



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

Perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.
e avaliação da sua atividade toxicológica, antitumoral e antibacteriana

Recife, 2018

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

Perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.
e avaliação da sua atividade toxicológica, antitumoral e antibacteriana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Produtos Naturais e seus compostos
bioativos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barreto Lopes Seabra

Recife, 2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

C837p

Costa, Raíra Justino Oliveira.

Perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e avaliação da sua atividade toxicológica, antitumoral e antibacteriana / Raíra Justino Oliveira Costa. – Recife: o autor, 2018.
81 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Ivone Antônia de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui referências, figuras, tabelas e gráficos.

1. Extratos Vegetais. 2. Histologia. 3. Resistência Microbiana a Medicamentos. 4. Sinergia de Substâncias Bioativas. 5. Testes de Drogas Anticâncer. I. Souza, Ivone Antônia. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 104)

RAÍRA JUSTINO OLIVEIRA COSTA

Perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.
e avaliação da sua atividade toxicológica, antitumoral e antibacteriana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação aprovada em: 27 / 02 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Jane Sheila Higino (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus inicialmente, por sempre se apresentar como um apoio nas horas que só a sua presença me confortaria.

Aos meus pais, Francisca e Lairton, por todos esforços realizados para que eu alcance meus objetivos, por todos os valores e educação transmitidos e por ser a minha fortaleza nos momentos mais difíceis. Tudo que faço é por vocês!

A minha irmã, Raiane, por me ensinar o quão bom é ter alguém para dividir os momentos e por ser uma certeza de porto seguro independente do que aconteça.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza, por ter me recebido em seu laboratório, investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido. Pela paciência, boa vontade, carinho e amizade no decorrer desse tempo, meu imensurável agradecimento.

A minha Coorientadora Dr.^a Maria Aparecida Barreto Lopes Seabra, por toda preocupação, esclarecimentos e boa vontade que me auxiliaram na conclusão desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE), pela oportunidade de realização do mestrado. Aos professores do Programa, que compartilharam comigo o seu conhecimento e a toda equipe de secretária por terem sido sempre tão solícitos em sanar minhas dúvidas e facilitar o percurso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da UFPE que sofreram e sorriram comigo nesta caminhada. Em especial ao grande amigo e companheiro que fiz no decorrer desse trabalho, Rômulo Carlos.

À Unileão, à Coordenadora do curso de biomedicina, Ana Ruth Sampaio Granjeiro, à aluna do curso de Biomedicina Ana Karoline e à professora Maria Karollyna do Nascimento,

por todo o auxílio oferecido. A colaboração de vocês foi imprescindível para a realização dos testes de atividade antibacteriana.

À professora Dr.^a Tassia Campos, pela ajuda e orientação na análise dos dados.

Ao professor Fernando Leandro, coordenador no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela boa vontade e paciência em me auxiliar na leitura e interpretação das lâminas histológicas.

Aos técnicos Sandrine Maria e Alex Benício, pela paciência e boa vontade em me transmitir seus conhecimentos e me auxiliar na confecção das lâminas histológicas.

A toda minha família que torce diariamente pelo meu sucesso. Que sempre foram grandes incentivadores dos meus sonhos, obrigada pela paciência, pelos incansáveis telefonemas e todas as orações intencionadas a mim ao longo desta caminhada. Amo vocês!

Aos amigos que sempre estiveram presentes e a aqueles que fiz no decorrer desse percurso, obrigada por todos os risos e momentos de descontração.

Ao meu grande amor, companheira, confidente e apoio de todas as horas e momentos, Maira Rodrigues. Obrigada, por ser sempre a minha grande motivadora, meu aconchego e minha calma.

RESUMO

Jatropha mollissima (Pohl) Baill. da família Euphorbiaceae é encontrada na Caatinga Brasileira e amplamente distribuída na região nordeste, porém com poucos estudos de seu potencial terapêutico. O objetivo dessa pesquisa foi realizar o perfil fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas de *Jatropha mollissima* (EEJM) e analisar as suas atividades toxicológicas, antitumoral e antibacteriana. A coleta do vegetal foi realizada na cidade de Caruaru-PE e encaminhada a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para identificação e obtenção do extrato etanólico. O perfil fitoquímico foi realizado através de Prospecção preliminar e Cromatografia de Camada Delgada (CCD). O protocolo para realização da toxicidade aguda foi baseado na Metodologia da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) 423. Avaliação da Atividade antitumoral foi realizada utilizando-se camundongos albinos Swiss fêmeas divididas em 4 grupos com 5 animais (Controle negativo, padrão, e tratamentos 100 mg/kg e 300 mg/kg, respectivamente). Protocolo da avaliação da atividade antitumoral foi realizado de acordo com Geran e colaboradores (1972) com algumas modificações. Nos testes de atividade antibacteriana e modulatória foi empregada a metodologia de microdiluição de acordo com *National Committee For Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) com finalidade de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para atividade modulatória foram utilizados os antibióticos Gentamicina e a Amicacina. Em relação ao preparo do inóculo foram utilizadas as linhagens padrões e resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos através das análises fitoquímicas demonstraram a presença de alguns metabólitos secundários tais como, catequinas, cumarinas, esteróides livres, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas, glicosídeos, taninos condensados ou catéquicos e terpenos. De acordo com os resultados do ensaio de toxicidade aguda, o extrato foi classificado na categoria 5 (como referência o *Globally Harmonised System* – GHS) e sua Dose Letal₅₀ (DL₅₀) foi estipulada como ≥ 5000 mg, entretanto, histologicamente foi verificado sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Quanto à atividade antitumoral, as doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg demonstraram resultados promissores, com percentual de inibição tumoral de 69,11% e 73,26%, respectivamente, e redução significativa das médias dos pesos dos tumores, histologicamente demonstrou sinais de alterações morfológicas nos mesmos. Os resultados da CIM com EEJM revelaram que o mesmo não possui atividade antimicrobiana contra as cepas padrões e resistentes de *E.coli* e *S. aureus* mostrando um valor ≥ 1024 µg/mL, porém quanto à atividade modulatória, os resultados demonstraram sinergismo diante de uma interação física com os antibióticos utilizados, com diminuição significativa da CIM com a gentamicina e amicacina frente a *S. aureus* e da amicacina frente a *E.coli*. Todos os resultados obtidos sugerem que o extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* apresentam uma ação promissora na redução de células tumorais e no combate à resistência bacteriana. Mais estudos são necessários para um maior entendimento dos mecanismos de ação das atividades antitumoral e antibacteriana.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Histologia. Resistência Microbiana a Medicamentos. Sinergia de Substâncias Bioativas. Testes de Drogas Anticâncer. Testes de Toxicidade Aguda.

ABSTRACT

Jatropha mollissima (Pohl) Baill. of the family Euphorbiaceae is found in the Brazilian Caatinga and widely distributed in the northeast region, but with few studies of its therapeutic potential. The objective of this research was to perform the phytochemical profile of the Ethanol Extract of *Jatropha mollissima* leaves (EEJM) and to analyze its toxicological, antitumoral and antibacterial activities. The collection of the vegetable was carried out in the city of Caruaru-PE and sent to the Federal University of Pernambuco (UFPE) to identify and obtain the Ethanol Extract. The phytochemical profile was performed through Preliminary Prospecting and Thin Layer Chromatography (CCD). The protocol for acute toxicity was based on the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Methodology 423. Evaluation of the antitumor activity was performed using female Swiss albino mice divided into 4 groups with 5 animals (negative control, standard, and treatments 100 mg / kg and 300 mg / kg, respectively). Protocol for the evaluation of antitumor activity was performed according to Geran et al. (1972) with some modifications. In the tests of antibacterial and modulatory activity, the microdilution methodology was used according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) in order to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The antibiotics Gentamicin and Amikacin were used for modulatory activity. In relation to the preparation of the inoculum the standard and resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were used. The results obtained through phytochemical analysis showed the presence of some secondary metabolites such as catechins, coumarins, free steroids, flavones, flavonols, xanthenes, flavanones, glycosides, condensed or cathectic tannins and terpenes. According to the results of the acute toxicity test, the extract was classified in category 5 (as a reference the Globally Harmonized System - GHS) and its Lethal Dose₅₀ (LD50) was stipulated as ≥ 5000 mg, however, histologically, signs of hepatotoxicity and nephrotoxicity. As for antitumor activity, the doses of 100 mg / kg and 300 mg / kg showed promising results, with a percentage of tumor inhibition of 69.11% and 73.26%, respectively, and a significant reduction in tumor weight means histologically showed signs of morphological changes in them. The results of MIC with EEJM revealed that it does not have antimicrobial activity against the standard and resistant strains of *E. coli* and *S. aureus* showing a value ≥ 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$, but regarding the modulatory activity, the results showed synergism with a physical interaction with the antibiotics used, with a significant reduction of MIC with gentamicin and amikacin against *S. aureus* and amikacin against *E.coli*. All the results obtained suggest that the ethanolic extract of the leaves of *Jatropha mollissima* present a promising action in the reduction of tumor cells and in the fight against bacterial resistance. Further studies are needed for a better understanding of the mechanisms of action of antitumor and antibacterial activities.

Key-words: Acute Toxicity Tests. Anticancer Drug Tests. Drug Resistance Microbial. Drug Synergism. Histology. Plant Extracts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Partes da planta <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.....	22
FIGURA 2 - Taxa de novos casos de câncer por localização primária do tumor e sexo, exceto pele não melanoma*.....	24
FIGURA 3 - Principais características do câncer.....	25
FIGURA 4 - Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias.....	31
FIGURA 5 - <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.....	32
FIGURA 6 - Fluxograma representando a metodologia de toxicidade segundo OECD	35
FIGURA 7- Esquema de distribuição e diluição seriada dos extratos vegetais na microplaca de 96 poços	39
FIGURA 8 - Imagens da análise histológica do corte de fígado dos animais do grupo 2000MG.....	51
FIGURA 9 - Imagens da análise histológica do corte rins dos animais do grupo 300MG e 2000MG.....	51
FIGURA 10 - Imagens da análise histológica do corte de pulmão e rins dos animais do grupo SF.....	56
FIGURA 11 - Imagens das análises histológicas dos cortes de rins, comparando os órgãos dos animais do grupo CIS e 300MG.....	57
FIGURA 12 - Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores, comparando os grupos SF e CIS.....	58
FIGURA 13 - Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores, comparando os grupos 300MG e CIS.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólico de <i>Jatropha mollissima</i>	41
TABELA 2 - Metabólitos encontrados no extrato etanólico de <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill. através de Cromatografia de Camada Delgada.....	42
TABELA 3 - Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEJM em Camundongo <i>Mus musculus</i>	45
TABELA 4 - Média $\pm$ desvio padrão das massas dos órgãos avaliados dos grupos controle e tratados no teste de toxicidade oral.....	49
TABELA 5 - Média $\pm$ desvio padrão das massas dos órgãos avaliados e do tumor segundo os grupos de estudo da atividade antitumoral.....	53
TABELA 6 - Valores do IT % para os grupos controle e tratamentos avaliados.....	54
TABELA 7 - Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do EEJM.	60

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste de Toxicidade Aguda (OECD)	48
GRÁFICO 2 - Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste da atividade antitumoral.....	53
GRÁFICO 3 - Atividade modulatória do extrato etanólico das folhas de <i>Jatropha mollissima</i> em associação aos antibióticos Amicacina e Gentamicina.....	63

LISTA DE SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comitê de Ética No Uso Animal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIS	Cisplatina
CL50	Concentração Letal
COBEA	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COMT	Catecol-O-Metiltransferase
DAEC	Difusamente adesiva
DL ₅₀	Dose Letal
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Desvio Padrão
EAGCC	Enteroagregativa
EC27	<i>Escherichia coli</i> 27
EEJM	Extrato etanólico bruto das folhas de <i>Jatropha mollíssima</i> (Pohl) Baill.
EHEC	Entero-Hemorrágica
EIEC	Enteroinvasiva
EPEC	Enteropatogênica
ETEC	Enterotoxigênia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
HE	Coloração por Hematoxilina-Eosina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP3	Trifosfato de Inositol
IT	Inibição Tumoral
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
PEXT	Peso do Extrato Seco
PFOLHAS	Peso das Folhas
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RE	Rendimento Total do Extrato
SA358	<i>Staphylococcus aureus</i> 358
SF	Soro Fisiológico
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USA	United States of America
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente à Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	17
2.1.1 Uso de Plantas medicinais no Brasil	18
2.1.2 Caatinga	19
2.2 ESPÉCIE <i>Jatropha mollissima</i>	19
2.2.1 Família Euphorbiaceae	19
2.2.2 Gênero: <i>Jatropha</i>	20
2.2.3 Espécie: <i>Jatropha mollissima</i>	21
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PLANTAS	22
2.3.1 Câncer: aspectos gerais e o processo de carcinogênese	23
2.3.2 Carcinoma de Ehrlich	26
2.3.3 Bactérias patogênicas de interesse médico	27
2.3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	29
2.3.2.3 Mecanismos de resistência	30
3 MATERIAL E METODOS	32
3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO	32
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	33
3.2.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada	33
3.2.2 Prospecção fitoquímica	34
3.3 TOXICIDADE AGUDA	34
3.3.1 Animais	34
3.3.2 Protocolo experimental	35
3.3.3 Acompanhamento e análise histopatológica	36
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	36
3.4.1 Animais	36
3.4.2 Delineamento experimental do estudo antitumoral <i>in vivo</i>	37
3.4.3 Tratamento e cálculo de inibição	37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA	38
3.6.1 Preparo da solução inicial	38

3.6.2 Microrganismos.....	38
3.6.3 Preparo e padronização de inóculos bacterianos.....	38
3.6.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
3.6.5 Avaliação da interferência do extrato sobre a resistência aos antibióticos aminoglicosídeos	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	40
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	41
4.3 TOXICIDADE AGUDA.....	44
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	52
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA.....	61
5 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina tradicional compreende diversos tipos de conhecimento e práticas que tem como base o conhecimento empírico, baseado em teorias, crenças e experiências próprias de diversas culturas, sendo elas passíveis de explicação científica ou não. Mesmo assim, de forma independente a isso, são utilizadas no cuidado à saúde, na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas ou mentais (WHO, 2013).

As plantas medicinais constituem parte importante da medicina tradicional, sendo considerada por séculos como sua base fundamental. A partir das plantas e seus derivados vegetais podem ser obtidos os medicamentos fitoterápicos, que contêm substâncias bioativas e são utilizados com a finalidade de prevenir e tratar doenças ou aliviar sua sintomatologia. Cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional, e destes, 85% utilizam as plantas medicinais para o controle e tratamentos das mais diversas doenças (FENALTI et al., 2016).

Observa-se, a nível mundial um aumento no interesse do conhecimento tradicional para o preparo de produtos industrializados. Muitos destes, tais como medicamentos, corantes, cosméticos e produtos alimentícios podem ser obtidos a partir de plantas medicinais. Nesse cenário encontra-se os fitoterápicos padronizados que são uma interessante opção terapêutica que vem ganhando cada vez mais espaço e importância na medicina atual (LUBBE; VERPOORTE, 2011).

A fitoterapia consiste no uso interno ou externo das plantas, no manuseio de suas partes, na forma *in natura* ou de medicamento com finalidade terapêutica. A ampliação do mercado consumidor impulsiona o interesse da indústria farmacêutica nesse segmento (ALMASSY JÚNIOR et al., 2010; BASTOS; LOPES, 2010). De acordo com Almeida et al. (2014), o mercado mundial de plantas medicinais, voltados para a fabricação de produtos para indústria farmacêutica, ronda os 32 mil milhões de euros.

Porém, vista a importância da fitoterapia dentro das possibilidades terapêuticas para a ciência médica, faz-se necessário um controle de qualidade e segurança desses produtos, para que seu uso seja realizado de maneira mais segura e se tenha informações a respeito da toxicidade, preparo, indicações, contraindicações e dosagens. As substâncias bioativas presentes nas plantas medicinais e nos fitoterápicos são conhecidas pelos benefícios obtidos através de seus usos, mas esses compostos também podem ser nocivos à saúde humana. Esse ponto salienta a importância de avaliar o grau tóxico, pois a sua dosagem pode inviabilizar o uso (CARNEIRO et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; SILVA et al, 2017b).

Portanto, é necessário conhecer as características farmacológicas e toxicológicas, a posologia e os aspectos clínicos associados as substâncias naturais, para evitar o uso inadequado e permitir que o seu uso seja realmente seguro (JORDAN, CUNNINGHAM, MARLES, 2010; SEEFF, 2007). Sendo assim, são desenvolvidos vários estudos buscando elucidar as questões relacionadas as atividades farmacológicas das plantas e dos seus princípios ativos (ABDULLA et al., 2010; AL-ATTAR, 2011).

No Brasil há um grande interesse no estudo de possíveis efeitos benéficos dos vegetais e seus derivados e o país vem buscando evidenciar e comprovar as atividades de plantas a partir dos relatos da população. A combinação entre a biodiversidade brasileira, que conta com um grande número de espécies existentes, e o rico conhecimento tradicional, obtido através da união de diversos povos, coloca o país em uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos produtos (BALBINO; DIAS, 2010; BRASIL, 2016a; FENALTI et al., 2016; PASA, 2011).

Dentre as plantas disponíveis para pesquisas nesse sentido, encontramos *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill, conhecida popularmente como pinhão-bravo, que é um arbusto com ampla distribuição no Nordeste, pertencente ao gênero *Jatropha* e à família Euphorbiaceae (LEAL; AGRA, 2005). Etnofarmacologicamente, essa espécie é utilizada para inflamação renal, ausência de apetite, cicatrização e contra picada de serpentes. Também possuem algumas propriedades terapêuticas comprovadas como a atividade hipotensora, antiproliferativa e moluscicida. Contudo, ainda não se sabe muito sobre ela, principalmente sobre suas atividades biológicas e farmacológicas (ARAÚJO et al., 2007; FERREIRA JÚNIOR; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011; LEAL; AGRA, 2005; MELO et al, 2010; VILAR, 2004.).

Espécies pertencentes ao gênero *Jatropha* são conhecidas no nordeste do Brasil por suas propriedades medicinais e estudos realizados com espécies desse gênero demonstraram resultados satisfatórios em relação a atividade antimicrobiana e anticâncer (AIYELAAGBE, et al, 2007; APU et al., 2012; BHASKARWAR; ITANKAR; FULKE, 2008; BRAQUEHAIS, 2016; DAS et al., 2009; MENDOZA-MUÑOZ, 2016).

A atividade anticâncer apresentada por esse gênero pode estar ligada às suas proteínas ricas em propriedades nutricionais, em particular a cursina, que apresenta potencial para ser utilizada como imunoconjugado no tratamento quimioterápico (DEVAPPA, MAKAR, BECKER, 2010b).

Existem também, vários relatos na literatura de ações antibacteriana e antifúngica de *Jatropha multifida*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha curcas*, *Jatropha podagrica*, entre outras. Desses estudos, muitos correlacionam essa ação com a presença de compostos fitoquímicos

encontrados em abundância nessas plantas, como por exemplo, taninos e flavonóides (AIYELAAGBE, 2001; AIYELAAGBE, et al, 2007; FÉLIX-SILVA, et al., 2014; HAMZA, et al., 2006; ONGTENGCO, 1992; SÁNCHEZ GREGORIO, 2012; VEIGA, 2008; AYANBIMPE, et al., 2009).

Tendo como base a literatura e os relatos a respeito de outras espécies desse gênero, o objetivo desse estudo foi avaliar os compostos fitoquímicos presentes no extrato etanólico bruto das folhas de *J. mollissima*, verificando sua toxicidade frente a camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) e analisando as suas atividades antitumoral e antibacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização empírica de espécies vegetais, a fim de melhorar a alimentação e tratar e curar doenças que acometem a humanidade, constitui uma prática que remonta ao início da civilização, criando assim, uma inter-relação entre o uso das plantas e evolução do homem. Desde o momento em que o homem percebeu a possibilidade de modificar o meio ambiente em prol de aumentar suas chances de sobrevivência, passou a utilizar as plantas como recursos terapêuticos (CARVALHO et al., 2010; GADELHA, 2013).

