. (2014) |
| Atividade tóxica | MARIZ (2008); MARIZ et al., (2006); ALMEIDA et al., (2015); MARIZ et al. 2012; HIROTA et al., (2010). |
| Diurético e hipotensor e relaxante vascular | AQUINO et al., 2006; CÔRREA, 1984; VALE (2006); HIROTA et al., (2010) |
| Anti-tumoral | SERVIN et al., (2006); MARIZ et al., (2010) |
| Moluscida | HIROTA et al., (2010); ALMEIDA et al., (2016); PEREIRA-Filho et al., (2014). |

Fonte: Autor, 2016.

Para dar ênfase nas principais ações da *Jatropha gossypiifolia* L. de interesse deste estudo, selecionamos no Quadro 2 as duas principais ações: cicatrizante e citotóxica.

Quadro 2 - Categorização dos estudos segundo ação da *J. gossypiifolia* L.

| Ação | Autor/Ano | Conclusão |
|--------------|---------------------|---|
| Cicatrizante | SERVIN et al., 2006 | O extrato <i>Jatropha</i> favoreceu processo cicatricial e aumento da resistência mecânica. |
| | SANTOS et al., 2006 | Houve melhora no aspecto microscópico com evidente aumento proliferação fibroblástica e reepitelização. |

| | | |
|------------|---------------------|---|
| | AQUINO et al., 2006 | Não demonstrou melhora significativa no processo de cicatrização da sutura da parede abdominal ventral de ratos. |
| | VALE et al., 2006 | O extrato bruto de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. favoreceu a cicatrização aumentando a resistência das gastrorrafias e a cicatrização aumentando a coaptação das bordas e reduzindo a inflamação. |
| Citotóxica | MARIZ et al.,2006 | O extrato etanólico de <i>J. gossypifolia</i> L. apresentou toxicidade aguda oral relativamente baixa em ratos Wistar. Apesar disso, em função das alterações orgânicas observadas, sugere-se a continuidade dos estudos mediante a avaliação da toxicidade crônica do produto. |
| | MARIZ et al.,2008 | Apenas nos animais tratados com a maior dose do extrato (5 g/kg) foram observadas alterações em fígado e pulmão evidenciadas por resposta Inflamatória e estimulação do sistema imunitário. Estes resultados indicam uma toxicidade aguda oral relativamente baixa. |
| | MARIZ et al.,2012 | A análise histopatológica mostra hepatotoxicidade e danos pulmonares. A letalidade foi de 46,6% entre os machos sob a dose experimental mais elevada (405 mg / kg) e 13,3% nas fêmeas sob a dose mais elevada e entre os animais tratados com 135 mg / kg do produto. Estes dados mostram a toxicidade crônica oral significativa de EE de <i>J. gossypifolia</i> em ratos. |

| | | |
|--|----------------------|---|
| | ALMEIDA et al., 2015 | Indicou potencial mutagênico para cromossomos com uso de <i>J. gossypiifolia</i> e que o látex é utilizado em terapias populares, pode-se ressaltar que seu uso para fins medicinais pode ser nocivo à saúde humana, especialmente se ingerido. |
|--|----------------------|---|

A referente planta tem como constituinte ativo principal o diterpeno macrocíclico jatrophone ou jatrofana que foi identificado na raiz e suas demais partes, que age como inibidor do crescimento tumoral (SERVIN, 2006). Apesar de todas essas vantagens, deve-se levar em consideração não apenas a eficácia desta espécie, mas considerar seus efeitos tóxicos.

Alguns estudos referentes à toxicidade aguda oral do extrato das partes aéreas da *J. gossypiifolia* L. concluiu que esse extrato apresentou baixa toxicidade e que promoveu alterações histológicas pouco significativas. Corroborando com este resultado, outro estudo que utilizou a dose de 500 mg/Kg por 30 dias, não apresentou alterações hematológicas e/ou bioquímicas nos animais (MARIZ et al., 2006; ALMEIDA et al., 2016).

Quando usado dose diária de 5g/Kg do extrato etanólico por 14 dias, foram observados sinais tóxicos gerais, porém é importante frisar que, outros estudos afirmam que o uso prolongado com extrato, em doses próximas das doses terapêuticas, produziu indícios de danos hepáticos, renais e pulmonares (MARIZ, 2008; HIROTA et al., 2010). De um modo geral, a ingestão de partes do vegetal pode produzir efeitos purgativos e depressores dos sistemas respiratório e cardiovascular. Na intoxicação surgem, inicialmente, distúrbios do sistema digestório, seguidos de dores abdominais, diarreia, desidratação, insuficiência renal e agravo cardiovascular (MARIZ, 2008).

Num estudo toxicológico crônico, utilizando ratos Wistar, foram administradas durante 13 semanas, doses de extrato etanólico das partes aéreas. Verificou-se toxicidade oral crônica significativas e na dose máxima, houve letalidade de 46,6% dos animais (MARIZ et al., 2012).

Outro estudo de toxicidade mostrou que, apesar da conhecida toxicidade de plantas do gênero *Jatropha*, a *J. gossypiifolia* apresenta baixa toxicidade em alguns experimentos *in vivo* e *in vitro*. Em relação especificamente a extratos aquosos das

folhas de *J. gossypifolia* foi relatado que o extrato aquoso obtido por extração do tipo Soxhlet, até a dose de 2 g/kg em ratos, não apresentou toxicidade oral aguda, sendo considerado, pelos autores, como seguro (SILVA, 2014).

Diante dessas considerações, o objeto desse estudo volta-se para a *Jatropha gossypifolia* L. que é popularmente conhecida no Brasil como pião roxo, visando analisar a avaliação antimicrobiana e cicatrizante desse extrato na terapêutica de feridas, com o intuito de gerar evidências de um produto eficaz e economicamente viável à população em geral, pergunta-se: Qual a atividade antimicrobiana e cicatrizante dos extratos da *Jatropha gossypifolia* L.?

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante de extratos das folhas, galhos e caule da *Jatropha gossypifolia* L.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos para fracionamento;
- Realizar a prospecção fitoquímica;
- Identificar os metabólitos secundários;
- Verificar a citotoxicidade dos extratos;
- Identificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Avaliar a atividade cicatrizante *in vitro*.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo:

Trata-se de uma pesquisa básica, experimental, que busca gerar novos conhecimentos para o avanço da ciência sem aplicação prática prevista. Consiste em determinar um objeto de estudo, selecionando as variáveis que podem influenciar no objeto a ser estudado. Este tipo de pesquisa exige um plano ou protocolo do experimento com passos bem definidos (KAUARK; MANHÃES; MEDEIROS, 2010)

4.2 Locais de realização

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Tratamento de Feridas/LPTF e de Química Medicinal, ambos da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, em parceria com o Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL.

4.3 Etapas do estudo

4.3.1 Material vegetal

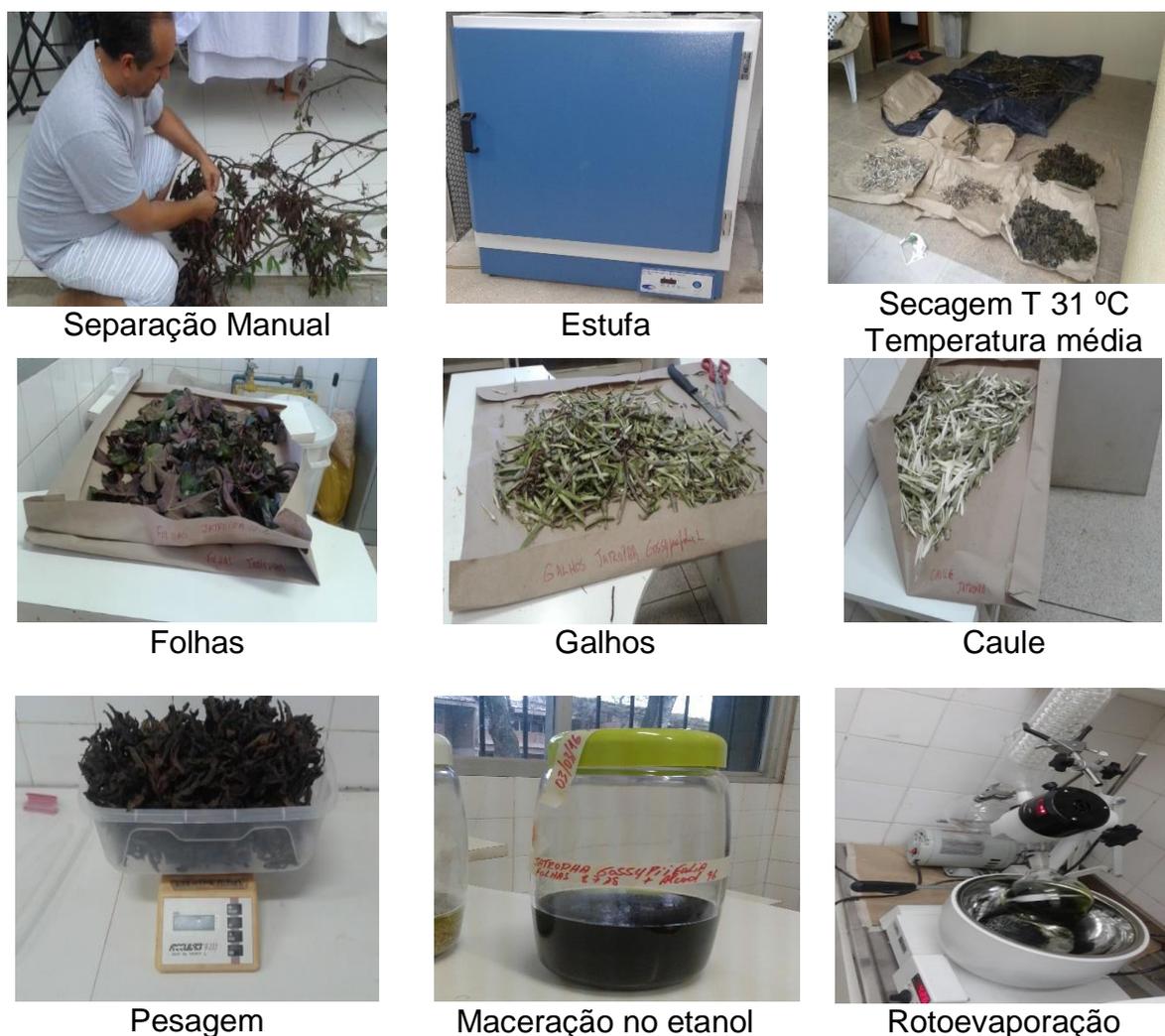
O material vegetal foi coletado no conjunto Cidade Universitária/INOCOOP, coordenadas 9°32'47.3"S 35°47'07.6"W, Rua D, Cep:57072-017, em janeiro de 2016 e encaminhadas para o Instituto do Meio Ambiente (IMA) do Estado de Alagoas, onde foi devidamente identificada, com MAC nº 241 (ANEXO A).

4.3.2 Obtenção do Extrato etanólico e seu fracionamento

Foram coletados 05 arbustos de porte médio e em seguida, feita a separação manual das partes folhas, galhos e caule da *J. gossypifolia* L., após pesagem 220 gramas de folhas, 280 gramas de galhos e 310 gramas de caule, que foram colocadas separadamente para secagem em temperatura ambiente por 5 dias, de 07 a 11 de março de 2016, apresentando temperatura média de 31°C, de acordo com o site <http://www.accuweather.com/pt/br/maceio/31913/march-weather/31913>. A seguir todo o material vegetal foi colocado em estufa para secagem a 40 °C por 72 horas e trituradas em um liquidificador. Após trituração foram colocados em recipiente com

tampa hermeticamente fechada, sendo cada uma num recipiente individual misturadas ao etanol 98% em temperatura ambiente por 72 horas. A filtração foi realizada a cada 72 horas até o esgotamento da extração, a cada filtração, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e mantido em dessecador com sílica gel para evaporação do solvente residual e obtenção dos extratos etanólicos (Figura 3).

Figura 3: Etapas da produção dos extratos.