Esse conhecimento acerca da utilização dos recursos vegetais foi sendo passado por gerações e as propriedades curativas dos vegetais ganhando recursos para se investigar e descobrir seu valor comercial e cultural (DUTRA, 2009). As plantas medicinais são definidas por Badke, (2011) como aquelas capazes de produzir princípios ativos, restaurando o equilíbrio orgânico ou a homeostasia nos casos de enfermidades.

Esse conhecimento continua a contribuir para o tratamento de diversas doenças em várias partes do mundo e juntamente com o uso de fitoterápicos vêm influenciando em mudanças econômicas, políticas e sociais. Assim, colabora para a implementação de políticas públicas no âmbito da medicina tradicional e nos avanços na área de registro de medicamentos à base de plantas, como é o caso da categoria do Produto Tradicional Fitoterápico (PTF), que é responsável por comprovar a eficácia desses produtos através do tempo de uso e por meio de literatura técnico-científica, baseada no uso tradicional (ETHUR et al., 2011).

O uso da medicina tradicional no tratamento de doenças é difundido em grande parte da população mundial. Em países industrializados como Canadá, França, Alemanha e Itália, no ano de 2013, foi visto que uma média de 80% da população utilizava plantas medicinais como

uma medicina complementar. Em países em desenvolvimento especialmente nos continentes Asiático e Africano e na América Latina e Oriente Médio, cerca de 95% da população faziam uso dos medicamentos tradicionais para a gestão da saúde, sendo que 85% da medicina tradicional está baseada do uso de plantas medicinais (WALJI; WIKTOROWICZ, 2013).

Das 1.073 novas entidades químicas aprovadas como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) entre os anos de 1981 e 2010, cerca de 60% são produtos naturais, derivados ou que são mimetizados a partir deles. Apesar de, nas últimas décadas, a química sintética e modelagem molecular estarem alcançado o seu auge, os recursos naturais ainda são os mais promissores para o desenvolvimento de fármacos, sendo apenas 36% dos medicamentos criados nessa época considerados verdadeiramente sintéticos (BRASIL, 2012b; CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012; WHO, 2011).

2.1.1 Uso de Plantas medicinais no Brasil

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, aproximadamente 20% do número de espécies da terra, encontram-se no território brasileiro. A esse fato ainda soma-se o grande conhecimento conservado pela população, originado a partir da miscigenação de índios, europeus e africanos (BRASIL, 2016b). Apesar desses fatores, ainda existe um grande distanciamento entre o uso da medicina tradicional e a medicina ocidental, destacando entre elas, a fitoterapia (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014; SHIN et al., 2013)

Um outro problema do uso de plantas medicinais é a escassez de estudos que possam fornecer um acervo de informações, a fim de comprovar cientificamente sua eficácia e segurança (FIRMO et al., 2011; ROSSATO et al., 2013). Apesar de todo o potencial apresentado pelo Brasil, pesquisas revelam que menos de 10% da flora nacional foi avaliada quanto às suas características biológicas e farmacológicas (ALMEIDA, 2012).

Atualmente, a maior parte dos fitoterápicos fabricados pela indústria brasileira tem como base o conhecimento popular, sendo difícil a sua competitividade comercial tanto nacional quanto internacional pois, na maioria das vezes, não existem comprovações clínicas ou pré-clínicas de suas atividades biológicas (AZEVEDO, 2008).

Por tais motivos, o Brasil tem buscado criar normas para estabelecer o uso de plantas medicinais na saúde pública e a promoção do uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Exemplos de medidas de funcionamento de políticas públicas voltadas nesse sentido foi a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política

Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2016a; BRASILEIRO et al., 2006).

2.1.2 Caatinga

Apesar de todos os esforços, alguns ecossistemas ainda são bastante negligenciados no que se diz respeito a novas investigações e conservação da sua flora, sendo a caatinga um dos sistemas menos estudados no Brasil, tendo o seu potencial subestimado (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; SCHMIDT, 2016). Esse bioma é típico da região nordeste do país, compreendendo uma área de aproximadamente 826.411 km², estendendo-se pelos nove estados dessa região e pela parte norte do estado de Minas Gerais (BRASIL, 2010; LEAL et al., 2005).

Tem como característica uma vegetação xerófita e decídua, com ocorrência de flores e folhas de acordo com a frequência de chuvas, que geralmente são escassas durante a maior parte do ano (ARAÚJO; CASTRO; ALBUQUERQUE, 2007). Por esse motivo, geralmente as plantas desse bioma apresentam-se sem folhas ou com coloração esbranquiçada. Este aspecto da vegetação faz com que associem à caatinga a falta de recursos naturais e improdutividade não revelando a riqueza oferecida por esse ambiente (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010).

Esse ecossistema riquíssimo é o único exclusivamente brasileiro, apresentando grande incidência de espécies endêmicas e elevada biodiversidade. Em um levantamento realizado no ano de 2012, a Caatinga apresentava um total de 4.440 espécies de plantas entre briófitas, samambaias, licófitas e plantas com sementes, sendo 748 endêmicas deste bioma, o que corresponde a quase 17% do total de táxons registrados (FORZZA et al., 2012).

Nesse ambiente, podemos encontrar várias plantas de interesse científico entre elas *J. mollissima*, conhecida popularmente por pinhão-bravo. Essa espécie faz parte da família Euphorbiaceae que apresenta plantas arbustivas. São nativas na América do Sul e presentes no Brasil principalmente na Caatinga. Porém, ainda são escassos os estudos ao que se referem a seu potencial terapêutico, sistemática e taxonomia (BARROSO et al., 1991; SANTANA; SOUTO, 2006).

2.2 ESPÉCIE *Jatropha molíssima* L.

2.2.1 Família: Euphorbiaceae

Euphorbiaceae está entre as grandes famílias de plantas com flores que consistem em uma grande variedade de vegetativas. Dividem-se em 4 subfamílias (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae), 52 tribos, 317 gêneros e 8 000 espécies. As Euphorbiaceae estão inclusas no filo Mangoleophyta, classe Mangoliopsida, ordem Malpighiales, na linhagem Rosids. Na região da Caatinga, por exemplo, Euphorbiaceae *sensu lato* representa a terceira maior família com 165 espécies descritas, sendo que 17 espécies são endêmicas (REDDY et al., 2017).

A família apresenta grande diversidade e geralmente é composta de todos os tipos de plantas, desde árvores altas e lenhosas a simples ervas daninhas de crescimento baixo. Geralmente apresenta seiva leitosa, flores díclinas unissexuais, sendo as flores femininas com gineceu sincárpico ovário superior e geralmente trilocular, placentação axilar, óvulos colaterais, pendulares com rabéia ventral e geralmente carunculadas. O fruto é geralmente uma cápsula tricoca, devido sua deiscência e abertura em três suturas (BIJEKAR; GAYATRI, 2014; MWINE; VAN DAMME, 2011; SATIRO; ROQUE, 2008).

É distribuída amplamente por todo o globo terrestre possuindo membros que se adaptam desde florestas tropicais até desertos quentes e secos. Possui grande variedade genética e morfologia e por esse motivo acredita-se que muitas plantas pertencentes a essa família ainda não foram identificadas (BIJEKAR; GAYATRI, 2014; MWINE; VAN DAMME, 2011).

Por possuir ampla distribuição em todos os tipos de habitats, as plantas pertencentes a essa família são induzidas a se adaptar, produzindo uma grande variedade de substâncias empregadas para sobrevivência, entre elas: ésteres de diterpeno, alcalóides, flavonóides, saponinas, terpenos, ésteres, glicosídeos cianogênicos, taninos, lectinas e e toxinas do tipo ricina (COSTA, 2012; MWINE; VAN DAMME, 2011; RAJESH et al., 2006; ROGÉRIO et al., 2007).

São de grande importância na atividade econômica, por seu uso na alimentação, como planta ornamental e matéria-prima para a produção de borracha e biodiesel. Como planta medicinal, essa família é considerada um potencial em produtos bioativos. Estudos retrataram o uso popular de algumas espécies, principalmente dos gêneros *Croton*, *Jatropha* e *Mabea* (LAMEIRA; PINTO, 2009; TRINDADE, 2015).

2.2.2 Gênero: *Jatropha*

O nome *Jatropha* é derivado do grego palavra 'jatos' (médico) e " trophe " (comida), esse gênero apresenta 175 espécies distribuídas no mundo, sendo o quarto maior da família

Euphorbiaceae. Demonstra algumas utilizações conhecidas, como por exemplo na decoração, devido à coloração de suas flores, e como planta medicinal, sendo utilizada por comunidades tradicionais como antitérmico, para cura de verruga e aftas, laxante, dores em geral, estimulante sexual, alucinógeno, ansiolítico, contraceptivo, entre outros (CARELS; SUJATHA; BAHADUR, 2012; HIROTA et al., 2010; RIOS, 2011; RODRÍGUEZ-ACOSTA et al., 2009)

Considerando o uso tradicional das plantas desse gênero e os compostos que são produzidos por elas, as espécies nele contidas vêm despertando grande interesse de países como Canadá, China, Japão e Estados Unidos, principalmente pelo seu uso na produção de biodiesel e fitoterápicos (PEREIRA et al., 2015).

Espécies de *Jatropha* são ricas fontes de moléculas interessantes do ponto de vista científico e farmacológico, sendo fontes de alcaloides, lignanas e terpenos. As proteínas presentes nessas espécies despertam o interesse industrial por possuírem propriedades nutricionais e biomédicas. Exemplos são as proteínas com alto poder de digestibilidade usadas na dieta de ruminantes e uma proteína bioativa, a cursina, utilizada como imunoc conjugado no tratamento de câncer (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010a; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010b).

2.2.3 Espécie: *Jatropha mollissima*

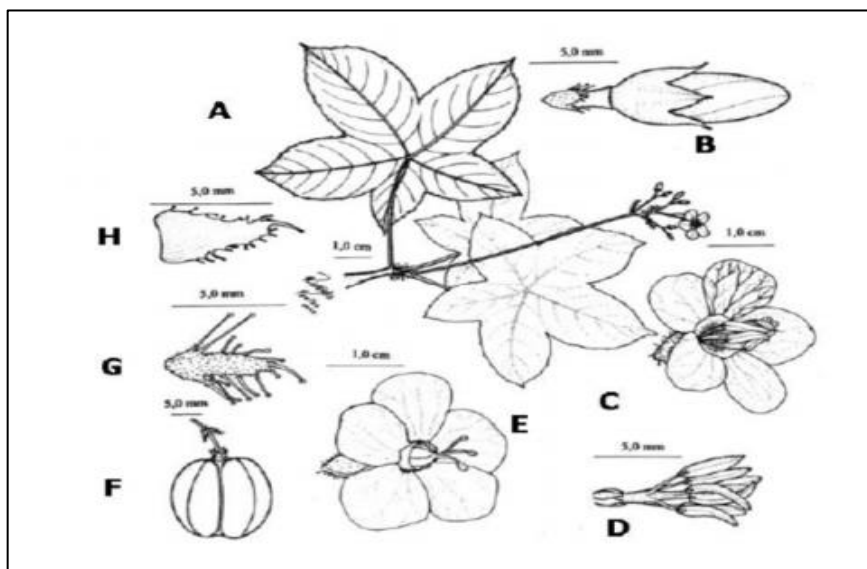
Entre as várias plantas de interesse científico do gênero *Jatropha*, encontra-se *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.. Essa espécie faz parte da família Euphorbiaceae, possui crescimento rápido e em condições de clima e solo favoráveis, podem chegar a uma altura de 5 metros e um diâmetro de 20 cm e tem como vantagem o fácil cultivo, adaptação a solos pouco férteis e tolerância a longos períodos de estiagem (FRANCIS; EDINGER; BECKER, 2005).

A descrição morfológica de *Jatropha mollissima* foi realizada por Leal e Agra (2005) como:

Arbusto com látex avermelhado, 2,0-3,0 m de comprimento; ramos cilíndricos, glabros, suculentos, estriados; estípulas caulinares, 2,0-4,0 mm, espinhosas, lignificadas, persistentes; estípulas nectaríferas foliares, filiformes, dissectas, glandular-estipitadas. Folhas peltadas; pecíolo 4,0-10,0 cm, cilíndrico, puberulento, tricomas simples unisseriados; lâmina 3,0-15,0 x 4,0-10,0 cm, orbicular, 5-palmatilobada, subcrassas; lobos elípticos, puberulentos, tricomas simples, unisseriados, denteados, glandular-estipitados, base aguda, ápice glandular-acuminado, broquidródrôma. Brácteas, 4,0-3,0 x 2,0-1,5 mm, elípticas, nectaríferas, glandular-estipitadas. Pedúnculo cilíndrico, 4,0-2,0 cm, puberulento. Inflorescências em corimbos, terminais, bracteados; 2 flores pistiladas circundadas por 4 flores estaminadas; pedicelos 0,4-1,5 cm, cilíndricos, glabrescentes. Brácteas

florais 0,2-1,0 cm, aciculares, puberulentas, glandular-estipitadas. Flores estaminadas e pistiladas pentâmeras, cálice 0,5-1,5 cm, sépalas soldadas no 1/4 basal, lobos ovalelípticos, estipitados, glabros; corola até 2,0 cm, pétalas livres, 0,5-1,0 cm, oblongas, face externa avermelhada e a interna amarela, glabra. Flores estaminadas marginais, estames-8, isodínamos, filetes 6,0 mm, condescidos na base, cilíndricos, glabros; antera 0,3-0,5 mm, sagitada, rimosa. Flores pistiladas centrais, estiletes-3, conatos na base, colunares, ca. 2,0cm; estigmas-2, bífidos, ovário trilocular, uniovular; disco hipógino, glabro. Fruto capsular, 1,5-3,0 cm, trilocular, glauco, com deiscência explosiva; sementes-3, oblongas, 0,8-1,0 cm, glabras, carúncula evidente, ca. de 1/5 do tamanho da semente; testa lisa, brilhante, marrom-ferrugínea. (LEAL; AGRA, 2005, p. 7)

Figura 1 - Partes da planta *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.



Fonte: (LEAL; AGRA, 2005).

Jatropha mollissima (Pohl) Baill. A. ramo florido; B. botão floral; C. flor masculina isolada; D. detalhe dos estames isolados; E. flor feminina; F. fruto tricoca; G. bráctea isolada; H. sépala isolada.

J. mollissima é uma espécie rica em óleos fixos e suas sementes são utilizadas principalmente na produção de biodiesel (DE ASSIS; PORTO; AGRA, 2013). Alguns estudos realizados demonstravam que essa espécie apresenta efeito antibacteriano (ROCHA; DANTAS, 2009), antioxidante (MELO et al., 2010), hipotensor e estimulante dos músculos lisos do intestino e do útero (LEAL; AGRA, 2005). Porém ainda são escassos os estudos ao que se referem a seu potencial terapêutico, sistemática e taxonomia (SANTANA; SOUTO, 2006).

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PLANTAS

Partes da planta como raiz, caule, folhas fornecem substâncias ativas que podem ser utilizadas pela indústria farmacêutica na obtenção de um medicamento e, por essa razão, as plantas estão sendo cada vez mais estudadas sendo consideradas possíveis fontes de substâncias com atividades biológicas. Essas substâncias são os chamados metabólitos secundários e comumente são utilizados em produtos e terapias (REZENDE et al., 2016; ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012).

Esses metabólitos não possuem suas funções fisiológicas totalmente definidas. Seus efeitos terapêuticos podem ser utilizados para o restabelecimento da saúde do ser humano mas também podem ser tóxicas a eles (JIRSCHITZKA et al., 2012). Por isso, os estudos realizados para avaliação da ação desses bioativos devem priorizar a qualidade e segurança desses produtos, associando conhecimentos com base nas ações farmacológicas e toxicológicas; a posologia e os aspectos clínicos associados às substâncias naturais, evitando uma propagação de uso inadequado e permitindo que o seu uso seja eficaz e não danoso (JORDAN, CUNNINGHAM, MARLES, 2010; SEEFF, 2007).

A realização de ensaios visando uma investigação analítica de forma quantitativa e qualitativa a fim de determinar a atividade de metabólitos frente a alguma enfermidade é imprescindível. Podendo assim, desvendar os conhecimentos relacionados às propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas, estabelecendo critérios de eficácia, segurança e qualidade para a população (CARVALHO, 2016; SOUZA et al., 2017).

Entre as atividades biológicas mais estudadas e pesquisadas para benefício da população, encontram-se as atividades antitumoral e antibacteriana. A investigação e procura de substâncias que possam atuar no combate a doenças como o câncer e as infecções causadas por microrganismos são de suma importância a nível mundial, sendo essas doenças responsáveis por altos índices de incidência e mortalidade em todo mundo.

2.3.1 Câncer: Aspectos Gerais e o Processo de Carcinogênese

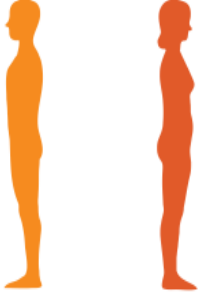
Câncer é o nome dado a um grupo de mais de cem doenças que tem como característica comum o crescimento e multiplicação anormal e descontrolada das células, podendo invadir tecidos e órgãos vizinhos e levando ao desenvolvimento de metástase (INCA, 2017a; MODIANO; BREEN, 2013). Vários fatores podem estar associados ao desenvolvimento de câncer; esses fatores podem ser internos ou externos ao organismo, estando eles geralmente correlacionados. Como causas internas, destaca-se os fatores genéticos que podem estar pré-

determinados levando ao descontrole celular ou a incapacidade do organismo de se defender de agressões externas. Já o ambiente onde nos encontramos e os hábitos de vida referem-se a fatores externos (INCA, 2017a).

Com base no documento *World Cancer Report (2014)* da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o câncer é um problema de saúde pública inquestionável, principalmente em países em desenvolvimento, onde espera-se que o impacto do câncer na população corresponda a cerca de 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados até 2025 (STEWART, WILD, 2014).

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2018/2019 aponta a ocorrência de aproximadamente 600.000 casos novos de câncer no Brasil para cada um desses anos, sendo a estimativa dos novos casos por localização primária do tumor e sexo demonstrados (figura 2) a seguir: (INCA, 2017b).

Figura 2 - Taxa de novos casos de câncer por localização primária do tumor e sexo, exceto pele não melanoma*

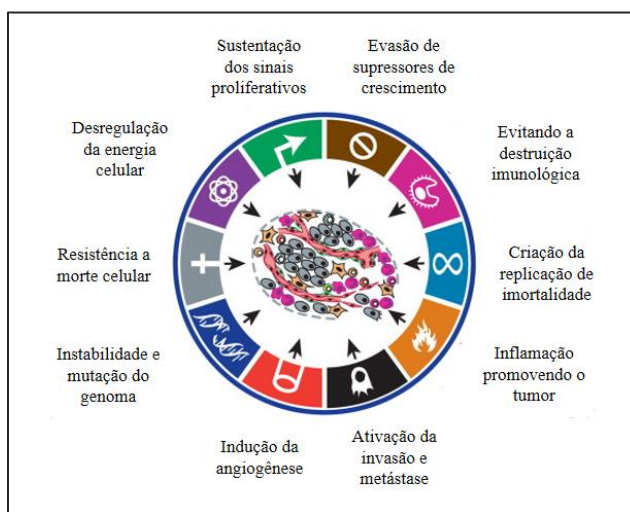
Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2017b

Durante o processo de carcinogênese, as células saudáveis acabam adquirindo capacidades que irão caracterizar a neoplasia, características essas que se manifestam através de alterações fisiológicas que permitem o crescimento do tumor e a metástase. Na figura 3, pode se observar as principais características do câncer descritas por Hanahan e Weinberg, (2011).

Figura 3 – Principais características do câncer



Fonte: Modifica de Hanahan e Weinberg, 2011.

Levando-se em consideração as recentes descobertas na oncologia, observa-se a importância dos genes supressores de crescimento, que são os responsáveis por manter a proliferação celular sob controle, reduzindo o crescimento celular. Porém, quando esses genes sofrem mutação perdem a capacidade de realizar essa função, permitindo assim o que as células com alterações no DNA se multipliquem de forma desordenada (BYRD; ARAGON; BREWER, 2012; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Muitos dos genes que participam dos processos de resposta aos danos causados ao DNA estão associados ao desenvolvimento de câncer e metástase, tais como, Rad9, PARP1, BRCA1, ATM e TP53. Muitos desses genes atuam como reguladores do ciclo celular, de proliferação e do mecanismo de senescência ou apoptose. Podem participar também na regulação de outros genes implicados na patogênese do câncer, sendo expressos em vários tumores humanos e estando relacionados à tumorigênese (BROUSTAS, LIEBERMAN, 2014; GONÇALVES, 2012).

Um processo de grande importância que também ocorre devido às características tumorais é a ativação da invasão e metastização. Este processo demonstra uma série de possíveis alterações biológicas sucessivas sendo elas: 1) invasão local, 2) invasão do tecido peritumoral e dos vasos sanguíneos e linfáticos (intravasão), 3) circulação das células (embolia neoplásica), 4) migração das células do lúmen dos vasos para o parênquima dos tecidos distantes, 5) agrupamento de células neoplásicas formando pequenos nódulos (micrometástases) e 6) crescimento das micrometástases levando à formação de tumores macroscópicos (GONÇALVES, 2012; TALMADGE; FILDER, 2010).

Entre outras características importantes para a sobrevivência das células tumorais, destaca-se a resistência à morte celular, também conhecida como apoptose, que funciona como um mecanismo para manter a homeostase do organismo, bem como serve de defesa na presença de agentes tóxicos. Um exemplo é o aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) ou de fatores de sobrevivência IGF 1 e 2, que diminuem a ação de fatores pró-apoptóticos (Ex: Bax, Bak e BH3) ou impedindo a morte celular induzida por ligantes extrínsecos (HANAHAH; WEINBERG, 2011; SU; MEI; SINHA, 2013).

A variedade de mecanismo que resulta na resistência à morte celular demonstra a diversidade de sinais indutores que as células cancerígenas descobrem durante a evolução do estado de malignidade (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Mas, além das vias apoptóticas, as células neoplásicas enfrentam outras condições que podem levar a sua morte, como a autofagia e a necrose (LANZ et al., 2013; RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013).

A morte celular necrótica diferentemente da apoptose, libera no microambiente do tecido sinais pró-inflamatórios que levam ao recrutamento de células inflamatórias do sistema imunológico (GALLUZZI; KROEMER, 2008; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, et al., 2010; WHITE et al., 2010). Naturalmente, esses elementos teriam como função examinar o dano tecidual e eliminar detritos necróticos restantes, mas vários estudos demonstram que essas células acabam, muitas vezes, colaborando com o crescimento tumoral. Eles podem agir promovendo a angiogênese, facilitando a proliferação das células neoplásicas, promovendo a invasão de outros tecidos e liberando fatores reguladores que podem estimular diretamente células viáveis vizinhas a se proliferar, facilitando a progressão neoplásica (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; RAICA; CIMPEAN; RIBATTI, 2009).

2.3.2 Carcinoma de Ehrlich

O avanço nos estudos a respeito do câncer de uma forma geral e dos mecanismos relacionados à sua etiologia, progressão, diagnóstico e tratamento, deve-se principalmente às pesquisas na área da oncologia experimental. Este ramo da oncologia surgiu com a introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis, que são mantidos em laboratório através da inoculação seriada em animais suscetíveis ou em cultura celular (GUERRA, 2002)

O adenocarcinoma de Ehrlich é um tumor espontâneo de glândula mamária, teve sua origem em camundongos fêmeas. Foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1896, e suas características foram descritas em 1909. Quando inoculado por via subcutânea ou

intramuscular em camundongos, desenvolve-se de forma sólida e, quando inoculado na cavidade peritoneal, desenvolve-se na forma ascítica (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992; NOGUEIRA, 2008; RIBEIRO, 2012; SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017).

A partir de 1940, os protocolos para pesquisas com a utilização do tumor de Ehrlich começaram a ser desenvolvidos e padronizados, adequando-se a pesquisas qualitativas e quantitativas. Esses protocolos representaram um marco na oncologia experimental pois o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia, conferiram vantagens para a escolha dessa metodologia (PALERMO; MASSOCO; SOUZA, 2003; VALADARES; QUEIROZ, 2002).

As características desse tumor são de crescimento espontâneo, indiferenciado e rápido, possui comportamento agressivo, levando a um curto período de vida. Em animais com o desenvolvimento do tumor na forma sólida a expectativa de vida é de 20 a 30 dias. Quando o animal desenvolve a forma ascítica, essa expectativa cai para 10 a 14 dias. Esse tumor não apresenta regressão espontânea e é facilmente transplantável em quase todas as espécies de camundongos usados em pesquisas (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017).

Quando o tumor se desenvolve de forma sólida, há a formação de edema e as células pró-inflamatórias migram para o local da inoculação. Após o terceiro dia de inoculação, já se pode notar um volume bem delimitado e ao toque observa-se que o tumor apresenta consistência fibrosa. A análise do tumor na forma sólida é realizada através do exame anatomopatológico, que é realizado após a excisão do tumor e, do ponto de vista morfológico, as células do tumor apresentam alto grau de atipias (anaplasia), com nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas e alta relação núcleo-citoplasma (RIZZO, 2000; SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017).

2.3.3 Bactérias patogênicas de interesse médico

As doenças causadas por bactérias podem ser causadas por bactérias exógenas e endógenas. As bactérias presentes na flora bacteriana humana podem romper as barreiras que delimitam sua flora normal, invadindo outros tecidos e levando ao desenvolvimento de infecções. O quadro infeccioso acontece quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores de virulência bacterianos e os mecanismos de defesa do hospedeiro, propiciando a multiplicação bacteriana e invasão de tecidos. A gravidade dessas infecções irá depender de algumas variáveis como a localização, estado imunológico do hospedeiro, número de bactérias infecciosas e os

microrganismos envolvidas (AMANO, 2010; RUSU et al., 2010; TODAR, 2009; TORTORA, 2010).

A capacidade dessas bactérias de originarem doenças no organismo é chamada de patogenicidade. Os microrganismos são chamados de bactérias patogênicas e dividem-se em dois grupos: patogênicas primárias ou obrigatórias e patogênicas oportunistas (BROOKS, 2010; TODAR, 2009).

As chamadas patogênicas primárias são capazes de originar um quadro infeccioso à medida em que entram em contato direto com um hospedeiro saudável. Já as bactérias patogênicas oportunistas são bactérias que estão em contato com o organismo de forma comensal, sem provocar doença, mas que mediante alguma alteração do hospedeiro como por exemplo na imunidade, elas podem desenvolver quadros patogênicos. (TODAR, 2009; TORTORA, 2010). Exemplos dessas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (DAYAN et al, 2016; OGAWA et al., 2012).

2.3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma espécie pertencente ao gênero *Staphylococcus*. As bactérias pertencentes a esse gênero são potencialmente patogênicas por possuir a capacidade de aderir a superfícies e desenvolver biofilmes, sendo essa uma forma de resistência à terapia antimicrobiana e às defesas do hospedeiro (PAHARIK; HORSWILL, 2016). *S. aureus* são cocos Gram positivos, oxidase negativo, catalase negativas, são imóveis, não esporulados e, na maioria das vezes, não encapsulados. Geralmente, apresentam-se em forma de cacho e está associada a uma variedade de infecções de caráter oportunista em seres humanos, tanto de origem comunitária quanto hospitalar (PESSOA, 2011; QUINN, 2011).

Nos seres humanos e animais, encontram-se presentes principalmente nas vias aéreas superiores, pele e cabelos. Podem provocar doenças devido a uma contaminação direta dos tecidos, bacteremia primária ou através da produção de toxinas. Em indivíduos sadios, matêm-se como comensais. Mas, diante a desequilíbrios na homeostase, podem gerar processos infecciosos, como foliculite, impetigo, furúnculos e abscesso, e até infecções invasivas como bacteremias, endocardite, pneumonias e meningites (NASCIMENTO, 2009; SILVA et al., 2010).

Além disso, essas bactérias possuem fatores de virulência sendo um deles a produção de toxinas, capazes de levarem a alergias, doenças autoimunes, intoxicações, síndrome da pele escaldada e síndrome de choque tóxico. Comumente essas toxinas, chamadas de endotoxinas,

encontram-se presentes em alimentos, sendo a fonte de contaminação mais frequente a manipulação e estão associadas também ao mal armazenamento do alimento ficando em uma temperatura ideal para o crescimento bacteriano e a produção de toxina (FORSYTHE, 2013; SILVA et al., 2010).

Outro fator que confere virulência ao *S. aureus* é a produção de proteína A. Ela é ligada à parede celular e estimula o sistema imunológico desencadeando a resposta inflamatória e a formação de uma cápsula polissacarídica, protegendo-a da fagocitose. A produção da enzima coagulase é outro mecanismo que dificulta a morte celular, pois ela converte o fibrinogênio em fibrina, provocando a deposição de fibrina em torno da bactéria (SANTOS et al, 2007).

No início da década de 70, as cepas de *S. aureus* começaram a apresentar resistência ao antibiótico meticilina, sendo essas bactérias identificadas como *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), sendo também resistentes aos demais betalactâmicos (cefalosporinas e outros). No ano de 1977, no Japão, surgiu a primeira cepa de *S. aureus* com resistência à Vancomicina (*S. aureus* Resistente à Vancomicina [VRSA]). As cepas de *S. aureus* resistente se disseminaram de forma rápida nos ambientes hospitalares, limitando cada vez mais, os antibióticos utilizados na terapia contra essa espécie (DOS SANTOS, 2007).

2.3.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie bacteriana Gram negativa, pertence à família Enterobacteriaceae, não é esporulada, é anaeróbica facultativa, fermentativa, e apresentam flagelos peritríqueos que as conferem motilidade, sendo típica do sistema gastrointestinal humano e umas das principais responsáveis por causar infecções nas vias urinárias e doenças diarreicas (BROOKS, 2010; CUNHA et al., 2012).

As cepas de *E. coli*, assim como *S. aureus*, também podem ser comensais no organismo, mas também podem ser patógenos importantes principalmente em quadros de imunodepressão. Por estarem presentes no intestino de mamíferos e aves, são encontrados nas fezes e a sua presença em alimentos indica contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos (JORIS et al, 2013; KNOBL et al, 2012).

Existem várias cepas patogênicas de *E. coli*, que baseado no potencial de virulência, sinais clínicos e nos mecanismos patogênicos, são divididas em seis grupos: enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroagregativa (EAaggEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente adesiva (DAEC). Comumente a transmissão dessa bactéria ocorrem através de alimentos contaminados e, como sintomatologia, pode

apresentar dores abdominais, diarreia, febre e vômito, e até complicações mais graves como colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica, púrpura trombótica trombocitopênica, doença crônica nos rins e distúrbios nervosos centrais os quais podem levar a convulsões, coma e morte (FORSYTHE, 2013).

Assim como as cepas de *S. aureus*, as cepas de *E. coli* também vêm se tornando resistentes aos antibióticos comumente utilizados. Estudos demonstraram que, nos últimos anos, a resistência de *Escherichia coli* a antibióticos vem aumentando, tanto a nível comunitário como a hospitalar. Esse fato pode ser explicado por fatores de virulência relacionados a alterações fenotípicas e genotípicas (FASUGBA et al., 2015; MIRANDA-ESTRADA et al., 2017). Dias et al. (2010) estudando a sensibilidade de 44 cepas de *E. coli* e observaram que 50% das cepas apresentaram resistência a Penicilina, 2,27% a Ampicilina, 40,90% a Oxacilina e 100% a Carbenicilina. Uma das cepas aduziu resistência a 41,66% dos antimicrobianos.

2.3.2.3 Mecanismos de resistência

A resistência bacteriana frente a algumas substâncias é resultado dos mecanismos de adaptação frente aos antimicrobianos disponíveis no mercado fazendo com que seja necessário a utilização de fármacos cada vez mais onerosos e inacessíveis à população de baixa renda. Esse fenômeno crescente tem atingido em larga escala a saúde pública mundial e é considerado uma resposta evolutiva a presença de substâncias antimicrobianas no ambiente e ao uso inadequado dessas drogas (BRASIL, 2012a; MACK, 2011; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2014; OBATA, 2010; WHO, 2013).

Quando o mecanismo de resistência surgiu, as bactérias se mostravam resistentes a uma única droga sendo possível a utilização de outros agentes antimicrobianos. Já nos últimos anos, ocorreu o aparecimento das espécies chamadas multirresistentes, dificultando o controle de várias infecções, principalmente das infecções hospitalares (FERNANDES, 2006; SHEA, 2003).

Esse acontecimento pode acontecer por meio de mutações (deleções, inserções ou mutações pontuais) ou por transferência lateral de genes de resistência (KAPIL, 2005; NORMARK; NORMARK, 2002; PITONDO-SILVA et al., 2014). As mutações ocorrem de forma espontânea durante o processo de divisão celular, mas que podem ser promovidas por agente mutagênicos, como por exemplo o raio X (DAVIES; DAVIES, 2010).

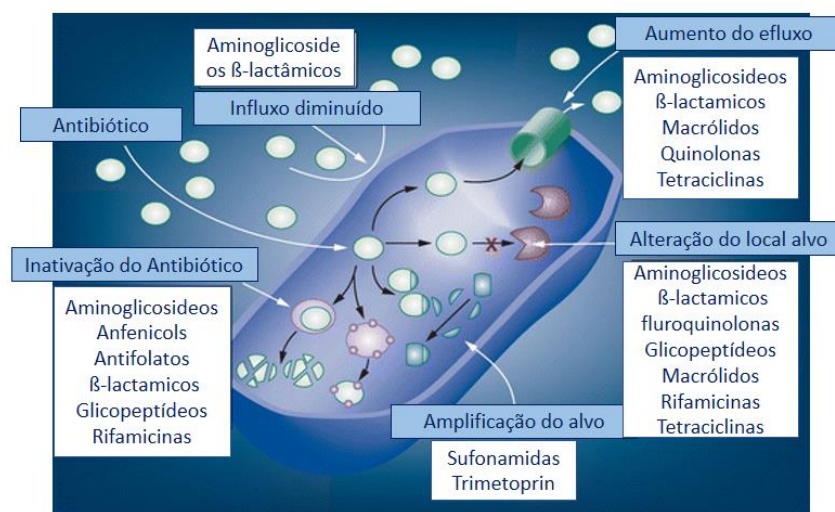
A transferência lateral ou horizontal de genes corre através de 3 mecanismos principais: 1) através de bacteriófagos (transdução); 2) plasmídeos (conjugação); e 3) e inserção direta de

DNA bacteriano do ambiente (transformação) (ZHANG; ZHANG; FANG, 2009). A transdução acontece apenas entre bactérias da mesma espécie e ocorre através da transferência de genes de uma bactéria para outra através de um vírus que se utiliza dos componentes celular da bactéria para se multiplicar. Ao realizar a multiplicação, esse vírus (bacteriófago) pode incorporar ao seu genoma fragmentos do DNA que contenham o gene de resistência e ao infectar outra bactéria pode carrear esses genes (FINLEY et al., 2013; TAVARES, 2000).

Quando o mecanismo acontece por conjugação, existe o contato físico entre as bactérias que podem ser da mesma espécie ou não. Esse contato pode ocorrer através do pili sexual ou pelo contato célula a célula. Já o mecanismo de transferência é considerado como o mais importante do ponto de vista clínico e ocorre quando uma bactéria absorve um fragmento de DNA de uma bactéria que sofre lise ou teve seu DNA liberado. Esse DNA pode ser um fragmento de cromossomo ou plasmídeo ou ocorrer através de transposons (fragmentos de DNA que não se multiplicam independentemente como os plasmídeos, mas que podem inserir DNA receptor ou plasmídeo e se replicar junto com ele) (CAUMO et al., 2010; FINLEY et al., 2013; FRANCO et al., 2009; GONZALEZ-CANDELAS et al., 2011; MERLIN et al., 2011; TAVARES, 2000).

Os mecanismos que levam à resistência mais conhecidos são: a) inativação enzimática; b) alteração de permeabilidade; c) bomba de efluxo; d) alteração do sítio de ação da droga; e) proteção do sítio de ação; f) superprodução de alvos (BOSZCZOWSKI, 2016). A figura 4 demonstra 5 desses mecanismos e quais as classes de drogas que agem em cada um deles.

Figura 4 - Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias.



Fonte: Modificada de Schmieder e Edwards, 2012.

A procura de soluções para o fenômeno da resistência bacteriana leva à investigação de fármacos alternativos para o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos. Uma estratégia recentemente utilizada é a combinação dos agentes antimicrobianos com extratos vegetais com a finalidade de buscar novos antimicrobianos, sendo considerados fontes promissoras nesse sentido. Esses fitoquímicos podem agir modificando os mecanismos de resistência, podendo modificar receptores ou sítios ativos ou bloqueando rotas metabólicas, potencializando o efeito do antimicrobiano sintético (HEMAISWARYA et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que extratos e óleos essenciais derivados de plantas podem modificar a atividade de antimicrobianos e assim melhorar o seu desempenho, diminuindo a concentração necessária para que haja a inibição do crescimento (COUTINHO et al., 2008b; MATIAS, 2010).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As folhas de *Jatropha mollissima* (5 A) foram coletadas em julho de 2017, na cidade de Caruaru, Pernambuco, Brasil, no Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA (Figura 5 B). Sítio Malhada Pedras (Coo. dms; 8° 14' 24.662" S 35° 55' 15.085" W ") e enviadas à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A exsicata foi depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de registro 82.721 (Figura 5 C).

Figura 5 : *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill



Fonte: Dados da pesquisa

Em A: Arbusto de *Jatropha mollissima*. B: Local de coleta (Instituto Agronômico de Pernambuco). C: Exsicata depositada sob o número de registro 82.721.

Posteriormente, as folhas foram lavadas, pesadas e levadas para estufa de secagem com circulação de ar e temperatura de 45 °C por 48 horas. O extrato de folhas secas foi preparado por maceração em Etanol PA, foram utilizados 100 g de folhas secas e a extração aconteceu por esgotamento, finalizando as extrações com um volume utilizado de 5 L de Etanol. As filtrações do extrato aconteceram através de papel filtro e após as sucessivas extrações o material foi evaporado em evaporador rotativo a temperatura média de 45 °C e a pressão reduzida, obtendo o extrato seco. Calculou-se o rendimento total do extrato, de acordo com a fórmula:

$$RE\%: \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100$$

Onde: RE = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g); P_{folhas} = Peso das folhas frescas ou secas (g).

3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Após secagem, o extrato etanólico bruto das folhas de *J. mollissima* foi submetido a duas metodologias para identificação dos seus fitoconstituintes.

3.2.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada

Foram retirados 15 µL do extrato e submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de gel de sílica (MERCK-Germany,15553), empregando-se o sistema de solventes.

Os alcalóides foram revelados com reagente de Dragendorff e utilizado escopolamina como substância padrão. Para flavonóides, uma alíquota do extrato foi solubilizada em álcool 70 % (ETOH 70 %), adicionado Clorofórmio (CHCl_3) e agitado para obtenção de duas fases, clorofômica e hidroalcoolica. Empregou-se uma mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100: 11: 11: 26 v/v) como fase móvel e foi revelada com o reagente de NEU, com observação em câmara de U.V. (365 nm), que utilizou como substância padrão a quercetina. Para a pesquisa de terpenos empregou-se como fase móvel uma mistura, tolueno: acetato de etila (93:7 v/v), revelada com vanilina sulfúrica a 1 %, seguida de aquecimento em estufa (100 °C). O surgimento de manchas com coloração roxo/verde/azul foi usado como critério diagnóstico. Para as Cumarinas, a fase móvel utilizada foi éter (1:1) após secagem utilizou-se o revelador KOH/EtOH e colocou sob uma luz UV. Na pesquisa de glicosídeos, em um tubo o extrato foi tratado com 1 mL de ácido acético. Adicionaram-se 2 gotas de FeCl_3 2%

(m/m) e transferiu-se para um tubo contendo 2 mL de H₂SO₄ concentrado observando possível mudança de cor castanho – avermelhada. Para taninos o efluente utilizado foi acetato de metila: tolueno: ácido fórmico: água (80:10:5:5) e o Revelador FeCl₃ e para as saponinas foi usado o índice de espuma após a agitação.