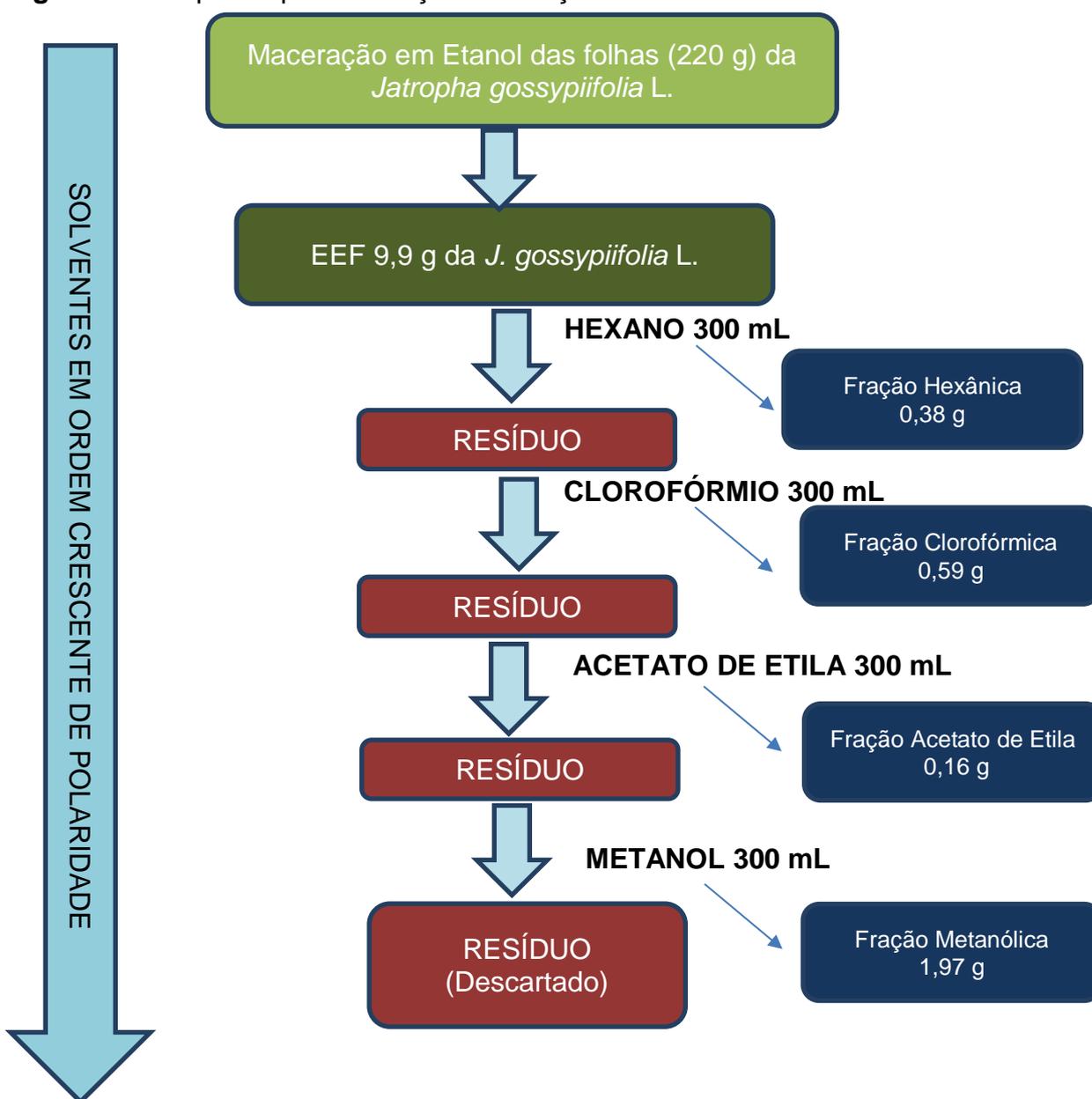
Fonte: Autor, 2016

Após esse processo foram obtidos os extratos brutos etanólicos das folhas, galhos e caule da *J. gossypifolia* L. e para uma separação prévia de compostos bioativos deste extrato, recorreu-se à técnica de extração por fracionamento com solventes orgânicos de polaridades crescentes, de forma sequencial, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. As frações foram concentradas em evaporador

rotatório a 40°C e mantidas em dessecador com sílica gel para evaporação do solvente residual (PARACAMPO et al., 2009).

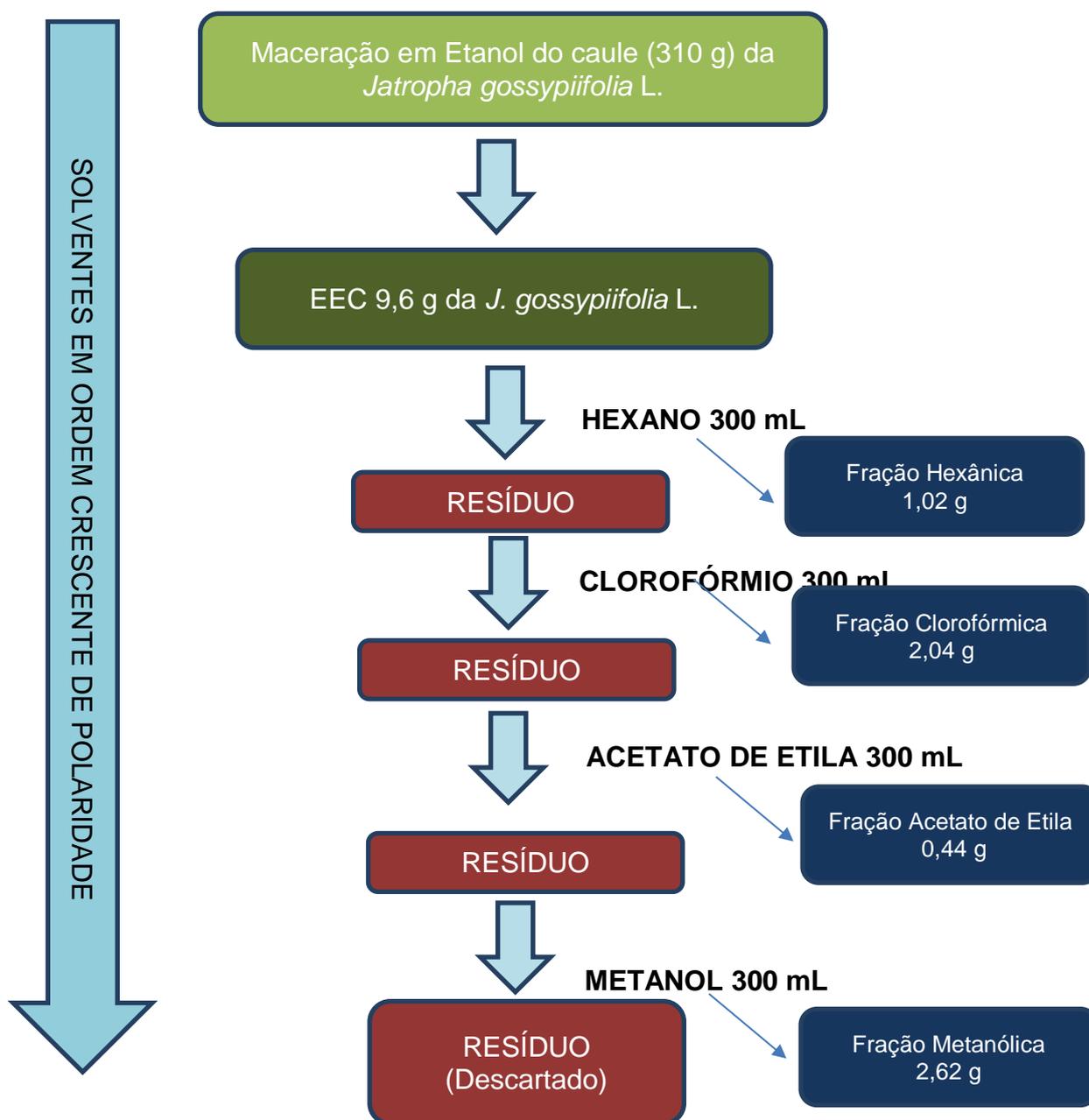
Os extratos etanólicos foram submetidos à partição (Figuras 4A e 4B), para obtenção das frações por separação pelo método de filtração em sílica gel, usando funil de partição, no qual a mistura desejada foi posta em decantação para separação por gravidade. Para acelerar o processo foi agregada ao funil uma bomba de vácuo. Nesta etapa, os extratos usados foram os das folhas e caule da referida planta, descartando os galhos, devido ao resultado inviável da viabilidade celular.

Figura 4A: Esquema para obtenção das frações das Folhas



Fonte: Autor, 2016

Figura 4B: Esquema para obtenção das frações do Caule

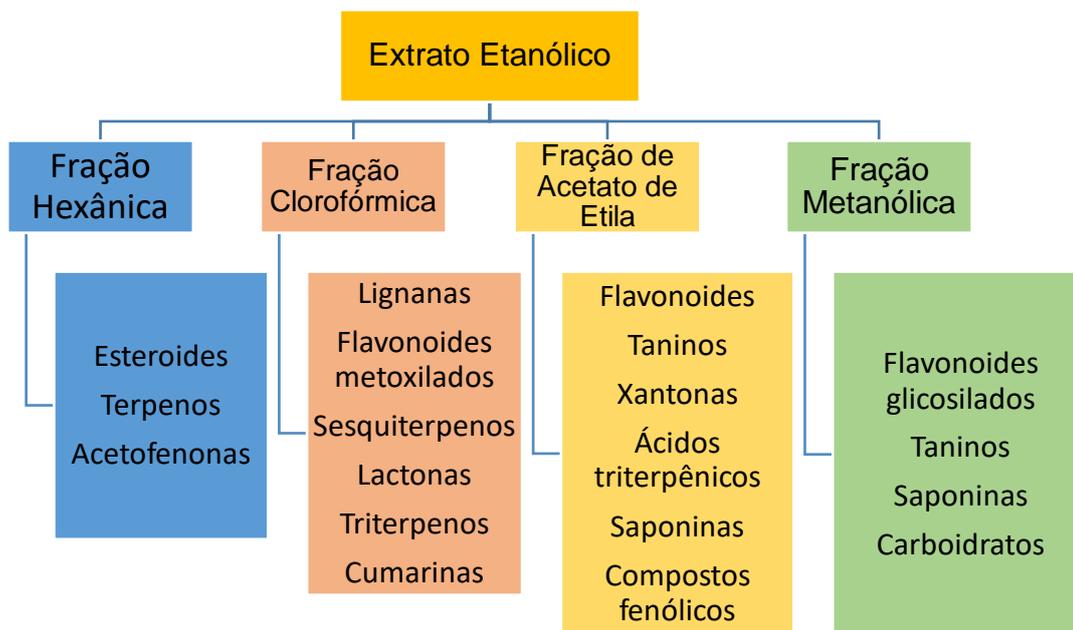


Fonte: Autor, 2016

Para a partição das folhas foi utilizada uma alíquota de 9,9 g do EEF, para tanto foi utilizado 15 g de sílica gel como fase estacionária e 300 mL de cada solvente orgânico como fase móvel, um de cada vez, obedecendo a sequência hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Foi utilizado o mesmo procedimento para o extrato etanólico do caule com massa de 9,6 g.

De acordo com a Figura 5, estão descritos os metabólitos secundários que são obtidos de acordo com a polaridade dos solventes utilizados para o fracionamento. Pode-se encontrar nas frações oriundas dos extratos etanólicos, as prováveis classes de metabólitos secundários (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Figura 5: Esquema geral da partição e separação dos prováveis e principais metabólitos secundários presentes nos extratos da planta.



Fonte: Adaptado de Cechinel Filho; Yunes, 1998.

4.3.3 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica é um estudo dos princípios ativos vegetais, que tem como objetivo descobrir os principais componentes existentes nas plantas, sua análise pode identificar os grupos metabólitos secundários (DA SILVA; MIRANDA; DA CONCEIÇÃO, 2010). Os compostos produzidos pelas plantas são separados em metabólitos primários e secundários. Os primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, estando relacionados a um conjunto de processos que desempenham funções essenciais na planta, tais como fotossíntese, respiração, biossíntese de aminoácidos e transporte de solutos. São encontrados em todas as células vegetais e, são macromoléculas como açúcares, carboidratos, aminoácidos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos (BRAZ FILHO, 2010).

Já quanto aos metabólitos secundários, sua presença nas plantas está relacionada com várias funções ecológicas, possuindo um papel fundamental nos seus sistemas de defesa contra os ataques de herbívoros, de patógenos, na competição entre as plantas, na atração de organismos benéficos (simbiose, polinizadores), proteção contra estresse biótico (mudanças de temperaturas, radiação solar, níveis de água e luz, deficiência de nutrientes minerais). Embora não sejam essenciais para a vida das plantas, eles desempenham essa função importante na interação delas com o meio ambiente, contribui com aromas, cores e a resistência a doenças e ou pragas (MOURA, 2015).

Essas funções ecológicas citadas provavelmente têm alguma relação com o potencial efeito medicinal para os seres humanos, apresentam grande importância à humanidade, devido às atividades antibióticas e de importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Cabe ressaltar, a importância desses metabólitos de espécies vegetais na área da saúde e biotecnologia em decorrência das atividades biológicas para a espécie humana (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Nesse estudo a prospecção visou identificar os componentes químicos presentes nos EEF, EEG e EEC da *Jatropha gossypifolia* L., em que se tomou como base a metodologia descrita por MATOS (2009). Dessa forma, foi pesquisada a presença das seguintes classes de metabólitos secundários:

Taninos

Os Taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis com peso molecular compreendido entre 500 a 3.000 Daltons. Possuem elevado peso molecular, estão associados aos mecanismos de defesa das plantas contra insetos são responsáveis pela adstringência das plantas e precipitam alcaloides, gelatina e outras proteínas formando um complexo insolúvel em água com estes compostos. Tendo como ações farmacológicas: antissépticos, antioxidantes, antídotos em intoxicação por metais pesados, cicatrizantes, protetores, reepitelizantes e antidiarreicos (PEREIRA; CARDOSO, 2012) e muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das

células fagocíticas e ação antitumoral, além das atividades anti-infecciosas (MONTEIRO et al., 2005).

A palavra *tanino* é largamente usada, particularmente em literatura botânica, originalmente derivada do termo "tanante", implicando que o material vegetal produza couro a partir de peles. Ajudam no processo de cura das feridas, queimaduras e inflamações através de uma camada protetora sobre a pele e ou mucosa danificada (MONTEIRO, 2005).

Para identificar a presença de tanino, adiciona-se em um tubo de cada grupo de extrato: EEF, EEG e EEC, 3 gotas de cloreto férrico FeCl_3 1 mol/L. Após agitação, foi observado se houve variação da cor, ou formação de precipitado, o que indica a presença de taninos.

Esteroides – Triterpenos

Os esteroides ou triterpenos constituem os óleos essenciais ou voláteis. Seu interesse terapêutico dá-se pela importância dos glicosídeos cardiotônicos, que fazem parte desse grupo; interesse por sitosterol, estigmasterol. Destacando-se pela capacidade de inibir a absorção do colesterol da dieta, reduzindo assim os níveis de colesterol circulante diminuindo com isso o risco de doença cardiovasculares (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O teste consiste em pegar uma amostra 5 mg de cada extrato (EEC, EEG e EEF) e acrescentar 1 mL clorofórmio (CHCl_3). Colocar essa solução para filtração em um funil com algodão coberto com sulfato de sódio (NaSO_4) anidro para retirada de água residual. No tubo de ensaio, após filtração, acrescentar 1 mL de anidrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) a 2%. Agitar suavemente e em seguida acrescentar 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, depois agitar novamente para observar a mudança de cor. A presença de cor azul evanescente seguida de verde permanente indica a existência de esteroides livres, caso obtenha-se a cor de parda a vermelho indica triterpenos presentes.

Flavonoides – Antocianinas – Antocianidinas

Os flavonoides constituem a maior classe de compostos fenólicos de plantas e são classificados em 4 grupos: Antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas

(isoflavonoides). São pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos graças as atividade como antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral; ainda possui poder antibiótico provavelmente relacionado formação de complexos com as proteínas das membranas plasmáticas das bactérias (OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Para avaliar a presença desses componentes foram preparados 3 tubos de cada amostra. Realizar a acidificação dos primeiros tubos com ácido clorídrico (HCl) 0,5 mL ajustando o pH = 3, os segundos tubos foram alcalinizados para pH = 8,5 e terceiros para pH = 11 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) respectivamente. As mudanças na coloração indicam a presença ou ausência dos compostos e foram observadas foram interpretadas de acordo com o Quadro 2 (MATOS, 2009).

Quadro 2 - Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis.

| Constituintes | Coloração observada | | |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|
| | Ácido pH = 3 | Alcalino pH = 8,5 | Alcalino pH = 11 |
| Antocianinas e antocianidinas | Vermelha | Lilás | Azul-púrpura |
| Flavonas, flavonóis e xantonas | - | - | Amarela |
| Chalconas e auronas | Vermelha | - | Vermelho púrpuro |
| Flavanonóis | - | - | Vermelho laranja |

Fonte: Matos, 2009.

Saponinas

A palavra saponina ou saponosídeo provém do fato de liberarem espuma quando misturadas com água à semelhança do sabão. Constituem um grupo particular de heterosídeos, possuem uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e

outra hidrofílica (carboidratos), que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água, característica de sua ação emulsificante. Esse composto irrita a mucosa, provoca um relaxamento intestinal, aumentam as secreções mucosas dos brônquios (é expectorante), é também usada como diurético e desinfetante das vias urinárias e antiinflamatório (SANTOS, 2013).

Para identificação de saponinas, acrescentou-se 10 mL de água destilada no resíduo insolúvel do clorofórmio do teste acima descrito em tubo de ensaio. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente durante alguns minutos num tubo de ensaio fechado. A formação de uma camada de espuma e sua permanência estável por mais de 30 minutos, representa resultado positivo para saponinas.

Alcaloides

Alcaloides são substâncias básicas nitrogenadas, de origem vegetal, pouco solúveis em água e dotados de uma estrutura complexa onde os átomos de nitrogênio são parte de um anel heterocíclico da molécula. Possui substâncias que promovem efeito no sistema nervoso e muscular, morfina, nicotina e atropina são exemplos de alcaloides usados com fins terapêuticos (SANTOS, 2013).

Para identificar a presença de alcaloides uma alíquota de 5 mg dos extratos etanólicos foram dissolvidas em 1 mL de etanol a 80% e, em seguida, foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico (HCl) a 5%. Quatro porções de 1 mL de cada solução foram separadas em tubos de ensaio e foram adicionadas gotas do reagente de Dragendorff. A precipitação de coloração vermelho-tijolo indica reação positiva.

Teste para Antraquinonas, antronas e cumarinas

Antraquinonas são compostos orgânicos derivados do antraceno, formados a partir da oxidação de fenóis. Algumas antraquinonas são utilizadas industrialmente como pigmentos ou indicadores de pH. São empregados terapeuticamente como laxativos e catárticos, por agirem irritando o intestino grosso e aumentando a motilidade intestinal. Principais vegetais que contém antraquinona: Babosa, cáscara sagrada, ruibarbo (SOUZA et al., 2003).

As cumarinas são uma série de compostos que possuem em comum um anel aromático fundido em um anel de lactonas condensado, tem um princípio ativo natural

existente em diversas plantas como o guaco, o agrião, a ipeca, o cumaru, a canela, a chicória, entre outras, e em frutas como o morango, a cereja, a framboesa e o damasco (SOUZA, 2005). São utilizadas como fixador de perfumes, aromatizantes de alimentos, além de possuírem propriedades antibióticas, broncodilatadora, anti-inflamatória, analgésica e também serem utilizadas em tratamentos contra o câncer. Sua propriedade anticoagulante é exercida de forma indireta, através da inibição da síntese dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (PINTO et al., 2015).

Os testes para antraquinonas e cumarinas foram realizados em placas de cromatografia em camada delgada. Os extratos foram solubilizados em metanol, aplicados na placa e eluídos com mistura de CHCl_3 : MeOH (9:1). Após eluição, borrifou-se KOH 10%, espera a secar e observou-se a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm. O surgimento de coloração azul é indicativo de cumarina, vermelho de antraquinona, e amarelo de antrona.

4.3.4 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT

A citotoxicidade foi avaliada através da utilização do método colorimétrico pelo sal de metil-tetrazolium (MTT), composto de tonalidade amarela quando em solução. Esse teste tem por objetivo avaliar a viabilidade celular, já que esse sal é facilmente incorporado por células viáveis as quais reduzem esse sal através das enzimas succinato desidrogenase, que se encontra nas mitocôndrias ativas num composto chamado de formazam, insolúvel em água e de cor violácea (MOSMANN, 1983).

Portanto, a capacidade das células em reduzir o MTT indica que estas estão metabolicamente estáveis e viáveis (ANVISA, 2012). Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular (GOES et al., 2012).

Para os extratos etanólicos das folhas, galhos e caule, as células utilizadas para este teste foram macrófagos da linhagem J774. Já para as frações oriundas dos extratos etanólicos das folhas e caules da espécie vegetal em estudo, foram utilizados fibroblastos da linhagem 3T3. A escolha pelos fibroblastos para os demais testes de viabilidade celular foi embasada no teste *scratch assay* de cicatrização *in vitro* que utiliza essas mesmas tipagem de células.

Os extratos etanólico folhas, galhos e caule da *Jatropha gossypifolia* L., previamente dissolvido em Etanol, foram diluídos em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços (100 μ L/

poço). As células (1.5×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de cultura (RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina e 40 ug/mL de gentamicina). Portanto, as células foram tratadas com concentrações que variam a partir de 62,5, 125 ou 250 ug /mL em meio de cultura durante 24 h em estufa a 5% de CO₂ 37 °C. Após a incubação, substitui-se o meio anterior por um RPMI fresco, recipiente contendo 100 µL da solução de MTT (500 µg/mL).

Após 4 horas de incubação adicional em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado a solução de dimetilsulfóxido (150 µL/poço). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorvância do produto foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a 595 nm (SILVA; ALBUQUERQUE, 2011).

4.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

As cepas avaliadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922). A avaliação dos extratos e frações da *J. gossypifolia* foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2012).

A escolha desses microrganismos foi com base num estudo recente de revisão integrativa cujo objetivo foi identificar a microbiota mais frequentes em feridas cirúrgicas, revelando que os microrganismos mais frequentes são *Staphylococcus aureus* com 39%, *Escherichia coli* com 30,4%, *Pseudomonas aeruginosa* 19,6%, *Staphylococcus epidermidis* com 17%, *Klesbsiella* spp 12,5% e *Enterobacter* spp 10,7% (SANTOS et al., 2016).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada de acordo com a metodologia descrita pelo protocolo baseado no Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), utilizando microplacas de poliestireno estéreis, contendo cada uma delas 96 poços, com 12 colunas (1 a 12), sendo que as 3 últimas (10^a, 11^a e 12^a colunas) correspondem, respectivamente, ao controle negativo (CN), controle de crescimento (CC) e controle

de esterilidade da placa (CE). As 8 linhas da placa são codificadas pelas letras de A a H e inicialmente, todos os poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI). Um volume de 100 µL da solução estoque, na concentração de 2000 µg/mL, das diversas amostras vegetais (EEF, EEC, EEG e suas frações) testadas foram inoculadas, em triplicata, nas colunas de 1 a 9 da linha A, alcançando uma concentração final de 1000 µg/mL (CLSI, 2012).

Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização o mesmo volume foi transferido para a linha C, reproduzindo este procedimento até a linha H, desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se concentrações decrescentes do extrato, metade da concentração para cada linha a partir da linha B, em µg/mL (1000 µg/mL - linha A; 500 µg/mL - linha B; 250 µg/mL - linha D, e assim continuamente, até a concentração final de 7,8 µg/mL na linha H) (CLSI, 2012).

Posteriormente, em cada orifício foram adicionados 5 µL de inóculo microbiano. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril e a suspensão bacteriana foi determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluída numa proporção de 1:10 para se conseguir uma diluição 10^7 UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias entre 5×10^5 UFC/mL e 5×10^4 UFC/poço, ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo (CLSI, 2012; FREITAS et al., 2013).

Os poços das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. O orifício 10 foi utilizado para controle negativo (CN), avaliado por meio da atividade inibitória do diluente DMSO a 2%, o orifício 11 utilizado para o controle de crescimento (CC) usado avaliar viabilidade microbiana, foi plaqueado com caldo de cultivo e inóculo microbiano de 5 µL. No orifício 12 destinado para o controle de esterilidade (CE), utilizou-se apenas o caldo de cultivo BHI.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 horas e após este período foram adicionados 20 µL de cloreto 2,3,5 trifênil tetrazolium (TTC) a 5% em cada poço. O TTC é um corante incolor na forma oxidada e torna-se vermelho quando reduzido por ação enzimática dos microrganismos vivos, originando o trifênil formazam, que torna as células vermelhas. Deste modo a mudança de incolor para vermelho indica a presença de microrganismo vivo, o que revela ausência de atividade das amostras testadas. No entanto, ausência de coloração, significa

resultado positivo para inibição das amostras sobre as bactérias avaliadas (CLSI, 2012; FREITAS, 2013).

4.3.6 Potencial cicatrizante *in vitro* utilizando *Scratch assay*

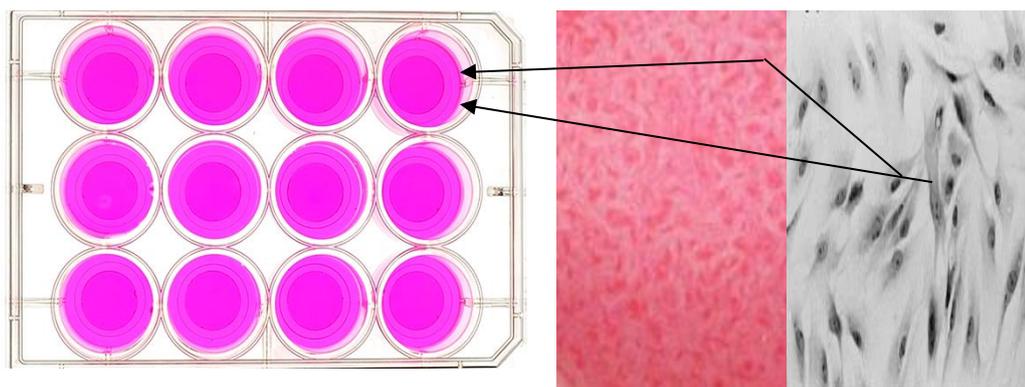
A proliferação de fibroblastos foi estudada *in vitro* utilizando um ensaio com fibroblastos da linhagem 3T3 de tecido de embrião de camundongo. A designação “3T3” se refere ao fato de que esta linhagem celular cresceu originalmente em uma concentração de 3×10^5 células por cm^2 (primeiro “3”), com um intervalo de transferência (“T”) de 3 dias (segundo “3”) (ABREU, 2008).