3.2.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada segundo a metodologia preconizada por Matos (1988), onde o extrato seco foi dissolvido e foram realizadas várias reações químicas para revelação dos seus componentes. Para identificar o grupo de heterosídeos antraquinônicos, foi usada a reação de Bornträger; no grupo de esteróides e triterpenóides, foi usada a reação de Liebermann-Burchard, a reação de Keller-Kiliani e a reação de Pesez; no grupo de heterosídeos flavonoides, foi usada a reação com ácido sulfúrico concentrado, a reação com hidróxidos alcalinos e a reação com cloreto de alumínio; no grupo de heterosídeos saponínicos, foi usado o índice de espuma após a agitação da solução neutralizada com carbonato de sódio; no grupo de fenóis e taninos, foi usada a reação com sais metálicos (acetato de cobre e cloreto de ferro) ; no grupo dos alcalóides foi usado o reativo de Mayer, o reativo de Dragendorff; no grupo das cumarinas foi usado o teste da fluorescência, sob luz UV, com uma gota de hidróxido de sódio e no grupo das resinas, foi avaliada a presença de uma coloração turva no extrato etanólico.

3.3 TOXICIDADE AGUDA

Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob protocolo de nº 0034/2017. Os experimentos foram conduzidos no Laboratórios de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2001) com doses sequenciais, seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3.1 Animais

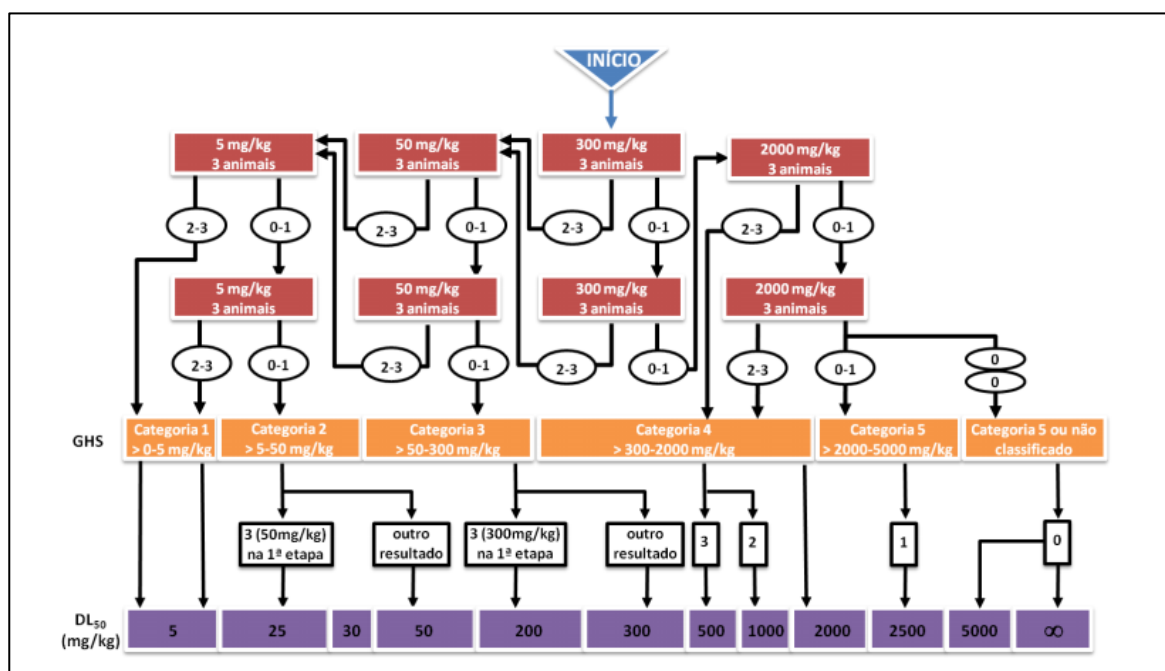
Nos ensaios biológicos, foram utilizadas fêmeas (nulíparas e não grávidas) de camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)*, pesando entre 30 e 45 gramas e com idades entre 90 e 120 dias. Os grupos experimentais de camundongos continham três animais por grupo.

3.3.2 Protocolo experimental

Como sugerido pelo protocolo, quando não houver estudos preliminares, deve-se partir da dose inicial de 300 mg/kg, onde a próxima dose a ser testada é determinada a partir do resultado da primeira aplicação, conforme apresentado na Figura 6.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/12 h escuro) e temperatura de 25 ± 2 °C. A alimentação foi suspensa por, no mínimo 4 horas, antes do experimento e a água liberada *ad libitum*, a alimentação foi reintegrada após 3 horas da administração. O EEJM foi solubilizado com Polysorbate (Tween 80) e água destilada. Posteriormente, a solução foi administrada por via oral nos camundongos, introduzida no trato digestório dos animais, através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo CEUA.

Figura 6 - Fluxograma representando a metodologia de toxicidade segundo OECD



Fonte: OECD (2001)

Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg.

3.3.3. Acompanhamento e análise histopatológica

Após a administração da dose por via oral, os animais foram acompanhados nas primeiras 2 horas, periodicamente nas primeiras 24 horas e diariamente por 14 dias. Cada animal foi marcado de forma diferente para posterior acompanhamento. As marcações foram realizadas com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais de 1 a 3. Os animais foram observados quanto às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

A massa corporal de cada animal e os parâmetros fisiológicos (consumo de ração e produção de excretas) foram acompanhados diariamente. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Foram retirados os órgãos (fígado, baço, rins e pulmão), lavados e fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas, e posteriormente lavados com água destilada e processados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100 %), embebida em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) subsequentemente foram analisados em microscopia.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo*.

Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação e Uso Animal (CEUA) da UFPE, Processo nº 0034/2017. Para análise da atividade antitumoral *in vivo*, foram utilizadas células tumorais da linhagem Carcinoma de Ehrlich (forma sólida) e seguido o modelo proposto por Geran e colaboradores (1972), com algumas modificações.

3.4.1 Animais

Os animais utilizados foram camundongos albinos Swiss, (*Mus musculus*), fêmeas com idade de 35 a 60 dias e massa médio de 30,0 g, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos- UFPE. Foram mantidos no biotério à temperatura de 25 °C ± 2 °C, sob ciclo dia/noite (12 h claro e 12 h escuro), com livre acesso de água e alimento durante o experimento e distribuídos em grupos segundo delineamento experimental.

3.4.2 Delineamento experimental do estudo antitumoral *in vivo*

As células do tumor experimental, carcinoma de Ehrlich, foram cedidas pelo Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos - UFPE. As células tumorais foram mantidas em camundongos albinos Swiss fêmeas, na forma ascítica, com frequência de manutenção de 7 dias. Os animais utilizados nos testes foram divididos em 4 grupos sendo eles: G1: Grupo controle negativo; G2: Grupo Controle positivo; G3: Grupo tratamento EEJM (100 mg/kg); e G4: Grupo tratamento EEJM (300 mg/kg). Para realização do experimento foram retiradas células do tumor ascítico do animal doador ($5,0 \times 10^6$ cél. ml⁻¹) e inoculadas via subcutânea na região axilar direita dos camundongos para desenvolvimento do tumor na forma sólida.

3.4.3 Tratamento e cálculo de inibição

O tratamento teve início 48 h após inoculação e foi realizado durante 7 dias consecutivos. As soluções de cada grupo foram administradas de forma oral por sonda intragástrica (gavagem), com exceção do grupo controle positivo que recebeu a solução por via intraperitoneal. A solução utilizada pelo grupo controle negativo para tratamento dos animais foi solução salina a 0,9 % estéril + tween; os animais do grupo controle positivo foram tratados com cisplatina (0,5 mg/kg), os animais do grupo EEJM 100 mg/kg e 300 mg/kg, receberam solução contendo salina estéril a 0,9 %, Tween 80 a 0,05 % (v/v) e as doses respectivas do extrato, todos em idênticas condições. Foram utilizados para a experimentação *in vivo* 20 animais divididos igualmente entre os tratamentos, ou seja, grupo 1: Solução Salina (5); grupo 2: Cisplatina (5), grupo 3: EEJM 100 mg/kg (5) e grupo 4: EEJM 300 mg/kg (5). Um dia após o término do tratamento, os animais foram anestesiados e consecutivamente foram sacrificados para retirada dos tumores e órgãos (fígado, pulmão, rins e baço) que posteriormente foram fixados em solução de formol e, em seguida, submetidos a análises histopatológicas. A taxa de Inibição Tumoral (IT %) foi determinada a partir da massa média dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado: $IT \% = C - T / C \times 100 \%$, onde C é a massa média dos animais do grupo controle (solução salina) e T corresponde a massa média dos animais dos grupos tratados.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados da toxicidade e da atividade antitumoral, utilizou-se o programa Microsoft Excel, exportando os dados para o software SPSS onde foi realizada a análise de estatística ANOVA (Análise de Variância). Quando observado variação estatística significativa foi aplicado o método Holm-Sidak para comparação da distribuição do parâmetro de interesse entre os grupos de tratamento. Considerou-se valores $p < 0,05$.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA

3.6.1 Preparo da solução inicial

No preparo da solução inicial, a amostra foi solubilizada em Tween 80, que foram calculadas as seguintes proporções: 10 mg da amostra solubilizados em 20 µl de Tween 80 e posteriormente diluído em água destilada, obtendo uma concentração inicial de 1024 µg/mL.

3.6.2 Microrganismos

Os microrganismos que foram utilizados nos testes foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Foram utilizadas linhagens padrões de bactérias *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e linhagens bacterianas multirresistentes (isolados clínicos) *E. coli* 27 e *S. aureus* 358.

3.6.3 Preparo e padronização de inóculos bacterianos

Culturas de bactérias ficaram mantidas a 4 °C em caldo *Brain Heart Infusion* – BHI (Acumedia Manufacturers Inc) a 10 % (preparado segundo as especificações do fabricante). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio BHI e incubadas a 35 °C por 24 horas. As linhagens repicadas a serem testadas foram diluídas em solução salina até atingir a concentração 0,5 McFarlan de equivalente a 10^5 céls/mL (CLSI 2014).

3.6.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

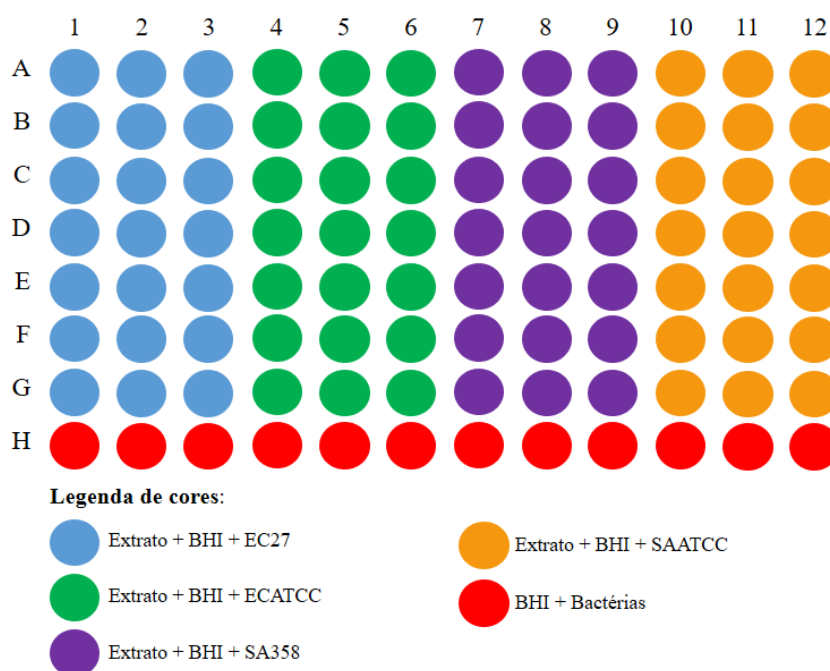
Os ensaios para determinação da CIM do extrato foram efetuados através do Método de Microdiluição em Caldo, com concentrações variadas (NCCLS, 2003). As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas 1:10 em Caldo BHI para obtenção da concentração final de 10^4 céls/mL (NCCLS, 2000).

As amostras foram preparadas em concentração dobrada em relação à concentração inicial definida (2.048 μ g/mL). Em cada cavidade, havia 100 μ L do meio de cultura com uma amostra de suspensão bacteriana diluída 1:10 e volumes de 100 μ L foram diluídos seriadamente 1:2 no caldo BHI 10 % a partir do primeiro poço. O esquema de distribuição das amostras e bactérias está demonstrado na figura 7.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram usados controles positivos (meio + inóculo) e controles de inibição utilizando o extrato em concentrações decrescentes a partir da máxima de 1.024 μ g/mL. As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Em placa separada também foi inoculado apenas o meio de cultura para verificação da esterilidade (controle negativo) (NCCLS, 2003).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 μ L da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente.

Figura 7 - Esquema de distribuição e diluição seriada dos extratos vegetais na microplaca de 96 poços.



Fonte: Dados da pesquisa

3.6.5 Avaliação da interferência do extrato sobre a resistência aos antibióticos aminoglicosídeos

Para avaliar o extrato como modulador da ação antibiótica, foram utilizados os antibióticos Amicacina e Gentamicina (*Sigma Aldrich Chemical Co.*, USA) e as cepas resistentes das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. A CIM foi avaliada na presença e na ausência do extrato em microplacas estéreis. O extrato foi diluído em caldo BHI 10 % em concentrações sub inibitórias (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada em relação à concentração inicial definida (1024 µg/mL) e volumes de 100 µL diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10 %. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura havia a suspensão bacteriana diluída (1:10). Foram utilizados os mesmos controles citados no teste da CIM (COUTINHO et al., 2008a). As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina sódica como citado anteriormente.

Os resultados dos testes foram obtidos em triplicata e expressos como média geométrica. Para análise estatística será aplicada a two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Considerando significância com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios propostos nessa pesquisa, a seguir, estão os resultados obtidos através das atividades testadas.

4.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para a obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de *Jatropha mollissima* (EEJM), foram utilizados 100 g do material seco, e resultou em 13,94 g de extrato, sendo de 13,94 % a taxa de rendimento calculada.

O Rendimento total do Extrato (RE) encontrado neste estudo está semelhante às encontradas na literatura em relação a outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Do Carmo e colaboradores (2017), encontraram RE de 15,56 % para extrato etanólico de *J. gossypifolia* e Santos (2014) utilizando metanol como solvente obteve 10,12 % de RE para a mesma espécie. Entretanto, outros trabalhos, como o realizado por Rocha (2013) calculou o

rendimento do extrato etanólico das folhas secas da *J. curcas*, como 21,97 %, resultado esse que se encontra acima dos obtidos para o EEJM.

Esses resultados são considerados normais ao observamos que além da diferença entre espécies existem inúmeros outros fatores que influenciam o rendimento do extrato como por exemplo: as condições ambientais em que a planta se encontra, o solvente utilizado e o método de extração.

4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

As plantas utilizadas pelo homem com a finalidades curativas têm instigado pesquisas que pretendem avaliar as suas atividades biológicas e os metabólitos secundários. Para elucidar e caracterizar as substâncias presentes nesses vegetais, tem se investido em estudos fitoquímicos buscando registrá-las e caracterizá-las. O perfil fitoquímico é um estudo preliminar que busca detectar a presença dos compostos de determinada planta e caracterizá-los. Servem de base para a investigação de plantas medicinais e como orientação para análises mais específicas e produção de fitoterápicos ou medicamentos de origem vegetal.

A análise fitoquímica preliminar do EEJM coletadas em Caruaru – PE, foi realizado utilizando duas metodologias diferentes: Prospecção fitoquímica e Cromatografia de Camada Delgada. Os resultados obtidos nas análises dos constituintes químicos encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima*.

Metabólicos secundários avaliados	Resultado
Ácidos Fixos Fortes	-
Alcalóides	-
Antocianinas e Antocianidinas	-
Auronas e Chalconas	-
Catequinas (Taninos Catéquicos)	+
Cumarinas	+
Esteróides Livres	+
Fenóis	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	+
Flavanonas	+

Tabela 1 - Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima*.

(Continuação)

Flavononóis	-
Heterosídeo Cianogênicos	-
Leucoantocianidinas	-
Resina	-
Saponinas	-
Taninos Hidrolisáveis	-
Taninos Condensados ou Catéquicos	+
Triterpenóides	-

Fonte: Dados da pesquisa

Resultado positivo (+), Resultado negativo (-), Não realizado (NR).

Tabela 2 - Metabólitos encontrados no extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. através de Cromatografia de Camada Delgada.

Classe de metabólitos	Presença/Ausência
Alcalóides	-
Cumarinas	+ + +
Flavonóides	+ + +
Glicosídeos	+
Taninos	-
Terpenos	+ + +
Saponinas	-

Fonte: Dados da pesquisa

Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

Os métodos químicos e cromatográficos são os procedimentos preliminares de prospecção fitoquímica mais utilizados. Os métodos químicos, como a prospecção fitoquímica de Matos (1988), baseiam-se na reação que ocorre entre os compostos presentes nos extratos vegetais e reagentes que são detectores previamente conhecidos. É a metodologia mais antiga e tem estudos datados de 1850 e podem ser baseados em precipitação, mudança de cor e formação de espumas.

A cromatografia é uma técnica utilizada também para identificação e análise de misturas e substâncias isoladas e consiste na utilização de uma fase estacionária e uma fase móvel que

irá eluir pela estacionária, separando os compostos em diferentes níveis. Existem vários tipos de Cromatografia, entre elas a CCD, que pode ainda se utilizar de reveladores para confirmação das substâncias (SIMÕES et al., 2010).

Conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2, foram reveladas através dessas técnicas a presença de diversas classes de metabólitos especiais, a saber: catequinas, cumarinas, esteróides livres, flavonas, flavonóis e xantonas, flavanonas, glicosídeos, taninos e terpenos. Na tabela 1, são mostrados os dados obtidos através da prospecção fitoquímica, que foram expressos de forma qualitativa. Já na tabela 2, encontramos as análises realizadas através de CCD com a utilização de reveladores para confirmação dos metabólitos e seu resultado apresentado de forma semi-quantitativa.

As duas análises corroboram com a maioria dos metabólitos pesquisados, existindo divergência apenas quanto a presença de taninos, onde a análise realizada baseada em Matos (1988) demonstrou a presença de taninos, já na análise realizada através de CCD a sua presença não foi detectada. Entende-se, que a aplicação dos métodos qualitativos e semi-quantitativos, como é o caso dos dois testes, possibilita um *screening* inicial (MATOS, 1997), especialmente quando não existem muitos estudos sobre o perfil fitoquímico da espécie. Logo, estudos mais detalhados são necessários para que se esclareça a composição do extrato testado e se esclareça as divergências entre os testes preliminares.

Poucos autores realizaram estudos fitoquímicos de *J. mollissima*, um deles foi Ribeiro (2014), seus resultados demonstraram a presença de flavonoides como um dos metabólitos secundários mais presentes, além de também terem sido encontrados cumarinas, esteroides, taninos e terpenos, corroborando com os dados encontrados nesse trabalho. Porém outros metabólitos que não foram encontrados nas nossas análises foram detectados, como: saponinas e alcaloides.

Melo et al (2010) realizou a pesquisa de terpenos nas folhas de *J. mollissima*, pelo método de difusão radial e também foi detectada a presença desse constituinte em uma concentração de 2,35 mg a cada 100 mg, resultado que demonstra similaridade com os resultados obtidos.

Branquehais et al. (2016) também realizou um estudo preliminar fitoquímico do EEJM e detectou cumarinas, taninos e alcaloides, esses resultados demonstram semelhança nos resultados obtidos, como também com os relatos descritos por Mariz et al. (2010), que utilizando extratos aquosos e orgânicos de partes de uma espécie de *Jatropha* detectou presença de taninos, cumarinas e alcaloides.

As poucas diferenças a respeito dos metabólitos secundários encontrados neste trabalho em relação aos de outros autores, pode ser justificada pelo fato de que os constituintes fitoquímicos de espécies vegetais sofrem influência qualitativa e quantitativa das variações climáticas e geográficas a que são expostos (NASCIMENTO et al., 2008). A maioria dos constituintes encontrados nesse trabalho estão de acordo com a literatura, apesar de poucos dados sobre a fitoquímica da espécie *J. mollissima*. Existe também outros relatos fitoquímicos de espécies do mesmo gênero em que podemos encontrar compostos semelhantes aos que foram detectados neste estudo.