Optou-se pela ensaio *in vitro* e não *in vivo*, tomando como base que hoje há um controle mais rigoroso em relação ao uso de animais também levando em conta o uso dos três Rs (3 Rs) Reduction, Refinement e Replacement, significando a redução no número de animais possíveis, refinamento ou aperfeiçoamento dos métodos e a reposição ou substituição dos testes, e que teste *in vitro*, apresentam vantagens tais como limita o número de variáveis experimentais, obtém dados significativos de forma mais “fácil”, menor período de execução e mais acessível (FRANCO et al., 2014).

Inicialmente, fibroblastos foram adicionados às garrafas de cultivo estéreis (poliestireno) contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soros fetal bovino (SBF) e colocadas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 24 horas, para alcançarem alta confluência. Após a constatação da confluência da monocamada, realizou-se as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas.

Após crescimento e serem tripsinizadas, os fibroblastos foram semeados em placas de 12 poços (Figura 6) e mantidos em estufa a 5% de CO_2 a 37°C , até atingirem confluência máxima. Constatado a confluência, retirou-se o meio de cultura e foi realizado o ensaio de *Scratch* fazendo a ferida, ou seja, um risco em linha reta na região mediana da placa com a ponta da pipeta de $200\ \mu\text{L}$. Este procedimento ocasiona uma ruptura entre as células, causando uma lesão mecânica. Para a remoção dos debridis resultantes da lesão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

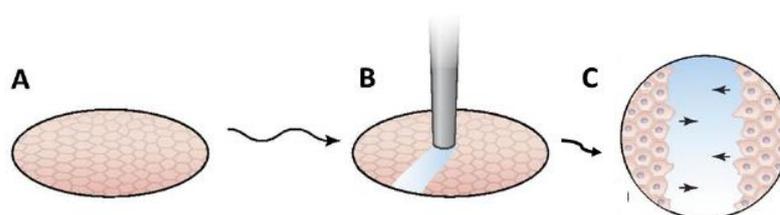
Figura 6: Placa de 12 poços com cultura de fibroblastos



Fonte: FRANÇA, 2015 com adaptações.

Para avaliação do potencial cicatrizante *in vitro* foi utilizada a análise de migração celular por meio do método *Scratch assay* (Figura 7). Este ensaio está fundamentado, na criação de uma área de descontinuidade de uma monocamada celular por raspagem (um risco), ou seja, uma ferida e o acompanhamento do fechamento desta observando crescimento e migração de células em direção ao centro, sendo monitorada por mensuração utilizando-se microscópio invertido de fase (CORY, 2011).

Figura 7: Esquema da técnica Ensaio da raspagem (*Scratch assay*): VEDULA et al., 2013.



$$\% \text{ Convergência da ferida} = \frac{(A-B) \times 100\%}{A}$$

A

Fonte: Adaptado de VEDULA et al., 2013.

Em seguida, as placas receberam os extratos de *Jatropha gossypifolia* L. na concentração de 125 µg/mL, estabelecida esta concentração após resultados do MTT com as frações das folhas e caules da referida planta, cujos valores na concentração 125 µg/mL evidenciou viabilidade celular e ausência de atividades citotóxicas, isto é,

acima de 90% da viabilidade, utilizando os tempos de migração em horas que foram de 0, 12 e 24 horas (OLIVEIRA, 2009).

As imagens foram captadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase, utilizando *software* NIS Elements F 3.2 e foram obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio com marcadores de ponta fina. Assim, a migração dos fibroblastos foi avaliada por meio dessas fotografias, utilizando-se o programa Adobe photoshop CS5, no qual mensurou-se a área lesional nos momentos 0, 12, 24 horas.

5 - RESULTADOS

5.1 Prospecção Fitoquímica

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas, galhos e caule da *J. gossypiifolia* L. evidenciou a presença de metabólitos secundários tais como taninos, esteroides, flavonoides, flavonas e xantonas, sendo mais evidenciados nos extratos das folhas, conforme Quadro 3 e Figura 8A e 8B.

Quadro 3. Triagem fitoquímica com Extratos Etanólicos das folhas (EEF), galhos (EEG) e Caule (EEC) da *J. gossypiifolia* L.

| Grupo químico | Avaliação Qualitativa | | |
|---------------------|-----------------------|-----|-----|
| | EEF | EEG | EEC |
| Taninos | + | + | + |
| Esteroides | + | + | + |
| Flavonoides | + | + | + |
| Flavonas e Xantonas | + | - | - |
| Saponinas | - | - | - |
| Alcaloides | - | - | - |

Legenda: (-) ausente; (+) presente; Fonte :Mattos, 2009.

Figura 8A. Triagem Fitoquímica para taninos.



Fonte: Autor, 2016.

Mudanças para coloração verde escuro, verde claro, EEF, EEC e EEG, respectivamente, após a adição de 3 gotas de FeCl_3 1%:

Figura 8B. Triagem fitoquímica para Esteroides

Fonte: Autor, 2016.

Adicionado 1 mL de $C_4H_6O_3$ 2%, agitou-se e em seguida 1 mL de H_2SO_4 , agitou-se novamente cada frasco, que resultou em verde evanescente (EEF), verde claro (EEG) e verde mais claro (EEC).

Após a triagem fitoquímica dos extratos etanólicos decidiu-se implementar este mesmo procedimento com as frações dos extratos das folhas e caules da espécie vegetal *J. gossypifolia* para averiguar a correlação entre as frações e os metabólitos presentes em cada uma delas (Quadro 4 e Figura 9).

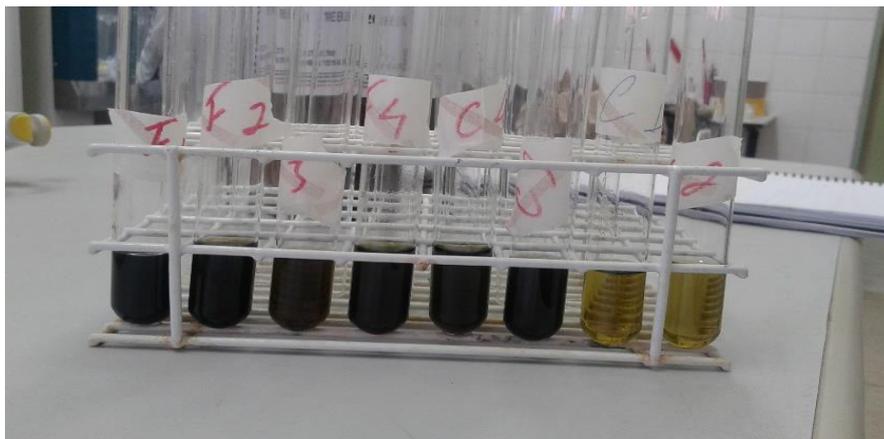
Quadro 4. Triagem fitoquímica das frações do Caule (EEC) e das folhas (EEF) da *J. gossypifolia* L.

| Grupo químico | Avaliação Qualitativa | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|----|----|----|--------------------|----|----|----|
| | Frações do Caule | | | | Frações das Folhas | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | F1 | F2 | F3 | F4 |
| Taninos | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Esteroides | + | - | + | + | + | - | + | + |
| Flavonoides | + | - | - | - | + | + | - | - |
| Flavonas e Xantonas | + | + | + | - | - | + | - | - |
| Saponinas | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Alcaloides | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cumarinas | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Antraquinonas | - | - | - | + | - | - | - | + |

Fonte: Autor, 2016. (MATOS, 2009).

Legenda: (-) ausente, (+) presente ; 1 = fração metanólica; 2 = fração acetato de etila; 3 = fração clorofórmica; 4= fração hexânica.

Figura 9: Manejo da Triagem Fitoquímica das frações da *J. gossypifolia* L.



Fonte: Autor, 2016.

Com relação ao extrato dos galhos estes não foram submetidos ao fracionamento, por apresentar baixa viabilidade celular no ensaio do MTT, o que justificou o descarte do mesmo, tendo em vista, que a utilização deste, acarreta danos para a saúde do homem.

5.2 Rendimento dos extratos etanólicos e suas frações

Os extratos etanólico das folhas e caules foram fracionados, o extrato etanólico dos galhos foi separado por apresentar-se severamente tóxico, de acordo com o MTT realizado com os extratos, motivo pelo qual ele foi descartado da continuidade deste estudo.

Após evaporação do solvente residual, obteve-se os extratos EEF e EEC. O rendimento de cada extrato encontra-se descrito na Tabela 1, na qual observa-se que o EEF apresentam maior rendimento quando comparado ao EEC. A fração do EEF e EEC que apresentou maior rendimento foi a metanólica.

O rendimento de uma extração ou de um fracionamento é calculado a partir da relação percentual entre a massa de material vegetal utilizada no processo e a massa do extraído seco. Dessa forma, partindo-se de 220 g de folhas secas e 310 g de caule secos da droga vegetal, foram obtidos 9,90 g de EEF e 9,60 g EEC, rendimento de 4,5 % das folhas e 3,1 % do caule em relação à droga vegetal.

Tabela 1: Rendimento dos extratos etanólicos de *J. gossypiifolia* L. suas frações

| Extratos | Rendimentos (g) |
|--------------------------------|------------------------|
| EEF | 9,90 |
| Fração hexânica do EEF | 0,38 |
| Fração clorofórmica do EEF | 0,59 |
| Fração acetato de etila do EEF | 0,16 |
| Fração metanólica do EEF | 1,97 |
| EEC | 9,60 |
| Fração hexânica do EEC | 1,02 |
| Fração clorofórmica do EEC | 2,04 |
| Fração acetato de etila do EEC | 0,44 |
| Fração metanólica do EEC | 2,62 |

Fonte: Autor, 2016

5.3 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método MTT

Este ensaio foi realizado pelo método do MTT frente a macrófagos J774, para avaliar possível citotoxicidade dos extratos etanólicos brutos (Tabela 2 e Figura 10).

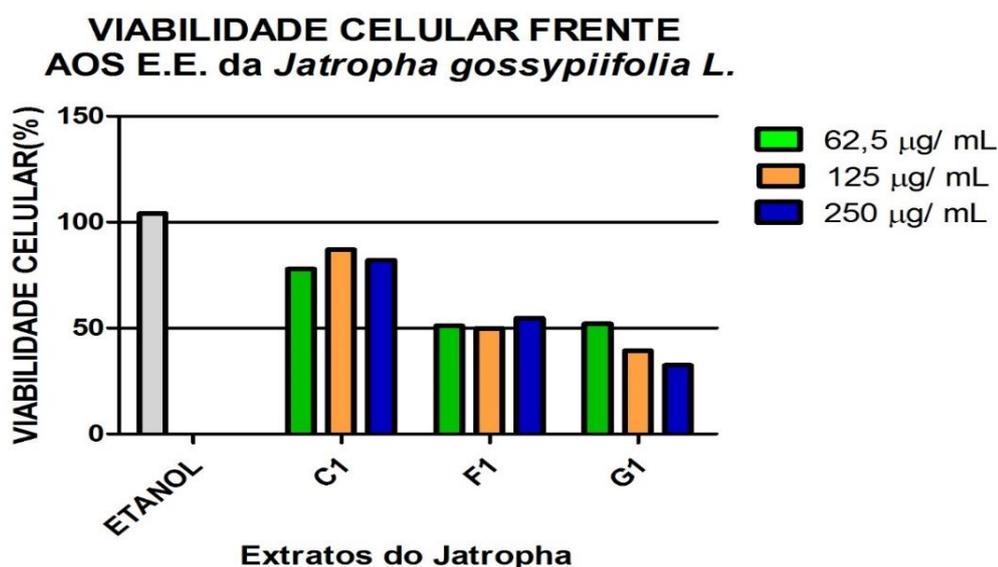
Tabela 2: Percentual de células viáveis por concentrações no ensaio de MTT

| Grupo | Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilidade Celular % |
|-----------------------|--|------------------------------|
| Veículo Etanol | -- | 104 \pm 2,86 |
| | 62,5 | 77,9 \pm 4,57 |
| C1 | 125 | 87 \pm 2,87 |
| | 250 | 82 \pm 6,49 |
| | 62,5 | 51 \pm 2,04 |
| F1 | 125 | 49,98 \pm 2,97 |
| | 250 | 54,74 \pm 0,75 |
| | 62,5 | 52,12 \pm 1,59 |
| G1 | 125 | 39,29 \pm 10,10 |
| | 250 | 32,44 \pm 3,58 |

Fonte: Autor, 2016. Os extratos etanólicos do Caule (C1), extrato etanólico da folha (F1) e extrato etanólico dos galhos (G1).

No referido ensaio foi utilizado a escala de citotoxicidade proposto por Sletten e Dahl, que classifica segundo os níveis de viabilidade celular em porcentagens da seguinte forma: não citotóxico quando igual ou maior que 90% da viabilidade celular; levemente citotóxico de 80 a 89%; moderadamente citotóxico 50 a 79% e severamente citotóxico menor que 50% (OLIVEIRA, 2009).

Figura 10: Viabilidade celular dos extratos etanólicos de *Jatropha gossypifolia*.



Fonte: Autor, 2016.

O extrato etanólico dos galhos da *Jatropha gossypifolia* L. causou lise celular em mais de 50% nas três concentrações testadas, inviabilizando o prosseguimento do estudo com essa amostra. Por isso, optou-se por realizar um novo teste MTT com as frações hexânicas, clorofórmicas, acetato de etila e metanólicas do caule e das folhas, cujo resultados estão descritos na Tabela 3, Figuras 11 e 12.

Após resultado dos extratos brutos foi realizado o teste de viabilidade celular pelo método do MTT, com as frações das folhas e do caule utilizando fibroblastos 3T3. Estas células desempenham um papel fundamental para a produção de colágeno, que é uma proteína de importância estrutural na formação da matriz extracelular e abundante no corpo humano e no reino animal. Portanto, os fibroblastos são as células responsáveis pela formação da matriz extracelular (CAMPOS, 2007). A escolha pelos fibroblastos 3T3, se apoiou na necessidade de realização do *Scracth assay*, que é feito com fibroblastos desta linhagem.

Tabela 3. Efeito das frações dos extratos das folhas e do caule da *Jatropha gossypifolia* L. na viabilidade celular dos fibroblastos 3T3.

| Amostra | Concentrações (µg/mL) | Viabilidade Celular % |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| C1 - fração metanólica | 62.5 | 108 ± 3,59 |
| | 125 | 117,8 ± 6,79 |
| | 250 | 132,8 ± 7,83 |
| C2 – fração acetato | 62.5 | 115,3 ± 3,8 |
| | 125 | 88,53 ± 4,02 |
| | 250 | 67,2 ± 1,63 |
| C3 – fração clorofórmica | 62.5 | 93,03 ± 6,86 |
| | 125 | 110,2 ± 1,93 |
| | 250 | 147,7 ± 6,64 |
| C4 – fração hexânica | 62.5 | 97,78 ± 2,88 |
| | 125 | 92,42 ± 5,51 |
| | 250 | 67,85 ± 5,19 |
| F1 - fração metanólica | 62.5 | 103,80 ± 2,75 |
| | 125 | 128,91 ± 4,95 |
| | 250 | 225,81 ± 13,39 |
| F2 – fração acetato | 62.5 | 118,52 ± 4,87 |
| | 125 | 105,52 ± 3,62 |
| | 250 | 99,29 ± 3,6 |
| F3 – fração clorofórmica | 62.5 | 89,46 ± 7,24 |
| | 125 | 79,28 ± 4,22 |
| | 250 | 45,22 ± 0,69 |
| F4 – fração hexânica | 62.5 | 87,01 ± 2,1 |
| | 125 | 76,11 ± 1,0 |
| | 250 | 78,72 ± 3,74 |

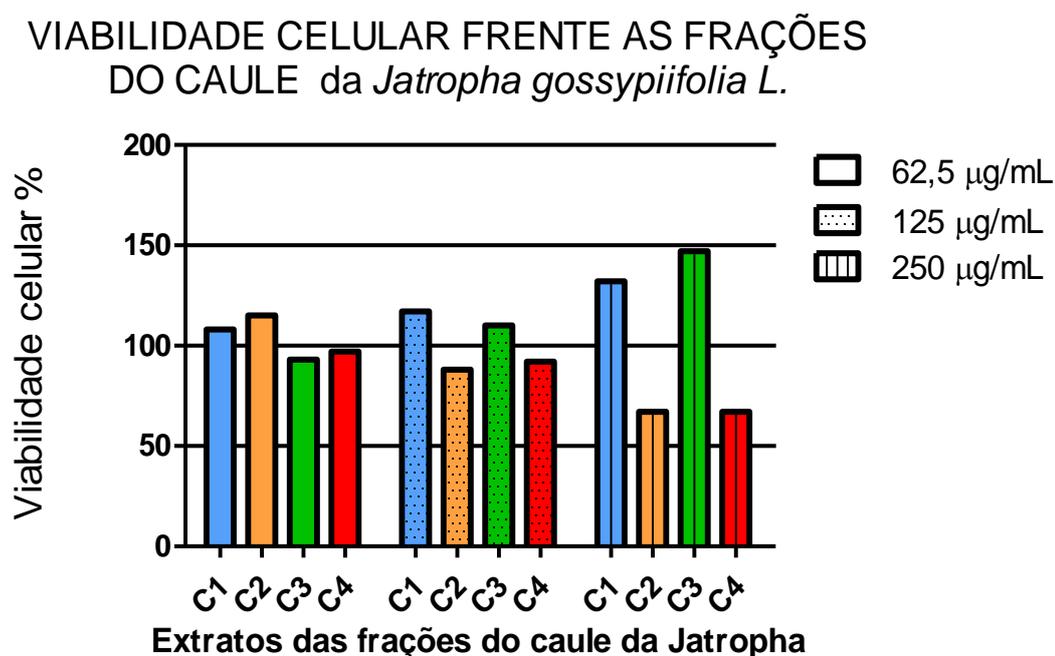
Fonte: Autor, 2016.

O efeito das frações obtidas de folhas e caules da *Jatropha gossypifolia* L. na viabilidade dos fibroblastos 3T3 (Figura 11) demonstra que as frações metanólica e clorofórmica do caule potencializaram a viabilidade. No tratamento com essas frações observou-se que à medida que as concentrações foram aumentando também ocorreu a proliferação da viabilidade dessas células. É importante frisar que, na concentração de 250 µg/mL foi capaz de aumentar a viabilidade dos fibroblastos em 30% e 45%, respectivamente.

As frações em acetato de etila e hexânica na concentração 62,5 µg/mL não mostraram atividade citotóxicas nessas células. Contudo, estas frações diminuíram a viabilidade celular à medida que suas concentrações foram aumentadas. Assim na

concentração de 250 µg/mL foram obtidos índices abaixo de 70% sendo classificado como moderadamente citotóxico. Por isso, optou-se dar prosseguimento ao estudo utilizando a concentração 125 µg/mL pois foi a concentração que melhor apresentou resultados na viabilidade celular.

Figura 11: Viabilidade celular das frações do caule

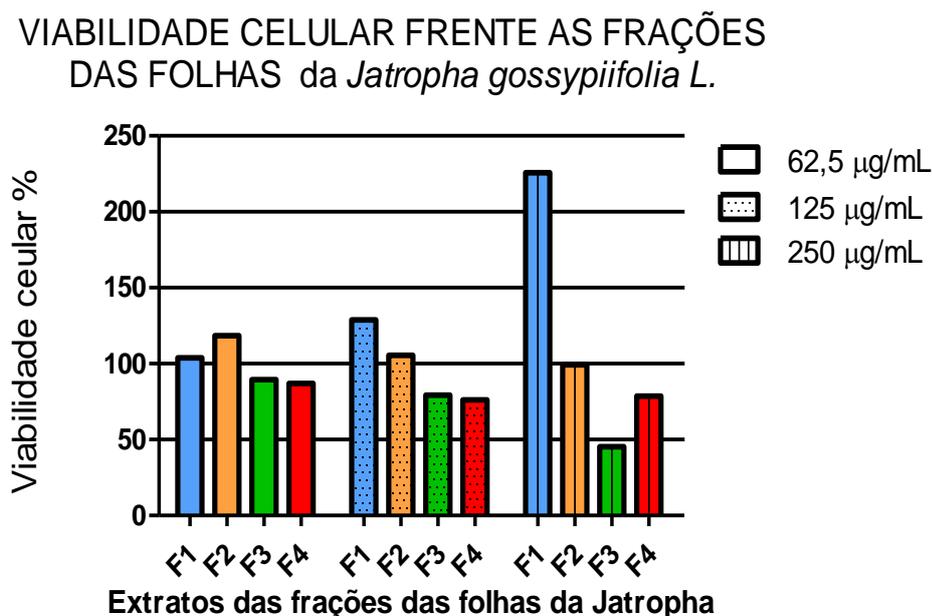


Fonte: Autor 2016.

Legenda: C equivale as frações do caule; C1 equivale a fração metanólica; C2 equivale a fração acetato de etila; C3 equivale a fração clorofórmica e C4 a fração hexânica.

A viabilidade dos fibroblastos foi observada em todas as concentrações das frações metanólica e acetato de etila das folhas. No entanto, nas frações clorofórmica e hexânica a citotoxicidade foi evidenciada (Figura 12). A viabilidade dos fibroblastos foi observada em todas as concentrações das frações metanólica e acetato de etila das folhas. No entanto, nas frações clorofórmica e hexânica a citotoxicidade foi evidenciada (Figura 12).

Figura 12: Viabilidade celular das frações das folhas.



Fonte: Autor 2016.

Legenda: F equivale as frações das folhas; F1 equivale a fração metanólica; F2 a fração de acetato de etila; F3 a fração clorofórmica e F4 a fração hexânica

5.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada, inicialmente, com os extratos (Tabela 4) e foi repetida com as frações oriundas destes extratos.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima/CIM dos extratos brutos da *Jatropha gossypifolia* L.

| Amostras testadas | CIM (µg/mL) | | | |
|-------------------|------------------|-----------------------|----------------------|----------------|
| | Microrganismos | | | |
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| FOLHAS | | | | |
| Extrato Etanólico | 500 | 500 | 500 | - |
| GALHOS | | | | |
| Extrato Etanólico | 1000 | 250 | 500 | - |
| CAULE | | | | |
| Extrato Etanólico | 1000 | 500 | 1000 | - |

Fonte: Autor, 2016.

Um grande número de bioensaios tem sido utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas, com a finalidade de encontrar o melhor agente antimicrobiano. Dentre os testes disponíveis para atividade antimicrobiana encontra-se a microdiluição em caldo (CLSI, 2012). A CIM realizada com as frações oriundas dos extratos em etanol das folhas e caules revelou que as frações não foram capazes de apresentar atividade inibitória para as bactérias no teste de microdiluição em caldo. (Tabela 5)

Tabela 5. Concentração inibitória mínima das frações das folhas e do caule da *Jatropha gossypifolia* L.

| Frações | Microrganismos/CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|----------------------------------|---|-----------------------|----------------------|----------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| Partes da planta (FOLHAS) | | | | |
| Metanólica | - | - | - | - |
| Acetato de etila | - | - | - | - |
| Clorofórmica | - | - | - | - |
| Hexânica | - | - | - | - |
| Partes da planta (CAULES) | | | | |
| Metanólica | - | - | - | - |
| Acetato de etila | - | - | - | - |
| Clorofórmica | - | - | - | - |
| Hexânica | - | - | - | - |

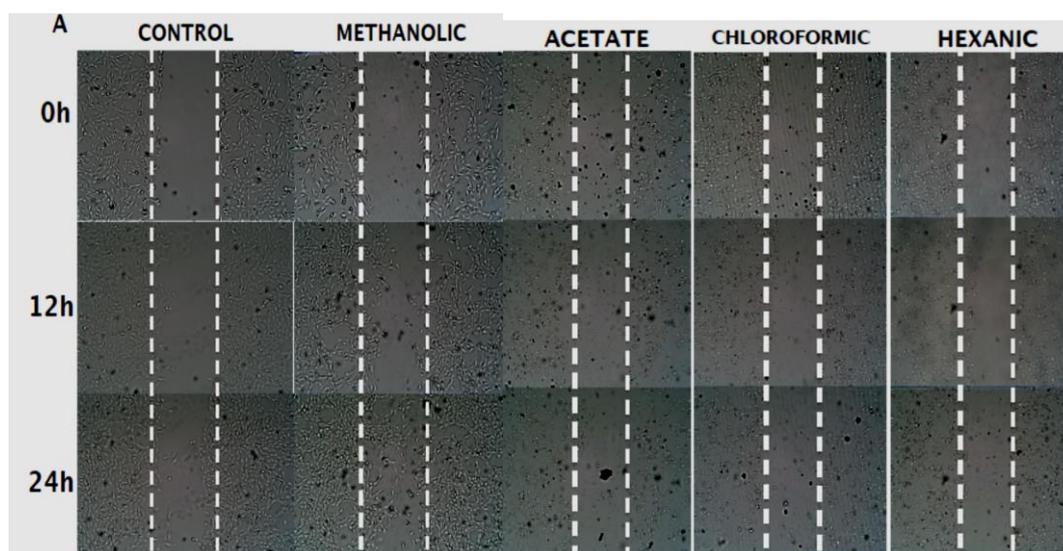
Legenda: (-) Não houve inibição. Fonte: Autor, 2016.

5.5 - Potencial cicatrizante in vitro utilizando Scratch assay

A migração dos fibroblastos é um passo chave para a cicatrização adequada das feridas, por desempenharem um papel importante na produção e deposição de componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno (CHEN, et al., 2014; ZHANG, et al., 2016). Assim, decidiu-se avaliar os efeitos das frações metanólica, acetato de etila, clorofórmica e hexânica das folhas e caules da *Jatropha gossypifolia* L. na migração dos fibroblastos.

Para isso, foi usada a técnica *scratch assay* que é um método de fácil manejo e baixo custo, além de quantificar a migração celular *in vitro* (LIANG; PARK; GUAN; 2007). As Figuras 13 e 14 , mostram os efeitos das frações das folhas e do caule de *Jatropha gossypifolia* L. na migração de fibroblastos. Na Figura 13 os fibroblastos tratados com a fração metanólica das folhas de *Jatropha gossypifolia* L. a 125 µg / mL exibiram um aumento na migração nos tempos de 12 h e 24 h quando comparados com células tratadas com meios de cultura.

Figura 13: Efeito das frações das folhas na migração dos fibroblastos pela técnica de *Scratch assay*.