Das e colaboradores (2009) verificaram a presença de terpenos ao analisarem o extrato de *Jatropha multifida*, resultado encontrado também por Braskarwar, Itankar e Fulke (2008), que detectaram no extrato das cascas de *Jatropha podagrica* a presença de terpenos além de outros metabólitos como esteróides. Ebuehi e Okorie (2009) encontraram alcalóides, glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos, taninos, flavonóides e saponinas no extrato metanólico das folhas de *Jatropha. curcas*. Já Okuyama et al. (1996) isolaram flavonóides e cumarinas em espécies de *Jatropha cillata*.

Dos metabólitos encontrados no EEJM que possuem atividades biológicas comprovadas, destacam-se nesta pesquisa os compostos que demonstram capacidade antibacteriana e anticâncer. A exemplo dos compostos que apresentam efeito tanto frente à microrganismos patogênicos, como na redução de células cancerígenas, destacamos: os taninos, os terpenos, os flavonoides e as saponinas (BESSA et al., 2013; LUZ et al., 2014; SIMÕES et al. 2010).

Ainda nesse sentido, evidencia-se os compostos fenólicos e as catequinas, como antioxidantes, reduzindo o risco de tumores e processos inflamatórios. E os esteróis, que destacam-se como redutores da absorção do colesterol da dieta e, consequentemente, na redução do risco de doenças cardiovasculares e na inibição do crescimento de certos tipos de tumores malignos (BESSA et al., 2013; SALGADO, 2009).

4.3 TOXICIDADE AGUDA

No ensaio de toxicidade, a menor dose testada nesse experimento (300 mg/kg), não levou nenhum dos 3 animais a apresentarem mortalidade ou morbidade nas primeiras 24 horas após a exposição ao extrato e nem durante o estudo. Sendo assim, seguiu-se o protocolo e realizou a exposição dos animais a dose de 2000 mg/kg, onde também não foi verificada

morbidade ou mortalidade. A dose de 5000 mg/kg não foi realizada pois a OECD indica o seu uso apenas em casos excepcionais onde exista a necessidade de sua utilização.

De acordo com os resultados diante das doses testadas o extrato foi classificado na categoria 5 de acordo com o GHS e sua Dose Letal₅₀ (DL₅₀) foi estipulada como ≥ 5000 mg.

Os sinais clínicos observados após a exposição dos animais as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg foram observados em relação a um grupo controle (CT), onde os animais receberam apenas solução salina + tween 80, na mesma proporção das doses. Os resultados foram tabulados segundo MALONE (1983) e estão demonstrados na tabela 3. Observou-se que os efeitos mais pronunciados foram no sistema nervoso central (SNC), principalmente desencadeando atividade estimulante, tais como aumento da ambulação, aumento da frequência respiratória, ereção de cauda, movimento estereotipado e reação de fuga.

Tabela 3. Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEJM em Camundongo *Mus musculus*.

Sinais Clínicos	Doses via oral (mg/kg)											
	300						2000					
	30 min			1 h			30 min			1 h		
	CR	TM	SM	CR	TM	SM	CM	LM	RM	CM	LM	RM
1. Sist. Nervoso Central												
Ausência de coord. motora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsão tônica crônica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parada cardiorrespiratória	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Refluxo	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1.1 Efeitos estimulantes												
Agressividade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ambulação aumentada	+++	++	++	+	+	+	+++	+++	++	++	+	+
Aumento da respiração	+	+	+	+	-	+	+++	+++	+++	+++	++	+++
Autolimpeza	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Bocejo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ereção de cauda	++	++	++	+	+	+	+++	+++	++	-	-	-
Espasmos	-	+	-	-	-	-	+	++		-	-	-
Frêmito vocal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversão de macha	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Irritabilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimento circular	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabela 3. Sinais clínicos e taxa de mortalidade após administração por via oral do EEJM em Camundongo *Mus musculus*.

(Continuação)												
Movimento das vibrissas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimento estereotipado	+++	+++	++	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Reação de fuga	+	-	+	-	+	-	+++	++	++	+	-	+
Sacudir a cabeça	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saltos acrobáticos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremores grosseiros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2 Efeitos depressores												
Ambulação diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catatonía	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda em straub	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Perda do reflexo auricular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptose palpebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resposta ao toque diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Sist. Nervoso												
Autônomo												
Cianose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diarreia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dispneia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distensão abdominal	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Diurese	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Edema de focinho	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Excreção fecal	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	++
Piloereção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taquipneia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Dados da pesquisa

Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

O comportamento estereotipado complexo e o aumento da ambulação observado nos camundongos tratados com o extrato, sugere uma possível atividade sobre o SNC considerando que, a atividade locomotora espontânea e o movimento repetitivo estão relacionados com os níveis de excitabilidade desse sistema (DA COSTA JÚNIOR et al., 2011). Prut e Belzung (2003), relataram em seus estudos que sinais como locomoção aumentada podem ser um indicativo de um efeito estimulante.

Diversos autores já relataram a capacidade de metabólitos secundários extraídos de plantas demonstrarem atividades nesse sistema (ALMEIDA et al., 2012; GIRARD, 2003; MUSTAD, 2014; SILVA et al, 2017a). Alguns dos metabólitos encontrado no EEJM são conhecidos por causarem alterações a nível de SNC. Um exemplo seria a classe das catequinas que foram encontradas nessa pesquisa e que em estudo realizado por Westerterp-Plantenga (2010) demonstrou que tanto as catequinas presentes no chá verde quanto a cafeína podem atuar inibindo a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) que é a responsável pela degradação das catecolaminas. Como consequência do acúmulo de substâncias como a noradrenalina o SNC será estimulado continuamente.

MacLennan, Darlington e Smith (2002) afirmam que os terpenos constituem o grupo de metabolitos com ações sobre o SNC, em seu estudo os diterpenóides encontrados no extrato de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), atuaram modulando sistemas neurotransmissores, tais como serotoninérgicos, noradrenérgico, dopaminérgico e colinérgico, aumentando o fluxo sanguíneo. Baseado nesse fato, podemos pressupor que esses transmissores tenham contribuído para alguns efeitos apresentados pelos animais como: formação do edema de focinho e aumento da frequência respiratória.

Os terpenos também atuam estimulando a geração do segundo mensageiro Trifosfato de Inositol (IP3), que mobiliza o Cálcio intracelular, levando a excitotocidade celular. Colaboram com o processo de consolidação de memória e também apresentam resultados na redução do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, aumentando assim, o tempo de latência para início do sono (MACLENNAN; DARLINGTON; SMITH, 2002; PASSOS et al, 2009). Esses fatos podem ter contribuído e influenciado no aumento da ambulação, e de forma geral nas características de estimulação do SNC.

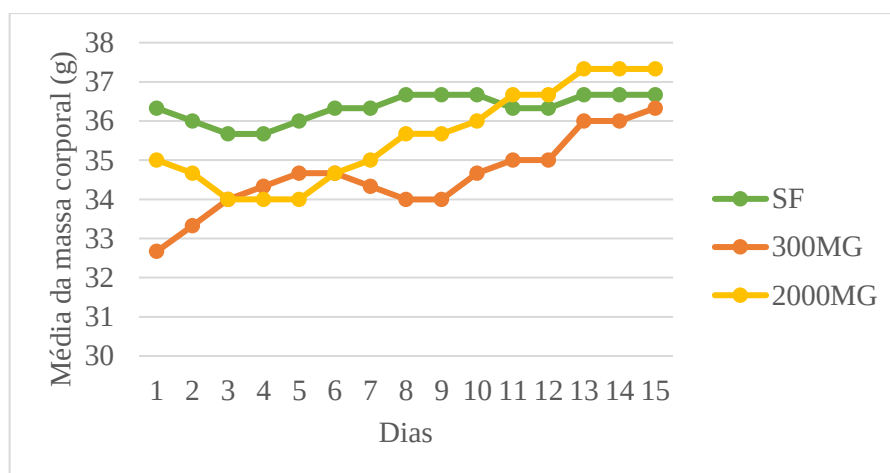
Como observado na tabela 3, não foi constatada mortes em nenhuma das doses testadas estando classificado como um extrato não tóxico, porém Branquehais (2016) realizou um teste de toxicidade que caracterizou o EEJM como tóxico mesmo em baixas concentrações. No entanto nesse estudo o ensaio de toxicidade foi baseado na Concentração Letal (CL50), utilizando o micro crustáceo *Artemia salina* e no presente, utilizamos o modelo da OECD,

buscando a DL_{50} em um modelo *in vivo* utilizando camundongos, o que pode contribuir para a obtenção de resultados diferentes. Associado a esse fator também soma-se o fato do material vegetal ter sido coletado em datas e locais diferentes o que pode levar a diferentes constituições fitoquímicas que poderão gerar respostas biológicas divergentes.

De acordo com Beutlher et al. (2001), é possível que plantas de diferentes variedades possam ter resultados de toxicidade diferentes umas das outras quando comparadas, pois, muitas vezes essas plantas são classificadas apenas quanto à espécie e não quanto à variedade. Lapa (1999) ainda retrata o fato de que além das características genéticas da planta, a síntese das substâncias químicas é controlada por fatores ambientais como ecossistema, iluminação, calor, constituição do solo, umidade, dentre outros.

A massa dos animais foi acompanhada durante 15 dias após a ingestão das doses. Como pode ser visto no Gráfico 1 foi observado que não houve grandes alterações na média das massas do grupo controle, porém observando os animais das doses de 300 mg/kg (300MG) e 2000 mg/kg (2000MG) nota-se que houve um aumento na massa corporal.

Gráfico 1: Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste de Toxicidade Aguda (OECD)



Fonte: Dados da pesquisa

SF: Grupo tratado com Solução Fisiológica 0,9%. 300MG: Grupo tratado com EEJM dose 300 mg/kg. 2000MG: Grupo tratado com EEJM dose 2000 mg/kg.

Passados os 15 dias de observação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e retirados fígado, baço, rins e pulmão, que em seguida foram pesados e levados para análise histológica. Com a determinação das massas foram calculadas as médias $\pm$ Desvio Padrão (DP) dos animais dos grupos SF09, 300MG e 2000MG, os valores estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão das massas dos órgãos avaliados dos grupos controle e tratado no teste de toxicidade oral

Fator Avaliado	Grupo avaliado			Valor p	Teste Utilizado
	SF09 Média $\pm$ DP	300MG Média $\pm$ DP	2000MG Média $\pm$ DP		
Fígado	1,841 $\pm$ 0,072	2,094 $\pm$ 0,102	2,696 $\pm$ 0,202	0,004	ANOVA (One Way Repeated Measures)
Baço	0,244 $\pm$ 0,020	0,310 $\pm$ 0,069	0,378 $\pm$ 0,026	0,029	ANOVA (One Way Repeated Measures)
Rins	0,531 $\pm$ 0,072	0,696 $\pm$ 0,014	0,774 $\pm$ 0,106	0,018	ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Ranks)
Pulmão	0,347 $\pm$ 0,101	0,349 $\pm$ 0,035	0,384 $\pm$ 0,073	0,801	ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Ranks)

Fonte: Dados da pesquisa

Se $p < 0,05$ a distribuição do fator avaliado difere significativamente entre os grupos avaliados.

Aplicou-se o método Holm-Sidak para os procedimentos de comparação múltipla entre os grupos com variação estatisticamente significativa, sendo destacados os órgãos: fígado, baço e rins, que apresentaram diferenças na média da massa dos órgãos após o teste de toxicidade.

Após a comparação grupo a grupo observou-se que em todos os testes a divergência dos pesos dos órgãos ocorria quando comparados o grupo 2000MG com o grupo SF e o grupo 2000MG com o 300MG. A comparação entre os grupos SF e o 300MG não apresentaram diferenças significativas.

O teste de toxicidade aguda é utilizado para classificar apropriadamente substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006). Desmarchelier e colaboradores (1999) evidenciam a importância da avaliação do peso corporal como um indicador de efeitos adversos que possam ser causados por drogas e produtos químicos. Jahn e Günzel (1997) relatam que o uso de animais e a avaliação de sua massa corporal é um forte indicador da toxicidade de uma substância e relata que a maioria das respostas está ligada a depressão ou ao não aumento do peso corporal, isso pode acontecer por diversos motivos, como por exemplo, a rejeição alimentar.

Neste estudo foi verificado um aumento da massa corporal dos animais tratados, tanto em relação a massa total, quanto no aumento das medições de massa dos órgãos pesquisados. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa (2013) e Alves (2007), onde os animais demonstraram uma tendência de ganho de peso ao longo do experimento. Para esse fator Jahn e Günzel (1997) explicam que o ganho de massa corporal também deve ser considerado como uma resposta tóxica, e que particularmente muitas vezes este fato está associado à redução de tempo na vida reprodutiva (pelo menos nas fêmeas) e a redução no tempo de vida.

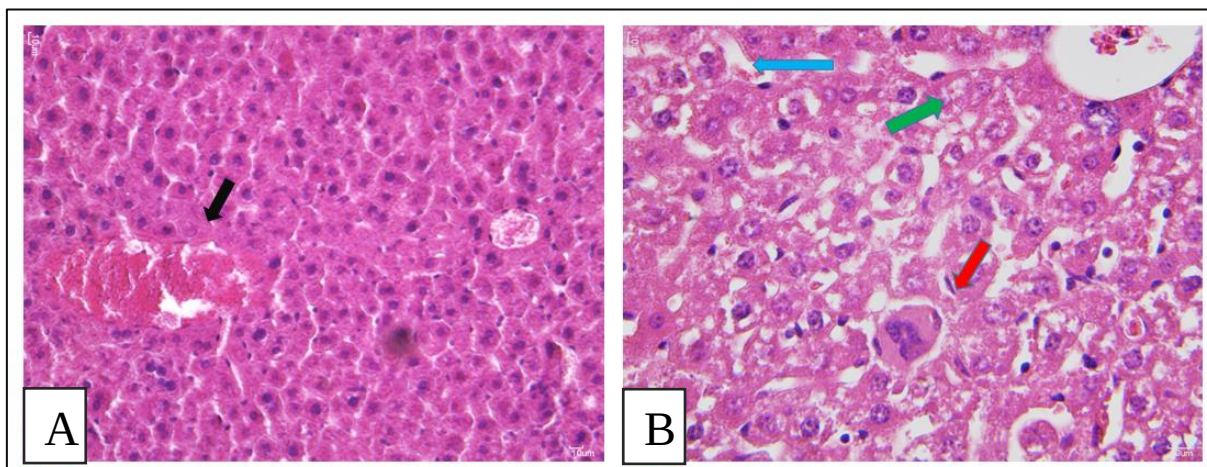
Bezerra et al. (2008) relata que a toxicidade pode ser também avaliada investigando a variação de massa dos órgãos e destaca como os principais órgãos afetados em caso de intoxicação são fígado e rins, por serem os órgãos responsáveis pela desintoxicação do organismo, e nesses casos podem ter seus volumes ou massas aumentadas.

Ainda no sentido de investigar os danos causado pelo EEJM, realizou-se a análise histopatológica dos órgãos, onde foi possível observar algumas informações importantes. O grupo controle apresentava de forma geral órgãos bem preservados apenas com pequenas alterações no fígado, onde foram observadas algumas células com núcleos grandes, alguns hepatócitos binucleados e discreta cariomegalia.

Já os animais tratados com EEJM nas doses de 300 e 2000 mg/kg apresentaram alterações mais significativas. Observou-se que o grupo 300MG apresentou no corte de fígado tumefação celular moderada e leve congestão dos grandes vasos (Figura 8). Os hepatócitos apresentavam granulações citoplasmáticas com algumas vacuolizações, núcleos aumentados, hepatócitos binucleados e anucleados e cariomegalia (Figura 8B). Foi possível também observar a presença de dois granulomas. Os animais que receberam a dose de 2000 mg/kg também apresentaram tumefação celular, no entanto, de forma intensa. A congestão dos grandes vasos e as alterações dos hepatócitos foram semelhantes nos dois grupos, entretanto com mais vacuolizações e em maior quantidade para 2000MG. Diferente da dose mais baixa essa dose também causou proliferação das células de kupffer e maior número de granulomas. O que pode significar um dano hepático maior, mas também uma tentativa de regeneração desse órgão.

No baço repetiu-se o quadro de moderada congestão na dose de 300MG e acentuada para a dose 2000MG. Na primeira dose visualizava-se inúmeros feixes de trabéculas musculares, muitas células multinucleadas e alguns megacariócitos. Na segunda destaca-se o padrão linfóide evidente, formação de folículos e um número mais elevado de megacariócitos e células binucleadas. O fragmento de pulmão em ambas as doses possuía padrão alveolar normal, sem alterações significativas.

Figura 8 - Imagens da análise histológica do corte de fígado dos animais do grupo 2000MG



Fonte: Dados da pesquisa

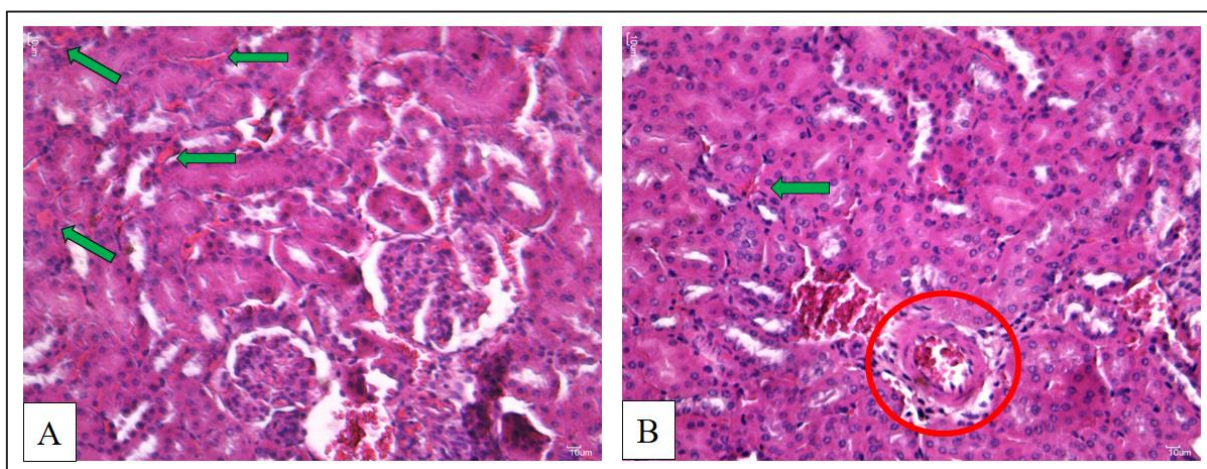
(A) – Seta preta apresenta intensa congestão do vaso hepático.

(B) – Em B corte histológico de fígado demonstra tumefação celular com áreas de necrose, onde há perda da morfologia celular. Seta azul demonstra hepatócito binucleado; seta verde apontando para hepatócitos anucleados e seta vermelha apresentando megacariócito.

Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

Os rins demonstravam tumefação do epitélio nas duas doses, com pequenos pontos hemorrágicos na dose de 300MG (Figura 9B) e moderados na dose de 2000MG (Figura 9A). Em ambas foram evidenciados endotélio dos ramos da artéria renal reativos (Figura 9B), demonstrando uma resposta do vaso a um estresse. Na dose mais baixa foi possível encontrar a presença de alguns cilindros hialinos nos tubos coletores e na dose mais alta o rim apresentou tumefação celular e tubos coletores com degeneração hidrópica.

Figura 9 - Imagens da análise histológica do corte rins dos animais do grupo 300MG e 2000MG



Fonte: Dados da pesquisa

(A) – Setas verdes apresentam pontos hemorrágicos no tecido renal do grupo 2000MG

(B) – Em B corte histológico de rim do grupo 300MG, demonstra vaso renal reativo; seta verde apontando para áreas de hemorragia.

Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

Esses dados corroboram com os que foram evidenciados na pesagem dos órgãos, demonstrando um grau de toxicidade do extrato que se mostrou mais acentuado conforme o aumento da dose, mesmo não tendo causado mortalidade no ensaio e sendo classificado como não tóxico o EEJM demonstrou sinais de citotoxicidade. Foi possível observar que os órgãos mais afetados pelo extrato foi o fígado, principalmente, e os rins, o que corroborou com a discussão do peso dos órgãos onde se afirma que esses são os órgãos que mais sofrem com reações tóxicas.