Fonte: Autor, 2016

A fração metanólica das folhas de *Jatropha gossypifolia* L. acelera a migração dos fibroblastos 3T3. Estes fibroblastos foram semeados em placas de 12 poços de um dia para o outro e as células foram arranhadas e incubadas com fração metanólica (125 µg/mL) ou meios de cultura. Observa-se ainda na Figura 13 que a fração metanólica pode ser uma alternativa viável, para investir em novas pesquisas que proporcione a segurança necessária para o uso desta espécie vegetal no tratamento de feridas. Este mecanismo de migração celular está melhor visualizado na Tabela 6 e na Figura 14.

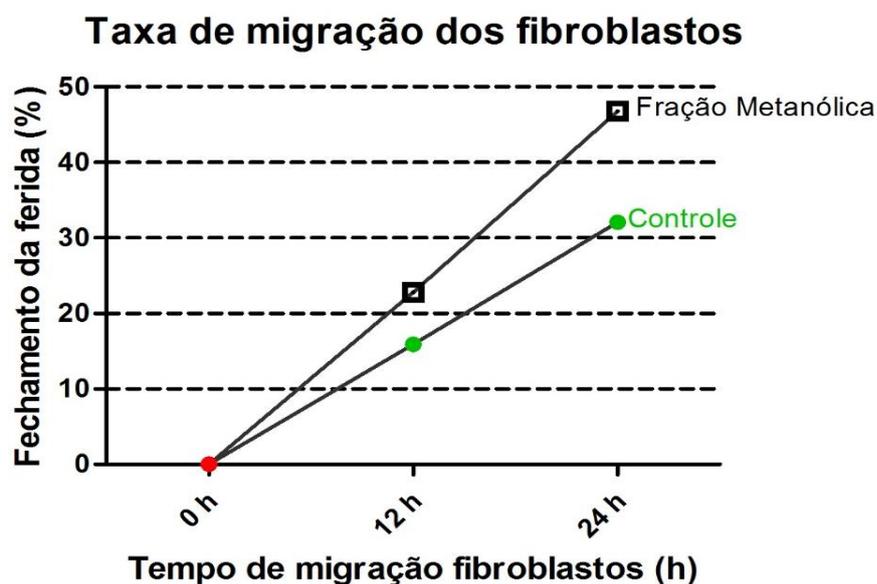
Tabela 6 –Efeito da fração metanólica das folhas na migração dos fibroblastos 3T3 no decorrer do tempo em horas.

| Tempo | Controle | | | Fração metanólica das folhas | | |
|-------|----------|------|---|------------------------------|------|---|
| | Média | Sem | N | Média | Sem | N |
| 12h | 15,89 | 0,45 | 6 | 22,8 | 0,71 | 4 |
| 24h | 32,05 | 1,46 | 6 | 46,76 | 1,32 | 4 |

Fonte: Autor, 2016

A análise da taxa de migração foi expressa como uma porcentagem de migração. Teste t de Student, *** p <0,001 (controle versus fração metanólica).

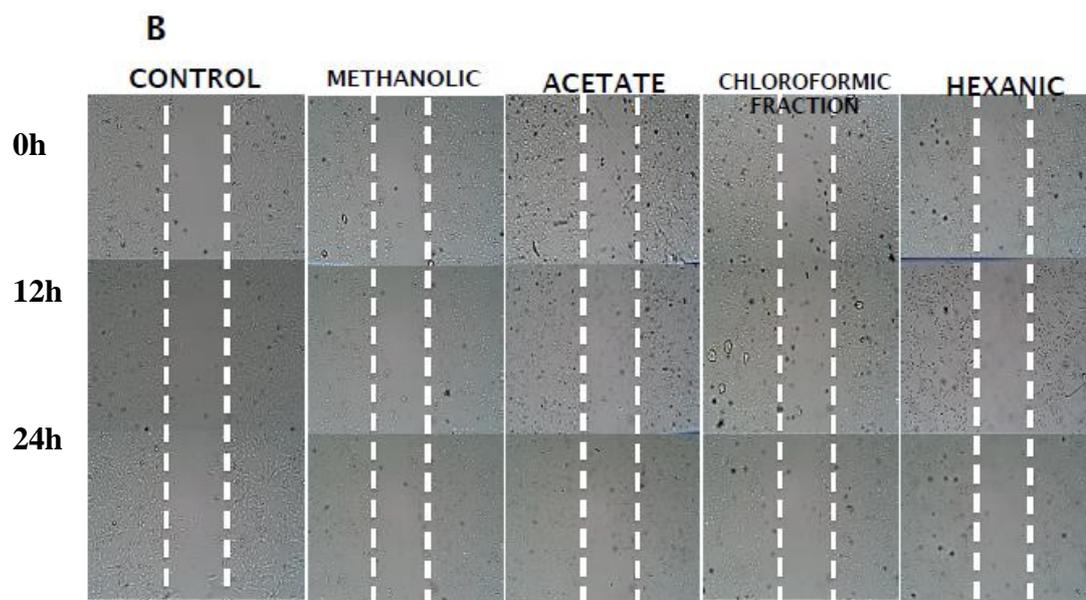
Figura 14: Análise da taxa de migração



Fonte: Autor, 2016

A Figura 15 refere-se a ação das frações dos caules na migração dos fibroblastos, os quais não apresentaram resultados significativos em nenhuma dessas frações. Constatou-se que os tratamentos com as frações conduziram mudanças nestas células inibindo o processo de migração, exceto para a fração metanólica.

Figura 15: Efeito das frações do caule na migração dos fibroblastos.



6 - DISCUSSÃO

Identificou-se na *J. gossypiifolia* do presente estudo os metabólitos secundários taninos, flavonoides, esteroides e cumarinas. Estes achados corroboram com o estudo de Mariz et al. (2010). Já testes de prospecção fitoquímica realizados por Hirota et al. (2010), com plantas do mesmo gênero identificaram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides e saponinas. Outro estudo encontrou metabólitos secundários como taninos, flavonoides, esteroides e saponinas nas diferentes partes da *J. gossypiifolia* o que corrobora com a presente pesquisa (FÉLIX-SILVA et al., 2014). Entretanto, metabólitos como terpenoides, quinonas, resinas, lactonas, lignanas relatados por Hirota et al. (2010) e Félix-Silva et al. (2014) não foram encontrados nos extratos estudados nesta pesquisa.

Santos (2014) relata que o gênero *Jatropha* possui vários metabólitos secundários como ácidos orgânicos, alcaloides, carotenos, fenois, fitoesteroides, flavonoides, glicosídeos, lactonas (cumarinas), lignanas, mucilagens, pectinas, polissacarídeos, quinonas, saponinas, taninos e terpenos, o que o caracteriza como um gênero que apresenta diferentes atividades biológicas, dentre elas, a antimicrobiana, anti-inflamatória e adstringente. Outros estudos fitoquímicos constataram a presença de açúcares, alcaloides, aminoácidos, esteroides, cumarinas, lignanas, flavonoides, proteínas, saponinas, taninos e terpenos nos extratos brutos (DEVAPPA et al., 2010; SABANDAR et al., 2013).

A presença de taninos nas frações das folhas confirma o forte traço deste metabólito na referida espécie vegetal. Na triagem fitoquímica dos extratos da *J. gossypiifolia* foram identificados taninos em todos os extratos, porém isto foi mais evidente no das folhas. Comparando-se os resultados do extrato etanólico das folhas com as frações provenientes deste extrato (Quadros 3 e 4), pode-se observar sua presença em todas as frações desta parte da planta.

Estes metabólitos secundários são estruturas complexas de baixo peso molecular e que possuem atividades biológicas marcantes e apresentam baixas concentrações (BERG; LUBERT, 2008). Eles são essenciais para a sobrevivência e continuidade das espécies vegetais, pois têm como funções a proteção contra ataques de herbívoros, ataque de patógenos, competição com outros vegetais, favorece a atração a polinizadores dentre outras. É provável que essa importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para seres humanos (PEREIRA,

2012). Assim sendo, os taninos têm ação antioxidante, antisséptica, cicatrizante e têm sido atribuídas a eles muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas, ação antitumoral e atividades anti-infectivas (MONTEIRO et al., 2005).

Pesquisa realizada mostrou que em plantas deste gênero a presença de alcaloides tem sido relatada por vários autores (FÉLIX SILVA et al., 2014), o que contraria os resultados aqui encontrados, cujos teste foram negativos. É importante salientar que foram repetidos os testes para detecção desse metabólito secundário, porém os resultados foram mantidos.

Quanto aos esteroides estes foram encontrados em todos os extratos e nas frações, no entanto, não foram identificados naquelas em acetato de etila. Estudo realizado por Almeida (2016) também identificou esse metabólito em folhas e caules da espécie *J. gossypifolia*. Estes pertencem à maior classe de metabólitos secundários, os quais em geral são insolúveis em água, atuam como toxinas e como repelentes para muitos insetos e mamíferos herbívoros. O interesse terapêutico por essa classe dá-se pela presença do sitosterol e estigmasterol, que servem de matéria-prima, principalmente, para a produção de anticoncepcionais, anabolizantes e anti-inflamatórios (FRACARO et al., 2004; CASTEJON, 2011).

Já a identificação de flavonoides, flavonas e xantonas na espécie vegetal em estudo foi observada, paralelamente, nas frações em metanol do caule e acetato de etila das folhas. Estes achados corroboram com aqueles encontrados em estudo anterior (SABANDAR et al., 2013). Essas classes de metabólitos apresentam importantes atividades terapêuticas como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios e antivirais (ARAÚJO, 2008). Outra atividade relacionada aos flavonoides é sua ação antioxidante devido à presença de hidroxilas aromáticas. Alguns flavonoides como rutina e quercetina têm mostrado melhor atividade antioxidante do que o ácido ascórbico que é considerado um potente redutor. Os flavonoides possuem ainda propriedade antibiótica provavelmente relacionada à capacidade de formar complexos com proteínas solúveis e com a parede de células bacterianas (FLAMBÓ, 2013).

Com a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e das frações da *Jatropha gossypifolia* L. evidenciou-se a presença de metabólitos secundários de grande importância biológica. No entanto, os resultados de diferentes prospecções podem sofrer variações e discrepâncias devido às técnicas de separação empregadas, os solventes utilizados e à sua polaridade. Por isso, diferentes

resultados podem ocorrer em comparações qualitativas e até mesmo quantitativas dos metabólitos secundários de uma mesma espécie, sendo isto relacionados ao solo, período climático, horário da coleta de material, parte utilizada da planta dentre outros fatores (SILVA et al., 2011).

A massa total de folhas colhido foi de 220 gramas das quais o rendimento foi de 4,5% que correspondem a 9,9 gramas em fracionamento realizado nesse estudo houve perda de 68,7% da massa, isto é, 6,8 gramas, restando desse total 3,1 gramas para realização dos testes. Nesse processo das amostras citadas 21,5% delas são solúveis em solventes orgânicos mais polares (frações metanólica e acetato de etila) e 9,7% são solúveis em solventes menos polares (frações hexânica e clorofórmica), indicando que grande parte dos constituintes presentes nas amostras apresenta maior polaridade e conseqüentemente, maior solubilidade nesse tipo de solvente. Resultado confirmado por um estudo feito por VEIGA (2008), demonstrando que suas amostras são solúveis em solventes mais polares.

Em relação ao extrato bruto do caule este possuía 310 gramas dos quais o rendimento foi de 3,1% que correspondem a 9,6 gramas. No processo de fracionamento das 9,6 gramas, foram perdidos 36,20 % que corresponde a 3,48 gramas restando 6,12 gramas para realização dos testes. Observou-se que houve resultado equiparado para solventes polares e apolares, cerca de 31,90% da amostra são solúveis em solventes mais polares e 31,90% menos polares.

Quanto à citotoxicidade, inicialmente, os extratos brutos foram testados frente aos macrófagos J774, que apresentaram resultados levemente citotóxico, para àqueles procedentes dos caules nas concentrações 62,5; 125 e 250 µg/mL. Já os oriundos das folhas, nas mesmas concentrações obtiveram resultados moderadamente citotóxico, enquanto o resultado dos galhos, também nas mesmas concentrações evidenciou citotoxicidade severa, com mais de 50% de inviabilidade, o que impossibilitou o prosseguimento do estudo com essa parte da planta.

Os dados da presente pesquisa contrariam o estudo de Silva (2014) ao realizar a citotoxicidade frente a células HEK-293 nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL oriundas do extrato bruto das folhas de *J. gossypifolia* obtido por decocção, o qual não foi evidenciado efeito citotóxico. Sendo, portanto, considerado com 100 % de viabilidade celular.

Os testes de viabilidade celular com as frações dos extratos das folhas e caules da *J. gossypifolia* foi realizado com fibroblastos 3T3, devido ao fato de que os

fibroblastos são a maior fonte de proteínas na matriz extracelular e responsáveis pela produção de colágeno, favorecendo a cicatrização por meio do processo de neoangiogênese. Nestes testes foi observado que, as frações metanólica e acetato de etila, nas concentrações de 62,5; 125 e 250 µg/mL apresentaram-se atóxicas, isto é, a viabilidade celular foi maior que 90%, enquanto a fração clorofórmica na concentração de 250 µg/mL apresentou resultado severamente tóxica, com viabilidade menor que 50%. Praticamente, todas as frações do caule não apresentaram citotoxicidade, exceto a acetato de etila e a hexânica nas concentrações 250 µg/mL consideradas moderadamente citotóxica com percentagem entre 50 a 79% de viabilidade (OLIVEIRA, 2009).

Conforme mostrado na Figura 12, a concentração de 250 µg/mL da fração clorofórmica induziu um declínio no número de células viáveis, levando a uma redução de 50% ($p < 0,001$) da viabilidade celular, bem como, para a fração hexânica, que diminuiu a viabilidade dos fibroblastos 3T3 em todas as concentrações testadas.

Paralelamente, estudos toxicológicos pré-clínicos em ratos tratados com o extrato etanólico de partes aéreas da *J. gossypifolia* demonstraram toxicidade aguda oral baixa, no entanto seu uso prolongado em modelo animal de toxicidade crônica revelou danos hepáticos, pulmonares e renais graves. Esses autores indicam que mais estudos devem ser realizados para elucidação do potencial citotóxico desta planta (MARIZ et al., 2006; MARIZ, 2007; MARIZ et al., 2008; MARIZ et al., 2010).

Com relação à CIM observou-se na Tabela 4, que os extratos de *J. gossypifolia* induziram inibição do crescimento frente às bactérias testadas, ao tempo em que o extrato etanólico das folhas apresentou uma CIM de 500 µg/mL para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto o extrato etanólico dos galhos expôs uma inibição de 1000, 500 e 250 µg/mL, e o extrato etanólico dos caules exibiu atividade antimicrobiana em 1000, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Observou-se também que, os extratos testados não foram capazes de promover a inibição do microrganismo *E. coli*.

Outro estudo de Kumar et al. (2006) identificaram a ação antimicrobiana da *J. gossypifolia* frente a oito microrganismos testados (*Bacillus cereus* var. *mycoides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* e *Candida albicans*). Ainda, corroboram com os resultados de Santos (2014), em que extratos da *J. gossypifolia* apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Os resultados da presente pesquisa, também,

corroboram com os relatos descritos por SABANDAR et al. (2013) que afirmam que os extratos do gênero *Jatropha* possuem ação antibacteriana.

Outro estudo a respeito da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill, pertencente à mesma família da *Jatropha* concluiu que o extrato metanólico do caule apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, enquanto o extrato metanólico das folhas não apresentou atividade. Por outro lado, para ARRAIS et al. (2014), todos os extratos foram inativos nas concentrações avaliadas frente às bactérias Gram-negativas utilizadas no estudo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), resultado este que também foi observado nos ensaios antimicrobianos *in vitro*, na atual pesquisa.

Em um estudo realizado por CAMELO (2015) foi revelado que o látex da *Jatropha molíssima* apresentou atividade antifúngica baixa com CIM 512 µg/mL para *Candida albicans* e ação bacteriostática frente à *S. aureus* e *E. faecalis*, denotando-se assim, o efeito bacteriostático. Com relação sua ação frente as bactérias *P. aeruginosas* e *E. Coli* não foi evidenciado atividade antibacteriana, atribuindo-se esse fato, à estrutura da parede celular desses microrganismos, por possuírem parede celular com dupla membrana externa dificultando com isso a entrada desses metabólitos.

Outro estudo conduzido por FÉLIX et al. (2014) confirmou a atividade antibacteriana dos extratos de folhas extraídas em clorofórmio e metanol contra a *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Estudo realizado com extratos metanólicos e de acetato de etila do látex da *Jatropha multifídia* mostram que estes foram ativos contra os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.Coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida* sp. (ARANSIOLA et al., 2014). Resultado este, diferente do encontrado no presente estudo, em que ao fracionar os extratos das folhas e caules, não foi encontrado atividade antibacteriana, como observado na Tabela 5.

Hirota et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de frações em acetato de etila e metanol de *J. gossypifolia* evidenciando que houve inibição do crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* nestas frações, o que contesta os dados obtidos no presente estudo. Outra pesquisa a respeito da avaliação microbiológica de frações da *J. gossypifolia* L. realizado por Veiga (2008) demonstrou a eficácia da fração clorofórmica frente a *S. aureus* e *C. albicans* na dosagem de 250 mg/mL a 500 mg/mL,

respectivamente, o que também contraria os resultados aqui obtidos. E apresentou resistência frente a todas as frações para os microrganismos *P. aeruginosa*, *E. coli* corroborando com os dados da presente pesquisa.

Destaca-se neste estudo, no que diz respeito às frações, que possivelmente, a inibição apresentada nos extratos e ausente nas frações seja decorrente do sinergismo dos metabólitos secundários, que ao se realizar o fracionamento houve uma separação dos mesmos podendo a ação antimicrobiana ter sido inativada. Melim (2011) vem corroborar com esta evidência ao descrever que a real eficácia de uma planta medicinal pode não ser devido a um componente ativo principal, mas a ação combinada de diferentes compostos. E ainda reforça, que em muitos casos o sinergismo dos metabólitos secundários potencializa a ação biológica de inúmeras espécies vegetais.

Neste estudo a avaliação da cicatrização foi realizada utilizando-se de um bioensaio *in vitro* com o emprego do *Scratch assay*, o qual avalia a migração celular nos intervalos de tempos de 0, 12 e 24 horas. Esta técnica baseia-se na criação de uma interrupção de continuidade de uma monocamada celular, ou ferida, em que o acompanhamento do fechamento desta lesão é realizado por observação em microscópio invertido de fase (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Este método foi utilizado com intuito de observar a ação cicatrizante *in vitro* das frações dos extratos das folhas e dos caules, por meio da migração celular dos fibroblastos 3T3.

O tempo 0 (zero) consiste no momento em que se realizou a ferida/risco e não há presença de células fibroblástica, no espaço induzido. Para as frações do caule não foi observado a migração dessas células em nenhum dos tempos. Para as frações das folhas ocorreu uma migração significativa na fração metanólica (45%), sendo observado um aumento mais acentuado na taxa de migração, quando se utilizou a concentração 125 µg/mL, o que demonstra a possibilidade dessa fração ser uma alternativa para a produção de um fitoterápico para o tratamento de feridas.

7- CONCLUSÃO

O estudo com a espécie vegetal *J. gossypifolia* iniciou-se com a obtenção da matéria prima (folhas, galhos e caules), da referida planta para serem produzidos extratos e frações, os quais foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguido de investigação da atividade citotóxica, antimicrobiana e cicatrizante *in vitro*, concluindo que:

- ✓ Na obtenção dos extratos e frações da referida espécie vegetal foi observado que quanto ao rendimento a relação entre extrato e frações ficou em torno de 4,5% das folhas e 3,1% dos caules desta espécie vegetal;
- ✓ A prospecção fitoquímica identificou a presença dos seguintes metabólitos secundários taninos, esteroides, flavonoides, flavonas e xantonas;
- ✓ Os resultados do MTT indicaram que o extrato dos caules apresentou viabilidade celular de levemente citotóxico a não citotóxico, enquanto o extrato das folhas foi moderadamente citotóxico. Já os galhos o resultado foi severamente citotóxico, inviabilizando o prosseguimento do estudo com essa amostra;
- ✓ A CIM do extrato das folhas foi de 500 µg/mL para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, enquanto o extrato etanólico dos galhos expôs uma CIM de 1000, 500 e 250 µg/mL e o extrato etanólico do caule exibiu atividade antimicrobiana em 1000, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Observou-se também que, os extratos testados não foram capazes de promover a inibição do microrganismo *E. coli*.
- ✓ A CIM realizada com as frações oriundas dos extratos etanólicos das folhas e caules não apresentaram atividade inibitória para as cepas bacterianas testadas.
- ✓ A avaliação cicatrizante pelo método do *Scratch assay*, evidenciou que a fração metanólica das folhas propiciou um aumento de 45% na migração dos

fibroblastos, sinalizando a possibilidade dessa fração ser uma alternativa para a produção de um fitoterápico para o tratamento de cicatrização de feridas

- ✓ Estudos com esta espécie vegetal devem ser continuados para isolamento do princípio ativo para melhor investigação da atividade cicatrizante.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9270/1/105.pdf>. Acesso em: 12 out. 2016.

ALMEIDA, P. M. et al. Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia* L.). **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 93-100, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25983630>. Acesso em: 16 Fev. 2017.

ALMEIDA, L. C. T., et al. Potencial antimicrobiano do óleo de coco no tratamento de feridas. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v.13, n.4, p. 880-7, 2012. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/index.php/rene/article/view/4053>. Acesso em: 16 set. 2016.

ALMEIDA, P. M., et al. "Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L." **Genetics and molecular research: GMR** v. 15 n. 1, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26909961>. Acesso em: 28 set. 2016.

ANVISA. **Guia para a avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª ed. Brasília, 2012. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf. Acesso em: 17 ago. 2016.

ARAÚJO, A. K. L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouretea* sp.** Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010. Disponível em: http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/adjana_araujo.pdf. Acesso em: 20 Jan. 2017.

ARAÚJO, T. A. S. **Tânicos e flavonóides em plantas medicinais da caatinga: um estudo de etnobotânica quantitativa**. 2008. Dissertação de Mestrado. Centro de ciências da saúde. Departamento de ciências farmacêuticas. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Recife, 2008. Disponível em: http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/3231/arquivo2107_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y. acesso em: 18 mar 2016.

ARANSIOLA, M. N. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Jatropha multifida* (Ogege) sap against some pathogens. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 53-57, Jul./Aug. 2014. Disponível em: <http://iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol9-issue4/Version-1/I09415357.pdf>. Acesso em: 17 Jan. 2017.

ARRAIS, L.G. et al . Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 16, n. 2, supl. 1, p. 316-322, 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500002&lng=en&nrm=iso>. access on 06 Apr. 2017. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_033.

AQUINO, J. U. et al. Avaliação fitoterápica da *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 61-66. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000800010. Acesso em: 19 Jan. 2017.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BHAGAT, R. B. HPTLC analysis and anti-inflammatory activity of *Jatropha gossypifolia* L. root in mice and wistar rats. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 3, n. 1, p. 13-17, 2013. Disponível em: <http://www.ss-journals.com/index.php/ijpr/article/view/1231>. Acesso em: 15 Jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Portal da saúde. Brasília. 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 2 maio. 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Avaliação de Múltiplas Tecnologias em feridas Crônicas e Queimaduras**. Brasília, 2011. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/14480/2120690_109700.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040. Acesso em: 18 Jan. 2017.

BROUGHTON 2nd, G.; JANIS. J. E.; ATTINGER, C. E. The basic Science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**; v. 11, n. 7 Suppl. P. 12S-34S, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799372>. Acesso em: 17 maio 2016.

CAMELO, S. de B. **Avaliação da atividade antimicrobiana do látex de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill e *Sapium glandulosum* (L.) Morong**. 2015. 32f. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202007000100010. Acesso em: 16 ago. 2016.

CARVALHO, E. S. S. **Como cuidar de pessoas com feridas: Desafios para a prática multiprofissional**. Salvador: Atualiza Editora, 2012.

CARNEIRO, C. M.; SOUSA, F. B.; GAMA, F. N. Tratamento de feridas: assistência de enfermagem nas unidades de atenção primária à saúde. **Rev Enferm Integrada**, v. 3, n. 2, p. 494-505, 2010. Disponível em: https://www.unilestemg.br/enfermagemintegrada/artigo/V3_2/03-tratamento-de-ferias-assistencia-de-enfermagem.pdf. Acesso em: 7 Fev. 2017.

CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas**. Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. 2011. Disponível em: https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Fernanda_Castejon_1c.pdf. Acesso em: 28 ago. 2016.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000100015. Acesso em: 18 ago. 2016.

CHEN, Ji-Cai et al. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=564ceedf5e9d97daf08b45a2&assetKey=AS%3A297254750572544%401447882463055>. Acesso em: 22 set. 2016.

CORRÊA, Manuel Pio. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional Brasília, 1984. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000119&pid=S0102-8650200600080001000003&lng=en

CORY, G. Scratch-wound assay. **Cell Migration: Developmental Methods and Protocols**, v. 769, p. 25-30, 2011. Disponível em: http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-207-6_2. Acesso em: 2 Fev. 2017.

CRUZ, M. J. B. et al. Uso de plantas medicinais por famílias do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 27, n. 1, p. 38-48, 2015. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=716>. Acesso em: 28 Jan. 2017.

CRUZ, M.T. Fitoterápicos: estudos com plantas para fins terapêutico e medicinal. **Acervo da Iniciação Científica**, n. 1, 2013. Disponível em: <http://www3.izabelahendrix.edu.br/ojs/index.php/aic/article/view/395>. Acesso em: 17 maio 2016.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. Atheneu, 2008.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Jatropha toxicity—a review. **Journal of toxicology and environmental health, Part B**, v. 13, n. 6, p. 476-507, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711929>. Acesso em: 17 Jan. 2017.

ERENO, D. Curativo de borracha. **Revista Pesquisa Fapesp**, n. 88, p. 66-69. 2003. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2003/06/66-medicina.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2016.