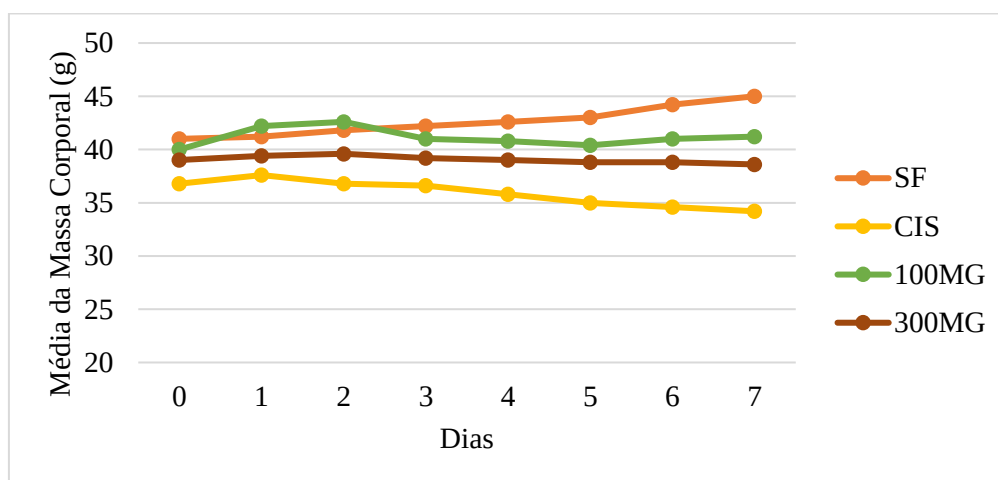
Sinais encontrado histologicamente no fígado como a presença de vacuolizações citoplasmáticas, que aumentam o volume dos hepatócitos, pode indicar a combinação de agentes tóxicos com lipídeos intracitoplasmáticos (Santos et al., 2004). Stalker e Hayes (2007) associam a presença da tumefação celular com a reação do hepatócito a agressões tóxicas. Yeh (2011), afirma que substâncias tóxicas podem provocar quadros inflamatório e degeneração hepática por meio da destruição de mitocôndrias. Quanto aos aumentos dos efeitos tóxicos de uma dosagem para outra, Maclachlan e Cullen (1998), relatam que a morfologia da lesão hepática induzida por toxinas varia consideravelmente com o tipo, dose e a duração da exposição ao agente tóxico.

Quanto as alterações dos rins, segundo Kumar, Abbas e Aster, (2015), os processos que possam causar uma agressão a membrana plasmática e na bomba de Na^+/K^+ , reduzem ATP e levam a retenção de Na^+ no citoplasma, liberando K^+ , isto leva a um aumento da concentração de água no citoplasma celular e pode levar a degeneração hidrópica e tumefação celular. Podendo assim, essa ser uma das explicações viáveis para as alterações histológicas no tecido renal.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo*.

Na análise da atividade antitumoral após 36 h da inoculação do tumor, os animais foram tratados por 7 dias e os seus pesos foram acompanhados durante esse tempo. Os valores das médias dos pesos dos grupos Solução Fisiológica a 0,9 % (SF), padrão cisplatina (CIS), tratado EEJM 100 mg/kg (100MG) e tratado EEJM 300 mg/kg (300MG) foram calculados e estão demonstrados no gráfico 2.

Gráfico 2: Médias da massa corporal dos grupos utilizados no teste da atividade antitumoral



Fonte: Dados da pesquisa

SF: Grupo tratado com Solução Fisiológica 0,9%. CIS: Grupo tratado com Cisplatina 0,5 mg/kg. 100MG: Grupo tratado com EEJM dose 100 mg/kg. 300MG: Grupo tratado com EEJM dose 300 mg/kg.

Após 24 horas da última dose do tratamento, os animais foram sacrificados e os tumores extirpados, juntamente com os órgãos (fígado, baço, rins e pulmão). Em seguida foram pesados e suas lâminas histológicas foram confeccionadas e coradas pela técnica de hematoxilina-Eosina (HE). Após a obtenção dos valores das massas foram calculados as médias e o valor de p, por meio da análise de variância ANOVA. Os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão das massas dos órgãos avaliados e do tumor segundo os grupos de estudo da atividade antitumoral

Fator Avaliado	Grupo avaliado				P	Teste utilizado
	SF09	CIS	100MG	300MG		
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP		
Fígado	2,742 $\pm$ 0,506	2,335 $\pm$ 0,115	2,578 $\pm$ 0,408	2,316 $\pm$ 0,378	0,337	ANOVA One Way Repeated Measures
Baço	0,325 $\pm$ 0,062	0,225 $\pm$ 0,095	0,339 $\pm$ 0,067	0,279 $\pm$ 0,047	0,112	ANOVA One Way Repeated Measures
Rins	0,630 $\pm$ 0,070	0,570 $\pm$ 0,080	0,735 $\pm$ 0,123	0,552 $\pm$ 0,066	0,027	ANOVA (Friedman Repeated Measures Ranks)

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão das massas dos órgãos avaliados e do tumor segundo os grupos de estudo da atividade antitumoral

						(Continuação)
Pulmão	0,331$\pm$0,051	0,405$\pm$0,099	0,429$\pm$0,079	0,429$\pm$0,138	0,277	ANOVA One Way Repeated Measures
Tumor	1,454$\pm$0,527	0,565$\pm$0,093	0,513$\pm$0,095	0,544$\pm$0,116	0,017	ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Ranks)

Fonte: Dados da pesquisa

Se $p < 0,05$ a distribuição do fator avaliado difere significativamente entre os grupos avaliados.

A massa dos órgãos dos animais após o teste de atividade antitumoral foi analisada e conforme apresentado na tabela 5, apenas as massas dos rins ($p = 0,027$) e do tumor ($p = 0,017$) obtiveram diferença estatística na comparação entre os grupos.

Após esse resultado foi utilizado o método Holm-Sidak para comparação grupo a grupo. Observou-se que a divergência das massas dos rins ocorreu principalmente quando comparados o grupo 100MG com os demais grupos, havendo também divergência entre o grupo SF quando comparado aos grupos 300MG e CIS. Quanto ao tumor após análise grupo a grupo foi comprovado que os grupos CIS, 100MG e 300MG tiveram redução significativa da massa tumoral quando comparados ao grupo SF, mostrando assim um efeito antitumoral positivo, tanto nos animais tratados com o antineoplásicos padrão, quanto aos tratados com EEJM.

Como o EEJM demonstrou diferença significativa entre as massas dos tumores foi calculado o percentual de Inibição Tumoral (IT %). Os percentuais de IT % para o Carcinoma de Ehrlich dos grupos padrão (cisplatina), tratado EEJM 100 mg/kg e tratado EEJM 300 mg/kg, foram determinados em relação ao grupo SF e estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6. Valores do IT% para os grupos controle e tratamentos avaliados.

Tratamento	IT(%)
Cisplatina 0,5 mg/kg	70,95
EEJM 100 mg/kg	69,11
EEJM 300 mg/ kg	73,26

Fonte: Dados da pesquisa

A IT % assim como a média das massas tumorais apresentou dados promissores quando comparamos os resultados dos grupos tratados com o EEJM e os tratados com o Padrão Cisplatina. As duas concentrações do extrato demonstraram resultados semelhantes ao padrão, apresentando um efeito dose dependente em relação a taxa de inibição. Esse fato pode levar a novos estudos já que as doses utilizadas nesse experimento encontram-se bem abaixo da DL₅₀ que foi estipulada nessa pesquisa, através da metodologia da OECD 423, em ≥ 5000 mg.

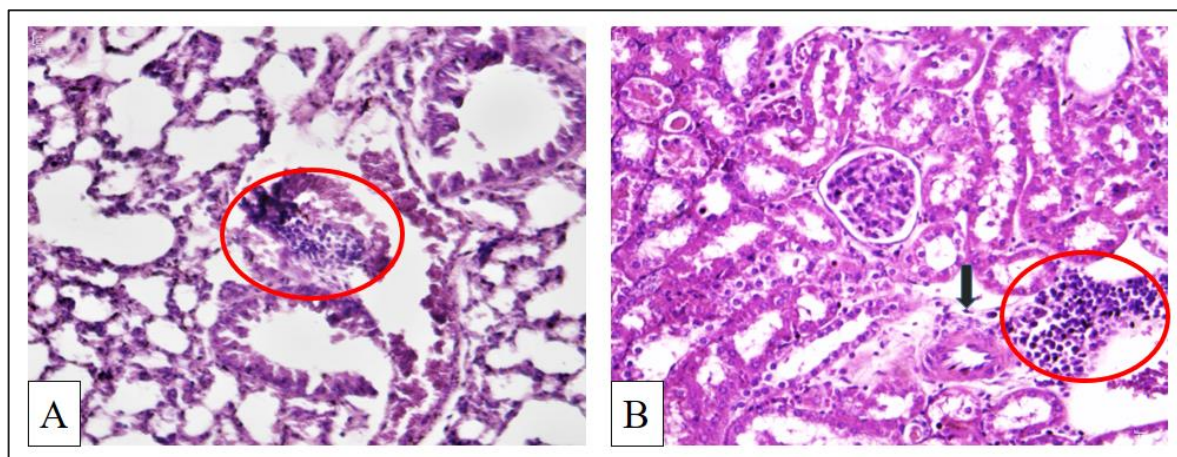
No teste para atividade antitumoral realizado nessa pesquisa, os animais tiveram sua massa corporal acompanhadas durante todo o tratamento, e conforme visto no gráfico 2 os pesos dos grupos tratados mantiveram uma constância. Nos grupos SF e CIS observa-se uma leve alteração das massas corpóreas com o decorrer dos dias. No grupo SF houve um aumento na massa dos animais isso pode ser justificado pelo rápido desenvolvimento dos tumores nos camundongos pertencentes a esse grupo. Quando se observa a tabela 5, verifica-se que esse grupo foi o que apresentou maior valor de massa tumoral apresentando uma média de 1, 454 g e mostrando-se estatisticamente diferente dos demais grupos. Já o grupo CIS apresentou um leve decréscimo de massa, esse é um fato considerado comum pois segundo autores como Tayarani-Najaran e colaboradores (2013) a perda de massa corpórea é um dos principais efeitos colaterais do uso de antineoplásicos, e se dá muitas vezes em consequência as náuseas e vômitos causados por esses medicamentos.

Foi realizada também a análise histológica dos órgãos e tumores dos animais que participaram do ensaio da atividade antitumoral. Os animais do grupo controle receberam como tratamento apenas SF, após análise histológica do corte de fígado foi possível observar tumefação celular acentuada e granulomas. Durante a leitura das lâminas, sempre ao lado de vasos foram vistos nódulos com um conjunto de células infiltradas, de citoplasma escasso, de núcleo bem destacado, apresentando células em vários formatos, mas com destaque para as células arredondadas e alongadas, sugerindo-se células neoplásicas. Além disso, foram encontrados hepatócitos binucleados, anucleados e com intensa vacuolização citoplasmática (indicando grande perda proteica).

Esse conjunto de células infiltradas com características de malignidade foram encontradas em todos os outros órgãos avaliados do grupo SF, apresentando-se quase sempre ao lado de um vaso (Figura 10B), o que se torna um indicador de metástase e de que sua disseminação aconteceu através da corrente sanguínea. O maior número de focos de células invasivas foi encontrado no pulmão (Figura 10A), o que nos faz considerar a proximidade com o local de implantação do tumor como principal explicação para o fato, seguido dos rins (Figura 10B), que é o órgão responsável pela filtração sanguínea. O baço demonstrou uma redução das

estruturas foliculares e algumas trabéculas musculares. O pulmão apresentou reatividade no endotélio das artérias, congestão e hemorragia; também foi visto uma desarrumação do tecido pulmonar juntamente com a presença das células neoplásicas demonstrando uma expansão desse cenário. O rim, por sua vez demonstrava vasos reativos, infiltrado perivascular de células mononucleadas e degeneração hidrópica.

Figura 10 - Imagens da análise histológica do corte de pulmão e rins dos animais do grupo SF.



Fonte: Dados da pesquisa

- (A) – O círculo vermelho aponta conjunto de células infiltradas com características de malignidade em corte de tecido pulmonar.
- (B) – Em corte de tecido renal o círculo vermelho aponta conjunto de células infiltradas com características de malignidade; seta preta aponta para vaso reativo.
- Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

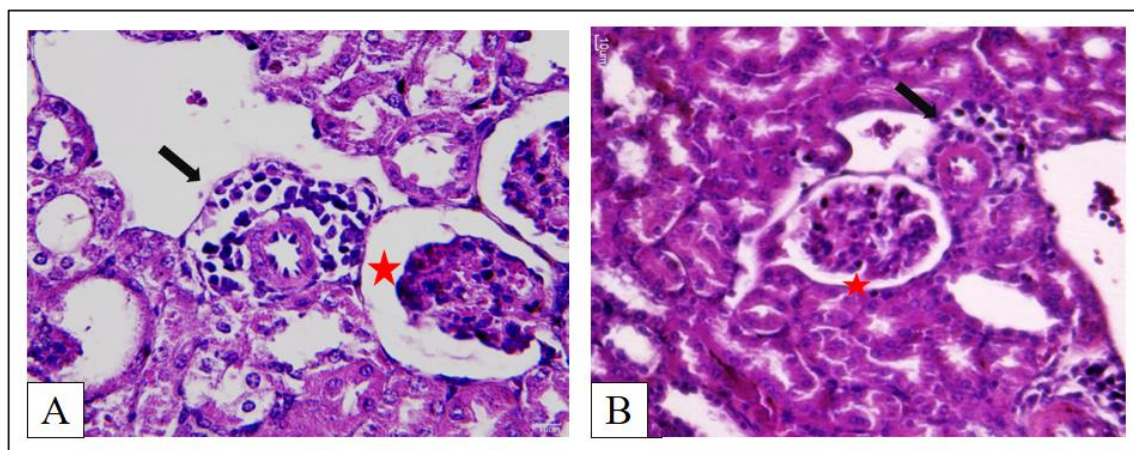
Os órgãos dos animais tratados com o padrão cisplatina apresentaram nódulos de células metastáticas apenas no pulmão e nos rins, porém o fígado e rins demonstram altos sinais de citotoxicidade, apresentando graves alterações teciduais. O fígado apresentou congestão e tumefação celular, hepatócitos anucleados, binucleado, sem limites definidas e cariomegalia. Foram encontradas extensas áreas de necrose. Nos rins além dos infiltrados celulares, o corte histológico demonstrou atrofia dos glomérulos com aumento do espaço peri-glomerular (Figura 11A), acentuada degeneração hidrópica e áreas de necrose, dilatação cística dos túbulos com intensa presença de cilindros hialinos.

Os danos hepáticos e renais severos causados nos órgãos dos animais do grupo CIS podem ser explicados pelo fármaco padrão utilizado. A cisplatina é uma droga antineoplásica padrão que forma ligações covalentes com as proteínas plasmáticas e é amplamente distribuída para os tecidos, principalmente rins e fígado. Apesar de possuir uma farmacocinética favorável, foi observado que causava, assim como grande parte dos antineoplásicos, reações adversas importantes, destacando-se a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Nos rins foram propostos três

mecanismos de ação: apoptose e necrose, inflamação e estresse oxidativo que causam redução da taxa de filtração glomerular, lesão tubular proximal e aumento de sais. No fígado aumenta as transaminases, altera o metabolismo energético do órgão, causa enrijecimento da membrana hepática, peroxidação lipídica, dano oxidativo à cardiolipina e de proteínas com grupos sulfidríla, e morte celular hepática (VISACRI, 2017).

Os animais dos grupos 100MG e 300MG demonstraram alterações bastante semelhantes a nível histológico. Foram encontradas áreas de metástase em fígado, pulmão e rins, porém as áreas eram menos frequentes e menores do que as encontradas no grupo SF. O fígado apresentou cogestão sinusoidal, tumefação celular (mais intensa periféricamente), hepatócitos anucleados e cariomegalia. O baço apresentava perda do aspecto linfóide com ausência de folículos, trabéculas musculares adelgadas. O pulmão apresentava-se discretamente enfisematoso com espaçamento do septo interalveolar e endotélio dos vasos reativo. Uma diferença encontrada nesse órgão em relação a todos os outros, inclusive de outros grupos, foi o fato de células neoplásicas terem sido encontradas dentro do vaso e não apenas periférico a ele. Os rins apresentavam degeneração hidrópica, cilindros hialinos nos tubos coletores. Nos grupos tratados com EEJM os glomérulos encontram-se bem preservados (Figura 11B). A figura 11 compara o glomérulo do grupo tratado Cisplatina e o tratado EEJM com 300 mg/kg.

Figura 11 - Imagens das análises histológicas dos cortes de rins, comparando os órgãos dos animais do grupo CIS e 300MG.



Fonte: Dados da pesquisa

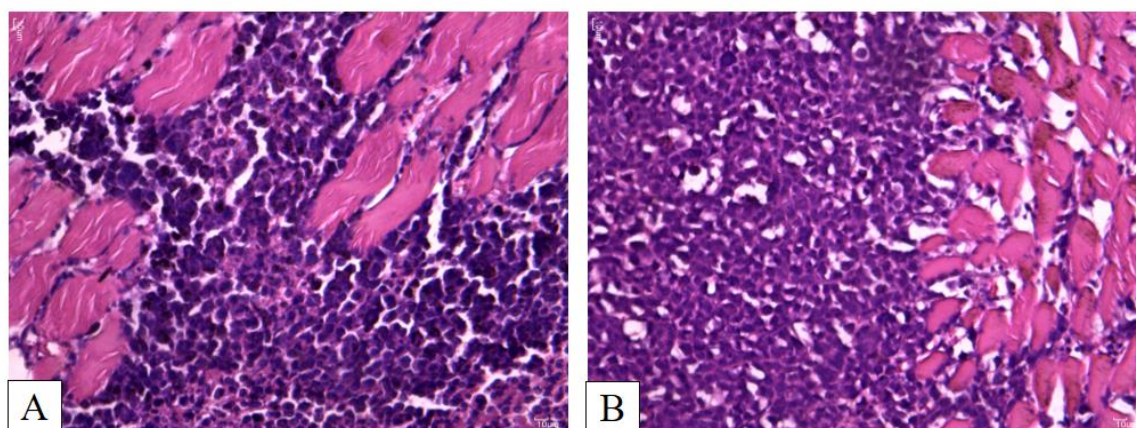
(A) – Corte histológico de rins do grupo Cisplatina (CIS). Aumento microscópico em 40x.

(B) – Corte histológico de rins do grupo 300MG. As estrelas representam o espaço peri-glomerular dos rins. As setas pretas demonstram infiltrados celulares ao lado de vasos. Aumento microscópico em 20x. Imagens coradas por HE.

Parte das alterações encontradas assemelha-se com as dos órgãos dos animais do teste de toxicidade aguda, visto que eles também receberam o EEJM e mesmo que no teste de atividade antitumoral as doses estejam bem abaixo das utilizadas no ensaio de toxicidade, estes fizeram seu uso diariamente por 8 dias. Além da citotoxicidade já demonstrada anteriormente ainda houve alterações celulares causadas pela metástase celular, que apesar de menos agressiva que no grupo SF, atingiu principalmente pulmão e rins.

Em relação aos tumores, os do grupo SF apresentaram, como demonstrado na figura 12A, um tumor revestido parcialmente de tecido muscular e adiposo, que recobrem uma massa de células com pleomorfismo apresentando em sua maioria células arredondadas, de núcleos grandes e excêntricos com citoplasma escasso e vacuolizado; cromatina granular e nucléolos proeminentes e áreas de necrose. O tumor do grupo CIS (Figura 12B) apresentou o mesmo padrão celular encontrado no grupo SF, porém apresentava mais variado formato celular. Essa descrição assemelha-se as características do tumor de Ehrlich descritas no Manual Básico de Cancerologia Experimental: Tumor de Ehrlich (SILVA; FREITAS; DOMINGUES, 2017).

Figura 12 - Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores, comparando os grupos SF e CIS.



Fonte: Dados da pesquisa

(A) - Corte histológico do tumor grupo SF.

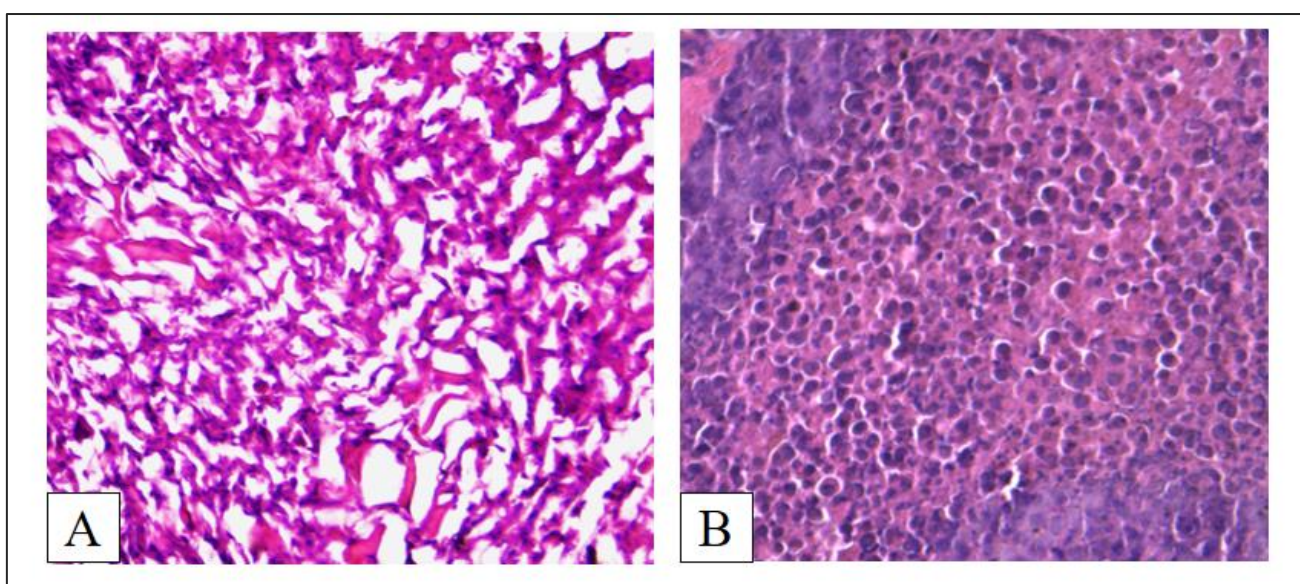
(B) - Corte histológico do tumor grupo CIS.

Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

Na análise histológica realizada nos tumores dos grupos 100MG e 300MG foi possível observar áreas com diferenças histológicas em relação aos grupos controle negativo (SF) e positivo (CIS). É possível visualizar na Figura 13 que o grupo 300MG (Figura 13A) apresenta uma dessas áreas, com menos celularização e tecido mais frouxo, com alto número de células anucleadas, apresentando também pleomorfismo celular, isso quando comparamos ao grupo

controle CIS (Figura 13B). Observa-se também mudanças tintoriais nas lâminas, com núcleos menos basofílicos e colorações mais acidófilas. Isso pode ter ocorrido devido a alguma mudança na fisiologia celular acarretando mudanças bioquímicas e em como ela responde a tintura. Como relata Gayotto, e colaboradores (2000), há uma associação da perda de atividade tintorial microscópica com uma alteração na conformação das proteínas que compõem as citoqueratinas.

Figura 13 - Imagens das análises histológicas dos cortes dos tumores, comparando o grupo 300MG e CIS.



Fonte: Dados da pesquisa

(A) - Corte histológico do tumor grupo 300MG.

(B) - Corte histológico do tumor grupo CIS.

Imagens coradas por HE e com aumento microscópico em 20x.

Esses resultados são vistos de forma positiva já que os grupos EEJM apresentaram resultados promissores na redução da massa tumoral (tabela 5), aumento na taxa de inibição (tabela 6) e histologicamente menos citotóxicas ao fígado e rins do que o controle CIS, causando alterações morfológicas e fisiológicas no tumor.

A busca por novas terapias que possam melhorar a qualidade de vida a quem sofre com o câncer é uma luta constante. E como visto, os produtos naturais apresentam-se como uma estratégia viável para a busca de novas ferramentas que possam ser utilizadas com esse fim. Como exemplos de compostos anticâncer desenvolvidos a partir desses produtos temos vindesina, vinorelbina, etoposida, docetaxel e topotecan (BEZERRA et al., 2008; TAYARANI-NAJARAN et al., 2013).

Por tais motivos é importante desbravar a variedade compostos disponíveis nas diversas espécies de plantas disponíveis e desvendar suas possíveis atividades terapêuticas, como por exemplo, a atividade anticâncer.

Apesar de não terem sido encontrados na literatura estudos que demonstrassem a atividade antitumoral *in vivo* de *Jatropha mollissima*, existem estudos que demonstraram a utilização de metabólitos encontrado em espécies do mesmo gênero que levam a redução de células cancerígenas. Exemplos são os estudos das seguintes espécies: *Jatropha gossypifolia* (DEVAPPA, MAKKAR, BECKER, 2010a), *Jatropha macrorhiza* (TORRANCE et al, 1976), *Jatropha divaricata* (DENTON et al., 2001; KREBS et al., 2004; SUTTHIVAIYAKIT et al., 2003), *Jatropha podagrica* (SANNNI et al., 1988).

Os compostos responsáveis por desencadear as atividades antitumorais nas espécies do gênero *Jatropha* listadas acima, podem ser os que se encontram em EEJM e que se encontram apresentas nas tabelas 1 e 2. Os metabólitos secundários são estudados principalmente a fim de se investigar as suas atividades biológicas e potenciais usos para o bem da saúde humana. Metabólitos com suas funções já desvendadas servem de base para investigação de possíveis atividades farmacológicas de outras plantas, principalmente quando estas são pertencentes ao mesmo gênero, pois são esperadas semelhanças com relação ao perfil fitoquímico.

Dos metabólicos identificados nas análises alguns apresentam importantes relatos na literatura a respeito de suas atividades metabólicas e em especial de seu efeito antitumoral, destacando: os flavonoides, catequinas (taninos catéquicos), taninos e cumarinas.

Bessa et al. (2013), Rocha et al. (2011) e Simões et al. (2010) em seus trabalhos destacam os flavonoides como os compostos mais numerosos nas Angiospermas e enfatizam entre outras, as suas atividades antiproliferativas, anticarcinogênicas e antitumorais. Bessa ainda destaca outras classes metabólicas com essas mesmas atividades, a exemplo as catequinas, que são anticarcinogênica e dos taninos, caracterizado como compostos fenólicos, que possuem a capacidade de neutralizar radicais livres diminuindo o risco do desenvolvimento de tumores e processos inflamatórios.

Schmitz et al., (2005) também relatam as atividades biológicas das catequinas pertencentes ao grupo dos polifenóis, apresentando atividades importantes para o combate do câncer além da anticarcinogênica, sendo elas: antioxidantes, quimioprotetora, termogênicas e anti-inflamatória.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA

Atualmente, um problema de saúde que vem chamando atenção mundial são os microrganismos considerados multirresistentes, as cepas de bactérias que ganham resistência, diminuem a eficácia dos antimicrobianos disponíveis no mercado, dificultando o tratamento do paciente com antibióticos mais simples. Isso leva a necessidade de antibióticos cada vez mais potentes, que tenham um amplo espectro e que por sua vez são mais caros e inacessíveis à população de baixa renda (BRASIL, 2012a; TERRÍVEL et al., 2013).

Devido a isso, a utilização de plantas com propriedades antimicrobianas e modulatórias ou com um possível sinergismo destas com fármacos, vem tomando força no cenário popular e científico, sendo ampliado seu uso para a diminuição do problema da resistência (CHAVES et al., 2011; COUTINHO et al., 2012; MATIAS et al., 2012).

Nas análises microbiológicas do EEJM foram utilizadas linhagens padrões e multirresistente das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os valores obtidos após determinação da CIM encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do EEJM.

Linhagens bacterianas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	$\geq 1024 \mu\text{g/MI}$
<i>Escherichia coli</i> EC27	$\geq 1024 \mu\text{g/MI}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25927	$\geq 1024 \mu\text{g/MI}$
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	$\geq 1024 \mu\text{g/MI}$

Fonte: Dados da pesquisa

Diversos autores relacionam a presença de alguns metabólitos encontrados nas análises fitoquímicas do EEJM com ação antibacteriana. A exemplo temos: flavonóides (TSUCHIYA et al., 1996), Taninos (BESSA et al., 2013; MELLO, SANTOS, 2001; SIMÕES et al. 2010;) e terpenos (SIMÕES et al. 2010; LUZ et al., 2014).

No entanto, em relação a análise da CIM, foi visto que o extrato, quando testados com linhagens bacterianas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não obteve resultados significativos mostrando um valor de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

Em um estudo realizado por Camelo (2015) com o látex da *J. mollissima*, mostrou-se que o mesmo não inibia o crescimento bacteriano e também não apresentou atividade bacteriostática frente a *E. coli*, resultado que reforça os dados encontrados nesta pesquisa.

Porém ainda neste estudo o látex reduziu o desenvolvimento de *S. aureus*, o que foi explicado por Camelo (2015) pela diferença da composição da membrana externa entre as duas bactérias, esse resultado diverge dos encontrado nessa pesquisa.

Já Branquehais et al (2016), utilizando *Enterococcus faecalis*, avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima*, coletada em Tauá-CE, e constatou ação antibacteriana do extrato na concentração de 250 mg/mL frente a essa bactéria.

As divergências de resultados da atividade antimicrobiana entre esses estudos podem ser explicadas pelo fato da planta ter sido coletada em épocas, horários e em regiões distintas, o que segundo Martins (2012) pode acarretar na mudança da quantidade e da atividade dos metabólitos secundários. Atualmente, sabe-se que os metabólitos das plantas estão ligados à forma como esse organismo se adapta ao ambiente a que pertence, podendo exercer diferentes atividades biológicas e farmacológicas, fornecendo aos estudiosos subsídios para aplicações na melhoria da saúde humana (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Juntamente com essa informação associa-se o fato de que as cepas bacterianas e as metodologias usadas nos testes são diferentes das encontradas nos trabalhos citados, sendo assim, o comportamento das cepas frente ao extrato pode ocorrer de forma diferenciada.

Além dos estudos que buscam avaliar o potencial antimicrobiano proveniente de plantas medicinais, existe os que pretendem demonstraram que extratos e óleos essenciais derivados de plantas podem modificar a atividade de antimicrobianos e assim melhorar o seu desempenho, diminuindo a concentração necessária para que haja a inibição do crescimento. Essas pesquisas são de grande interesse para a indústria farmacêutica devido ao crescente número de casos de resistência que os microrganismos adquirem frente aos antibióticos de uso tradicional (BOHATCH JUNIOR et al, 2016; COUTINHO et al., 2008b; MATIAS, 2010).

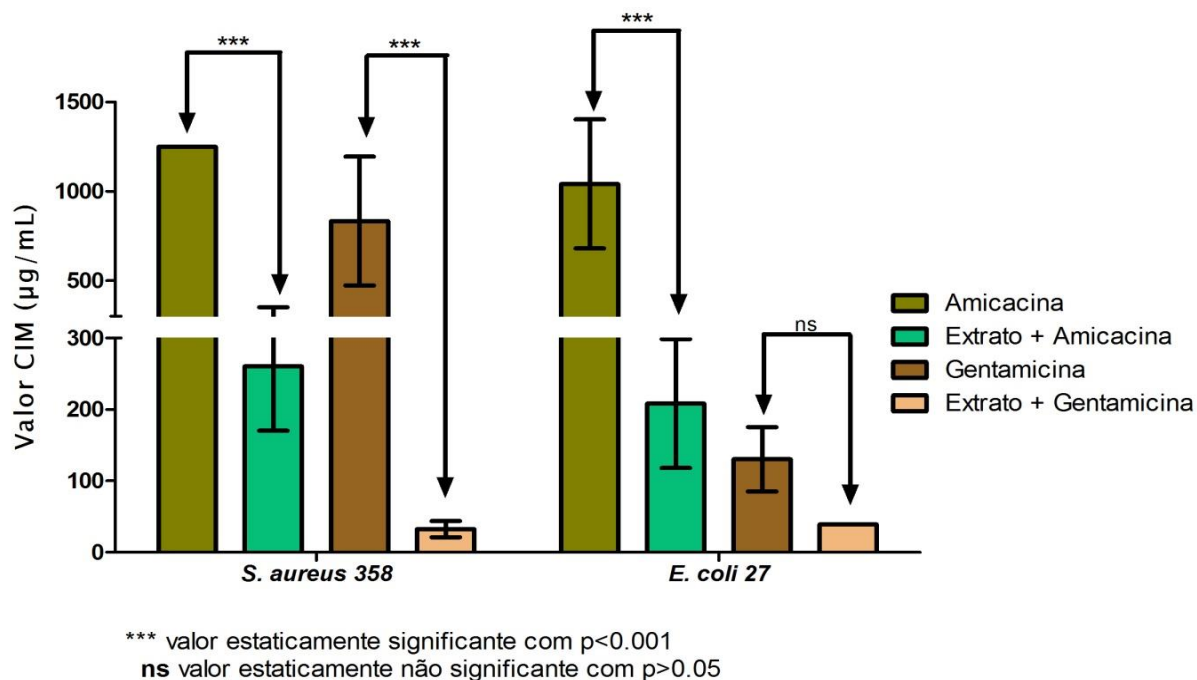
Com isso buscou-se analisar um possível sinergismo do EEJM diante da interação física com os antibióticos utilizados no mercado e testa-los frente as cepas resistentes de *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados obtidos podem ser observados no Gráfico 3.

A atividade modulatória do extrato EEJM, juntamente com a Amicacina e a Gentamicina, foi estaticamente significativo frente às cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* 358 (SA358) e *Escherichia coli* 27 (EC27). Porém houve sinergismo do extrato junto a cada um dos dois antibióticos testados frente *S. aureus* e apenas junto a Amicacina, frente *E.coli*.

A atividade sinérgica apresentada pela gentamicina associada com o extrato frente à SA358 pode ser explicada pelo fato de que os antibióticos oriundos de vegetais parecem

apresentar maior inibição contra microrganismos Gram-positivos do que para Gram-negativos (ALMEIDA et al, 2013).

Gráfico 3 - Atividade modulatória do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* em associação aos antibióticos Amicacina e Gentamicina.



Fonte: Dados da pesquisa

Estudos realizados por Silva (2013), Araújo (2015) e seus colaboradores confirmam os resultados encontrados neste trabalho sobre maior sensibilidade de *S. aureus* aos extratos vegetais. Segundo Bylka et al. (2004) a camada de peptidoglicano presente na parede celular das bactérias Gram-positivas é mais espessa, em relação as da Gram-negativas. Além do fato dos organismos Gram-negativas apresentarem uma outra camada externa ao peptideoglicano. Sendo que estas diferenças estruturais podem resultar em diferentes susceptibilidades a uma variedade de antibióticos que tem as estruturas de contorno celular como sítios de ação.

Essa camada externa das Gram-negativas é composta de uma camada de lipopolissacarídeos juntamente com proteínas e fosfolipídios, o que pode justificar os resultados de EC27 frente a substâncias que inibem a ação lítica (ANVISA, 2006; COSTA, 2017).

A Amicacina, ao contrário da Gentamicina, obteve resultados estaticamente significativo frente às cepas de EC27 quando utilizada em conjunto com o EEJM o que segundo Gamboa-Marín et al. (2013) é um resultado satisfatório, já que esse fármaco é comumente utilizado na clínica contra bactérias gram-negativas, pois conseguem atravessar sua membrana externa e

inibem a síntese proteica, gerando proteínas com perda da função e tóxicas, ocasionando a morte da bactéria.

Acredita-se que um dos mecanismos que contribuem para o sinergismo entre os extratos vegetais e os antibióticos é a capacidade do extrato de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando absorção das drogas (MATIAS, 2010). Essas combinações entre produtos naturais e aminoglicosídeos podem contribuir para a diminuição das CIMs dos antibióticos, minimizando seus efeitos secundários e diminuindo a dose necessária para que se tenha um efeito terapêutico (FIGUEREDO et al., 2013).

Apesar dos resultados da CIM não terem sido positivos, os metabólitos secundários encontrados nas análises fitoquímicas podem estar relacionados aos efeitos positivos apresentado na avaliação da atividade moduladora. São necessários mais estudo para verificar de que forma o EEJM atua sobre a célula bacteriana e quais os componentes do extrato são responsáveis pela potencialização dos antibióticos padrões.

5 CONCLUSÃO

A Prospecção fitoquímica do Extrato Etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. demonstrou a presença de várias classes de metabólitos, sendo elas: catequinas, cumarinas, esteróides livres, flavonas, flavonóis e xantonas, flavanonas, glicosídeos, taninos condensados ou catéquicos e terpenos.

O teste de toxicidade aguda, por via oral, não causou mortalidade e nem morbidade a nenhum dos animais que receberam as doses testadas, sendo assim classificado na categoria 5 de acordo com o GHS e sua Dose Letal₅₀ (DL₅₀) foi estipulada como ≥ 5000 mg. Entretanto, na análise da massa dos órgãos e histologia dos tecidos, foi possível observar que o EEJM provocou lesões nos rins e fígado nas duas doses utilizadas. Esse resultado demonstra que existe a possibilidade de intoxicação ao se fazer uso de altas doses desse extrato.

Quanto a avaliação da atividade antitumoral os resultados demonstram-se promissores. Nas análises histológicas o extrato mostrou-se menos hepatotóxico e nefrotóxico do que o padrão Cisplatina e mostrara-se semelhante quanto aos percentuais de inibição tumoral, bem como na redução do peso do tumor. Com base nesses resultados é necessário a realização de novos estudos, buscando identificar outras linhagens sobre as quais o extrato seja efetivo e investigar os possíveis mecanismos de ação pelo qual atua.

Em relação a CIM, o extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill, não apresentou atividade relevante frente às cepas bacterianas testadas. Em contrapartida, os

testes com a modulação do EEJM em combinação com antibióticos aminoglicosídeos reduziram a CIM das cepas bacterianas resistentes, provavelmente devido as presenças de alguns dos metabólitos secundários encontrados e que são reportados como antimicrobianos.

Porém outros estudos devem ser realizados na tentativa de identificar e isolar os compostos responsáveis pela atividade modulatória, identificando a via de ação pela qual ocorre o sinergismo e criando alternativas terapêuticas para o tratamento de patologias causadas por microrganismos resistentes.

REFERÊNCIAS

ABDULLA, M. A. et al. Gastroprotective effect of *Phyllanthus niruri* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 226-230, 2010.

AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 544-546, 2001.

AIYELAAGBE, O. O. et al. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. **Phytochemistry**, v. 68, n. 19, p. 2420-2425, 2007.

AL-ATTAR, A. M. Protective effect of *Avicennia alba* leaves extract on gastric mucosal damage induced by ethanol. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 4, p. 477-490, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.

ALMASSY JÚNIOR, A. A; SILVA, A. F; FONSECA, M. C. M. Conhecimento tradicional do uso medicinal das plantas. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 31, n. 255, p. 20-26, 2010.

ALMEIDA, A. et al. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)- limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56-62, 2012.

ALMEIDA, G. D. et al. Extrato Aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos, vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 487-492, 2013.

ALMEIDA, I. et al. Shifting to green economy: hype or hope for entrepreneurs into medicinal and aromatic plants. In: **Proceedings of 21st International Annual EurOMA Conference (Operations Management in an Innovation Economy)**. 2014.

ALVES, N. M. Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.), **Universidade de Brasília**, 2007.

AMANO, A. Host–parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. **Periodontology** **2000**, v. 54, n. 1, p. 9-14, 2010.

ANTONIO, G.D.; TESSER, C.D.; MORETTI-PIRES, R.O. Phytotherapy in primary health care, **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n.3, p. 541-553, 2014.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Módulo 5: Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos**. 2006. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Controle+Interno+da+Qualidade+para+Testes+de+Sensibilidade+a+Antimicrobianos/2beacd67-7f23-4d18-b0c5-3af0bfe87e87>>

Acesso em: 11 Nov. 2017.

APU, A. S. et al. Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

ARAÚJO, E. L.; CASTRO, C. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga. A review concerning plants environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**. 2007.

ARAÚJO, E. R. D. et al. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO E AQUOSO DA ESPÉCIE *Anadenanthera colubrina* FRENTE À BACTÉRIAS GRAM NEGATIVA E GRAM POSITIVA. **Biota Amazônia**. v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

ARAÚJO, S. D. et al. Effect of dexamethasone associated with sérum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Inflammation Research**, v. 56, p. 409-413, 2007.

AYANBIMPE, G. M. et al. Evaluation of extracts of *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* in culture media for selective inhibition of saprophytic fungal contaminants. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 23, n. 3, p. 161-164, 2009.

AZEVEDO, M. A. M. Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. **Revista da FAE**, v. 11, n. 1, 2016.

BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **SciELO**. Escola Anna Nery, v.15, n.1, p.132-139. 2011.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2010.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa. 1991.

BASTOS, R. A. A; LOPES, A. M. C. A fitoterapia na rede básica de saúde: o olhar da enfermagem. **Revista brasileira de ciências da saúde**, v. 14, n. 2, 2010.

BESSA, N. G. F. D. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013.

BEUTLER, A. N. et al. Agregação de Latossolo Vermelho distrófico típico relacionada com o manejo na região dos cerrados no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 1, 2001.

BEZERRA, D.P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of applied toxicology**, v.28, p.156-163, 2008.

BHASKARWAR, B.; ITANKAR, P.; FULKE, A. Evaluation of antimicrobial activity of medicinal plant *Jatropha podagrica* (Hook). **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 13, n. 5, p. 3873-3877, 2008.

BIJEKAR, M. S. R.; GAYATRI, M. C.. In vitro techniques to accelerate flavonoid synthesis in some Euphorbiaceae members. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, v.9, n., p.54-60, 2014.

BOHATCH JUNIOR, E. A., et al. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico da *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. **Eletronic Journal of Pharmacy**, v13, n. 2. p. 100 -106, 2016.

BOSZCZOWSKI, Í. **Análise espacial da ocorrência de infecções bacterianas da corrente sanguínea causadas por agentes multirresistentes em unidades de terapia intensiva do estado de São Paulo**. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

BRAQUEHAIS, I. D. et al. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.(pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 18, n. 2, supl. 1, p. 582-587, 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos**. Brasília, DF, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, DF, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2016a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Monitoramento do bioma Caatinga 2002 a 2008**. Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite. Acordo de Cooperação Técnica MMA/IBAMA. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **5º relatório nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica**. Brasília, 2016b.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 19, p. 195– 202, 2006.

BROOKS, G. F. et al. Medical Microbiology. 25ª edição. Atlanta: McGraw Hill Lange.. Rio de Janeiro, 2010.

BROUSTAS, C. G; LIEBERMAN, H. B. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis. **Radiation research**, v. 181, n. 2, p. 111-130, 2014.

BYLKA, W; MATLAWSKA, I; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 7, p. 24-31, 2004.

BYRD, A. E; ARAGON, I. V; BREWER, J. W. MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 6, p. 689-698, 2012.

CAMELO, S. B. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Látex de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill e *Sapium glandulosum* (L.) Morong**. 2015. 29f. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2015.

CARELS, N.; SUJATHA, M.; BAHADUR, B. (Ed.). **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: Volume 1: Farming, Economics and Biofuel**. Springer Science & Business Media, 2012.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARVALHO, M.C.G. et. al. Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 8, n. 3, p. 127-131, 2010.

CARVALHO, W. R. S. Ensaios in vitro para determinação do potencial medicinal de extratos de plantas. In: HIDALGO, E. M. P (Org.). **VI Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. Cap. 11, p. 105-118.

CAUMO, K. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89–188, 2010.

CHAVES, T. P. et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, p. 11-17, 2011.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. **CLSI document M100-S24**. Wayne, Pa: CLSI; 2014.

- COSTA, F. J. M. D. Resistência a polimixina B em bactérias Gram-negativas carbapenemos **resistentes isoladas em hospitais do Rio Grande do Norte**. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2017.
- COSTA, L. L. G, et al. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1070-1078, 2012.
- COSTA, T. N. Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *aspidosperma subincanum* (apocynaceae) em camundongos. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008a.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**, v. 41, n. 1, p. 67-72, 2012.
- COUTINHO, H.D.M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008b.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- CUNHA F. A. B, et al. Phytochemical screening, antibacterial activity and in vitro interactions between *Costus cf. arabicus* L. with UV-A and aminoglycosides. **Natural product research**, v. 26, n. 4, p. 380-386, 2012.
- DA COSTA JÚNIOR, J.S. et al. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011.
- DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p.97-103,1992.
- DAS, B. et al. Multifidone: a novel cytotoxic lathyrane-type diterpene having an unusual six-membered A ring from *Jatropha multifida*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 1, p. 77-79, 2009.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010

DAYAN, G. H. et al. Staphylococcus aureus: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 11, p. 1373-1392, 2016.

DE ASSIS, J. M; PORTO, N. M; AGRA, M. F. Caracterização anatômica e histoquímica de estruturas Secretoras de folhas e caule de *jatropha mollissima* (euphorbiaceae). **64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte**. 2013.

DENTON, R. W. et al. New Diterpenes from *Jatropha divaricata*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 6, p. 829-831, 2001.

DESMARCHELIER, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

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, 2010a.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S; BECKER, K. Nutritional, biochemical, and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *jatropha*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6543-6555, 2010b.

DIAS, M. T. et al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna* linnaeus, 1758) à antimicrobianos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 319-324, 2010.

DO CARMO, M. et al. Avaliação da Atividade antioxidante do extrato etanólico da folha pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) Através método radical livre DPPH. In: **3º Simpósio Nordeste de Química**. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande. 2017.

DOS SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

DUTRA, M.G. **Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Saúde Pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. 2009. 112f. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente)-Centro Universitário de Anápolis, Goiás, **2009**.

EBUEHI, O. A. T.; OKORIE, N. A. Phytochemical screening and quantification of flavonoids from leaf extract of *Jatropha curcas* Linn. **Nigerian quarterly journal of hospital medicine**, v. 19, n. 4, 2009.

ETHUR, L. Z. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui - RS. SciELO. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.2, p.121-128. Botucatu. 2011.

FASUGBA, O. et al. Ciprofloxacin resistance in community-and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 545, 2015.

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, 2014.

FENALTI, J. M. et al. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 38-49, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497–503, dez. 2006.

FERREIRA JÚNIOR. W. S. F.; LADIO. A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 238-252, 2011.

FIGUEREDO, F. G. et al. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* AC Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

FINLEY, R. L. et al. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 5, p. 704–710, 2013.

FIRMO, W.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**. 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FORZZA, R.C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v.62, n. 1, 2012.

FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. In: **Natural Resources Forum**. Blackwell Publishing, Ltd.p. 12-24, 2005.

FRANCO, B. E. et al. The determinants of the antibiotic resistance process. **Infection and drug resistance**, v. 2, p. 1–11, 2009.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil Bibliographical study on the use of medicinal and herbal plants in Brazil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208 - 212, 2013.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, 2008.

GAMBOA-MARÍN, A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. **Journal of Swine Health Production**, v. 21, p. 10-21, 2013.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S. Fígado e vias biliares. In: FILHO, G. B. Bogliolo Patologia. 6 a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1328p.

GERAN, R. I. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 3, p. 51-61, 1972.

GIRARDI, G. Breve História das Drogas. **Revista Galileu Especial**, n. 3, p. 6-7, Ed. Globo, 2003.

GONÇALVES, L. M. C. **Avaliação da expressão génica num modelo de neoplasia experimental da mama**. 2012. 69f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. Português. 2012.

GONZALEZ-CANDELAS, F. et al. The Evolution of Antibiotic Resistance. In: TIBAYRENC, M. (Ed.). **Genetics and evolution of infectious diseases**. Elsevier, 2011. p. 33.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GUERRA J.L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. *Fitoterapia*, v.73, p.730-733; 2002

HAMZA, O. J. M et al. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 124-132, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v.144, p. 646-674, 2011.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HIROTA, B. C. K. et al. Fitoquímica e Atividades biológicas do gênero Jatropha: Mini-revisão. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 3. Edição. Revista atual. – Rio de Janeiro, 2017a.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017b.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, 1997.

JIRSCHITZKA, J. et al. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 103-104, 2012.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 198-216, 2010.

JORIS, M. A. et al. Antibody Responses against Locus of Enterocyte Effacement (LEE) Encoded Antigens for Monitoring EHEC infections on Cattle Farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3677-3683, 2013.

KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. **The Indian journal of medical research**, v. 121, n. 2, p. 83–91, 2005.

KNOBL, T. et al. Prevalence of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

KREBS, H. C. et al. Chemical composition and antitumor activities from *Givotia madagascariensis*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 59, n. 1, p. 58-62, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 9ª Ed. Elsevier, Brasil, 2015.

LAMEIRA, A. O; PINTO, J. E. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

LANZ, H. L. et al. Mitotic catastrophe triggered in human cancer cells by the viral protein apoptin. **Cell death and disease**, v.4, n. 2, p. e487, 2013.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, 1999.

LEAL C.K.A.; AGRA M.F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerens**. 2005.

LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**. 2005.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n.1, p. 785–801, 2011.

LUZ, H. S. et al. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 657-662, 2014.

MACLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino. In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. **Patologia Veterinária Especial**. 2.ed. Artmed, São Paulo, p.95-131, 1998.

MACK, Alison et al. (Ed.). **Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: workshop summary**. National Academies Press, 2011.

MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. **Progress in neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 235-257, 2002.

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983.

MARIZ, S.R.; et al. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.346-357, 2010.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Upsala journal of medical sciences**, v. 119, n. 2, p. 68–77, 2014.

MARTINS, F. M. M. **Estudo da Influência de Fatores Ambientais na Composição Química e Atividades Biológicas de *Xylopia sericea* St. Hill**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo. 2012.

MATIAS, E. F. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. 2010. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção molecular). Universidade Regional do Cariri-URCA. Crato. 2010.

MATIAS, E. F. F. et al. Screening the *in vitro* modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p.1912-1907, 2012.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições EUFC, 1988. 141p.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª edição. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543, 2001

MELO, J. G. et al. Antiploriferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 8534-8542, 2010.

MENDOZA-MUÑOZ, M. **Evaluación farmacológica de la actividad analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L.** 2016. 108f. Tese de Doutorado. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Química Farmacia. Departamento de Farmacia. Santa Clara, 2016.

MERLIN, C. et al. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. **Water research**, v. 45, n. 9, p. 2897–905, 2011.

MIRANDA-ESTRADA, L. I. et al. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, v. 35, n. 7, p. 426-433, 2017.

MODIANO, I. F.; BREEN, M. The etiology of cancer. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book**, p. 1, 2013.

MUSTARD, J. A. The buzz on caffeine in invertebrates: effects on behavior and molecular mechanisms. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 8, p. 1375-1382, 2014.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.5, p.652-662, 2011.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NASCIMENTO, T.C. **Caracterização Fenotípica, susceptibilidade a antimicrobianos e pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus coagulase negativo* recuperadas de resíduos dos serviços de saúde.** 2009. 109f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2009.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 5ª ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, 2000.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically.** 6ed. Pennsylvania, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p.311-335, 2012.

NOGUEIRA, I. A. L. **Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* Pax in vitro e in vivo.** 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of internal medicine**, v. 252, n. 2, p. 91–106, 2002.

OBATA, F. Influence of Escherichia coli shiga toxin on the mammalian central nervous system. **Advances in applied microbiology**, v. 71, p. 1–19, 2010.

OGAWA, T. et al. Investigation of oral opportunistic pathogens in independent living elderly Japanese. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, 2012.

OKUYAMA, E. et al. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, huanarpo (Jatropha cillata). **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 44, n. 2, p. 333-336, 1996.

OLIVEIRA, S.L. et al. Efeito antagonista de PAF no número de células, apoptose, produção de PGE2 e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). **Instituto e Ciências Biomédicas**, USP, Pôster 236, 2003.

ONGTENGCO, D. C. The in vitro antibacterial activity of Jatropha multifida Linn. latex against common bacterial wound isolates. **Acta Manila Ser A**, v. 40, n. 0, p. 25-28, 1992.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PAHARIK, A.E; HORSWILL, A.R.; The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.2, p. 1-48, 2016.

PALERMO, J. N.; MASSOCO, C. O., SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**. v.17, p. 43-54, 2003.

PASA, M. C. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 1, n. 1, p. 179-196, 2011.

PASSOS, C. S. et al. Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PEREIRA, S. A. et al. PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO GÊNERO JATROPHA (EUPHORBIACEAE). **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 2, p. 355, 2015.

PEREIRA. R.J; CARDOSO. M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade**. v. 3, n.4: p. 146-152, 2012.

PEREIRA, V. S. et al. Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de Ocimum gratissimum. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 4, 2014.

PESSOA, I. C. **Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR**. 2011. 101f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

- PITONDO-SILVA, A. et al. High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil of different crops in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 473-474, p. 155–158, 2014.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
- QUINN, P. J. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2ª Edição. John Wiley & Sons, 2011. p. 1231.
- RAJESH, R., et al. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313–1322, 2006.
- RAICA, M; CIMPEAN, A; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European journal of cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924-1934, 2009.
- RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. I. Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and imune therapy of cancer. **Cancer Immunol Immunoyher**, v.62, p.405-410, 2013.
- REDDY, B. S. et al. Phytochemical, pharmacological and biological profiles of *Tragia* species (family: euphorbiaceae). **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v.14, n.3, p.105, 2017.
- REZENDE, F. M et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: Hidalgo, E. M.P (Org.). **VI Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, São Paulo, 2016. Cap. 10, p. 93-104.
- RIBEIRO, A. F. C. **Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. &Bonpl.) B. Verlot**. 2012. 92f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Toxicologia e Plantas Tóxicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte. 2012.
- RIBEIRO, A. R. C. **Prospecção química, toxicidade do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e seu efeito sobre ovos, larvas e adultos de *Haemonchus contortus* no Semiárido paraibano**. 2014. 33f . Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande, Centro Saúde e Tecnologia Rural. 2014.
- RIOS, J. B. **Estudo Químico da raiz de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill; identificação de compostos fenólicos em quatro espécies do gênero *Anthurium* através de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas**. 2011. 79f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.
- RIZZO, M.S. Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos. São Paulo, 2000. 100p. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

ROCHA, G. F. A.; DANTAS, L. I. S. Atividade antimicrobiana in vitro do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mol lissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. **Holos**, v. 4, 2009.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROCHA, N. F. Atividade antioxidante e antitumoral em extratos de *Jatropha curcas* L. 2013. 110f. Dissertação de Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, M. et al. Distribución del género *Jatropha* L.(Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. **Polibotánica**, n. 28, p. 37-48, 2009.

ROGÉRIO, A.P. et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v.17, p.795-804, 2007.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B.. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p.306-310, 2012.

ROSSATO, A. E. et al. **Fitoterapia racional**: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. 1ª Edição. DIOESC. Florianópolis, 2013.

RUSU, G. G. et al. The Modifications of the Bacterial Human Endogenous Flora During Hospitalisation. **Acta Medica Transilvanica**, v. 2, n. 4, p. 305-307, 2010.

SALGADO, J. M. **Guia dos Funcionais: Dieta Alimentar para Manter a Saúde e Evitar Doenças**. Rio de Janeiro: Ediouro. 2009. 192p.

SANNI, S. B. et al. Crystal and molecular structure of 1R, 3S, 5S, 7R, 10R-3, 6, 6, 10, 14-Pentamethyltricyclo [10.3. 0.0 5, 7] pentadeca-11, 14-diene-1, 10-dihydroxy-2, 13-dione (Japodagrol), C 20 H 28 O 4. **Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research**, v. 18, n. 5, p. 575-582, 1988.

SÁNCHEZ GREGORIO, A. **Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de *Jatropha dioica* Sessé ex Cerv.** 2012. 97f. Tese de Doutorado. Unversidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, 2012.

SANTANA, J. A da S.; SOUTO, J. S. Diversidade e estrutura fitossociológica da Caatinga na Estação Ecológica do Seridó-RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 232-242, 2006.

SANTOS, A.A. et al. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, criadas em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.141-145, 2004.

SANTOS, A.L.; et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, M. P. **Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L.: avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2014. 147f. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa, 2014.

SÁTIRO, L.N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, n. 22 p. 99-118, 2008.

SCHIMITZ, W. et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SCHMIDT, E. C. Universidade Federal Do Rio Grande do Norte. Structure Of Mutualistic Networks Between Bats And Plants And Other Feeding Strategies In A Semiarid Caatinga Forest Of Rio Grande Do Norte, Brazil. Dissertação. Natal, 2016.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future microbiology**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.

STALKER, M. J.; HAYES, M. A. Liver and biliary system. In: MAXIE, M. G. **Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 297-388.

SEEFF, L. B. Herbal hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 577-596, 2007.

SHEA, K. M. Antibiotic Resistance : What Is the Impact of Agricultural Uses of Antibiotics on Children ' s Health ? **Padiatrics**, v. 112, n. 1, p. 253–258, 2003.

SHIN, J., et al. Constructing a knowledge-based database for dermatological integrative medical information. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SILVA, E. S. et al. Alterações comportamentais em ratos administrados com preparações da *Datura suaveolens*. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 33-50, 2017a.

SILVA, N. C. C., et al. Synergism of crude extracts and essential oils from medicinal plants with antimicrobial drugs. **Journal of Antimicrobials**, p. 189-197, 2013.

SILVA, N. C. S. et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017b.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. edição. São Paulo: Varela, São Paulo, 2010. 632 p.

SILVA, P. I. C; FREITAS, J. J. S; DOMINGUES, R. J. S (Org.). **Manual Básico de ONCOLOGIA EXPERIMENTAL Tumor de Ehrlich**. 1ª Edição. Belém. 2017

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRS/ UFS. 2010.

SOUZA, C. A. S. et al. Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, 2017.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World cancer report 2014. international agency for research on cancer. **World Health Organization**, v. 505, 2014.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in câncer. **Journal of oncology**, v. 2013, p.1-14, 2013.

SUTTHIVAIYAKIT, S. et al. A novel 8, 9-seco-rhamnofolane and a new rhamnofolane endoperoxide from *Jatropha integerrima* roots. **Tetrahedron letters**, v. 44, n. 18, p. 3637-3640, 2003.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281–301, 2000.

TAYARANI-NAJARAN, Z.; et al. Antiemetic activity of volatile oil from *Mentha spicata* and *Mentha x piperita* in chemotherapy-induced nausea and vomiting. **Ecancer medical Science**, v.7, 2013.

TERRÍVEL, J. et al. Conhecimento dos médicos relativo à prescrição de antibióticos e à resistência microbiana: Estudo piloto de comparação de questionário online vs papel. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, p. 93-98, 2013.

TODAR, K. The microbial world. **The Prokaryotes: Archaea and Bacteria. Lectures in Microbiology**, 2009.

TORRANCE, S. J. et al. Antitumor agents from *Jatropha macrorhiza* (Euphorbiaceae). II. Isolation and characterization of jatrophatrione. **The Journal of organic chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1855-1857, 1976.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiology: an introduction**. 10ª edição. CA: Benjamin Cummings, San Francisco, 2010.

TRINDADE, M. T. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, 2015.

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-34. 1996.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALADARES, M. C.; QUEIROZ, M. L. S. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European journal of pharmacology**, v. 439, n. 1-3, p. 35-42, 2002.

VEIGA, A. A. S. **Isolamento e quantificação de flavonóides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L.** 2008. 67f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará. Belém. 2008.

VILAR, J. C.; **Ofidismo em Sergipe: Epidemiologia e plantas da caatinga utilizadas popularmente como antiofídicas.** 2004. 38f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente). Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2004.

VISACRI, M. B. **Avaliação do uso da acetilcisteína na atenuação das toxicidades induzidas por cisplatina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço em tratamento com quimioterapia e radioterapia: influência do estresse oxidativo.** 2017. p.190. Tese de doutorado, Campinas, 2017.

WALJI, R.; WIKTOROWICZ, M. Governance of natural health products regulation: An iterative process. **Health Policy**, v. 111, p. 86– 94, 2013.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. **Physiology & Behavior**, v. 100, n. 1, p. 42-46, 2010.

WHITE, E. et al. Papel da autofagia na supressão da inflamação e do câncer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 212 – 217, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. **World Health Organization, Geneva,,** p. 12, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine Strategy: 2014-2023. Geneva, Switzerland: **World Health Organization** Press. 2013.

YEH, M. M., Nonalcoholic Fatty Liver Disease, **in: Saxena, R., Pratical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach**, Elsevier, Philadelphia, 2011, p. 435-440.

ZHANG, X.-X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 397–414, 2009.