FRANCO, Ana Lúcia et al. Pesquisas em animais: uma reflexão bioética. **Acta Bioethica**, v. 20, n. 2, 2014.

FERREIRA, A. M.; et al. Conhecimento e prática de acadêmicos de enfermagem sobre cuidados com portadores de feridas. **Esc. Anna Nery**, v. 17, n. 2, p. 211-219, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-81452013000200002. Acesso em: 19 abr. 2016.

FÉLIX-SILVA, J.; et al. Jatropha gossypifolia L.(Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014a. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/369204/>. Acesso em: 19 mar. 2016.

FÉLIX-SILVA, J.; et al. In vitro anticoagulant and antioxidant activities of Jatropha gossypifolia L.(Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014b. disponível em: <http://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-405>. Acesso em: 10 ago. 2016.

FIRMO, W. C. A.; et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90-5. 2012.

Disponível em:
<http://www.periodicoeletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/746/2578>. Acesso em: 4 ago. 2016.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos Flavonoides**. Dissertação de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2013. Disponível em:
<http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2016.

FRACARO, Sheyla Noya. **Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de Tillandsia usneoides Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

FRANÇA, A.J.V.B, O Papel das cianinas e a influência do fator necrose tumoral na proliferação In Vitro de fibroblastos. 25 de fevereiro de 2015, 83 páginas. Dissertação, UNIVALI, Itajaí, 2015. Disponível em:
<http://siaibib01.univali.br/pdf/Ana%20Julia%20Vernay%20Franca.pdf>.

FREITAS, M. A. et al. Avaliação in Vitro da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, 2013. Disponível em:
<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/17128>. Acesso em: 18 jun. 2016.

GOES, A. M. et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282012000100008. Acesso em: 19 ago. 2016.

GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira et al . Wound healing - A literature review. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 91, n. 5, p. 614-620, Oct. 2016 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962016000500614&lng=en&nrm=iso. access on 18 Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035. Acesso em: 14 jun. 2016.

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

HIROTA, B. C. K. et al. Fitoquímica e atividades biológicas do gênero *Jatropha*: MINI-REVISÃO. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 1518-8361, 2010. Disponível em: <http://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21374>. Acesso em: 29 ago. 2016.

IRION, G.L. **Feridas: Novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2012.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46294/49950>. Acesso em: 22 ago. 2016.

KAUARK, F; MANHÃES, F.C; MEDEIROS, C.H. **Metodologia da pesquisa: guia prático**. Itabuna: Via Litterarum, 2010.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729362>. Acesso em: 22 set. 2016.

KUMAR, V. P. et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 182-188, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678369>. Acesso em: 19 ago. 2016.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, vol. 2, n. 2, p. 329-33. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>. Acesso em: 10 Fev. 2017.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v78n4/16896.pdf>. Acesso em: 17 set. 2016.

MARANGUELI, C. L.; MINGUZZI, S. Estudo Químico da raízes da *Jatropha Gossypifolia* L. **ANAIS DO ENIC**, v. 1, n. 1, 2015. Disponível em: <http://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/1037/1060>. Acesso em: 11 jul. 2016.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Rev. bras. farmacogn**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000300015. Acesso em: 16 maio 2016.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 2007. 191 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraí-ba, João

Pessoa, 2007. Disponível em: <http://tede.biblioteca.ufpb.br/handle/tede/6736>. Acesso em: 15 ago. 2016.

MARIZ, S. R. et al. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 213-6, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200012. Acesso em: 18 Jan. 2017.

_____. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Rev Bras Plantas Med.** v. 12, n. 3, p. 346-357. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000300013. Acesso em: 18 jun. 2016.

_____. Chronic toxicologic study of the ethanolic extract of the aerial parts of *Jatropha gossypifolia* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 663-668. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v22n3/aop02012.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2016.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150 p.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 3, p. 257-262. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v84n3/v84n03a07.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2016.

MELIM, C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de quatro espécies de plantas medicinais da flora brasileira**. Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Carla%20Melim.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2016.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova.** v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500029. Acesso em: 14 jul. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>. Acesso em: 17 jul. 2016.

MOURA, P. A. **Screening das atividades antioxidantes e anticoagulantes de plantas do bioma Caatinga**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal De Pernambuco. Centro De Ciências Biológicas. Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas. 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/16955/Disserta%c3%a7%c3%>

a3o%20de%20Mestrado.Piscilla%20Andrade%20de%20Moura.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 12 nov. 2016.

NEVES, F. S. et al. Diversity of arboreal ants in a Brazilian tropical dry forest: effects of seasonality and successional stage. **Sociobiology**, v. 56, n. 1, p. 177-194, 2010. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103289968>. Acesso em: 16 ago. 2016.

NÓBREGA, J. D. S.; AGRA, H. S.; ALBUQUERQUE, H. N. Uso e aceitação das plantas medicinais e fitoterápicos nos PSF's do município de Pedra Lavrada-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas**. v. 2, n. 3, p. 66-78. 2011. Disponível em: http://www.rbic.com.br/artigos%20pdf/vol2_n3%20-%202011/9%20vol2n3.pdf. Acesso em: 17 maio 2016.

OLIVEIRA, G. L. S et al. Identificação de metabólitos secundários da casca da bauhinia forficata platypetala e bauhinia unguiculata. **V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica – CONNEPI**. 2010. Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/778/491>. Acesso em: 9 out. 2016.

OLIVEIRA, M. P. **Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/4495/1/000417400-Texto%2bCompleto-0.pdf>. Acesso em: 12 Jan. 2017.

PARACAMPO, N. E. N. P. et al. Atividade fitotóxica e fungitóxica de extratos de *Vouacapoua cf americava* Aublet (leg.-caesalp.), essência florestal nativa da amazônia. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Belém, v.1, n. 52, p. 9-22, jul./dez. 2009. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30292/1/AtividadeFitotoxicaFungi toxica.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012. Disponível em: <https://sistemas2.uft.edu.br:8004/index.php/JBB/article/view/386/268>. Acesso em: 8 out. 2016.

PEREIRA FILHO, A. A. et al. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 505-510, Dez. 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000600505&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 8 Jan. 2017.

PINTO, L. F. et al. Extração supercrítica com utilização de modificadores e caracterização a partir da semente de cumaru (*dipteryx odorata*). **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, vol. 1 num. p. 16248-16255, 2015. Disponível

em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1938-16781-145061.pdf>. Acesso em: 10 set. 2016.

PIRÍZ, M. A. et al. Uso popular de plantas medicinais na cicatrização de feridas: implicações para a enfermagem. **Revista Enfermagem Uerj. Rio de Janeiro**. vol. 23, n. 5. p. 674-679. set./out. 2015. Disponível em: <http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/enfermagemuerj/article/view/5624>. Acesso em: 19 Jan. 2017.

PIRIZ, M. A. et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 3, p. 628-636, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3/20.pdf>. Acesso em: 9 out. 2016.

RIBEIRO, A. R.C. et al. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 11, p. 1051-1055, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014001100002. Acesso em: 19 out. 2016.

RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Rev. bras. plantas med., Botucatu**, v. 13, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13nspe/a14v13nspe.pdf>.

SABANDAR, C. W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942212004657>. Acesso em: 17 Jan. 2017.

SANTOS, W.B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **REV. SOBECC**, v. 21, n. 1, p. 46-51. São Paulo. 2016. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1414-4425/2016/v21n1/a5576.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2016.

SANTOS, C. V. C. D. **Avaliação do efeito dos extratos aquoso e metanólico da *Schinus terebinthifolius*, Raddi (Aroeira) sobre culturas de esplenócitos murinos e sobre a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. 2013. Disponível em: http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/bitstream/ri/11819/1/Tese_ICS_%20C%3%a1udia%20Valle%20dos%20Santos.pdf. Acesso em: 6 nov. 2016.

SANTOS, Miriam Pires dos. **Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L.: avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante**. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Engenharia De Lisboa. Área Departamental de Engenharia Química. 2014. Disponível em:

<http://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4387/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2016.

SANTOS, A. M. A. et al. Fitoterapia popular: passado e presente. **Revista Espacios**, v. 34, n. 11, p. 2013. Pág. 2-7. 2013. Disponível em: <http://www.revistaespacios.com/a13v34n11/13341102.html>. Acesso em: 19 jul. 2016.

SANTOS, M. F. S. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir. Bras**, v. 21, supl. 3, p. 2-7, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000900002. Acesso em: 16 out. 2016.

SCHMELZER, G. H. et al. **Plant Resources of Tropical Africa 11(1) - Medicinal plants**. Backhuys Publishers, Wageningen, Netherlands. 2008.

SCHULTZ, G. S.; LADWIG, G.; WYSOCKI, A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. **World wide wounds**, 2005. Disponível em: <http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Test-ECM.html>. Acesso em: 14 out. 2016.

SERVIN, S.C.N et al. Ação do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) na cicatrização de anastomose colônica: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 89-96. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000900012. Acesso em: 7 out. 2016.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010. Disponível em: <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/22/14>. Acesso em: 29 ago. 2016.

SILVA, J. F. **Atividade antiofídica do decocto das folhas de *Jatropha gossypifolia* I. frente o veneno de *Bothrops jararaca***. 2014. 195f. Dissertação (Mestrado Em Ciências Farmacêuticas) - Centro De Ciências Da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/19306>. Acesso em: 2 out. 2016.

SILVA, C. C.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Determinação da atividade citotóxica do extrato etanólico do caule de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. In: **XIX CONIC, III CONITIVII JOIC**, 2011. Anais. Recife, UFPE, 2011.

SOUSA, O. V. et al. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 30-34, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000300012. Acesso em: 5 nov. 2016.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/102097/221535.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. acesso em: 7 nov. 2016.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Wound biology and healing. **Simpósio: Fundamentos em Clínica Cirúrgica - 1ª Parte. Capítulo II. Medicina** (Ribeirão Preto), v. 41, n. 3, p. 259-64. 2008. Disponível em: http://revista.fmrp.usp.br/2008/VOL41N3/SIMP_2Biologia_ferida_cicatrizacao.pdf. Acesso em: 8 nov. 2016.

TINTINO, Saulo Relison et al. **Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto Morinda citrifolia L.** Acta Biológica Colombiana, v. 20, n. 3, p. 193, 2015.

TRINDADE, M. T. **Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil.** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 19, n. 4, 2015. Disponível em: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/113/105>. Acesso em: 29 jul. 2016.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-07072006000100014. Acesso em: 19 jul. 2016.

VALE, J. D. R. et al. Estudo comparativo da cicatrização de gastrorrafias com e sem o uso do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) em ratos. **Acta Cir. Bras.** v. 21, n. supl. 3, p. 40-48, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000900007. Acesso em: 8 jul. 2016.

VEDULA, S.R. K. et al. Collective cell migration: a mechanistic perspective. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 370-379, 2013. Disponível em: <http://physiologyonline.physiology.org/content/28/6/370.short>

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026. Acesso em: 6 nov. 2016.

VEIGA, A. A. S. **Isolamento e quantificação de flavonóides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L..** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2008. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 2008. 67f. Disponível em: http://www.repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/2155/1/Dissertacao_IsolamentoQuantificacaoFlavonoides.pdf. Acesso em: 8 dez. 2016.

VERONA, R. L. C. **Ácaros associados à *Jatropha spp.* (Euphorbiaceae) no Brasil.** 2010. 69f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/87654>. Acesso em: 6 dez. 2016.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, ACR; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** 2010. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20101886074>. Acesso em: 18 nov. 2016.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004. Disponível em: http://www.gruponitro.com.br/atendimento-a-profissionais/%23/pdfs/artigos/farmacologia/lenita_wanmacher.pdf. Acesso em: 17 jul. 2016.

WAIZEL-UCAY, J.; RICO, I. M. M. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. **REVISTA ADM**, v. 68, n. 2, p. 73-88, 2011. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2011/od112e.pdf>. Acesso em: 18 set. 2016.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae, **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 3-32. 1994. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/2399908?seq=1#page_scan_tab_contents. Acesso em: 15 nov. 2016.

ZHANG, Eryun et al. Notoginsenoside Ft1 Promotes Fibroblast Proliferation via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Benefits Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 324-332, 2016. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/356/2/324.full.pdf?with-ds=yes>.

ANEXOS

ANEXO A - DECLARAÇÃO DO IMA



INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE ALAGOAS – IMA
HERBÁRIO MAC

Av. Major Cícero de Góes Monteiro, 2197, Mutange.
CEP 57017-320, Maceió – AL, Brasil

Site www.ima.al.gov.br email herbariomac.ima@gmail.com

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a planta utilizada na pesquisa de **Paulo Sérgio Gomes da Silva** é semelhante à amostra da mesma espécie coletada, por *G.L.Esteves n°col.183 em 05/12/1977* e depositada no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas. Trata-se de:

| Reg. MAC | Nº Col. | Família | Espécie | Det. |
|----------|---------|---------------|---------------------------------|-------------|
| 241 | 183 | Euphorbiaceae | <i>Jatropha gossypifolia</i> L. | G.L.Esteves |

OBS: Recomenda-se a citação, no corpo do trabalho, que a identificação do material estudado foi efetuada pelos técnicos do Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente.

Maceió, 15 de Fevereiro de 2016.

Rosângela P. Lyra Lemos
Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC