

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pósgraduação em Química

Estudo fitoquímico e atividades biológicas do extrato etanólico das
folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae)

DAYLIN GAMIOTEA TURRO

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

G192e Gamiotea Turro, Daylin
Estudo fitoquímico e atividades biológicas do extrato
etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) /
Daylin Gamiotea Turro. –
Araraquara: [s.n.], 2018
158 f.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos
Coorientador: Daniel Rinaldo

1. Euforbiácea. 2. Flavonóides. 3. Diabetes mellitus.
4. Citotoxicidade. 5. Cromatografia líquida de alta de eficiência.

I. Título

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo fitoquímico e atividades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae)"

AUTORA: DAYLIN GAMIOTEA TURRO

ORIENTADORA: LOURDES CAMPANER DOS SANTOS

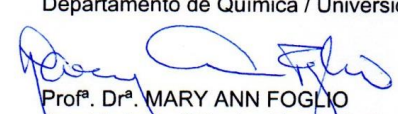
COORIENTADOR: DANIEL RINALDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a Dr.^a ANA HELENA JANUÁRIO
Departamento de Química / Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca


Prof.^a Dr.^a MARY ANN FOGLIO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas


Prof.^a Dr.^a HOSANA MARIA DEBONSI
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 27 de agosto de 2018

Dados curriculares

Dados pessoais

Nome: Daylin Gamiotea Turro

Filiação: Delfin Adalberto Gamiotea Spengler e Mirsa Turro Guilian

Naturalidade: La Habana/Cuba

E-mail: gamiotea.turro@unesp.br

daylingamioteaturro@gmail.com

Formação acadêmica

Graduação

Instituição: Universidad de La Habana, Facultad de Química.

Local: La Habana/Cuba.

Curso: Química Licenciatura.

Período: 1991 – 1996.

Pós-graduação:

Mestrado

Instituição: Universidad de La Habana, Facultad de Química.

Título da dissertação: Semisíntesis de derivados de Prostaglandina B₂ con borohidruro de sodio.

Orientador: Dr. José Antonio González Lavaut

Local: Universidad de La Habana, Facultad de Química

Período: 09/1998– 11/2000.

Doutorado

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

Título da Tese: Estudo fitoquímico e atividades biológicas do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Co-Orientado: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bolsista: CAPES (período 10/2014 – 07/2018)

Local: Araraquara/SP

Período: 08/2014 – 07/2018

Atuação profissional

Instituto de Investigaciones Fundamentales em Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT).

Período: 2006-2014. Vínculo: Servidor público. Especialista em pesquisa e desenvolvimento. Carga horária: 44. Regime: Dedicação exclusiva.

Centro de Química Farmacéutica (COF).

Período: 1996-2004, Vínculo: Servidor público. Pesquisador. Carga horária: 44, Regime: Dedicação exclusiva.

Artigos publicados em revistas científicas

1. **GAMIOTEA-TURRO, D.**; CAMAFORTE, N.A.P.; VALERINO-DIAZ, A.B.; ORTIZ-NÚÑEZ, Y.; RINALDO, D.; BOSQUEIRO, J.R.; DOKKEDAL, A.L. AND SANTOS, L.C. Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1419–1427, 2018.
2. VALERINO-DIAZ, A.B.; **GAMIOTEA-TURRO, D.**; ZANATTA, C.; VILEGAS, W. GOMES MARTINS, C. H.; SOUZA SILVA, T.; RASTRELLI, L. AND SANTOS L.C. New polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaf alcohol tincture with antibacterial activity against oral pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 33, p. 8703–8713, 2018.
3. THAYNA HENRIQUES MARCONDES; DAYLIN GAMIOTEA TURRO; ANA CAROLINE ZANATTA SILVA; LOURDES CAMPANER DOS SANTOS. Avaliação do potencial antirradicalar e determinação do teor de flavonoides totais das frações acetato de etila e n-butanol das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) coletadas em Havana, Cuba. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 37 Supl. 1, Agosto 2016.
4. YARELIS ORTIZ NÚÑEZ; JANET RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; YULIET AGUADO RODRÍGUEZ; MARÍA E. RUENES FIGUEROA; MARÍA E. ÁLVAREZ VALDÉS; YANNIN LORENZO RODRÍGUEZ; LUZ DIVINA LIÑEIRO; **DAYLIN GAMIOTEA TURRO**; IVÁN SIXTO SAYAGO. Efecto de la aplicación combinada de extractos de paraíso y el bioproducto dimabac sobre la germinación de semillas de tomate (var. Inifat-28) en cepellón. **Agrotecnia de Cuba**, v. 37, n. 2, p. 39-51, 2013.
5. YARELIS ORTIZ NÚÑEZ; RAFAEL F. CASTAÑEDA RUIZ; MARÍA E. ÁLVAREZ VALDÉS; YANNIN LORENZO RODRÍGUEZ; BEATRIZ RAMOS GARCÍA; LIUBA PLANA PÉREZ; IRMA MARRERO GRANADO; DORIS GARCÍA VÁZQUEZ; YULIET AGUADO RODRÍGUEZ; MARÍA E. RUENES FIGUEROA; **DAYLIN GAMIOTEA TURRO**. Actividad fungicida de espécies de *Cladobotryum* sobre *Cladosporium*

colocasiae y *Cladosporium oxysporum*. **Agrotecnia de Cuba**, v. 36, n. 1, p. 80-84, 2012.

6. YARELIS ORTIZ NÚÑEZ; IRAIDA SPENGLER SALABARRÍA; RUBÉN AVILÉS PACHECO; YAMILET RODRÍGUEZ DÍAZ; MARÍA E. ÁLVAREZ VALDÉS; YANNIN LORENZO RODRÍGUEZ; **DAYLIN GAMIOTEA TURRO**; YOLANDA MARTÍNEZ; YULIET AGUADO RODRÍGUEZ. Agroquímicos naturales a partir de plantas cubanas. **Agrotecnia de Cuba**, v. 33, n. 1, p. 28-35, 2009.

7. IRAIDA SPENGLER SALABARRÍA; ALEXANDER B. VALERINO DÍAZ; TELCE GONZÁLEZ MORERA; **DAYLÍN GAMIOTEA TURRO**; TRINA H. GARCÍA PÉREZ. Estudio fitoquímico y de actividad alelopática del extracto de *n*-hexano del follaje de *Lantana trifolia* L. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, v. 40, n. 1, p. 33-37, 2009.

8. **DAYLIN GAMIOTEA-TURRO**; OSMANY CUESTA-RUBIO; SYLVIA PRIETO-GONZÁLEZ; FRANCESCO DE SIMONE; SIRO PASSI; LUCA RASTRELLI. Antioxidative Constituents from the Leaves of *Hypericum styphelioides*. **Journal of Natural Product**, v. 67, n. 5, p. 869–871, 2004.

9. PRIETO-GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, J. A.; MOLINA, J., DIEGUEZ, R.; GARRIDO, G.; **GAMIOTEA-TURRO, D.**; HERRADA, D.; AGUERO, J. B.; MORA, G. A.; VELEZ, H.; RASTRELLI, L. Utilización de productos naturales en el tratamiento antiviral. **Revista Cubana de Química**, v. 13, p. 408-412, 2001.

10. **GAMIOTEA, D.**; RIVAS, Y.; RUIZ, R.; MARQUEZ, M.; GARCIA, N. AND GONZALEZ, J. A. *Pseudoplexaura porosa* y *Eunicea tourniforti*: Aplicación de dos nuevas gorgonias em la hidrolisis del éster metílico de Prostaglandina A₂. **Revista Cubana de Farmacia**, Supp. Esp., v. 34, p. 345–347, 2000.

Participação em congressos

1. **Gamiotea-Turro, D.**; Valerino-Díaz, A. B.; Ortiz-Nuñez, Y.; Rinaldo, D., Bosqueiro, J. R.; Camaforte, N. A. and Santos, L. C. Chemical characterization of antidiabetic active ethanolic extract from *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves. **41^a Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química**, 2018.
2. Valerino-Díaz, A. B.; **Gamiotea-Turro, D.**; Zanatta, A. C.; Vilegas, W. and Santos, L. C. New steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae) leaves. **41^a Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química**, 2018.
3. Rodriguez, J. E.; Rodriguez, Z. and **Gamiotea-Turro, D.** Characterization of *N,N,N*-trimethylchitosan chloride obtained on a bench scale. **VII Congresso Internacional de Biomateriais**, 2018.
4. Valerino-Díaz, A. B.; **Gamiotea-Turro, D.**; Martins, C. H. G.; Ambrosio, M. A.; Vilegas, W. and Santos, L. C. Antimicrobial activity of the ethanolic extract and the

- saponin fraction from *Solanum paniculatum* L. **6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM**, 2017.
5. **Gamiotea-Turro, D.**; Valerino-Diaz, A. B.; Marcondes, T. H. and Santos, L. C. Phenolic compounds from *Jatropha aethiopica* used in the folk Cuban medicin. **XIII Jornada Paulista de Plantas Medicinais**, 2017.
 6. Marcondes, T. H.; **Gamiotea-Turro, D.** and Santos, L. C. Avaliação do potencial antirradicalar e determinação do teor de flavonoides totais das frações acetato de etila e n-butanol das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) coletadas em Havana, Cuba. **VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**, 2016.
 7. **Daylin Gamiotea-Turro** and Iván S. Sayago. Uso y abuso de los agroquímicos. Consecuencias. **Intercambio participativo sobre el sistema agroecológico de producción de hortalizas bajo condiciones de organoponia**, 2014.
 8. **Gamiotea-Turro, D.**; Ruenes-Figueroa, M. E.; Álvarez-Valdés, M. E.; Aguado-Rodriguez, Y.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Valerino-Diaz, A. B.; Spengler-Salabarría, I. Natural products: Bioregulators in the seed germination for obtaining innocuous foods. **III Congreso Internacional de Farmacología de productos Naturales (FAPRONATURA 2012)**, 2012.
 9. **Gamiotea-Turro, D.**; Aguado-Rodriguez, Y.; Ruenes-Figueroa, M. E.; Álvarez-Valdés, M. E.; Ortiz-Nuñez, Y.; Lorenzo-Rodriguez, Y. and Valerino-Diaz, A. B. Extratos vegetais como promotores da germinação de sementes de hortaliças. **IV Congreso de Agricultura Tropical - Tropico 2012**, 2012.
 10. **Gamiotea-Turro, D.**; Álvarez-Valdés, M. E.; Perera, W.; Aguado-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Valerino-Diaz, A. B.; Spengler-Salabarría, I.; Lorenzo-Rodriguez, Y. Propiedades anti-oxidantes de la *Jatropha aethiopica*. **IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicinas Naturales (ProdMedNatur 2010)**, 2010.
 11. **Gamiotea-Turro, D.**; Álvarez-Valdés, M. E.; Aguado-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Lorenzo-Rodriguez, Y. and Valerino-Diaz, A. B. Usos etnomédicos de las especies de *Jatrophas* presentes en el Arboretum del INIFAT. **Ier Congreso Internacional LABIOFAM 2010. Ier Simposio de Productos Naturales en la Terapia contra el Cáncer**, 2010.
 12. Ortiz-Nuñez, Y.; Castañeda, R. F.; Plana, L.; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ramos, B.; Gonzalez, N.; Aguado-Rodriguez, Y.; **Gamiotea-Turro, D.** and Ruenes-Figueroa, M. E. Actividad fungicida de hongos anamórficos sobre especies de *Cladosporium* spp. **XVII Congreso Científico Internacional del INCA**, 2010.
 13. **Gamiotea-Turro, D.**; Perera, W.; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Aguado-Rodriguez, Y.; Valerino-Diaz, A. B.; Spengler-Salabarría, I. Determinación de la capacidad antioxidante y del contenido de fenoles totales de la especie *Jatropha aethiopica*. **XVIII Congreso Ítalo- Latino-americano de Etno medicina. "Juan Tomás Roig y Mesa". VIII Taller de los Productos Naturales**, 2009.

14. **Gamiotea-Turro, D.**; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Ortiz-Nuñez, Y.; Aguado-Rodriguez, Y.; Valerino-Diaz, A. B.; Spengler-Salabarría, I. Propiedades etnomédicas de três espécies de *Jatropha* cultivadas em Cuba. **XVIII Congresso Ítalo- Latino-americano de Etno medicina. “Juan Tomás Roig y Mesa”.** VIII Taller de los Productos Naturales, 2009.
15. M. E. Álvarez Valdés, M. Alfonso, R. Avilés, Y. Ortiz-Nuñez, Y. Martínez, Y. Lorenzo, **D. Gamiotea-Turro**, Y. Aguado. Atividade inseticida e fungicida de *Thuja orientalis* L. **IV encuentro Internacional por el Desarrollo Forestal Sostenible**, 2009.
16. Y. Ortiz-Nuñez, I. Spengler Salabarría, Y. Rodríguez Díaz, M. E. Álvarez Valdés, Y. Lorenzo Rodríguez, **D. Gamiotea-Turro**, Y. Aguado. Actividad antimicrobiana de *Juniperus lucayana* B. **IV encuentro Internacional por el Desarrollo Forestal Sostenible**, 2009.
17. **Gamiotea-Turro, D.**; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Sánchez, R.; Hernández, Y.; González, M; Ortiz-Nuñez, Y.; Valerino-Diaz, A. B. and Spengler-Salabarría, I. *Jatropha aethiopica*: Composición química y actividad alelopática. **19 Conference of Chemistry**, 2008.
18. Pérez, C. E.; Álvarez, M. E.; González, M.; Villasana, R.; Pérez, D.; **Gamiotea-Turro, D.** and Spengler, I. Composición química y actividad alelopática frente a malezas de las hojas de *Wedelia trilobata* L. **19 Conference of Chemistry**, 2008.
19. **Gamiotea-Turro, D.**; Álvarez-Valdés, M. E.; Lorenzo-Rodriguez, Y.; Sánchez, R.; Hernández, Y.; González, M; Ortiz-Nuñez, Y.; Valerino-Diaz, A. B. and Spengler-Salabarría, I. Estudio preliminar de germinación de semillas de interés económico utilizando extractos de plantas. **XVI Congreso Científico Internacional del INCA**, 2008.
20. **Gamiotea-Turro, D.**; González-Lavaut, J. A. and Ramirez, E. *Zanthoxylum Kellermanii*: Especie con potencial antimicrobiano. **4to Congreso Forestal de Cuba. III Encuentro Internacional de Jóvenes Investigadores**, 2007.
21. González, J. A.; Rivas, Y.; Fernández, O.; Orta, R.; Padilla, A.; Castro, M. and **Gamiotea-Turro, D.** Prostanoides bioactivos de una fuente natural. **II Encuentro Internacional de Farmacia y Nutrición**, 2003.
22. **Gamiotea, D.**; Prieto, S.; González, J. A.; Molina, J.; Aguero, J.; Marquez, L. and Rivas, Y. Modulación de la actividad antiviral por efecto de la luz en el género *Hypericum*. **FotoCiencias 2002**, 2002.
23. **Gamiotea, D.**; Prieto, S.; González, J. A.; Molina, J.; Aguero, J.; Marquez, L. and Rivas, Y. Evaluación Fitoquímica de la especie *Hypericum styphelioides*, A. Rich. **Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Félix Pifano”**, 2001.
24. González, J. A.; Rivas, Y.; Fernández, O.; Orrett, E.; Orta, R.; Padilla, A.; Castro, M. and **Gamiotea-Turro, D.** Potencialidades de un recurso natural. **IV Congreso Internacional de Química**, 2001.
25. **Gamiotea, D.**; Rivas, Y.; Ruiz, R.; Marquez, L.; Garcia, N. and González, J. A. *Pseudoplexaura porosa* y *Eunicea tourniforti*: Aplicación de dos nuevas gorgonias en la hidrólisis del éster metílico de Prostaglandina A₂. **IV Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**, 2000.

26. **Gamiotea-Turro, D.**; García, N.; González, J. A. and Rivas, Y. Prostaglandina E1: Intermediarios para su obtención. **III Congresso Internacional de la Sociedade Cubana de Química**, 1998.
27. **Gamiotea-Turro, D.**; González, J. C.; Estévez-Rodríguez, Y. and Ramos-Cairo, R. Hidracinas aromáticas para el marcaje de anticuerpos monoclonales. **III Congresso Internacional de la Sociedade Cubana de Química**, 1998.

Organização de cursos

1. 1^ª Escola de Verão do Insitutto de Química de Araraquara (UNESP-SP) (Fevereiro 2018). Prof^a. Dr^a. Lourdes C. dos Santos, Prof^a. Dr^a. Isabele R. Nascimento, **Daylin Gamiotea-Turro**, Alexander B. Valerino Díaz, Ana C. Zanatta, Felipe Hilário, Marcelo Amorim, Mayra Fonseca, Weslei Botero.
2. Protecção de Plantas (2013): Dra. Yarelis Ortiz Nuñez, Dr. Rubén Avilés, **Daylin Gamiotea Turro** (Alelopatia).
3. Manejo Integrado de Pragas (2012; 2011): Dra. Yarelis Ortiz Nuñez, Dr. Rubén Avilés, **Daylin Gamiotea Turro**, Maria de los A. Sayas.

Bancas

Graduação

- 1 Spengler-Salabarría, I.; Nogueiras, C. e Gamiotea-Turro, D. Participação em banca de Lyanne Rodríguez Pérez. “**Triterpenos con potencial anti-inflamatorio aislados de la corteza del tallo de *Maytenus elaeodendroides* (Griseb)**”, 2012, Universidade de Havana, Cuba.

Comissões julgadoras

- 1 Presidente de Sessão Avaliadora na Sociedade Cubana de Química (2009). **Daylin Gamiotea-Turro**.
- 2 Membro da Comissão do Forum Municipal de Ciência e Técnica (2007; 2006). **Daylin Gamiotea-Turro**.

Orientações

- 1 Supervisão do desenvolvimento do TTC da aluna Thayna Henrique Marcondes, estudante do curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química de Araraquara; onde desenvolve o projeto intitulado “Estudo fitoquímico comparativo de metabólitos secundários produzidos pela espécie *Jatropha multifida* L. cultivada no Brasil e em Cuba” com bolsa CUCA.

*“Debes amar la arcilla que va en tus manos,
debes amar su arena hasta la locura;
y sí no, no la emprendas que será en vano,
Sólo el amor alumbra lo que perdura,
sólo el amor convierte en milagro el barro.
Debes amar la hora que nunca brilla
y sí no, no pretendas tocar lo cierto
Sólo el amor engendra la maravilla,
sólo el amor consigue encender lo muerto”*

(Silvio Rodríguez)

Dedicado a:

Delfin Adalberto Gamiotea Spengler

Meu Pai
In memoriam

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir estarmos hoje reunidos defendendo uma parte muito importante da minha vida.

À professora Lourdes Campaner dos Santos, por ser mãe, amiga, colega. Muito obrigada professora por ser como você é, autêntica e única.

Ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo, pela sua amizade e me aceitar como doutoranda compartilhando os seus conhecimentos.

Ao Brasil, pela oportunidade que brinda aos estrangeiros para sermos formados nas suas Instituições.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio na realização das pesquisas.

Ao Instituto de Química e sua Seção Técnica de Pós-Graduação por abrirem as oportunidades a Cuba. Wennia, Célia, Cintia, obrigado.

Aos servidores públicos da Biblioteca, da STAEPE, da STI, dos Serviços de Manutenção e Serviços Gerais. Muito obrigada pela paciência e compreensão.

Ao departamento de Química Orgânica, seus Docentes, Graduando e Pós-Graduandos, por oferecer-me seus laboratórios e companheirismo. Por demonstrar-me que o conhecimento pode estar em qualquer um de nós e principalmente, aprendi valorizar à Fitoquímica como uma parte ainda importante no desenvolvimento da Química. Não posso deixar de mencionar ao Dr. Nivaldo Boralle, Lucineia Vizzotto Marconcini, Prof. Dr. Ian Castro Gamboa, Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, Dra. Juliana Rodrigues, João Luiz Bronzel Junior, Camila Luiza Cunha, Mayra Fonseca Costas e Natália Vieira. Espero todos saibam o por que do meu agradecimento, meu profundo carinho e respeito por vocês.

Aos colegas do meu grupo de Fitoquímica, primeiro por recebermos como família e depois por ensinar-me a crescer e me valorizar como profissional e pessoa: ao Weslei Botero, Felipe Hilário, Maiara Borges, João Pedro, Henrique Veloso, Pedrinho, Marcelo. À Ana Carolina Zanatta Silva (Aninha) e Thayna H. Marcondes, meu carinho, admiração e respeito muito especial.

À comunidade de Cubanos em Araraquara sem os quais a nossa vida teria sido diferente. Alguns conhecia desde Cuba, outros conheci aqui, mas ficaram como família. As famílias podem ter os seus problemas. Porém, acredito que na hora certa eles estarão presentes. Uns já continuaram suas vidas em outras terras, outros continuam aqui, mas sempre seremos “Cubanos em Araraquara” Mayté Paredes, Celia M. Casado Martins, Jorge R. Chanfrau, Bárbara M. Reyes, Deivys Leandro, Ana Isa Pérez Cordoves, Yayma Veranes, Leonar D. Granela, Michael Pérez Rodríguez, Yani, Viviam Ruz, Antonio Fernández, Patricia Carreaga e Paulo Henrique quem é um cubano mais. Os médicos cubanos Jorge, Yadian e Erika, Yisel. *Con ellos mi tranquilidad, mi salud y de mi familia, siempre estuvieron seguros.*

Aos amigos de São Carlos: Dianne, Yuleidi, Humberto, Elsie e Marcus, Ínes.

Às Instituições e pessoas que chegaram à nossa vida não por acaso e sim para formar parte do nosso passado, presente e futuro: Aos professores da escola EE Antônio J. de Carvalho, EE Narciso da Silva César, Lar Nossa Sra. das Mercês que acolheram a minha filha com muito amor (Andreia, Dalva, Rosângela, Irmã Cida, Sueli, Joseane, etc). Os meus vizinhos que formam parte da minha família brasileira: Maria Cecília Onofrio, Dona Luzia, Daiana (francesa), Wolter Logatte, Christina. Aos amigos dos nossos amigos que já são os meus amigos: Marcelio Souza, Vanusa e Flia, Daiana, Osmar e Katia, etc.

Mis amigos de siempre: Araisa y Flia, Wilmer Perera y Flia, Abel Gómez y Flia, Moisés Terrero "del Valle" y Flia, Yaelis Rivas y Flia. Todos son y siempre serán importantes en nuestras vidas.

Maite Docampo y Flia, mi mejor e incondicional amiga. Sin ti, sabes que esta batalla hubiera sido más difícil.

Jorge L. Escobar, Dunia García y Flia: Gracias por el afecto y las muestras de amistad y cariño sincero sobre todo em esta última etapa.

Mis querid@s amig@s del INIFAT, Yarelis Ortiz, Maria Elena Álvarez, Yuliet Aguado, Evelyn Gueishman, Ivan Sayago, Zoraida, Yannin, Ruben, Pancho. Están siempre presentes en mi corazón.

Maria Eugenia Ruenes Figueroa, de amiga pasaste a hermana que sin darme cuenta. No tengo más que escribir porque todo te lo he dicho.

Mi familia: primos, tios, ahijados, comadres y compadres. No imaginan el tamaño de la alegría cuando sé de uds, cuando nos reunimos en nuestras vacaciones em Cuba, cuando nos vemos por IMO. Wilmer, Tomasito, Yahima, Dulce, Iraida, Carlos, Anita, Ritsie, Fernandito, Anneriesse, Annerys.

A Beatris Leander y Marlon Valerino por siempre estar presente como si estuviéramos em el mismo País. Los quiero mucho, mucho.

A mi suegra, cuñados y conuñas. Sin uds no existiera esse hombre maravilloso que siempre me acompaña. Uds. también son mi familia: Miriam, Reinier, Martín, Yaquelin, Yaneisy, Mercedes, etc.

Mi madre, Mirsa Turro Guilian, mi inspiración y mi fuerza. Dios te bendiga siempre y nos permita disfrutar de tu claridade, alegría y sabiduria por muchos años más. Mi hermano, Alberto L. Gamiotea Turro: Siempre en mis pensamientos. Cuídate y DtB.

A minha pequena princesa, Lauren Valerino Gamiotea. Meu todo, a minha razão de viver, a minha maior motivação para me aventurar nessa história e para quem eu quero continuar.

Alexander B. Valerino Díaz: Meu esposo, amigo, cúmplice, companheiro, colega de trabalho. Não tenho palavras para descrever o importante que você é na minha vida. Muito obrigada mesmo por aceitar os meus defeitos e sobre tudo, por essa caminhada que estamos fazendo juntos.

A todos, "Muchas gracias".

RESUMO

A espécie *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) é usada em Cuba como planta ornamental e medicinal, conhecida como "Chaya" ou "mata diabetes". As pessoas garantem que o chá feito das folhas é capaz não só controlar o diabetes, mas também curá-la. Este trabalho teve como objetivo o estudo químico através da identificação, isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos presentes no extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*, assim como avaliar a atividade hipoglicemiante e a citotoxicidade desse extrato. Técnicas cromatográficas de isolamento e purificação (Sephadex LH-20, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diosdos (CLAE-DAD), Cromatografia Líquida de Media Pressão (CLMP)), assim como a otimização desses métodos, possibilitaram o isolamento e caracterização química de 12 substâncias utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Foram quantificados por CLAE-DAD tanto no extrato etanólico quanto na fração fenólica, os metabolitos secundários identificados majoritariamente no DAD. A metodologia analítica foi validada segundo as normas da ANVISA. A análise por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas com interface de ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS), foi útil na confirmação da presença de vários isômeros de flavonoides e compostos nitrogenados, bem como, na determinação do possível mecanismo de fragmentação dessas substâncias. A atividade hipoglicemiante foi determinada usando um modelo de camundongo swiss, no entanto a atividade citotóxica foi determinada mediante os testes colorimétricos MTT (Brometo de 3-((4,5-dimetiltiazol)-2, il)-2,5-difeniltetrazólio) e XTT (Hidrato de benzenilsulfito 3'-[1-[(fenilamino]-carbonil-3,4-tetrazólio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) de sódio) para linhagens tumorais e células normais, respectivamente. Das 27 substâncias identificadas a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, foram isoladas e caracterizadas duas substâncias nitrogenadas, três ácidos fenólicos e sete flavonoides: 3-carboxiamida-1-metilpiridinium (**1**); *N*-(2-aminobutilamil)-*N*-(1-hidroxi-1-isopropil)-*N*-2-oxo-5-amino-5-pentanol (**2**); ácido protocatecuico (**3**); quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo [α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 2")]-[α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")] (**4**); quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo [α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 2")]-[α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")] (**5**); canferol 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo [α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 4")]-[α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")], descrita pela primeira vez nesse trabalho (**6**); canferol 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo [α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 2")]-[α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")] (**7**); rutina (**8**); canferol-3-*O*-rutinosídeo (**9**); ácido cafeico (**10**); ácido *p*-cumárico (**11**) e quercetina (**12**). Na quantificação demonstrou-se os altos conteúdos de flavonoides que apresenta o extrato etanólico (62,5 mg g⁻¹) e a fração fenólica (61,7 mg g⁻¹). As demais estruturas das substâncias identificadas por análises de LC-ESI-MS, correspondem aos isômeros dos flavonoides isolados e outras estruturas ainda não identificadas. O estudo de atividade hipoglicemiante mostrou a potencialidade das folhas de *J. aethiopica*. Tanto os testes antitumorais quanto os de viabilidade celular mostraram a baixa citotoxicidade dessa espécie pelo qual pode-se sugerir que a mesma possa ser utilizada em formulações de tintura. Portanto, os dados desse trabalho podem auxiliar no potencial uso de *J. aethiopica* pela população.

Palavras chaves: *Jatropha aethiopica*; atividade hipoglicemiante; quantificação; flavonoides triglicosídeos; substâncias nitrogenadas.

ABSTRACT

Jatropha aethiopica (Euphorbiaceae) leaves are used in Cuba both as ornamental and medicinal plant. This species is known as "Chaya" or "mata diabetes". People have hypothesized that consumption of the tea made from fresh leaves is capable of not only controlling diabetes but also curing it. The main of this work was to study the chemical composition through the identification, isolation and structural elucidation of the metabolites present in the ethanolic extract of the leaves of *J. aethiopica*, as well as to evaluate the antihyperglycemic activity and cytotoxicity of this extract. Isolation and purification chromatography techniques (Sephadex LH-20, High Performance Liquid Chromatography coupled to the Photodiode Array Detector (HPLC-PAD), Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)), as well as the optimization of these methods, allowed the isolation and chemical characterization of 12 substances using spectroscopic and spectrometric techniques. The secondary metabolites identified by DAD detection at the ethanolic extract and the phenolic fraction, were quantified. The analytical methodology was validated according to ANVISA standards. Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization interface (HPLC-ESI-MS/MS) analysis, was useful in confirming the presence of several isomers of flavonoids and nitrogen compounds, in addition to determinate the probable fragmentation mechanism of these substances. Hypoglycemic activity was determined using a swiss mouse model; nevertheless, cytotoxic activity was determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and XTT ((sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) colorimetric assays for tumor and normal cell lines, respectively. Of the 27 substances identified from the ethanolic extract of the *J. aethiopica* leaves, two nitrogenous substances, three phenolic acids and seven flavonoids were isolated and characterized: 3-carbamoyl-1-methylpyridinium (**1**); 3-amino-4-((5-amino-5-hydroxy-2-oxopentyl) (1-hydroxy-2-methylpropyl) amino) butanamide (**2**); protocatechuic acid (**3**); quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 2")-[α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6")]- β -D-galactopyranoside (**4**); quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 2")-[α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6")]- β -D-glucopyranoside (**5**); kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 4")-[α -L-rhamnopyranosyl-(1" $\rightarrow$ 6")]- β -D-galactopyranoside, descrita pela primeira vez nesse trabalho (**6**); kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl- (1" $\rightarrow$ 2")- [α -L-rhamnopyranosyl- (1" $\rightarrow$ 6")]- β -D-glucopyranoside (**7**); rutin (**8**); kaempferol-3-O-rutinoside (**9**); caffeic acid (**10**); *p*-cumaric acid (**11**) e quercetin (**12**). High content of the quantified flavonoids in the ethanolic extract (62.5 mg g⁻¹) and in the phenolic fraction (61.7 mg g⁻¹) were demonstrated. The remaining structures of the identified substances by the LC-ESI-MS analysis correspond to isomers of the isolated flavonoids and other structures not identified. The hypoglycemic activity study showed the potentiality of *J. aethiopica* leaves. Both antitumor and cell viability tests showed the low cytotoxicity of this species by which suggest it the use in tincture formulations. Therefore, the data of this work can help in the potential use of *J. aethiopica* by the population.

Key words: *Jatropha aethiopica*, hypoglycemic activity; quantification; triglycosilated flavonoids; nitrogens compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPC	<i>Base Peak Chromatogram</i>
^{13}C	Isótopo do carbono
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de diodos
D ₂ O	Água deuterada
DAD	Detetor de arranjo de Diodos
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electrospray)
FCN	Fração de Compostos Nitrogenados
FF	Fração Fenólica
Frç	Fração
^1H	Isótopo do hidrogênio
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography- Electrospray ionization-Mass Spectrometer</i>
LC-ESI-QTOF-MS	<i>Liquid Chromatography- Electrospray ionization-Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer</i>
LP07	Linhagem celular: adenocarcinoma de pulmão murino
MCF-7	Linhagem celular: adenocarcinoma de mama humano
MeOH	Metanol
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Média Pressão)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MTT	Brometo de 3-((4,5-dimetiltiazol)-2, il)-2,5-difeniltetrazólio
<i>m/z</i>	Relação massa carga
^{15}N	Isótopo do nitrogênio
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NCDs	Noncommunicable diseases (doenças não transmissíveis)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
PFGSE	<i>Pulsed field-gradient spin echo</i> (Ecos de spin com gradientes de campo magnético pulsados)
ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoroetileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP18	<i>Reversed Phase octadecylsilan</i> (Fase reversa octadecilsilano)
RPMI	Meio de cultura para o crescimento de células (<i>Roswell Park Memorial</i>)

	<i>Institute medium</i>)
SPE	<i>Solid Fase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
STZ	Estreptozotocina (<i>streptozotocin</i>)
TFA	Ácido Trifluoracético
TOCSY 1D	<i>Total Correlation Spectroscopy 1 Dimension</i>
UNESP-SP	Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – São Paulo
UV	Ultravioleta
XTT	Hidrato de benzenilsulfito 3’-[1-[(fenilamino)-carbonil-3,4-tetrazólio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Espécies de importância económica dentro da família Euphorbiaceae	25
Figura 2.	Espécies do género <i>Jatropha</i> .	31
Figura 3.	Espécie <i>Jatropha aethiopica</i> Muell Arg	35
Figura 4.	Fluxograma de preparo e fracionamento do EE das folhas de <i>J. aethiopica</i>	53
Figura 5.	Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de <i>J. aethiopica</i> , com espectros no UV representativos	55
Figura 6.	Representação dos sistemas benzoil (II) e cinamoil (I) dos flavonoides. Bandas I e II em um espectro no UV de flavonoide glicosilado e outro não glicosilado na posição 3	56
Figura 7.	Fluxograma de isolamento das substâncias nos extrato etanólico das folhas de <i>J. aethiopica</i>	58
Figura 8.	Espectro RMN ^1H de 3	59
Figura 9.	Estrutura do ácido protocatecuico 3	60
Figura 10.	Espectro RMN ^1H de 10	61
Figura 11.	Estrutura do ácido cafeico 10	61
Figura 12.	Espectro RMN ^1H de 11	62
Figura 13.	Estrutura do ácido <i>p</i> -cumárico 11	63
Figura 14.	Espectro RMN ^1H de 4	65
Figura 15.	Mapa de contorno gHSQC de 4	65
Figura 16.	Mapa de contorno gHMBC de 4	66
Figura 17.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_{H} 5,57 de 4	66
Figura 18.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_{H} 5,05 de 4	67
Figura 19.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_{H} 4,38 de 4	67
Figura 20.	Mapa de contorno gHMBC de 4	68
Figura 21.	LC-MS (modo negativo) do extrato de <i>J. aethiopica</i> . Íon extraído m/z 755	69
Figura 22.	Espectros de massas obtidos do pico de m/z 755 substância 4	70
Figura 23.	Espectro ESI-MS/MS (modo negativo) de 4	70
Figura 24.	Diagrama de fragmentação de flavonóis	71
Figura 25.	Estrutura do flavonoide 4	72
Figura 26.	Espectro RMN ^1H de 5	73

Figura 27.	Mapa de contorno <i>g</i> HSQC de 5	74
Figura 28.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 5	74
Figura 29.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,53 de 5	75
Figura 30.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,06 de 5	75
Figura 31.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,33 de 5	76
Figura 32.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 5	77
Figura 33.	Estrutura do flavonoide 5	77
Figura 34.	Espectro RMN 1H de 6	78
Figura 35.	Mapa de contorno <i>g</i> HSQC de 6	79
Figura 36.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6	80
Figura 37.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,55 de 6	81
Figura 38.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,05 de 6	81
Figura 39.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 0,80 de 6	82
Figura 40.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,35 de 6	82
Figura 41.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 6	83
Figura 42.	LC-MS (modo negativo) do extrato de <i>J. aethiopica</i> . Íon extraído <i>m/z</i> 739	84
Figura 43.	ESI-MS/MS (modo negativo) do extrato de <i>J. aethiopica</i> . Íon extraído <i>m/z</i> 739	84
Figura 44.	Diagrama de fragmentação do íon <i>m/z</i> 739 com clivagem homolítica via radical na posição 3- <i>O</i> -Glicosídeo e formação do íon radical $[Y_0-H]^-$	85
Figura 45.	Estrutura do flavonoide 6	85
Figura 46.	Espectro RMN 1H de 7	86
Figura 47.	Mapa de contorno <i>g</i> HSQC de 7	87
Figura 48.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 7	87
Figura 49.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,48 de 7	88
Figura 50.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,04 de 7	88
Figura 51.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 0,78 de 7	89
Figura 52.	Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,31 de 7	89
Figura 53.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 7	90
Figura 54.	Estrutura do flavonoide 7	91
Figura 55.	Espectro RMN 1H de 8	92
Figura 56.	Mapa de contorno <i>g</i> HSQC de 8	92
Figura 57.	Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 8	93

Figura 58.	Estrutura do flavonoide 8	93
Figura 59.	Espectro RMN ^1H de 9	94
Figura 60.	Mapa de contorno gHSQC de 9	95
Figura 61.	Mapa de contorno gHMBC de 9	96
Figura 62.	Estrutura do flavonoide 9	96
Figura 63.	Espectro RMN ^1H de 12	97
Figura 64.	Estrutura do flavonoide 12	97
Figura 65.	Espectro RMN ^1H da fração G-160	102
Figura 66.	Espectro DOSY da fração G-160	103
Figura 67.	Mapa de contorno gHMBC- ^{15}N da mistura G-160	104
Figura 68.	Mapa de contorno gHSQC mistura G-160	104
Figura 69.	Mapa de contorno gHMBC da mistura G-160	105
Figura 70.	Espectro TOCSY 1D da substância 1	106
Figura 71.	Espectro de massas mistura G-160	107
Figura 72.	Espectro de massas MSMS do íon m/z 137	107
Figura 73.	Estrutura da substância 1	107
Figura 74.	Espectro RMN ^1H da substância 2 identificada da mistura de G-160	109
Figura 75.	Mapa de contorno gHMBC- ^{15}N da substância 2 na mistura G-160	109
Figura 76.	Mapa de contorno gHSQC da mistura G-160	110
Figura 77.	Mapa de contorno gHMBC da mistura G-160	111
Figura 78.	Espectro TOCSY 1D da substância 2 , irradiado em δ_{H} 4,24	111
Figura 79.	Espectro TOCSY 1D da substância 2 , irradiado em δ_{H} 3,20	112
Figura 80.	Espectro TOCSY 1D da substância 2 , irradiado em δ_{H} 0,90	112
Figura 81.	Espectro de massas mistura G-160	113
Figura 82.	Espectro de massas MSMS do íon m/z 137	113
Figura 83.	Diagrama do padrão de fragmentação proposto para a substância 2	114
Figura 84.	Estrutura da substância 2	114
Figura 85.	Perfil por LC-ESI-MS do extrato etanólico das folhas de <i>J. aethiopica</i>	116
Figura 86.	Espectros representativos de ESI-MS/MS para distinguir as classes de metabólitos por meio de identificação da aglicona	118
Figura 87.	Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 757 (A – C) com diferente t_{R}	124

Figura 88.	Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 611 (A – B) com diferente t_R	125
Figura 89.	Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 741 (A – B) e m/z 595 (C – D) com diferente t_R	126
Figura 90.	Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 771 (A – B), m/z 625 (C – D) e m/z 479 (E – F) com diferente t_R	127
Figura 91.	Diagrama de fragmentação de flavonoides. Adaptado de VUCKICS; GUTTMAN, 2010	128
Figura 92.	Perfil cromatográfico da fração fenólica (FF) das folhas de <i>J. aethiopica</i>	131
Figura 93.	Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões	132
Figura 94.	Espectros de UV dos padrões comparados com os compostos isolados no laboratório	133
Figura 95.	Efeito do tratamento com EE de <i>J. aethiopica</i> a la concentração de 500 mg kg ⁻¹	138
Figura 96.	Efeito da fração de compostos nitrogenados (FCN) do tratamento de <i>J. aethiopica</i> nas doses de 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	140
Figura 97.	Efeito da fração fenólica (FF) do tratamento de <i>J. aethiopica</i> nas doses de 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹	140
Figura 98.	Efeito das frações de compostos nitrogenados e fenólica do tratamento de <i>J. aethiopica</i> nas doses de 50 e 200 mg kg ⁻¹	141
Figura 99.	Reação de redução do MTT ao formazan	144
Figura 100.	Gráfico comparativo entre os valores de IC ₅₀ para as linhagens tumorais	145
Figura 101.	Reação de redução do XTT ao formazan	146
Figura 102.	Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações (µg mL ⁻¹) de extrato etanólico de <i>Jatropha aethiopica</i>	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Exemplo de metabólitos obtidos de espécies do gênero <i>Jatropha</i>	27
Tabela 2.	Resumo de estudos de atividade hipoglicemiante (IC ₅₀) de algumas espécies de <i>Jatropha</i>	33
Tabela 3.	Colunas RP18 utilizadas no presente trabalho	38
Tabela 4.	Rendimento das frações obtidas da partição líquido-líquido	57
Tabela 5.	Deslocamentos de hidrogênio de compostos 3 (ácido protocatecuico), 10 (ácido cafeico) e 11 (ácido <i>p</i> -cumárico) isolados das folhas de <i>J. aethiopica</i>	63
Tabela 6.	Dados de RMN ¹³ C dos flavonoides isolados 4 , 5 , 6 , 8 , 8 , 9 e 12	99
Tabela 7.	Dados de RMN ¹ H dos flavonoides isolados 4 , 5 , 6 , 8 , 8 , 9 e 12	100
Tabela 8.	Dados da RMN ¹ H e ¹³ C da substância 1 (C _d = 9,04) da fração G160	105
Tabela 9.	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 2 (C _d = 9,10)	110
Tabela 10.	Proposta de identificação dos compostos a partir do extrato etanólico das folhas de <i>J. aethiopica</i> por LC-MS e MS/MS	119
Tabela 11.	Estruturas propostas de flavonoides do extrato etanólico das folhas de <i>J. aethiopica</i> identificadas por CLAE-ESI-HRMS/MS	122
Tabela 12.	Parâmetros das curvas analíticas dos padrões	132
Tabela 13.	Precisão intra-dia e inter-dia para o método de determinação do Ácido protocatecuico (AcP)	134
Tabela 14.	Precisão intra-dia e inter-dia para o método de determinação da rutina (R)	134
Tabela 15.	Exatidão do método para o extrato etanólico (EE) e fração fenólica (FF) das folhas de <i>J. aethiopica</i>	135
Tabela 16.	Teor dos compostos isolados no extrato etanólico (EE) e fração fenólica (FF) das folhas de <i>J. aethiopica</i>	136
Tabela 17.	Efeito do extrato etanólico (EE) de <i>J. aethiopica</i> (500 mg kg ⁻¹ por peso) sobre os níveis de glicose em camundongos normoglicêmicos e diabéticos depois de 14 dias de tratamento	137
Tabela 18.	Efeito do tratamento de extrato bruto de <i>J. aethiopica</i> (500 mg kg ⁻¹ por via oral) em parâmetros de soro após 14 dias de tratamento	139
Tabela 19.	Efeito das frações de compostos nitrogenados (FCN) e fenólica (FF) nos níveis de glicose no sangue (mg dL ⁻¹) após 7 dias de tratamento	141
Tabela 20.	Efeito das frações dos compostos nitrogenados e fenólicas de <i>J. aethiopica</i> em parâmetros séricos após 7 dias de tratamento	142
Tabela 21.	Valores de citotoxicidade para o EE das folhas de <i>J. aethiopica</i>	144

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1. EUPHORBIACEAE	24
1.2 JATROPHA.....	26
1.2.1 Substâncias isoladas do gênero <i>Jatropha</i>	26
1.2.2 Usos	30
1.2.3 Atividade biológica de compostos fenólicos isolados do gênero <i>Jatropha</i>	31
1.3 <i>Jatropha aethiopica</i>	34
2. Objetivos	36
2.1 Objetivo geral:.....	36
2.2 Objetivos específicos:	36
3. PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1 Materiais, Reagentes e Soluções.	37
3.2 Procedimentos gerais instrumentais	37
3.3 Metodologia	40
3.3.1 Etapa Botânica.	40
3.3.2 Preparação dos extratos.....	40
3.3.3 Etapa Química.....	41
3.3.3. Etapa cromatográfica.....	42
3.3.4 Etapa de avaliação da atividade biológica	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1. Etapa química.....	54
4.1.1 Obtenção dos extratos das folhas de espécies de <i>Jatropha aethiopica</i> por percolação.	54
4.1.2 Perfil cromatográfico.	54
4.1.3 Fracionamento em Sephadex® LH-20 e CLME.	57
4.2 Elucidação estrutural dos compostos isolados do extrato etanólico das folhas de <i>J. aethiopica</i>	58
4.2.1 Identificação dos ácidos fenólicos	59
4.3 Análises por LC–ESI–MS.	115
4.4 Quantificação no extrato etanólico (EE) e na fração fenólica (FF) das substâncias isoladas.	130
4.4.1 Linearidade e sensibilidade.	131
4.3.2 Seletividade.	133
4.3.3 Precisão.....	134
4.3.4 Exatidão.....	135
4.3.5 Quantificação dos compostos isolados.....	135
4.4 Atividades biológicas.	136
4.4.1 Efeito hipoglicêmico e anti-hiperglicêmico do tratamento com <i>J. aethiopica</i>	136
4.4.2 Determinação da citotoxicidade.....	143
4.4.3 Determinação da citotoxicidade em células normais.	146
5. CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS	150

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as pessoas procuravam drogas na natureza em busca de amenizar as doenças. O início do uso das plantas medicinais foi instintivo, como é o caso dos animais (HALBERSTEIN, 2005). De fato, a demanda por fontes naturais aumentou de 8% a 15% ao ano na Europa, América do Norte e Ásia nos últimos vinte anos (VERMA; SINGH, 2008). No entanto, pesquisadores pertencentes a diversas áreas do conhecimento como química, biologia e farmacologia, têm direcionado esforços para reunir informações e validar o conhecimento desta medicina tradicional (FABREGA Jr., 2012).

Pesquisadores de diferentes países têm reunido informações sobre a composição química de espécies vegetais, assim como sobre seu uso com interesse farmacológico e medicinal (INTA et al., 2013; PRABHU et al., 2014). Portanto, é importante que exista um interesse em pesquisas com espécies vegetais para o conhecimento de sua composição química e seu potencial farmacológico.

1.1. EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae (também conhecida como família Spurge), possui mais de 300 gêneros e cerca de 7.500 espécies segundo vários autores (GOVAERTS; FRODIN; RADCLIFFE-SMITH, 2000; WEBSTER, 1994). Essa família está dividida em cinco subfamílias devido, principalmente a critérios morfológicos (WEBSTER, 1994). Várias plantas da família Spurge são de considerável importância econômica. Entre as plantas proeminentes estão a mandioca (*Manihot esculenta*), uma das principais fontes de amido na alimentação humana; a mamona (*Ricinus communis*) e o pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) devido ao seu potencial para extração de óleo. Por outro lado, *Hevea brasiliensis* conhecida como borracha do Pará ou seringueira, é a principal fonte de borracha natural, além de plantas ornamentais, como a poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (WEBSTER, 1994) (Figura 1, Pagina 25). No entanto, a espécie *Croton antisiphiliticus* (pé-de-perdiz) utilizado pelas suas propriedades medicinais no tratamento de eczemas, depurativo do sangue, úlceras e anti-sífilis (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Figura 1 – Espécies de importância económica dentro da família Euphorbiaceae

Manihot esculenta
(Mandioca)



Euphorbia pulcherrima
(Poinsétia)



Hevea brasiliensis
(Seringueira)



Ricinus communis
(Mamona)



Croton antisiphiliticus
(pé-de-perdiz)



Euphorbiaceae apresenta-se como uma família com grande potencialidade medicinais devido as suas propriedades biológicas, assim como uma fonte importante de metabólitos pelo que podem contribuir para a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas.

Na medicina algumas espécies de Euphorbiaceae são utilizadas pelas suas propriedades antissépticas e citotóxicas, (RAHMAN; AKTER, 2013). Estudos já publicados relatam vários grupos de substâncias isoladas a partir de espécies da família Euphorbiaceae. Entre elas podemos mencionar alcaloides, terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos), flavonoides, lignanas, cumarinas, cumarinas-lignoides, outros compostos fenólicos, entre outros (AMINAH; KRISTANTI; TANJUNG, 2014; SABANDAR et al., 2013).

1.2 JATROPHA.

O gênero *Jatropha* é constituído por cerca de 170 espécies e pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Jatrophaeae (SUJATHA; BAHADUR; REDDY, 2013; BAHADUR; PULLAIAH; MURTHY, 2013). Por ser um gênero de crescimento rápido, fácil propagação e adaptação, apresenta uma vasta distribuição (DEHGAN, 1982). O gênero abrange espécies africanas, indianas, sulamericanas, antilhanas e das regiões meso- americanas. Algumas espécies de *Jatropha* foram naturalizadas na América do Sul e nas regiões meso-americanas, México, Cuba, Peru, Bolívia, Costa Rica, Paraguai, Jamaica, Brasil, El- Salvador, Guatemala, Argentina, Republica Dominicana, Colombia, Nicarágua e nos estados americanos de Arizona e Texas. (SABANDAR et al., 2013; HELLER, 1996). A distribuição dessas plantas encontra-se majoritariamente nas Américas (Central e Sul), de onde a maior parte é nativa.

Devido a esta distribuição, é um gênero morfológicamente diverso, composto por plantas herbáceas perenes, suculentas, facultativas anuais, geófitas, arbustos, subarbustos rizomatosos e árvores lenhosas, cada uma com uma região geográfica específica para o seu desenvolvimento (SUJATHA; BAHADUR; REDDY, 2013; SABANDAR et al., 2013; DEHGAN, 1982). Esta diversidade morfológica permitiu que várias espécies fossem cultivadas como plantas ornamentais devido a beleza das flores e folhas (SUJATHA; BAHADUR; REDDY, 2013).

1.2.1 Substâncias isoladas do gênero *Jatropha*.

Vários produtos naturais bioativos foram descritos a partir de extratos de espécies de *Jatropha*, e estes são recursos promissores para o desenvolvimento de fármacos potenciais e outros produtos. Nesta revisão resumimos o progresso fitoquímico e listamos alguns compostos isolados do gênero *Jatropha* (Tabela 1, Pagina 27).

Como observado, a diversidade de metabólitos do gênero *Jatropha* compreende substâncias fenólicas, terpenos, compostos nitrogenados, entre outros. Essa característica faz de *Jatropha* um gênero com espécies de alto valor na medicina tradicional e, portanto, justificando seu estudo químico e biológico (SABANDAR et al., 2013).

Tabela 1 – Exemplo de metabólitos obtidos de espécies do gênero *Jatropha*.

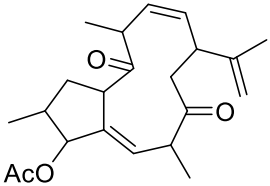
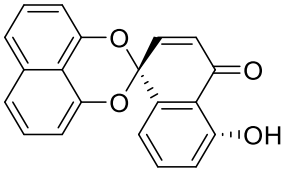
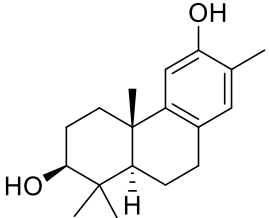
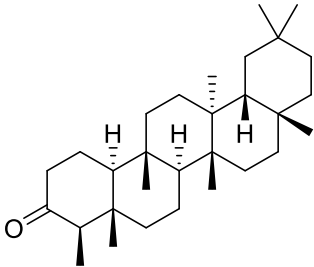
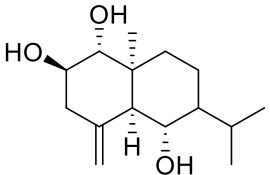
N.	Nome comum	Nome IUPAC	Estrutura	Espécie/PP	Referência
1	Integerrimene	Acetato de 1,2,3,3a,4,5,8,9,10,11-deca-hidrociclopenta-anulen-1-il-(6Z, 12E) -2,5,11-trimetil-4,10-dioxo-8- (prop-1-en-2-il)		<i>J. integerrima</i> Caule	RAVINDRANATH et al., 2004a
2	Palmarumicina CP1	5-hidroxi-4H-espiro [naftaleno-1,2'-nafto [1,8-de] [1,3] dioxina] -4-ona		<i>J. integerrima</i> Caule	RAVINDRANATH et al., 2004a
3	3β,12-diidroxi-13-metilpodocarpano-8,10,13-trieno	(2S, 4aS, 10aR) -1,1,4a,7-tetrametil-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-octa-hidrofenantreno-2,6-diol		<i>J. curcas</i> Partes aéreas	RAVINDRANATH et al., 2004b
4	Friedelina	(4R, 4aS, 6aS, 6bR, 8aR, 12aR, 12bS, 14aS, 14bS) -4,4a, 6b, 8a, 11,11,12b, 14a-octametilicosa-hidropiceno-3 (2H) -ona		<i>J. curcas</i> Partes aéreas	RAVINDRANATH et al., 2004b
5	-	(1R, 2R, 5S, 6S, 7S, 10S) -5-Epieudesm-4 (15) -eno-1R, 2α, 6R-triol		<i>J. neupauciflora</i> Casca	GARCIA et al., 2006

Tabela 1 – Continuação...

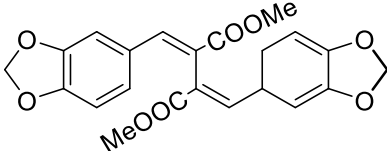
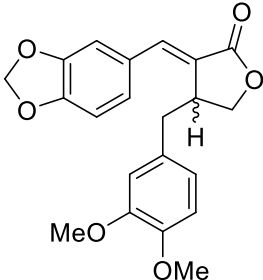
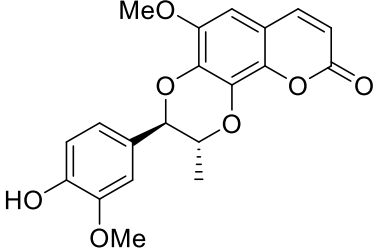
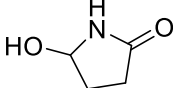
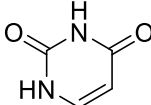
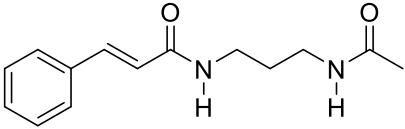
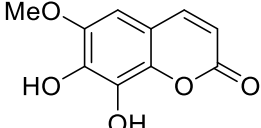
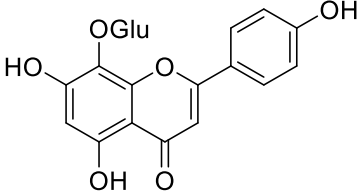
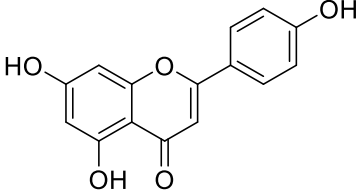
N.	Nome comum	Nome IUPAC	Estrutura	Espécie/PP	Referência
6	Gossipidieno	Succinato de dimetil (2E, 3E) -2- (benzo-[1,3]-dioxol-5- ilmetileno) -3 - ((5,6-di-hidrobenzo-[1,3]-dioxol-5-il) metileno)		<i>J. gossypifolia</i> Caule	DAS et al., 1999.
7	Jatrofan	(E) -3- (benzo-[1,3]-dioxol-5-ilmetileno) -4- (3,4-dimetoxibenzil)-di-hidrofuran-2 (3H) -ona		<i>J. gossypifolia</i> Caule, raízes e sementes	BANERJI et al., 1984
8	Propacina	(2R, 3R) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -5-metoxi-2-metil-2,3- di-hidro-9H- [1,4] dioxino [2,3] cromen-9 -ona		<i>J. gossypifolia</i> Planta inteira	DAS et al., 2001
9	5-hidroxipirrolidin-2-ona	5-hidroxipirrolidin-2-ona		<i>J curcas</i> Folhas	STAUBMANN et al., 1999
10	Pirimidina-2,4-diona	Pirimidina-2,4-(1H, 3H)-diona		<i>J. curcas</i> Folhas	STAUBMANN et al., 1999

Tabela 1 – Continuação...

N.	Nome comum	Nome IUPAC	Estrutura	Espécie/PP	Referência
11	Curcumida	<i>N</i> -(3-acetamidopropil)-cinamamida		<i>J. curcas</i> Semente	YAO et al., 2012
12	Fraxetina (7,8-di-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona)	7,8-di-hidroxi-6-metoxi-2H-cromen-2-ona		<i>J. glandulífera</i> Raízes	PARTHASARATHY et al., 1984
13	Vitexina	Ácido (S)-4-(((5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4-oxo-4H-cromen-8-il)-oxi)-amino)-5-oxopentanóico		<i>J. gossypifolia</i> Folhas	SANKARA et al., 1971
14	Apigenina	5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona		<i>J. gossypifolia</i> Folhas	SANKARA et al., 1971

PP: Parte da Planta

1.2.2 Usos

O gênero *Jatropha* destacou-se nas últimas décadas, particularmente, pelo óleo proveniente das suas sementes, que é considerado uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel (da SILVA et al., 2014). A espécie *J. curcas* é a mais estudada do gênero pelas suas sementes serem ricas em óleo, o que levou nos últimos 20 anos ao aparecimento de vastas áreas de plantações dessa espécie em alguns países da Ásia, África e América do Sul (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; de OLIVEIRA et al., 2009). Após a extração do óleo da semente, a torta restante é usada na desintoxicação e alimentação do gado (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; DEVAPPA; SWAMYLINGAPPA, 2008).

O nome *Jatropha* é derivado das palavras gregas "*jatros*" (médico) e "*trophe*" (nutrição), o que justifica seu uso medicinal e na alimentação (KUMAR; SHARMA, 2008). Alguns de seus nomes populares são: óleo de noz selvagem, *jatropha*, pinhão, crioulo. (Fonte: Centro Mundial Agroflorestal [base de dados Agroforestree], <http://tinyurl.com/yfvod37>).

Este gênero é utilizado como planta medicinal por mais de 80% da população mundial, onde destacamos a Ásia, América Latina e a África (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010; SABANDAR et al., 2013). Três espécies podem ser destacadas por serem as mais utilizadas como medicinais: *J. gossypifolia*, *J. multifida* e *J. curcas*. (SABANDAR et al., 2013) (Figura 2, Pagina 31).

Este gênero é conhecido pelo efeito purgativo do óleo proveniente das suas sementes as quais são usadas para sintomas digestivos, diarreia, disenteria, vômitos, náusea e dor de estômago. Quanto às folhas de algumas das espécies, também apresentam semelhante efeito purgativo. Por outra parte, o óleo da semente, o látex, as folhas, a casca do caule ou da raiz trituradas, são aplicadas sobre a pele para tratar eczemas, coceiras, furúnculos, bolhas na boca, feridas e inchaços, assim como são igualmente aplicadas no tratamento de doenças venéreas e de trato urinário (DEVAPPA, MAKKAR e BECKER, 2010). As raízes das espécies *J. gossypifolia* é usada no tratamento de lepra (FÉLIX-SILVA, 2014).

Figura 2 – Espécies do gênero *Jatropha*.



J. gossypifolia



J. multifida



J. curcas

Fotos: Fornecidas pelo autor

O látex das espécies *J. curcas* e *J. mollissima* é usado como antídoto do veneno de cobra, concentrado para o uso externo e diluído com água para uso interno (SABANDAR, et al., 2013; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2010). Os extratos aquosos e alcoólicos do caule e da casca da espécie *J. macarantha* são usados como estimulante sexual masculino. (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2011)

1.2.3 Atividade biológica de compostos fenólicos isolados do gênero *Jatropha*.

A maioria das atividades biológicas relacionadas ao gênero *Jatropha* na literatura, são atribuídas aos compostos fenólicos, incluindo flavonóis, dos quais uma grande variedade está presentes nessas espécies. Estas propriedades incluem efeitos anticoagulante (FÉLIX-SILVA et al., 2014), anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2010), antimalárico (JANSEN et al., 2010), antimicrobiano (DHALE; BIRARI, 2010; GAIKWAD et al., 2012), cicatrizações de feridas cutâneas (SANTOS et al., 2006), citotóxica (MATOS, 2004; NAZEEMA; GIRIJA, 2013), antitumoral (MATOS, 2004; MARIZ et al., 2010; DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2011; NAZEEMA; GIRIJA, 2013; SABANDAR et

al., 2013), antioxidante (NAZEEMA; GIRIJA, 2013), antiviral (MARIZ et al., 2010), antiúlcera (SABANDAR et al., 2013), entre outras.

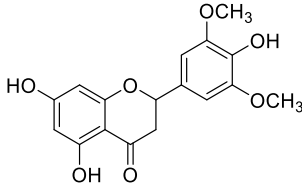
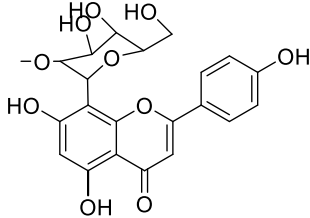
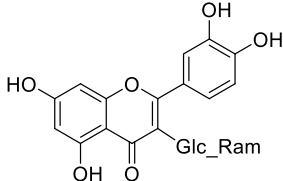
Os flavonoides têm sido avaliados pelas suas propriedades citotóxicas. Devido as características estruturais, as flavonas e pterocarpanos apresentam valores de CIM_{50} que podem ser reconhecidos pelo Instituto Nacional do Câncer, que requer um valor CIM_{50} menor que 30 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos brutos ativos contra células cancerígenas (OSKOUETIAN et al., 2011; BOIK, 2001). Portanto, uma vez que um extrato apresente um valor de CIM_{50} inferior ou igual à exigida pelo Instituto Nacional do Câncer, este pode ser considerado uma fonte promissora de substâncias bioativas que podem, na sequência, serem purificadas para o desenvolvimento de drogas anticâncer, (OSKOUETIAN et al., 2011).

Segundo SONODA et al., (2004), flavonas hidroxiladas nas posições 2', 3', 5 e 7 nos anéis A e B, apresentam maior atividade citotóxica quando testada frente a células leucêmicas ($CIM_{50}=9,5 \mu\text{m}$), seguido de outras substâncias que não possuem substituintes na posição 3 do anel C (Tabela 2, Pagina 33). Por outro lado, SAK; KASEMAA; EVERAUS (2016), mostraram a atividade citotóxica da luteolina contra melanoma com $CIM_{50}=10 \text{ mg mL}^{-1}$. Com esses valores de CIM_{50} as substâncias podem ser avaliadas como muito ativas e portanto, estabelecem um padrão de comparação com os metabolitos isolados da espécie em estudo.

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia/hipoglicemia crônica causada por defeitos na ação da insulina e/ou a secreção dela, que afeta o metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos (BAVILONI et al., 2010). Além disso, DM é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das quatro principais doenças não transmissíveis (NCDs) e que afetam a muitas pessoas (WHO, 2016).

Diabetes Mellitus Tipo 1 é caracterizado pela deficiência absoluta de produção de insulina e representa 5-10 % de todos os casos de diabetes e resulta de uma destruição auto-imune de células β pancreáticas. No Diabetes Mellitus tipo 2, que representa 90 a 95% dos casos de diabetes, a resistência à insulina e a falência progressiva das células β (diminui a massa celular β , a sensibilidade à glicose e a capacidade secretória) são características e vários fármacos são usados para aumentar a sensibilidade à insulina configurações (WHO, 2016).

Tabela 2 – Resumo de estudos de atividade hipoglicemiante (IC_{50}) de algumas espécies de *Jatropha*.

Espécie (Ref)	Extrato (parte da planta) /Substância testada	IC_{50} (mg mL ⁻¹)	Estrutura isolada
<i>J. curcas</i> (KUMAR et al., 2016)	Hidroalcoólico (folhas)	400	-
<i>J. gossypifolia</i> * (SALEEM et al., 2016)	Metanol (raízes)	<400	-
	Metanol (folhas)	<400	-
	Diclorometano (folhas)	392,41± 0,68	-
	Acetato de etila (folhas)	213,45± 0,12	-
	<i>n</i> -butanol (folhas)	218,47± 0,23	-
<i>J. gossypifolia</i> ** (GRANADOS et al., 2015)	Metanol (folhas)	135	-
	Etil éter (folhas)	57	-
	Acetato de etila (folhas)	>200	
	Vitexina	>200	
<i>J. curcas</i> *** (EL-BAZ et al., 2014)	Metanol (folhas)	-	

 α -glicosidase

** absorção de glicose em miotubos resistentes à insulina

***mecanismo não determinado

A diabetes aumenta 2-3 vezes o risco de ataque cardíaco e derrame cerebral (SARWAR et al., 2010). Suas opções de tratamento incluem a aplicação de insulina exógena ou combinando-a com outras drogas como metformina, glibenclamida e inibidores de alfa-glucosidase (acarbose e miglitol), que agem diminuindo a glicemia no jejum através de muitas vias. No entanto, o uso prolongado desses medicamentos é

susceptível de produzir efeitos colaterais adversos e também pode levar a um declínio na sua eficácia (SARWAR et al., 2010).

A Tabela 2 (Pagina 33) apresenta estudos de extratos de diferentes polaridades, de várias partes de espécies de *Jatropha*, e a avaliação do potencial hipoglicemiante desses extratos. Como observado, extratos de várias polaridades tem sido avaliados pelas suas propriedades hipoglicemiantes, porém, poucos compostos foram testados. Por outro lado, a natureza das substâncias identificadas em extratos ativos é majoritariamente flavonóis.

Existem várias drogas utilizadas para induzir o diabetes no modelo de estudo estabelecido. Nesse caso, a estreptozotocina (STZ), uma glicosamina-nitrosureia, é comumente usada para produzir o diabetes. A STZ é um potente agente alquilante de DNA, altamente tóxico, carcinogênico e diabetogênico, devido à destruição seletiva das células beta produtoras de insulina provocando assim o diabetes (MARINI, 2014; SILVA, 2011).

1.3 *Jatropha aethiopica*.

Jatropha aethiopica Müell-Arg (Euphorbiaceae) foi introduzido em Cuba, de local e data não conhecidos (FUENTES-FIALLO et al., 2001). É uma árvore de até 4 m de altura e sua base possui mais do que 20 cm de diâmetro. A árvore tem também muitos ramos e produz uma seiva leitosa (ROIG Y MESA, 1974). Apesar da floração abundante que caracteriza a espécie, poucos frutos são produzidos, quase escassos (FUENTES-FIALLO et al., 2001) (Figura 3). A espécie *J. aethiopica* é usada em Cuba como planta ornamental e medicinal e em várias cidades é conhecida como "Chaya" ou "mata diabetes". As pessoas garantem que o chá feito das folhas não só controla o diabetes, mas também cura (ROIG Y MESA, 1974). Embora, as folhas de *J. aethiopica* sejam usadas na medicina popular, não há evidência experimental, provando suas propriedades hipoglicemiantes (ROIG Y MESA, 1974) e sua composição química ainda não foi definida.

Considerando todos estes dados apresentados e a grande importância da validação do uso de plantas usadas na medicina tradicional, o estudo da espécie *Jatropha aethiopica* contribuirá com o enriquecimento do gênero *Jatropha*, assim como da família Euphorbiaceae, visto que esta espécie ainda não possui estudos químicos e biológicos

citados na literatura até o momento.

Figura 3 – Espécie *Jatropha aethiopica* Muell Arg.

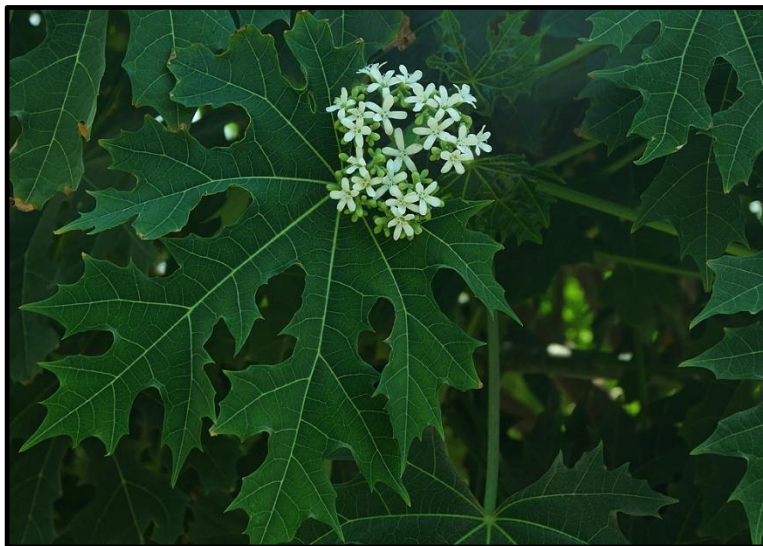


Foto: Fornecida pelo autor

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Identificar, isolar e elucidar estruturalmente os metabólitos presentes no extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*, assim como avaliar a atividade antihipoglicemiante e a citotoxicidade desse extrato.

2.2 Objetivos específicos:

- Realizar o perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*;
- Fracionar o extrato etanólico por técnicas cromatográficas convencionais até o isolamento dos metabólitos secundários;
- Elucidar ou determinar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas e espectroscópicas (RMN *mono* e *bidimensionais*, EM, UV);
- Identificar metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* por LC-ESI-QTOF-MS/MS;
- Quantificar os metabolitos isolados a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*;
- Realizar o ensaio de atividade hipoglicemiante de frações enriquecidas de compostos nitrogenados e fenólicos, assim como do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*;
- Realizar o ensaio antitumoral do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*;
- Realizar o ensaio de viabilidade de células normais com o extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, Reagentes e Soluções.

Os procedimentos experimentais foram realizados utilizando solventes grau PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, metanol, *n*-propanol (Synthlab); para as análises em CLAE foram utilizados solventes grau CLAE: metanol (Tedia) e água Milli-Q (Millipore®); para as análises em espectrômetro de massas foram utilizados solventes grau LC/MS: metanol, água e ácido fórmico (Merck) e para a análise em RMN das substâncias isoladas nos procedimentos cromatográficos foi utilizado solvente deuterado: DMSO- d₆ (Aldrich).

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de adsorvente de fase reversa à base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg mL⁻¹ (33 µm, Supelco®) foram usados na etapa de preparo das amostra dos extratos e frações, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*®, Millipore®) com poro de 0,45 ou 0,22 µm antes de análise por CLAE.

Foram utilizadas placas de camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (Merck®) (20 x 20 cm x 0,2 mm) na triagem fitoquímica das frações. A eluição foi realizada em cuba saturada com as fases móveis *n*-BuOH/CH₃COOH/H₂O (80:18:2, v/v/v), CHCl₃/MeOH/H₂O (65:25:10, v/v/v, fase orgânica) ou CHCl₃/MeOH/H₂O (43:37:20, v/v/v, fase orgânica). A revelação das placas foi feita com luz UV (Câmara com luz UV 254 nm - Chromatovue®) e anisaldeído/H₂SO₄, nesta ordem.

3.2 Procedimentos gerais instrumentais

Os extratos e frações foram concentrados em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

As balanças analíticas Bioprecisa® FA2104N (capacidade 200 g e precisão de 0,1 mg) e Shimadzu® modelo AY-220 (capacidade para 220 g e precisão de 0,0001 mg) foram usadas na pesagem das folhas, dos extratos e frações, respectivamente.

O fracionamento por cromatografia de permeação em gel foi realizado em colunas de vidro com 80 cm de altura por 2 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba

peristáltica (Pharmacia) a uma vazão de 3,0 mL min⁻¹. As frações foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2018 (Jasco®) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®). No entanto, as separações foram realizadas em um cromatógrafo líquido semi-preparativo de gradiente binário (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco®). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o *software ChromNAV* (Cromatec®). As colunas utilizadas tanto no modo analítico quanto no semi-preparativo, estão sendo reportadas na Tabela 3.

Testes foram feitos por CLAE com detector de índice de refração (IR) modelo Knauer–Azura, com detector smartline 2300, com duas bombas modelos Pump 1 ASM 2.1L Knauer (10 mL/min) e Pump 2P 6.1 L Knauer (50 mL/min), foi utilizado no modo analítico utilizando as colunas da Tabela 3.

Tabela 3 – Colunas RP18 utilizadas no presente trabalho.

	Modelo	Características	Modo
1	Thermo Hypersil Gold	250 x 4,6 mm x 5 µm	Analítico
2	Luna Phenomenex®	250 x 4,6 mm x 5 µm	Analítico
3	Luna Phenomenex®	250 x 10 mm x 5 µm	Semipreparativo
4	Synergi Hydro RP	250 x 4,6 mm x 5 µm	Analítico
5	Synergi Hydro RP	250 x 10 mm x 5 µm	Semipreparativo
6	HILIC Phenomenex®	250 x 4,6 mm x 5 µm	Analítico

Em todas as condições foram usadas coluna guarda (4 x 3 mm)

A cromatografia líquida de media pressão (CLMP) foi realizada em um sistema Buchi®, equipado com uma bomba Gerente C-615.

Os experimentos de RMN mono e bidimensionais de ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC, TOCSY e HMBC-¹⁵N, foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla), usando uma sonda criogênica 5 mm, detecção inversa de três canais (¹H, ¹³C, ¹⁵N), um gradiente z, além de ajuste (do inglês: tuning) automático e correspondência (ATM) dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆ (Aldrich) ou água deuterada (D₂O (Aldrich)). O software *Top Spin* versão 3.5 foi utilizado durante aquisição dos deslocamentos químicos de cada espectro, assim como na interpretação dos dados.

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados no laboratório de “Bioprospecção de Produtos Naturais” do Campus Litoral Paulista (UNESP-SP), coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas e participação do Dr. Marcelo Tangerina. A análise das amostras foi realizada por injeção direta em um analisador Ion Trap (sigla em inglês IT) Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Thermo, San Jose, CA, EUA) (FIA-ESI-IT-MS). Utilizou-se tubo capilar de sílica fundida a 280°C, voltagem de pulverização de 5,00 kV, voltagem do capilar de -35 V, voltagem da lente de -100 V e uma vazão de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. As amostras foram analisadas no modo negativo com varredura completa registrada na faixa m/z de 100-2000.

As fragmentações em múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) com hélio para ativação dos íons. O primeiro evento foi um espectro de massas de varredura completa para monitoramento da intensidade de todos os íons produzidos nessa faixa m/z . Os experimentos de fragmentação MSⁿ para as substâncias de interesse foram realizados utilizando uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons produto foram então submetidos a sucessivas fragmentações nas mesmas condições, até que não foram observados mais fragmentos.

A análise por UPLC-ESI-IT-MS foi realizada num equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência Thermo Scientific®, consistindo num injetor automático (Accela AS), uma bomba quaternária (Accela 600) acoplada a um espectrômetro de massas LTQ XL descrito acima, operando nas mesmas condições. As separações cromatográficas foram realizadas numa coluna RP-C18 ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm de diâmetro, 1,7 mm à temperatura ambiente. As fases móveis consistiram no eluente A (0,1% de ácido fórmico em água, v/v) e no eluente B (0,1% de ácido fórmico em metanol, v/v). O volume de injeção utilizado para cada amostra foi de 10 μL e a vazão de 0,350 mL min^{-1} com um programa de gradiente linear: 5-100% B de 0 a 8,0 min. Depois de manter 100% de B durante 5 min, a coluna foi recondicionada à condição inicial para as análises realizadas em sequência.

Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo e processados no *software* Xcalibur (versão 2.0). Para a identificação e proposta das substâncias encontradas, foi utilizado uma biblioteca de metabólitos e uma base de dados de referência online (METLIN, KNApSAcK Core System e SciFinder®).

Os experimentos de LC/MS no modo positivo foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e

Sintéticos e da Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas na USP de Riberão Preto e com a participação do Dr. Alan Pilon. Os espectros foram obtidos num espectrômetro de massas modelo Bruker Maxis Impact e configuração ESI-QqTOF-MS. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna kinetex 2.6 um XB-C18 100 Angstroms (100 x 2.1 mm) a uma vazão de 0.4 mL min⁻¹. A condição inicial: 5% de B (ACN + 0.1% ácido fórmico), temperatura de coluna: 40°C. Como condição de eluição usou-se 5% B a 35% B (23 min), 35% a 100% B (40 min), manteve-se em 100% B (48 min), 100% B a 5% B (50 min), manteve-se em 5% B até 60 min Solvente A: água + 0.1% ácido fórmico. Os parâmetros do massas: End Plate: 500V Voltagem do capilar: 4500V Nebulizador: 4.5. Bar Dry gas: 9.0 L min⁻¹ e temperatura: 200°C, Configurado em modo Auto-MS/MS.

Os espectros de massas adquiridos no modo positivo foram processados no *software* DataAnalysis 4.1. Para a identificação e proposta das substâncias encontradas, foi utilizado uma biblioteca de metabólitos e uma base de dados de referência online (METLIN, KNApSACK Core System e SciFinder[®]).

3.3 Metodologia

3.3.1 Etapa Botânica.

As folhas de *J. aethiopica* Muell-Arg. foram obtidas de alguns espécimes adultos no município de Boyeros, em Havana - Cuba, de agosto a setembro de 2014. Os espécimes foram autenticados pelo Dr. Victor Fuentes-Fiallo, pesquisador titular da Estação Experimental de Plantas Medicinais "Dr. Juan T. Roig ", Cuba. Uma exsicata (INIFAT # 1165) foi depositada no Herbário do Instituto de Pesquisas Fundamentais em Agricultura Tropical (INIFAT), em Havana.

3.3.2 Preparação dos extratos

a) Secagem

O material botânico coletado e identificado foi seco em estufa em ar circulante a 40°C.

b) Moagem

O material botânico foi finamente dividido em moinho de facas com rotor vertical MAO 90 CF a fim de se facilitar a extração de seus constituintes químicos na etapa seguinte.

3.3.3 Etapa Química

3.3.3.1 Extração

O pó obtido na moagem foi extraído com etanol por meio da percolação exaustiva. Uma quantidade do pó (800,0 g) foi intumescida em 1,5 L do solvente extrator (etanol) durante 2 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura pó e etanol e o efluente foram coletados na vazão de $1,0\text{--}2,0\text{ mL min}^{-1}\text{ Kg}^{-1}$.

Foi padronizado o procedimento operacional da percolação para a etapa de obtenção de extratos mantendo-se constante a razão droga vegetal: solvente extrator (1:5 m/v). Após a extração, o solvente extrator foi rotoevaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40°C. O extrato etanólico (**EE**) foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente. A massa de **EE** obtido foi 80,0 g (10%).

3.3.3.2 Extração líquido-líquido

O extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Para isso, foram solubilizados 40,0 g do EE das folhas em 150 mL de etanol e depois foi adicionado 1850 mL de água para uma relação final de 1:50 (m/v). Na sequência, a solução aquosa foi particionada como *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol. Cada processo foi repetido por três vezes (600 mL x 3), a fim de esgotar os compostos solúveis nesses solventes. As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida a 35°C, transferidas para vidros tarados e deixadas em capela até completa eliminação dos solventes.

3.3.3. Etapa cromatográfica

3.3.3.1 otimização do perfil cromatográfico do extrato etanólico (EE) das folhas de *J. aethiopica* por CLAE-DAD

O EE foi passado pelo cartucho de SPE (ver seção 3.1), posteriormente foi seco e redissolvido numa concentração de 5 mg mL⁻¹ na mistura MeOH:H₂O (9:1) para injeção no CLAE.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (descrito na seção 3.2) no modo analítico, onde foram usadas várias colunas segundo a Tabela 3 (Pagina 38). O volume de injeção foi de 10 µL, a vazão utilizada de 1 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno ajustada para 25°C. A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e metanol ou acetonitrila (eluente B), acidificados com 0,1% de TFA em todos os casos, sendo que as otimizações cromatográficas decorreram de acordo com a resolução dos picos cromatográficos, sendo necessárias modificações na proporção da fase móvel e no tempo de análise.

3.3.3.2 Fracionamento em Sephadex LH-20 do extrato de acetato de etila das folhas de *J. aethiopica*

A fração acetato de etila (3,0 g) foi solubilizada em metanol (10,0 mL), utilizando ultrassom por 10 minutos e centrifugado por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e passado por coluna de Sephadex LH-20 (85 x 2,5 cm, H x d.i.) com bomba peristáltica e coletor automático, utilizando metanol como eluente.

As frações com aproximadamente 3 mL foram recolhidas em coletor automático Redifrac (Pharmacia). Foram obtidas 186 frações, as quais foram eluídas em clorofórmio:metanol:água, (65:25:15, v/v/v) e (43:37:20, v/v/v) e reveladas sob luz UV. Estas frações foram reunidas por CCD, de acordo com a coloração e o R_f, resultando em 18 frações. Da fração 17 (F₁₇) foi isolada a substância **12** (6 mg).

3.3.3.3 Separações em CLMP

Na sequência, submeteu-se o extrato etanólico (20 g) a CLMP equipado com coluna de modo reverso C18 (90 g), para se obter duas frações: uma fração de compostos nitrogenados (**Frç-01 - FCN**) e outra de fenólicos (**Frç-02 - FF**). Para evitar um prejudicial alargamento da banda extra-coluna, devido ao volume de injeção, foi preparada uma difusão em fase sólida da amostra. Portanto, no fracionamento foram pesados cada vez 1,5 g do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* para 4,5 g de areia de quartzo branco (50-70 mesh, SIGMA-ALDRICH).

3.3.3.4 Separações em CLAE-DAD semi-preparativo

A fração F₉ (190 mg), obtida do fraçãoamento em sephadex LH – 20, foi submetida a um procedimento de purificação por CLAE- DAD (semi-preparativo, gradiente). A amostra foi solubilizada em 3,8 mL de fase móvel (MeOH/H₂O, 9:1, v/v) e filtrada em membranas de PTFE (politetraflouroetileno, teflon®, Millipore®) com poro de 0,45 µm. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de modo reverso RP18 (Tabela 3, Pagina 38). O volume injetado foi de 400 µL, e a vazão de 13,0 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada consistiu de água 67 % (eluente A) e metanol 33 % (eluente B) contendo 0,1 % de TFA. O método de eluição foi o gradiente com uma rampa de eluição de 25 min, variando a proporção de MeOH de 33 a 50 %. Este procedimento de separação forneceu cinco picos denominadas **3** (5 mg), **8** (59 mg), **9** (6 mg), **10** (6 mg) e **11** (4 mg). As substâncias foram identificadas segundo dados dos experimentos de RMN mono e bidimensionais e com coinjeção de padrões autênticos existentes em nosso laboratório.

A fração dos compostos nitrogenados (**Frç-01 FCN**) (145 mg) obtida do fraçãoamento por CLMP, foi sujeita a CLAE-DAD semi-preparativo utilizando a coluna 5 (Tabela 3, Pagina 37) no modo isocrático 10% de metanol (%B) em 10 min. No entanto, para fração fenólica (**Frç-02 FF**) (160 mg) foi utilizado um gradiente 5-13% em 10 min seguido de gradiente de 13-65% de metanol (%B) em 20 min. Deste procedimento foi possível obter as substâncias **1+2** (4,1 mg) a partir de **FCN** e **4+5** (2,9 mg) e **6+7** (2 mg) de **FF**, respectivamente.

3.3.3.5 Etapa de quantificação no extrato etanólico e fração fenólica das substâncias isoladas

A quantificação de alguns das substâncias isoladas de *J. aethiopica* foi realizada por CLAE-DAD utilizando um padrão de calibração externo (RIBANI et al., 2004; ROBARDS, 2003). Os flavonoides glicosilados identificados no extrato etanólico (**EE**) e na fração fenólica (**FF**) das folhas de *J. aethiopica*, assim como o ácido protocatecuico identificado no **EE**, foram quantificados.

As curvas foram construídas utilizando padrões de ácido protocatecuico, quercetina e canferol (Sigma). Soluções estoque de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões foram preparadas realizada a diluição seriada de $250 - 3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 - 7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata e as medições foram monitoradas a 254 nm. As áreas médias dos picos cromatográficos obtidos foram interpoladas em função da concentração utilizando regressão linear e foram utilizadas para gerar as curvas analíticas. O coeficiente de correlação (r^2), coeficientes lineares (a) e angulares (b) foram obtidos a partir das curvas analíticas de cada padrão. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados utilizando as expressões I e II, respectivamente (MARCUCCI, 2011):

$$\text{LD} = 3.3 \text{ s/S} \quad \text{I}$$

$$\text{LQ} = 10 \text{ s/S} \quad \text{II}$$

Onde s representa o desvio padrão da intersecção com o eixo Y e S representa o coeficiente angular da curva analítica.

A precisão do método de CLAE-DAD foi estimada a partir dos testes de recuperação das substâncias isoladas, o ácido protocatecuico (**AcP**) e a rutina. Nesse caso, o extrato foi fortificado com três níveis de concentrações conhecidas (baixa, média e alta) dos compostos ($3,15$ e $62 \mu\text{g mL}^{-1}$ para **AcP** e 15 , 62 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a rutina). O valor médio de recuperação foi calculado utilizando a fórmula (III):

$$\% \text{ de recuperação} = [(C_f / C_{nf} + C_{pd})] \times 100 \quad \text{III}$$

Onde C_f corresponde a concentração fortificada, C_{nf} corresponde à concentração não fortificada e C_{pd} corresponde à concentração do padrão adicionado. O ensaio de repetitividade (precisão) foi realizado com as soluções estoques dos padrões ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), os quais foram diluídos a três níveis de concentrações. As soluções

utilizadas nos ensaios intra-dia e inter-dia foram preparadas individualmente para cada dia de injeção.

3.3.4 Etapa de avaliação da atividade biológica

3.3.4.1 Avaliação da atividade hipoglicemiante

O extrato etanólico e as frações fenólicas e nitrogenadas, foram submetidas a testes farmacológicos em parceria com o Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da Faculdade de Ciências de Bauru/UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro e com participação da Dra. Nathalia Aparecida de Paula Camaforte.

3.3.4.1.1 Animais

Camundongos suíços machos (com 60 dias de idade, pesando 40,0 g) foram obtidos do Biotério Central em Botucatu (SP, Brasil) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Os animais foram mantidos sob condições ambientais padrão: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12/12h ciclo luz/escurecimento. Eles foram mantidos com alimentos industrializados (Labina[®], Purina, Brasil) e água ad libitum. O Comitê de Ética local (CEP-FC) aprovou os procedimentos, que seguiram todas as recomendações para o uso ético de animais declarado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (www.cobea.org.br).

3.3.4.1.2 Indução de diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizado utilizando uma única injeção de 150 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) em camundongos em jejum durante 12-14 h. A STZ foi dissolvida em tampão citrato (pH 4,5) e injetada imediatamente por via intraperitoneal. Os animais foram mantidos em jejum

durante 3 h após a indução e, nas próximas 24 h, receberam uma solução de glicose (10%) para prevenir a hipoglicemia. No sétimo dia após a injeção de STZ, os animais com glicemia de jejum superior a 250 mg dL⁻¹ foram incluídos no estudo (VAREDA et al., 2014).

3.3.4.1.3 Tratamento com extrato etanólico de *J. aethiopica* e medição de glicemia

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (n = 8/grupo): **CTLSAL** - camundongos não diabéticos tratados com solução salina; **CTLEXT** - camundongos não diabéticos tratados com extrato de *J. aethiopica* a 500 mg kg⁻¹ b.w.; **STZSAL** - ratos diabéticos tratados com solução salina; **STZMET** - camundongos diabéticos tratados com metformina a 300 mg kg⁻¹ b.w.; **STZEXT** - camundongos diabéticos tratados com o extrato de *J. aethiopica* a 500 mg kg⁻¹ de peso corporal. Tanto a solução salina quanto o extrato e a metformina, foram administrados por via oral por sonda uma vez por dia durante 14 dias consecutivos. A glicemia de jejum foi medida semanalmente usando um glucômetro (One touch, Johnson & Johnson).

3.3.4.1.4 Teste de tolerância oral à glicose (oGTT) após o tratamento com *J. aethiopica*

Para o teste, todos os grupos foram submetidos a jejum durante 8-10h e receberam o respectivo tratamento por gavagem 30 min antes da medição da glicemia no tempo zero. Depois disso, os animais receberam uma carga oral de D-glicose (2,0 g kg⁻¹ por peso) e, em seguida, mediu-se a glicemia em 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. As amostras de sangue foram obtidas a partir da ponta da cauda sob anestesia (Tiopental[®] 60 mg kg⁻¹ b.w.) e os níveis de glicose foram medidos usando o kit enzimático (Dolles[®], Goiás, Brasil). O desvio na concentração de glicose no sangue a partir do valor basal foi analisado e representado como glândula sanguínea delta.

3.3.4.1.5 Teste de tolerância oral à glicose (oGTT) para a determinação da dose das frações nitrogenadas e fenólicas

Os animais foram divididos em oito grupos ($n = 10/\text{grupo}$): **CTLSAL**: camundongos não diabéticos tratados com solução salina; **STZSAL**: camundongos diabéticos tratados com solução salina; **FCN50**: camundongos diabéticos tratados com 50 mg kg^{-1} de fração de compostos nitrogenados; **FCN100**: camundongos diabéticos tratados com 100 mg kg^{-1} de fração de compostos nitrogenados; **FCN200**: camundongos diabéticos tratados com 200 mg kg^{-1} de fração de compostos nitrogenados; **FF50**: camundongos diabéticos tratados com 50 mg kg^{-1} de fração de compostos fenólicos; Camundongos diabéticos **FF100** tratados com 100 mg kg^{-1} de fração de compostos fenólicos e **FF200**: camundongos diabéticos tratados com 200 mg kg^{-1} de fração de compostos fenólicos. Todos os grupos estavam em jejum durante 8-10h, receberam o respectivo tratamento por gavagem 30 minutos antes da medição da glicemia no tempo zero. Depois disso, os animais receberam uma carga oral de D-glicose (2,0 g kg^{-1} por peso) e, em seguida, mediu-se a glicemia em 30, 60 e 90 min após a administração de glicose. As amostras de sangue foram obtidas a partir da ponta da cauda, sob anestesia (Tiopental® 60 mg kg^{-1} b.w.), e os níveis de glicose foram medidos usando o kit enzimático (Dolles®, Goiás, Brasil). O desvio na concentração de glicose no sangue a partir do valor basal foi analisado e representado como glândula sanguínea delta.

3.3.4.1.6 Tratamento com frações dos compostos nitrogenados e fenólicos; medição da glicemia

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos ($n = 8 /\text{grupo}$): **CTLSAL** - camundongos não diabéticos tratados com solução salina; **STZSAL** - camundongos diabéticos tratados com solução salina; **STZMET** - camundongos diabéticos tratados com metformina a 300 mg kg^{-1} b.w.; **FCN50** - camundongos diabéticos tratados com a fração de compostos nitrogenados a uma dose de 50 mg kg^{-1} b.w; **FF200** - camundongos diabéticos tratados com a fração de compostos fenólicos a uma dose de 200 mg kg^{-1} b.w. A solução salina, as frações e a metformina foram administradas por via oral por sonda uma vez ao dia durante sete dias consecutivos. A glicemia de jejum foi medida semanalmente usando um glucômetro (One touch, Johnson & Johnson).

3.3.4.1.7 Teste de tolerância oral à glicose (oGTT) após o tratamento com as frações

Todos os grupos estavam em jejum durante 8-10h e receberam o respectivo tratamento por gavagem 30 minutos antes da medição da glicemia no momento zero. Depois disso, os animais receberam uma carga oral de D-glicose ($2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de peso corporal) e, em seguida, a glicemia foi medida aos 15, 30, 60 e 90 min após a administração de glicose. As amostras de sangue foram obtidas a partir da ponta da cauda sob anestesia (Tiopental[®] 60 mg kg^{-1} b.w.) e os níveis de glicose foram medidos usando o kit enzimático (Dolles[®], Goiás, Brasil). O desvio na concentração de glicose no sangue a partir do valor basal foi analisado e representado como glândula sanguínea delta.

3.3.4.1.8 Parâmetro bioquímicos

No final do tratamento com o extrato etanólico, as frações de compostos nitrogenados ou fenólicos, os animais estavam em jejum durante 8-10 h e as amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min para obter soro e armazenadas a -80°C . A ureia, proteínas totais, colesterol total (TC), HDL-colesterol e triglicerídeos (TG) foram medidos por espectrofotometria usando o equipamento A15 da Bioclin[®] usando kits Biosystems. O colesterol VLDL foi medido de acordo com a fórmula: $\text{VLDL} = \text{TG} / 5$. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.3.4.1.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada usando o software Instat 3[®]. Para comparações múltiplas, a ANOVA foi utilizada, seguida do teste de Tukey e para comparação entre dois grupos, o teste *t* de Student foi utilizado. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3.3.4.2 Avaliação da atividade citotóxica pela técnica de MTT (Brometo de 3-((4,5-dimetiltiazol)-2, il)-2,5-difeniltetrazólio)

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da FCFAr - Unesp Araraquara sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Iracilda Z. Carlos. O ensaio de viabilidade celular seguiu a metodologia descrita por MOSMANN (1983).

3.3.4.2.1 Ajuste das concentrações das suspensões das células tumorais

A linhagem tumoral adenocarcinoma de pulmão murino (LP07) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), foram cedida pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina e pelo Banco de Células de Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

As células LP07 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI-1640-C, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de antibiótico em frascos plásticos (Corning) em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e tensão constante de 5 % de CO₂. Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco) e ajustado a uma concentração de 5×10^4 células.mL⁻¹.

3.3.4.2.2 Ajuste das amostras avaliadas

A solução-mãe do extrato avaliado foi preparada em concentração máxima de DMSO de 5 % v/v, conforme os métodos convencionais. A solução foi diluídaa em MEM (Minimum Essential Medium) por diluição sucessiva nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.7 e 7.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3.4.2.3 Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LP07 e MCF-7

A determinação da citotoxicidade do extrato sobre as células tumorais foi quantificada pelo método baseado na capacidade das células viáveis de reduzirem o MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa formando cristais

de formazana (MOSMANN, 1983). As amostras (200 μL) de LP07 e MCF-7 (5×10^4 células. mL^{-1}) foram adicionadas em placas de 96 poços e então pré-incubadas na ausência do extrato investigado por 24 h para que as células se adaptem antes da adição dos agentes de teste. Após 24 h de incubação, formado o tapete celular, os sobrenadantes foram removidos e os extratos foram adicionados (200 μL ; 1000 – 7,8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). O efeito do extrato sobre as células foi determinado após 24 h de incubação. Os sobrenadantes foram removidos, e a solução de MTT (100 μL ; 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$) foi adicionada a cada poço contendo as amostras. O ensaio de MTT foi realizado e as placas foram incubadas durante 3 horas, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 μL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais formados. Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular (CIM) dos extratos foram quantificados através de curvas dose-resposta Concentração da Amostra x Viabilidade Celular utilizando o software Origin® 8.0. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.4.3 Avaliação da atividade citotóxica frente a células normais pela técnica de XTT (Hidrato de benzenilsulfito 3'-[1-[(fenilamino)-carbonil-3,4-tetrazólio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) de sódio]

A avaliação da atividade citotóxica frente a células normais foi realizada no Laboratório de Mutagênese na Universidade de Franca sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Denise Crispim Tabares e participação da pós-graduanda Fernanda Diniz de Sousa. O ensaio de viabilidade celular seguiu a metodologia descrita por BERRIDGE; HERST; TAN, (2005).

3.3.4.3.1 Ajuste das concentrações das suspensões das células normais

A avaliação atividade citotóxica foi utilizando o ensaio colorimétrico do XTT (ROEHM et al., 1991) -Kit XTT (Roche Diagnostics). A linhagem normal de fibroblasto de pulmão humano (GM07492A), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Mutagênese da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto, São Paulo.

As células encontram-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1×10^6 células mL^{-1} em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (HAM F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich, 40% de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). Para realização dos experimentos as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura HAM F10 + DMEM, na proporção 1:1. O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro bovino fetal, $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e $0,06 \text{ g L}^{-1}$ penicilina (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em monocamada com 10 mL de meio de cultura utilizando frascos descartáveis de 25cm^2 (Corning) a $36,5^{\circ}\text{C}$ em estufa de CO_2 (Sanyo) em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO_2). A cada dois ou três dias, as células foram sub cultivadas, usando PBS para lavá-las e tripsina (solução 10x, Sigma-Aldrich) na proporção 1 tripsina: 9 PBS, para desprender as células da superfície interna do frasco de cultura. Após o desprendimento das células 1,5 mL de meio de cultura completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal) foi adicionado ao frasco para inativação da tripsina e homogeneizado. Em seguida, 200 μL de células foram colocados em cultivo em novos frascos contendo 10 mL de meio de cultura completo e incubado a $36,5^{\circ}\text{C}$. Para a realização dos ensaios, a linhagem celular escolhida (GM07492A) foi utilizada a partir da quarta passagem até a décima quarta passagem.

3.3.4.3.2 Ensaio de viabilidade celular com as células normais GM07492A

A atividade citotóxica na linhagem celular foi avaliada após 24 horas de tratamento. A metodologia utilizada foi de acordo com orientações do fabricante com algumas modificações. O extrato etanólico (EE) das folhas de *J. aethiopica* foi diretamente diluído em meio de cultura (HAM F10 + DMEM 1:1) suplemento com 10% de soro bovino fetal nas diferentes concentrações que variam de 2500 a $19,50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

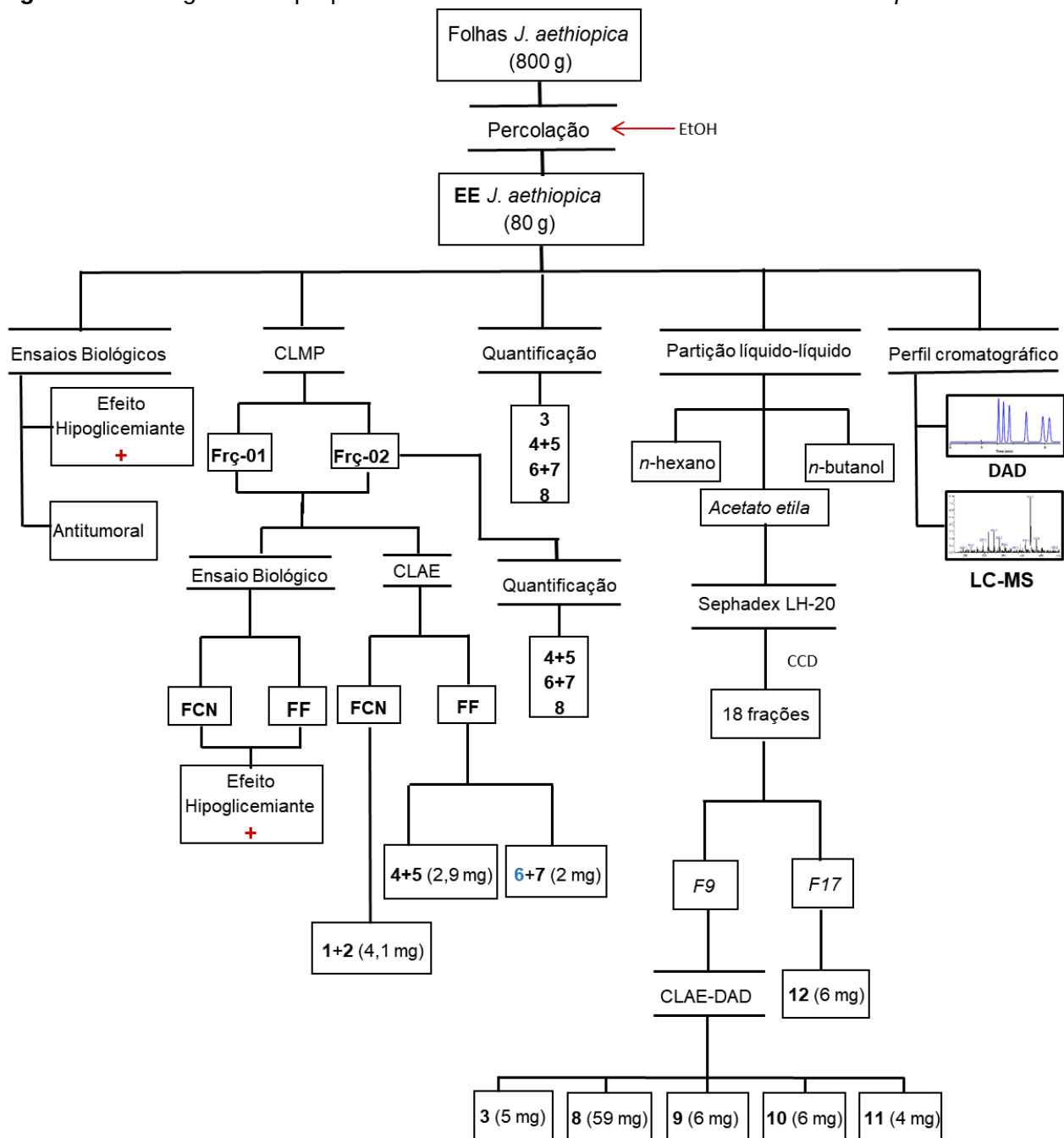
Para realizar os experimentos, 1×10^3 células foram semeadas em microplacas de 96 poços. Em cada poço, o volume máximo foi de 100 μ L de meio de cultura (HAM F10 + DMEM 1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após 24 h, as culturas foram tratadas com as diferentes concentrações do EE acima descrito. Os grupos controles negativos (sem tratamento), solvente (DMSO 0,4%) e positivo (DMSO 25%), foram incluídos nos poços. Na sequência, as placas foram incubadas a 36,5°C por 24 horas. Depois desse período de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 μ L de PBS para retirar o tratamento evitando possíveis alterações no resultado e expostas a 100 μ L de meio cultura HAM-F10 sem vermelho de fenol. Então, 25 μ L de XTT foram adicionados em cada poço e as microplacas incubadas a 36,5°C por 17h. A absorbância das amostras foi determinada através de um leitor de multiplacas (Elisa –Asysm programa Microwin 2.000) no comprimento de onda de 450 nm e comprimento de referência de 620 nm. A quantidade de produto solúvel formado (formazan) foi proporcional ao número de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados de IC₅₀ (concentração que inibe 50% de crescimento) obtidos para as células normais ou sadias, GM07492A.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e foi utilizado o método Tukey para a comparação dos diferentes tratamentos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prisma, V. 5.00.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fracionamento do extrato etanólico (**EE**) das folhas de *Jatropha aethiopica*, assim como um resumo das etapas de trabalho desenvolvidas, são apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma de preparo e fracionamento do **EE** das folhas de *J. aethiopica*.



O fluxograma da Figura 4 apresenta as etapas desenvolvidas durante a pesquisa. A partir do material vegetal seco e moído, foi obtido o extrato etanólico (**EE**) por percolação (80,0 g). Na sequência, o extrato foi dividido em cinco partes para realizar os estudos químicos (70,0 g) e biológicos (10,0 g). A partir do extrato etanólico obtiveram-se as frações de compostos nitrogenados (**FCN**) e de compostos fenólicos (**FF**) mediante CLMP tanto para isolamento de substâncias quanto para testes biológicos. Os perfis cromatográficos por CLAE-DAD e LC-MS, foram otimizados variando os diferentes parâmetros até atingir uma boa resolução. O isolamento das substâncias (**3,8,9,10,11** e **12**) foi realizado a partir da fração acetato de etila obtida da partição líquido-líquido do EE com solventes de diferente polaridade e das frações **FCN** e **FF**. Esta etapa possibilitou a caracterização de 6 substâncias em mistura (**1+2** e **4+5**, **6+7**, respectivamente). A quantificação de algumas das substâncias isoladas assim como a validação do método analítico desenvolvido foi feito a partir do **EE** e **FF**. Paralelamente foram feitos os testes de atividade hipoglicemiante, citotoxicidade e viabilidade celular a partir do **EE** das folhas de *Jatropha aethiopica*, assim como no primeiro caso também para as frações **FCN** e **FF**.

4.1. Etapa química

4.1.1 Obtenção dos extratos das folhas de espécies de *Jatropha aethiopica* por percolação.

O extrato etanólico (**EE**) das folhas de *J. aethiopica* foi obtido por percolação do pó com etanol. Apesar de que a população de Cuba consome a infusão ou decocção a partir das folhas frescas, selecionou-se o extrato etanólico para facilitar o estudo químico da planta, assim como avaliar as propriedades biológicas desse extrato.

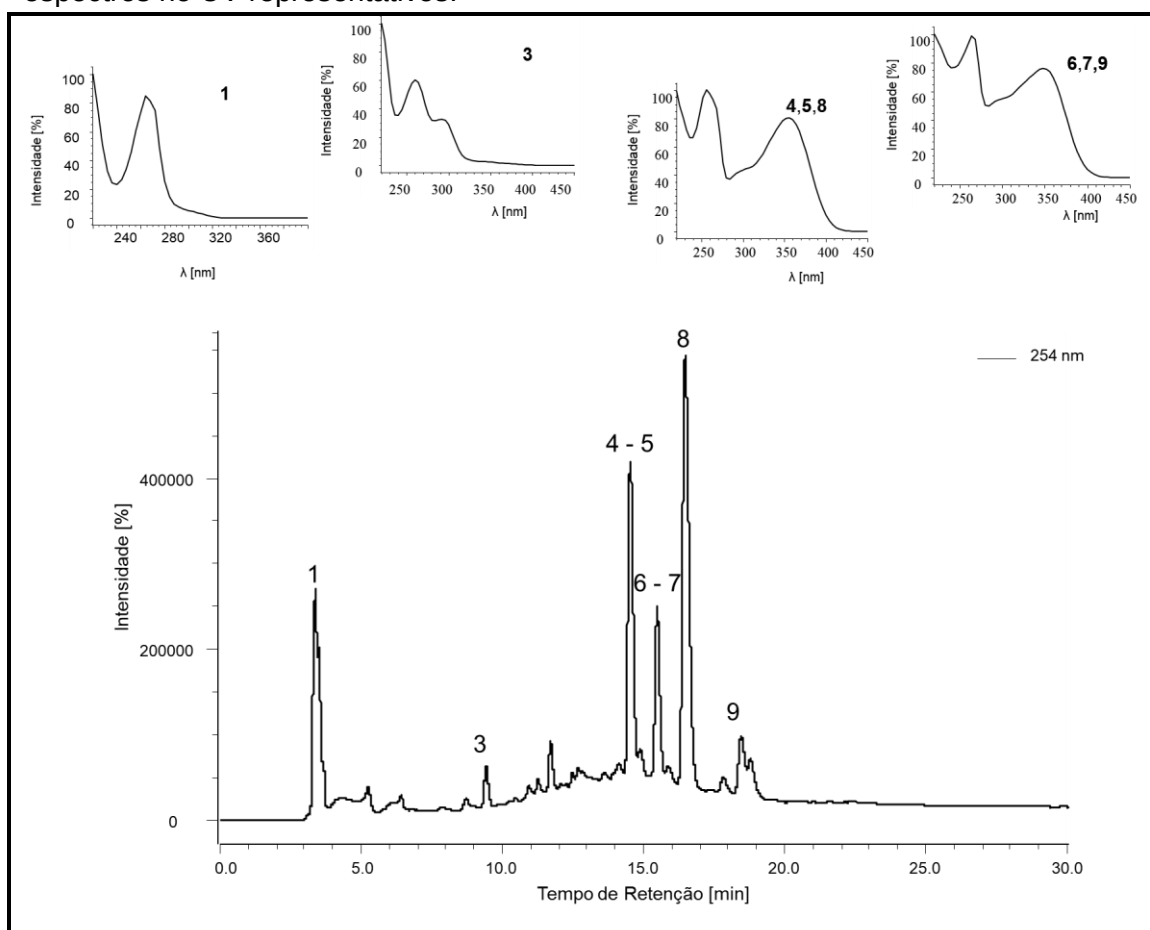
4.1.2 Perfil cromatográfico.

O perfil cromatográfico traçado por CLAE-DAD é de grande utilidade no estudo de extratos polares. Através da comparação dos espectros no UV, assim como pelo tempo de retenção (t_R) de compostos conhecidos ou padrões autênticos (comerciais ou já isolados em laboratório) com as substâncias presentes num extrato/fração, é possível

inferir ou identificar a classe de substâncias presentes na amostra (RINALDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2008).

Durante o processo de otimização do perfil cromatográfico do extrato etanólico a partir das folhas de *J. aethiopica*, assim como para o isolamento das substâncias, foram desenvolvidas várias metodologias para atingir os melhores resultados como por exemplo a resolução de bandas e otimização do tempo de eluição. Variações nas características das colunas como a porosidade das partículas, atividade dos grupos silanois, assim como as interações intermoleculares foram avaliadas na seleção. Outros aspectos analisados foram a força de eluição e a natureza do solvente (MeOH e ACN) (dados não apresentados). As condições otimizadas para cada processo, foram descritas na seção “Parte Experimental”. A Figura 5 apresenta o cromatograma otimizado do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* monitorado em 254 nm.

Figura 5 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *J. aethiopica*, com espectros no UV representativos.



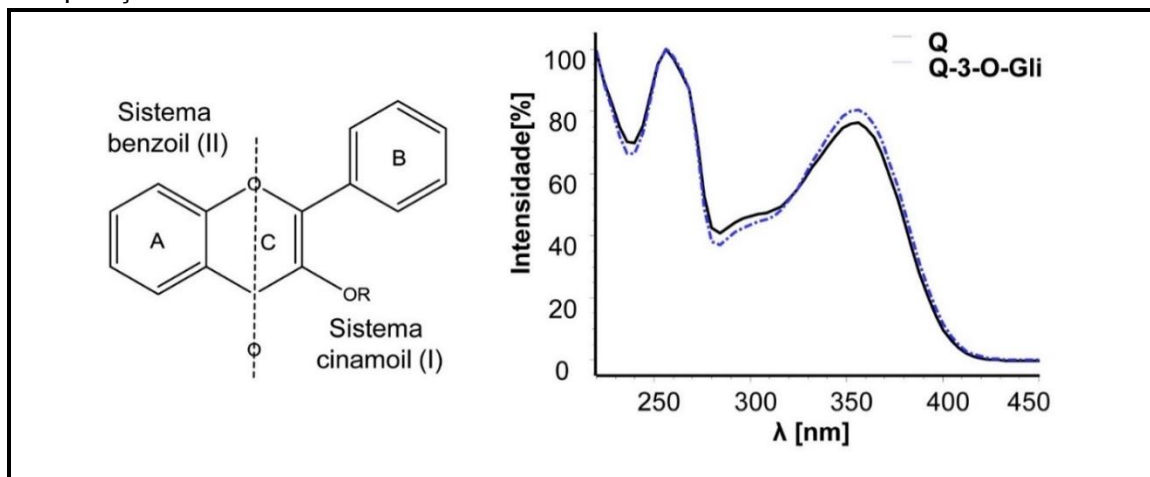
Coluna Thermo Hypersil Gold (250 x 4,6 mm, 5 μm), 5 – 65 % de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1 % de TFA; solvente B: MeOH acidificado com 0,1 % de TFA), 25°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹

Fonte: Cromatograma adaptado de GAMIOTEA-TURRO et al., (2018)

A análise do perfil cromatográfico do extrato etanólico (EE) das folhas de *J. aethiopica* e os espectros de UV das bandas principais, permitiu determinar as classes de metabólitos secundários presentes no extrato. Com a otimização do método cromatográfico obteve-se melhor resolução na separação das bandas cromatográficas, sendo possível propor estratégias para o isolamento e posterior quantificação das substâncias a partir do **EE** e **FF**.

O espectro UV de um flavonol apresenta máximos de absorção característicos devido às bandas I e II e, ao grupo hidroxila na posição três (C_3) do anel C do flavonoide. A substituição em C_3 e a dupla ligação entre os carbonos C_2 e C_3 aumentam a conjugação entre os anéis B e C. Por isso, a ligação do grupo hidroxila em C_3 tem efeito significativo nos máximos de absorção dos flavonóis, dando deslocamentos batocrômicos nas bandas de absorção (BOHM 1999). Quando a hidroxila em C_3 está glicosilada, o espectro UV não apresenta mudanças nos deslocamentos das bandas e na intensidade de absorção (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) (Figura 6).

Figura 6 – Representação dos sistemas benzoil (II) e cinamoil (I) dos flavonoides. Bandas I e II em um espectro no UV de flavonoide glicosilado e outro não glicosilado na posição 3.



Fonte: Adaptado de MARKHAM, 1982; MERKEN; BEECHER, 2000.

Segundo MARKHAM (1982), os máximos de absorção esperados para flavonóis 3-O-substituídos estão dentro da faixa de 250-280 nm para a banda II e 330-360 nm para a banda I, o que faz com que os máximos de absorção apresentados pelos picos 5-10 apontem para a presença desta classe de flavonoides no extrato estudado.

Os espectros no UV mostraram também bandas características de ácidos fenólicos em 254-300 nm (RODRIGUES et al., 2008) e possíveis derivados da uracila (259 nm) (STAUBMANN, et al., 1999).

4.1.3 Fracionamento por Sephadex® LH-20 e CLME.

A partir do extrato etanólico (40,0 g) da espécie *J. aethiopica*, realizou-se a extração líquido-líquido com *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Rendimento das frações obtidas da partição líquido-líquido.

No.	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
1	<i>n</i> -hexano	0,72	1,8
2	Acetato de etila	4,6	11,5
3	<i>n</i> -butanol	15,2	38,0
4	Aquosa	18,6	46,5

A partir do perfil cromatográfico a 254 nm do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, pode-se identificar os flavonoides como os compostos majoritários. Portanto, foi selecionado o extrato acetato de etila para o isolamento e caracterização desses compostos.

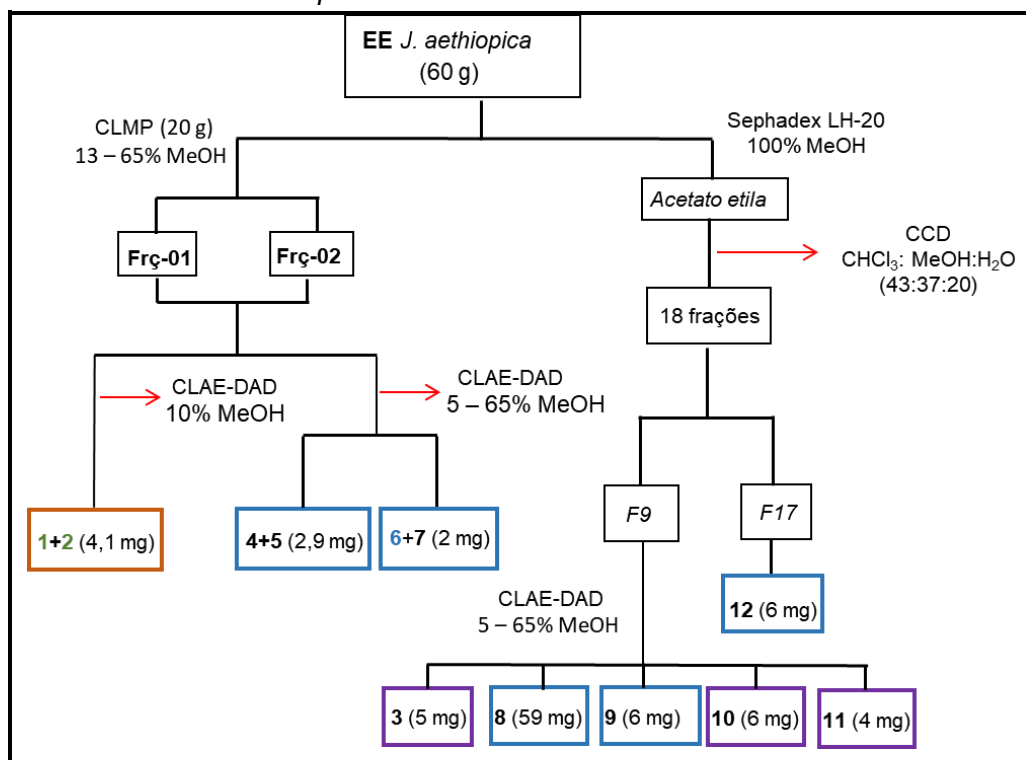
A fração acetato de etila (3 g) foi fracionada em coluna Sephadex LH-20 (Seção 3.3.3.2). Cento e oitenta e seis eluatos (5 mL cada) foram coletados e combinados em dezoito frações (F₁ - F₁₈) de acordo com resultados de seus R_fs em camada delgada (CCD) (Condições descritas na seção 3.3.3.2).

A partir do EE (20 g) foi feito um fracionamento por CLMP para se obter duas frações: a fração Frç-01 (6,0 g – 30%) que foi denominada como fração de compostos nitrogenados (**FCN**) e a fração Frç-02 (10,5 g – 52,5%) denominada fração fenólica (**FF**).

4.2 Elucidação estrutural dos compostos isolados do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*

As etapas desenvolvidas para o isolamento de cada substância estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de isolamento das substâncias nos extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*.



Foi realizada a a partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* com solventes de polaridades diferentes, e posteriormente feito o fracionamento utilizando uma coluna empacotada com gel de Sephadex LH-20. Dessa maneira obtiveram-se subfrações que foram reunidas segundo o perfil por CCD. As substâncias **3**, **8**, **9**, **10** e **11** foram isoladas por CLAE-DAD modo semi-preparativo a partir da subfração F₉ (ver condições na seção 3.3.3.4). No entanto, a substância **12** foi isolada diretamente da Sephadex como um composto puro da fração F₁₇. As substâncias **1+2** foram isoladas como uma mistura a partir de **FCN** enquanto que as substâncias **4+5** e **6+7** foram obtidas a partir de **FF**, respectivamente (ver condições na seção 3.3.3.4).

4.2.1 Identificação dos ácidos fenólicos

4.2.1.1 Identificação da substância **3**.

O espectro de absorção no UV da substância **3** apresentou máximos de absorção em 260 e 293 nm, característicos de ácidos fenólicos (AO et al., 2009) (Figura 5, Pagina 55).

A análise dos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H da substância **3** (Figura 8; Tabela 5, Pagina 63) forneceu sinais de hidrogênios aromáticos na região de 6-8 ppm. Os deslocamentos químicos em δ_{H} 7,33 apresentou sinais de hidrogênios acoplados em *meta* (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e em δ_{H} 7,28 hidrogênios acoplados em *orto* e *meta* (1H, dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz). Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,78 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) corresponde ao sistema de hidrogênios acoplado em *orto*, sugerindo um anel trissubstituído. Assim, diante dos dados e em comparação com dados da literatura (AN et al., 2006), chegou-se a estrutura do ácido protocatecuico ou o ácido 3,4 dihidroxibenzoico, **3** (Figura 9).

Figura 8 – Espectro RMN ^1H de **3**.

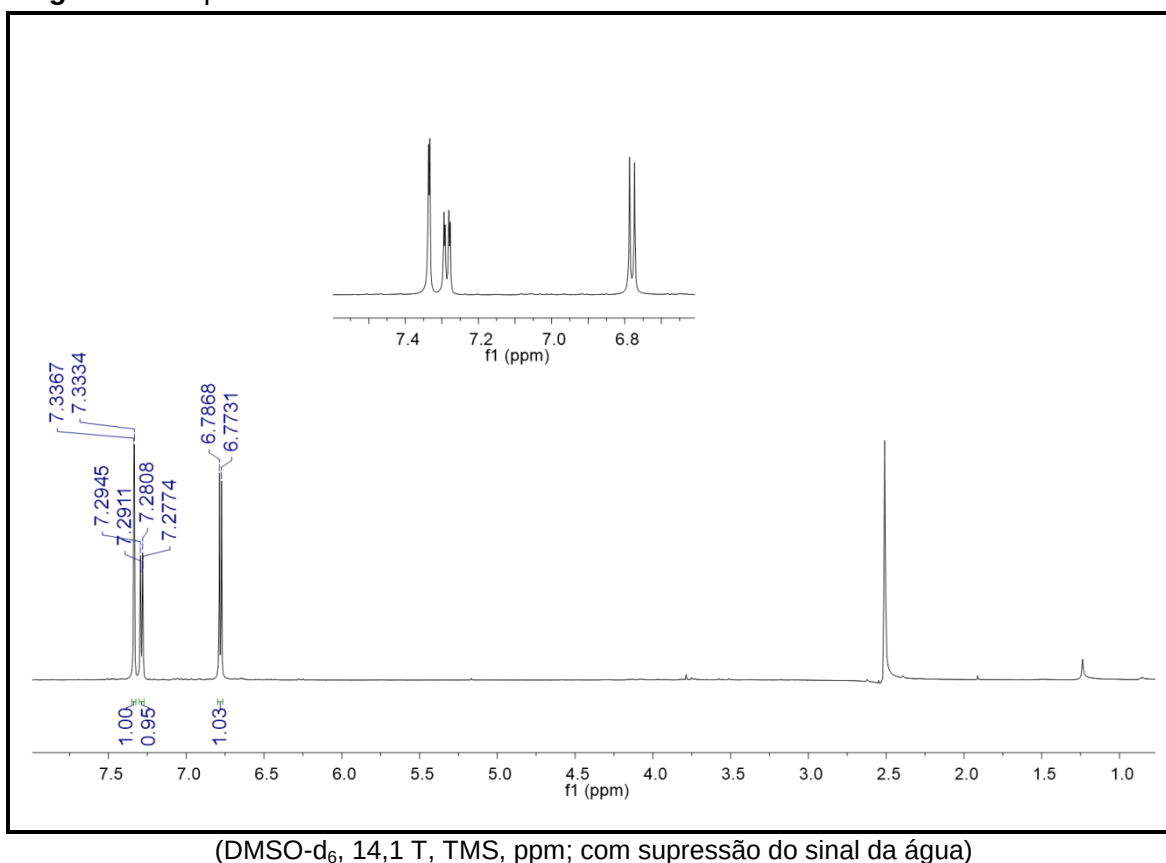
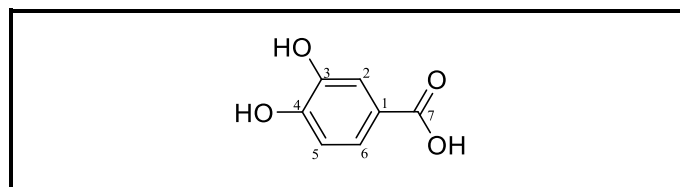
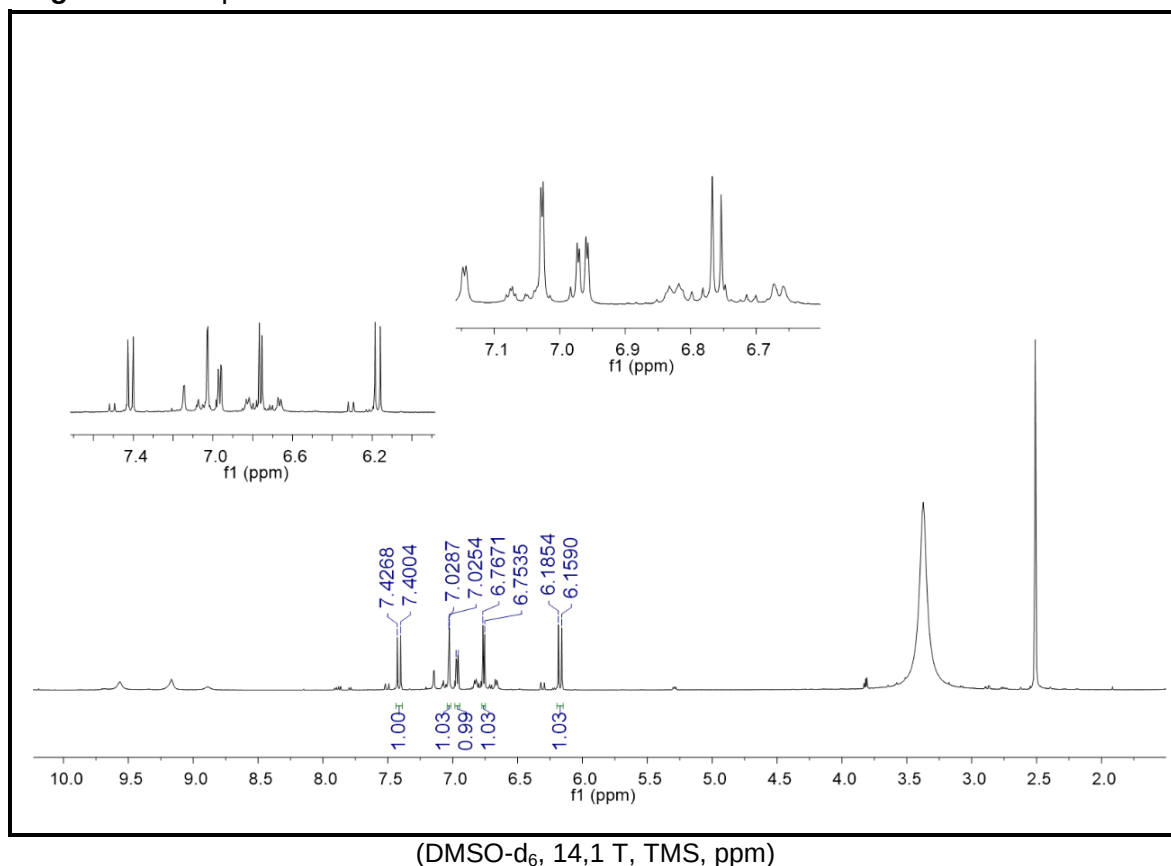


Figura 9 – Estrutura do ácido protocatecuico **3**.

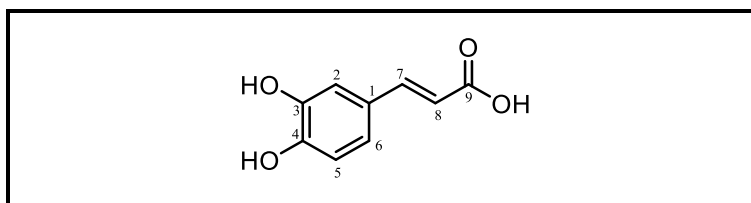
Esta substância foi anteriormente isolada das sementes de *Jatropha curcas* (VERMA et al., 2012) das quais o óleo é utilizado na produção de biodiesel, assim como isolada e reportada pela primeira vez da espécie em estudo *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018). Por outro lado, o ácido protocatecuico é o composto principal do metabolismo de polifenóis complexos, especialmente antocianinas, os quais são abundantemente formados e absorvidos no intestino grosso devido à metabolização microbiana e podem contribuir para os inúmeros benefícios à saúde (KAY et al., 2005; VITAGLIONE et al., 2007). Além disso, SEMAMING et al. (2014) demonstraram o efeito atenuante do ácido protocatecuico na disfunção cardíaca induzida por diabetes.

4.2.1.2 Identificação de **10**.

No espectro de RMN de ^1H de **10** (Figura 10, Tabela 5, Pagina 63), forneceu sinais de deslocamento químico na região de hidrogênios aromáticos, característicos de compostos fenólicos, além de duplas ligações. Dois dupletos foram observados, sendo um em δ_{H} 7,41 (1H, d, $J = 15,8$ Hz) e outro em δ_{H} 6,17 (1H, d, $J = 15,8$ Hz) que foram atribuídos a uma dupla ligação com os hidrogênios em posição *trans*. O sinal em δ_{H} 7,03 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) corresponde ao H-2 do anel fenólico, o duplo duplete em δ_{H} 6,96 (1H, dd, $J = 2,0; 8,2$ Hz) foi atribuído ao H-6. Por outro lado, o sinal em δ_{H} 6,76 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) corresponde ao H-5 que faz correlação em *orto* com H-6. Diante os dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura (ANDARY et al., 1982), chegou-se a estrutura da substância **10** como o ácido cafeico (Figura 11).

Figura 10 – Espectro RMN ^1H de **10**.

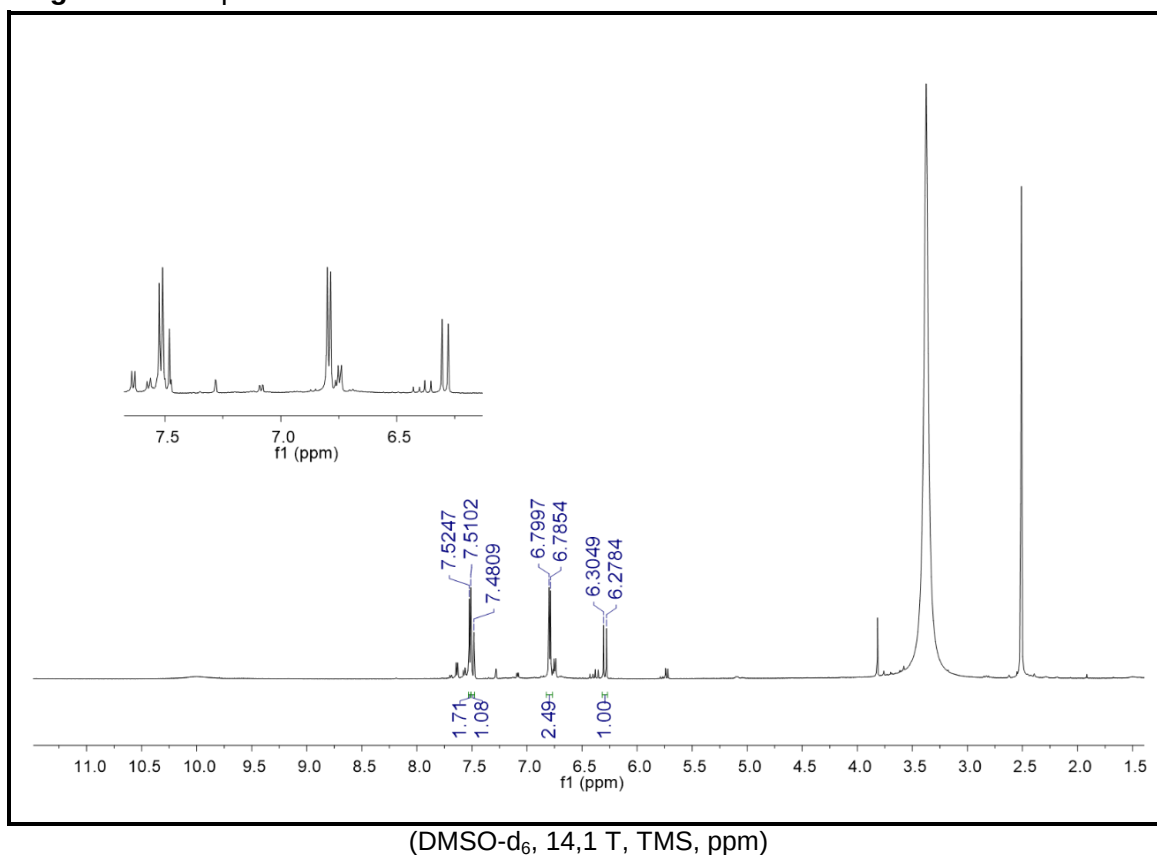
Esta substância foi anteriormente identificada nas sementes moídas de *J. curcas* (OSKOUÉIAN et al., 2011), assim como isolada e reportada pela primeira vez da espécie em estudo *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018). Porém, a sua presença não tem sido reportada em outras espécies do gênero. A atividade antioxidante do ácido cafeico foi demonstrado utilizando vários ensaios mostrando atividade compara com o tocoferol (GÜLCIN et al., 2006). Por outro lado, esse composto também foi avaliado quanto à atividade anti-inflamatória em ensaios de inibição de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 (NILE et al., 2016).

Figura 11 – Estrutura do ácido cafeico **10**.

4.2.1.3 Identificação de **11**.

O espectro de RMN de ^1H de **11** (Figura 12, Tabela 5, Pagina 63), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de compostos fenólicos contendo duplas ligações. Dois dupletos: um em δ_{H} 7,50 (1H, d, $J = 15,9$ Hz) e outro em δ_{H} 6,29 (1H, d, $J = 15,9$ Hz) foram atribuídos a uma dupla ligação com os hidrogênios em posição *trans*. O sinal em δ_{H} 7,52 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) corresponde aos H-2 e H-6 do anel fenólico. No entanto, o sinal em δ_{H} 6,80 (2H, d, $J = 8,6$ Hz) foi atribuído aos H-3 e H-5 demonstrando um acoplamento *orto* entre os hidrogênios. A característica do acoplamento das dois sinais do anel aromático em forma de telhado, confirma que o anel apresenta uma bisubstituição em *para*. Comparação com dados da literatura (SWISŁOCKA et al., 2012) confirmou a estrutura da substância **11** como sendo o ácido *p*-cumárico (Figura 13).

Figura 12 – Espectro RMN ^1H de **11**.



Esta substância foi anteriormente isolada das espécies *J. multifida* e *J. podagrica* e foi considerada como marcador químico do gênero (THOMAS, 2016). NILE et al. (2016), avaliaram o composto para a atividade anti-inflamatória em ensaios de inibição de células TNF- α e IL-6 fornecendo inibição superior a 40 e 60% respectivamente. Além disso, a atividade inibidora de XO foi também demonstrada (> 50%) (NILE, et al., 2016). A presença desta substância foi descrita pela primeira vez na espécie *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018).

Figura 13 – Estrutura do ácido *p*-cumárico **11**.

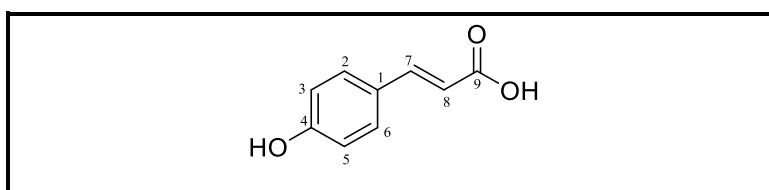


Tabela 5 – Deslocamentos de hidrogênio das substâncias **3** (ácido protocatecuico), **10** (ácido cafeico) e **11** (ácido *p*-cumárico) isolados das folhas de *J. aethiopica* e da literatura.

Posição	¹ H (J = Hz)		¹ H (J = Hz)		¹ H (J = Hz)	
	3	Literatura	10	Literatura	11	Literatura
1	-	-	-	-	-	-
2	7,33 (1H) <i>d</i> (2,0)	7,33 (1H) <i>d</i> (1,9)	7,02 (1H) <i>d</i> (2,0)	7,2 (1H) <i>s</i>	7,52 (1H) <i>d</i> (8,6)	7,49 (1H) <i>d</i> 8,4)
3	-	-	-	-	6,80(1H) <i>d</i> (8,6)	6,79 (1H) <i>d</i> 8,4)
4	-	-	-	-	-	-
5	6,78 (1H) <i>d</i> (8,2)	6,79 (1H) <i>d</i> (8,2)	6,76 (1H) <i>d</i> (8,2)	6,76 (1H) <i>d</i> (8,0)	6,80 (1H) <i>d</i> (8,6)	6,79 (1H) <i>d</i> 8,4)
6	7,28 (1H) <i>dd</i> (2,0; 8,2)	7,29 (1H) <i>dd</i> (1,9; 8,2)	6,96 (1H) <i>dd</i> (2,0; 8,2)	6,94 (1H) <i>d</i> (8,0)	7,52 (1H) <i>d</i> (8,6)	7,49 (1H) <i>d</i> 8,4)
7	-	-	7,41 (1H) <i>d</i> (15,8)	7,46 (1H) <i>d</i> (16,0)	7,50 (1H) <i>d</i> (15,9)	7,52 (1H) <i>d</i> 15,8)
8	-	-	6,17 (1H) <i>d</i> (15,8)	6,18 (1H) <i>d</i> (16,0)	6,29 (1H) <i>d</i> (15,9)	6,29 (1H) <i>d</i> 15,8)

Deslocamentos químicos foram comparados com a literatura: AN et al., 2006; ANDARY et al., 1982; SWISŁOCKA, et al., 2012; GAMIOTEA-TURRO et al., 2018. Espectros obtidos em: *DMSO-d₆, 14,1 T

4.2.2 Identificação dos flavonoides

4.2.2.1 Identificação da substância 4.

No espectro de RMN de ^1H de **4** (Figura 14, Tabelas 6–7, Páginas 99–101), observou-se sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de flavonoides derivados da quercetina. (HARBORNE, 1996). Um sinal em δ_{H} 12,70 sugere que a substância possui a hidroxila C-5 quelada à carbonila C-4. Sinais em δ_{H} 7,68 (1H; dd, $J = 2,2$; 8,5 Hz), em δ_{H} 7,48 (1H; d; $J = 2,2$ Hz) e em δ_{H} 6,81 (1H; d; $J = 8,5$ Hz) foram atribuídos ao H-6' e H-2' e H-5' do anel B. Um duplete em δ_{H} 6,39 (1H; d; $J = 1,8$ Hz) atribuído ao H-8 acoplado com o duplete H-6, δ_{H} 6,19 (1H; d; $J = 1,8$ Hz) (HARBORNE, 1996), indicando assim que o anel A está trissubstituído. Na região entre δ_{H} 4,00 e δ_{H} 5,70 foram atribuídos os três H anoméricos em δ_{H} 5,57 (1H; d; $J = 7,7$ Hz) sugerindo uma configuração β . Outros sinais em δ_{H} 5,05 (1H; s) e δ_{H} 4,38 (1H; d; $J = 1,3$ Hz) indicam a presença de anoméricos com configuração α . Os demais sinais de hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares foram observados entre δ_{H} 3,00 e δ_{H} 4,00; porém, devido a sobreposição de sinais além do sinal do solvente, os deslocamentos químicos foram atribuídos com ajuda dos mapas de contorno *gHSQC* e *gHMBC* (Figuras 15 e 16, respectivamente).

Os deslocamentos químicos em δ_{H} 1,05 e δ_{H} 0,80 foram atribuídos a dois grupos metila, sendo possível propor que o flavonoide apresenta açúcares do tipo deoxihexose (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos mapas de contorno *gHSQC* e *gHMBC*.

A natureza dos açúcares foi determinado através dos experimentos TOCSY 1D, onde irradiou-se cada um dos hidrogênios anoméricos e confirmou-se o sistema de spins de cada unidade de açúcar. Com estes experimentos foi possível atribuir uma unidade de galactose e duas de ramnose (Figuras 17 – 19). Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C foram atribuídos a partir dos mapas de contorno *gHSQC* e *gHMBC* (Figuras 15 e 16, respectivamente; Tabela 6, Página 99).

Figura 14 – Espectro RMN ^1H de 4.

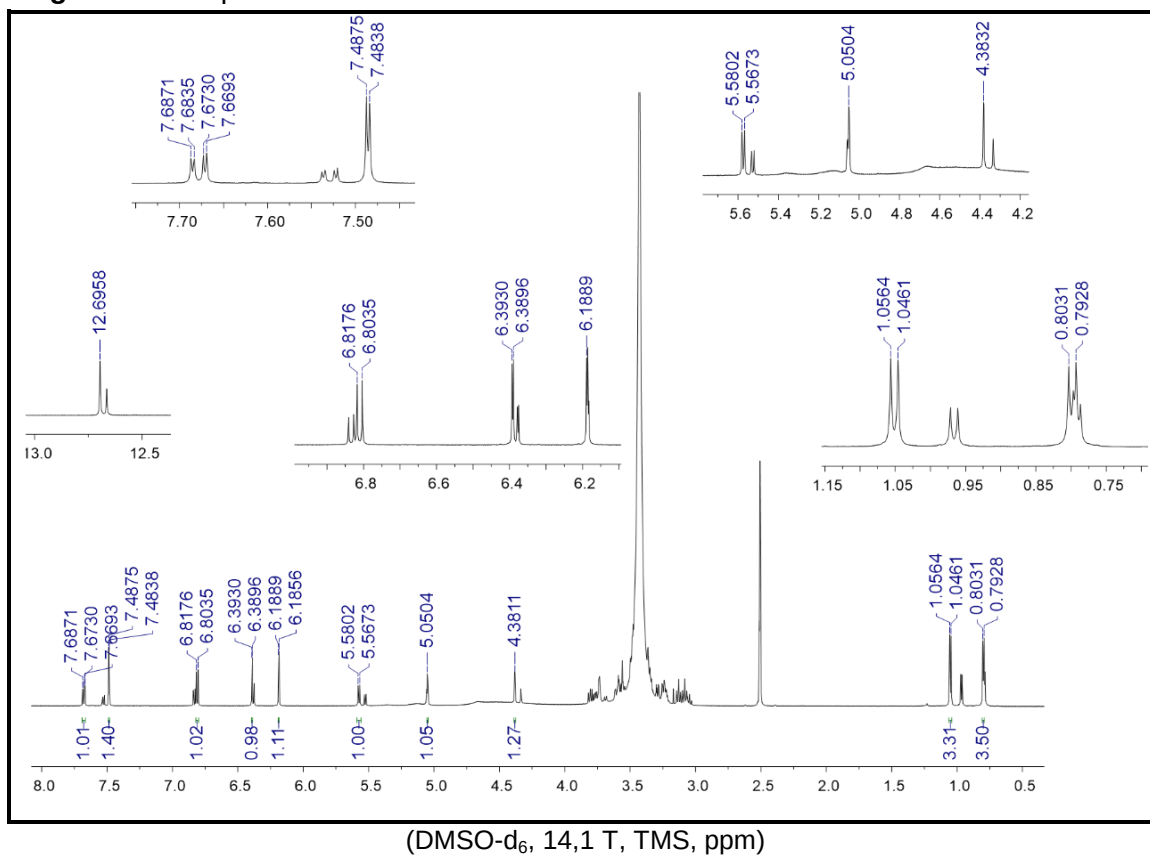


Figura 15 – Mapa de contorno gHSQC de 4.

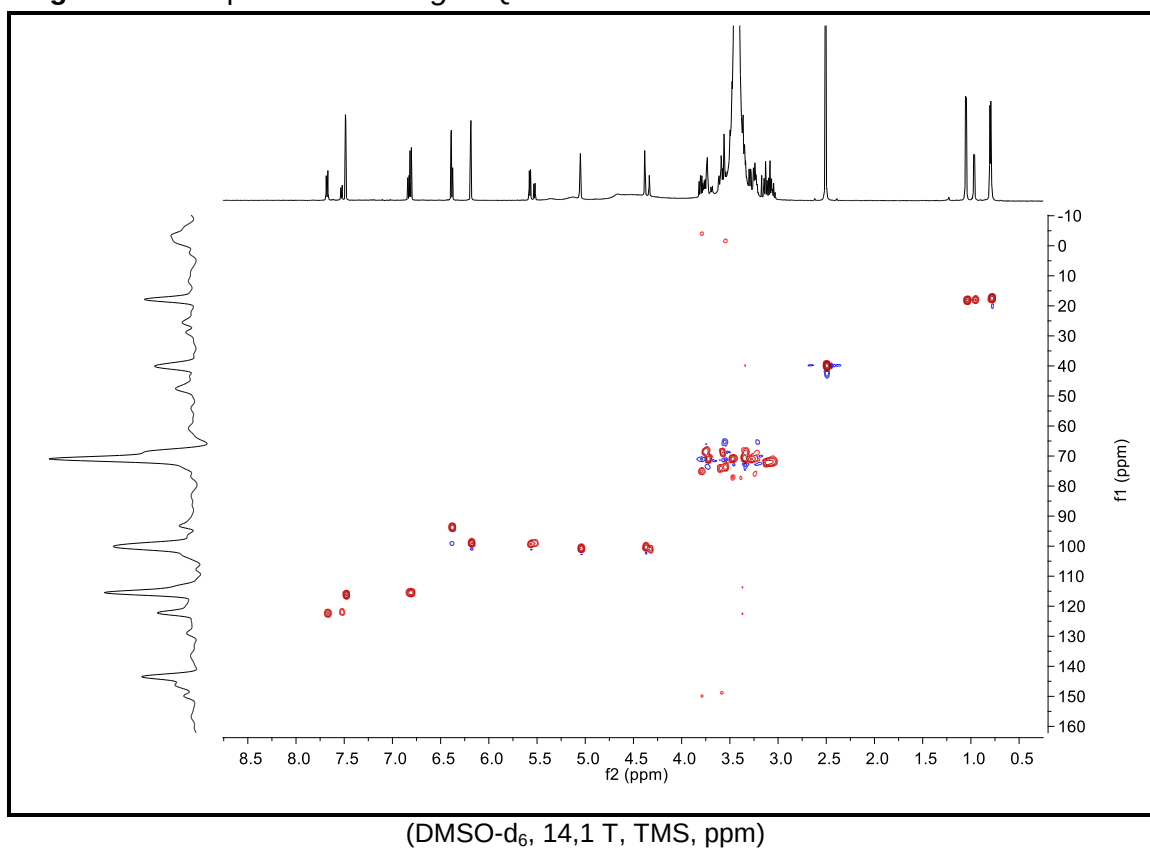


Figura 16 – Mapa de contorno gHMBC de **4**.

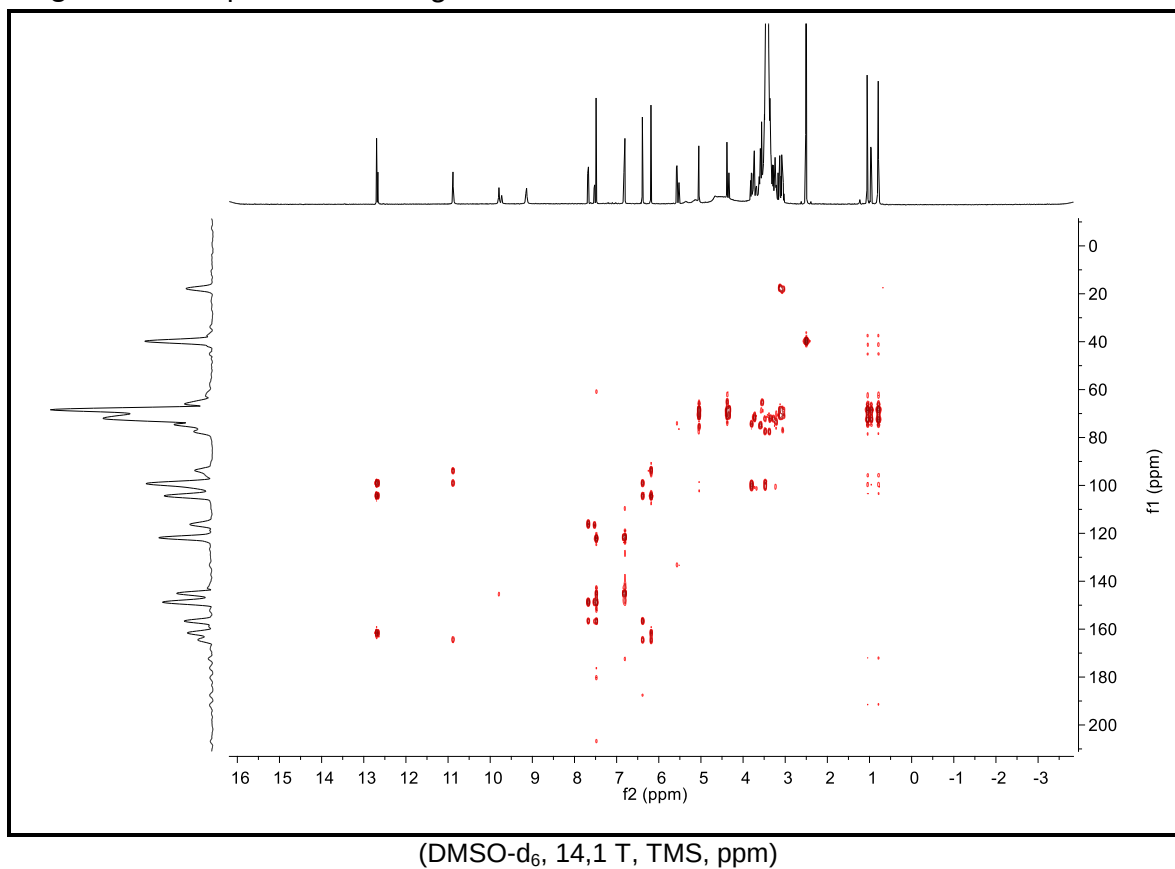


Figura 17 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_{H} 5,57 de **4**.

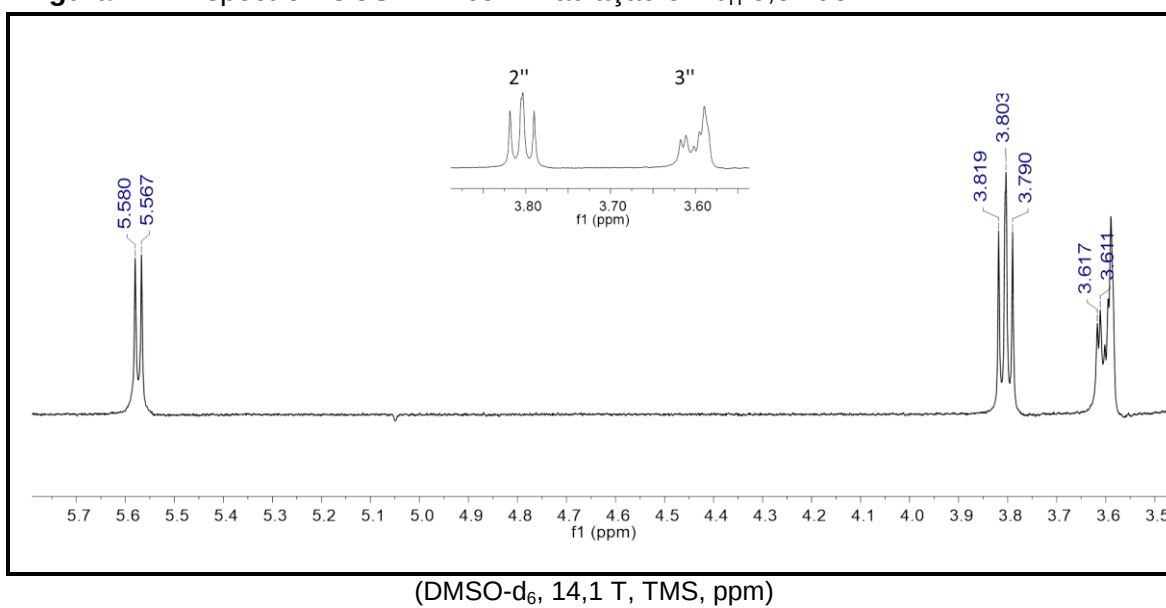


Figura 18 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,05 de **4**.

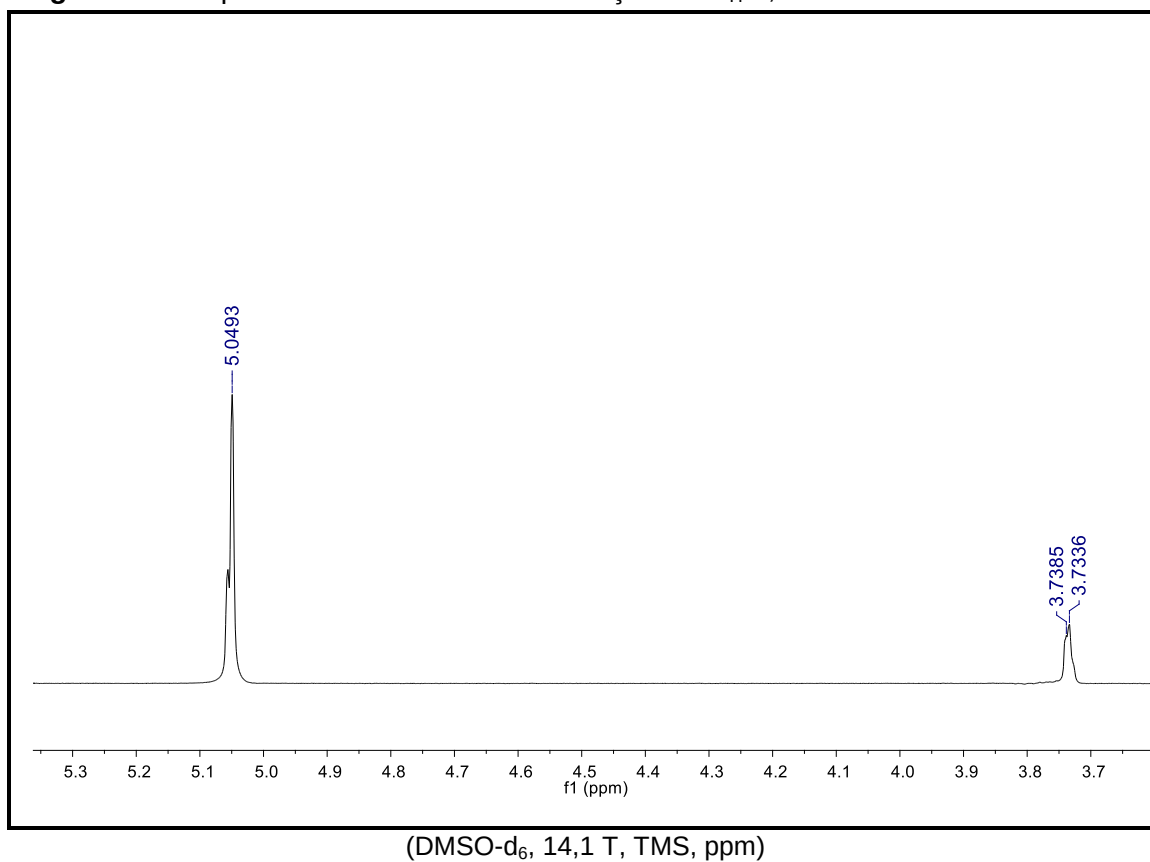


Figura 19 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,38 de **4**.

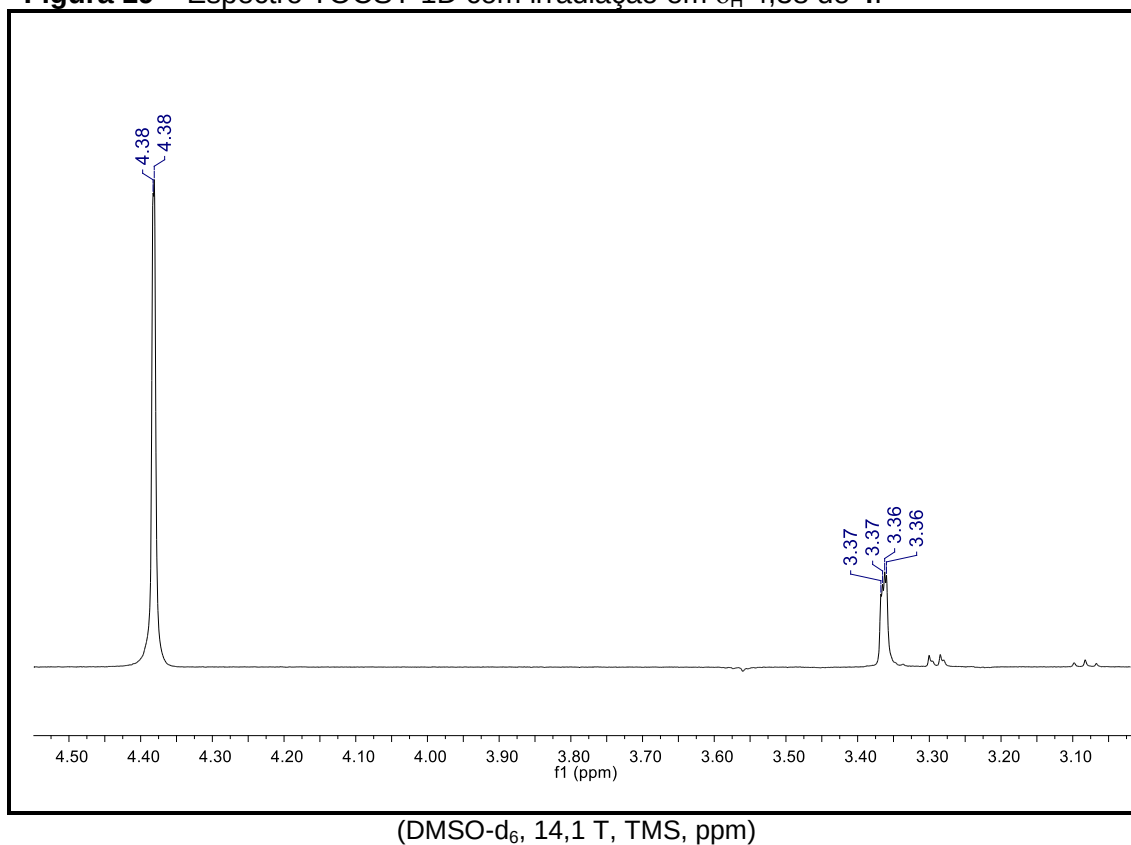
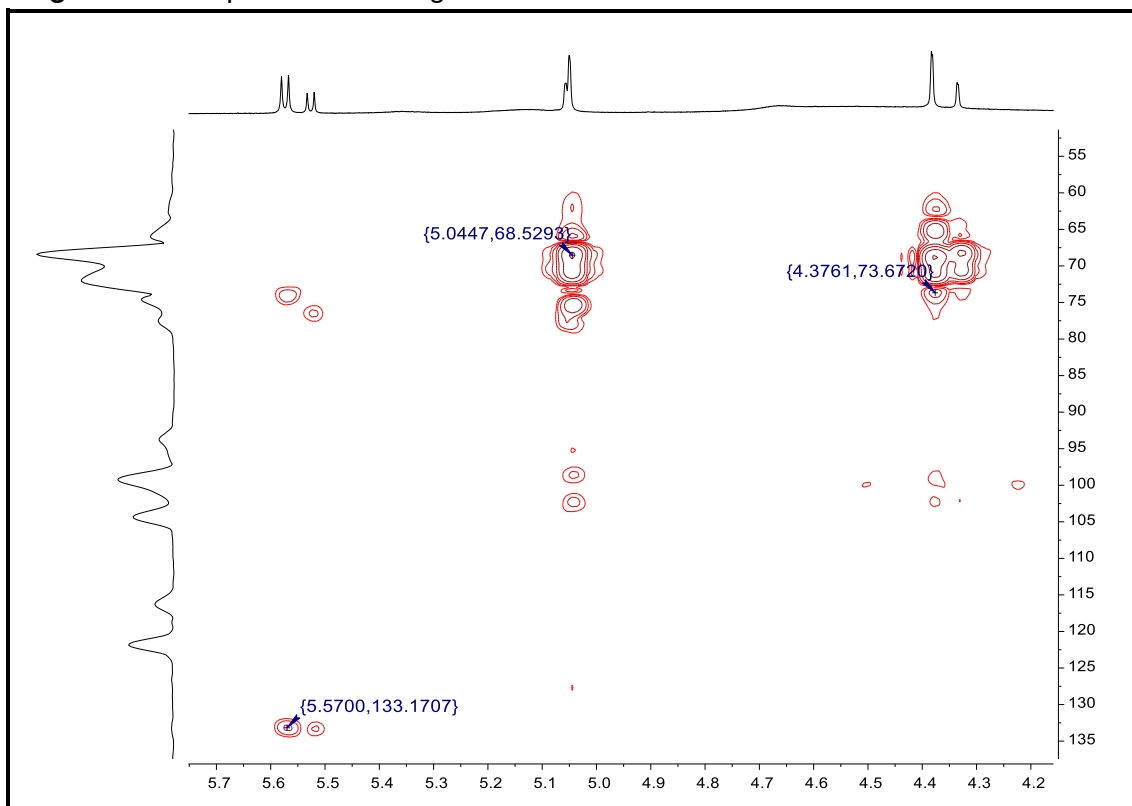
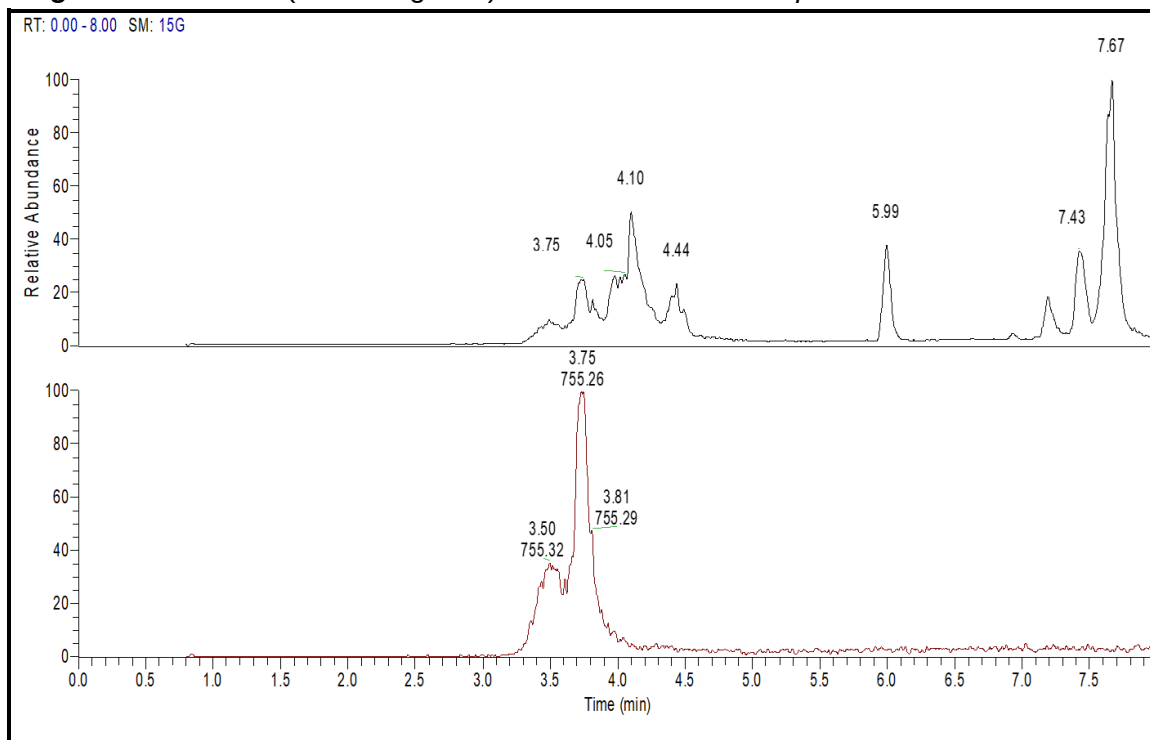


Figura 20 – Mapa de contorno gHMBC de **4**.

(DMSO- d_6 , 14,1 T, TMS, ppm, expansão na região (f1) δ_H 4,40 a δ_H 6,00 e (f2) δ_C 60a δ_C 140)

Por outro lado, para determinar as posições dos açúcares ligados à aglicona, foi analisada uma expansão do mapa de contorno gHMBC (Figura 20), onde mostram-se as correlações a longa distância ($^2J - ^3J$). O sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,57 (H-1''gal) com o carbono em δ_C 133,2 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,05 (H-1''') com o carbono em δ_C 68,5 (C-6'') da galactose. No entanto o hidrogênio anomérico em δ_H 4,38 (H-1''') com o carbono em δ_C 73,7 (C-2'') da galactose indicando que as duas unidades de ramnose encontram-se ligadas à galactose pelas posições 2'' e 6'', respectivamente (Figura 20).

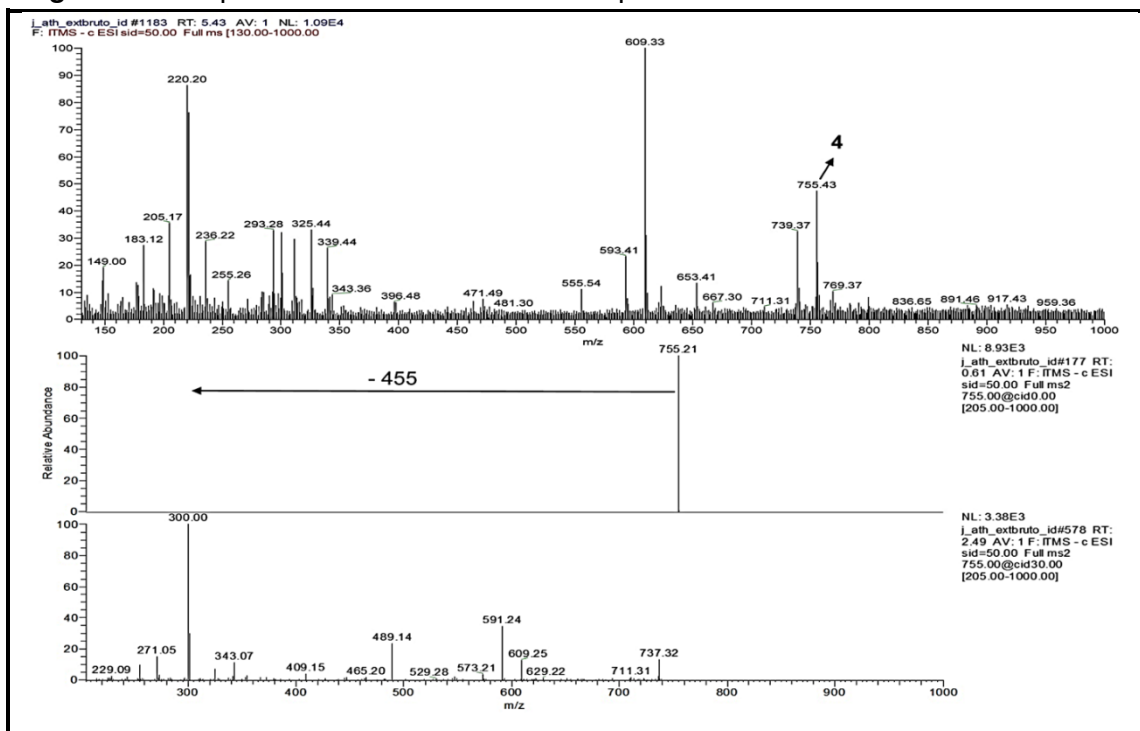
O experimento de LC-MS, modo negativo, confirmou a mistura de isômeros, com tempos de retenção em $t_R = 3,52$ min e $t_R = 3,75$ min. (Figura 21).

Figura 21 – LC-MS (modo negativo) do extrato de *J. aethiopica*. Íon extraído m/z 755.

Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental (Seção 3.2)

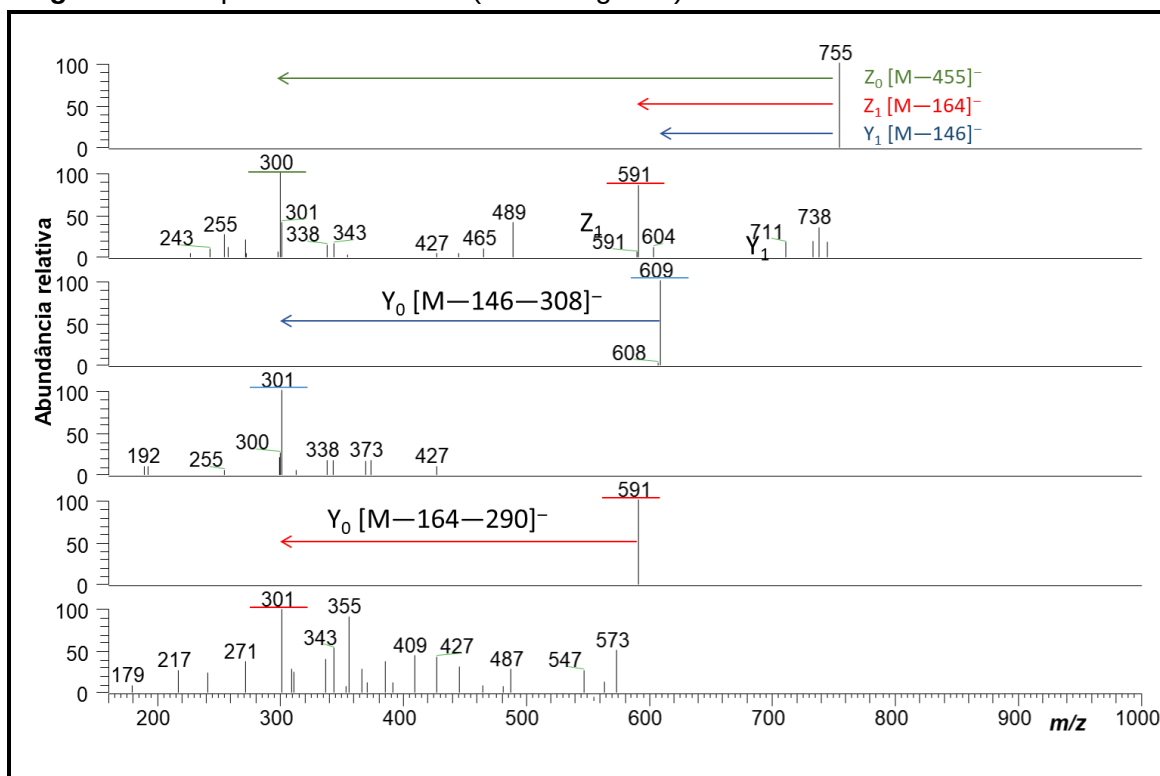
A análise do espectro de massas de ESI-MS/MS (modo negativo) para o íon m/z 755,43 (cald. m/z 755,66) (substância **4**) mostrou um padrão de fragmentação característico de derivados da quercetina glicosilados. O espectro de massas ESI-MS/MS do íon precursor mostrou um íon produto em m/z 300 $[M-455-H]^-$, que foi atribuído à clivagem homolítica das unidades de açúcares ligadas ao núcleo do flavonoide, resultando no ânion radical da aglicona $[Y_0-H]^-$ (ENGELS et al., 2012). Pelo padrão de fragmentação foi possível observar a perda neutra consecutiva de 146 e 162 Da o que confirmou às unidades de deoxihexose e hexose como os glicosídeos dessa substância (Figura 22 – 23).

Figura 22 – Espectros de massas obtidos do pico de m/z 755 substância 4.



Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.2)

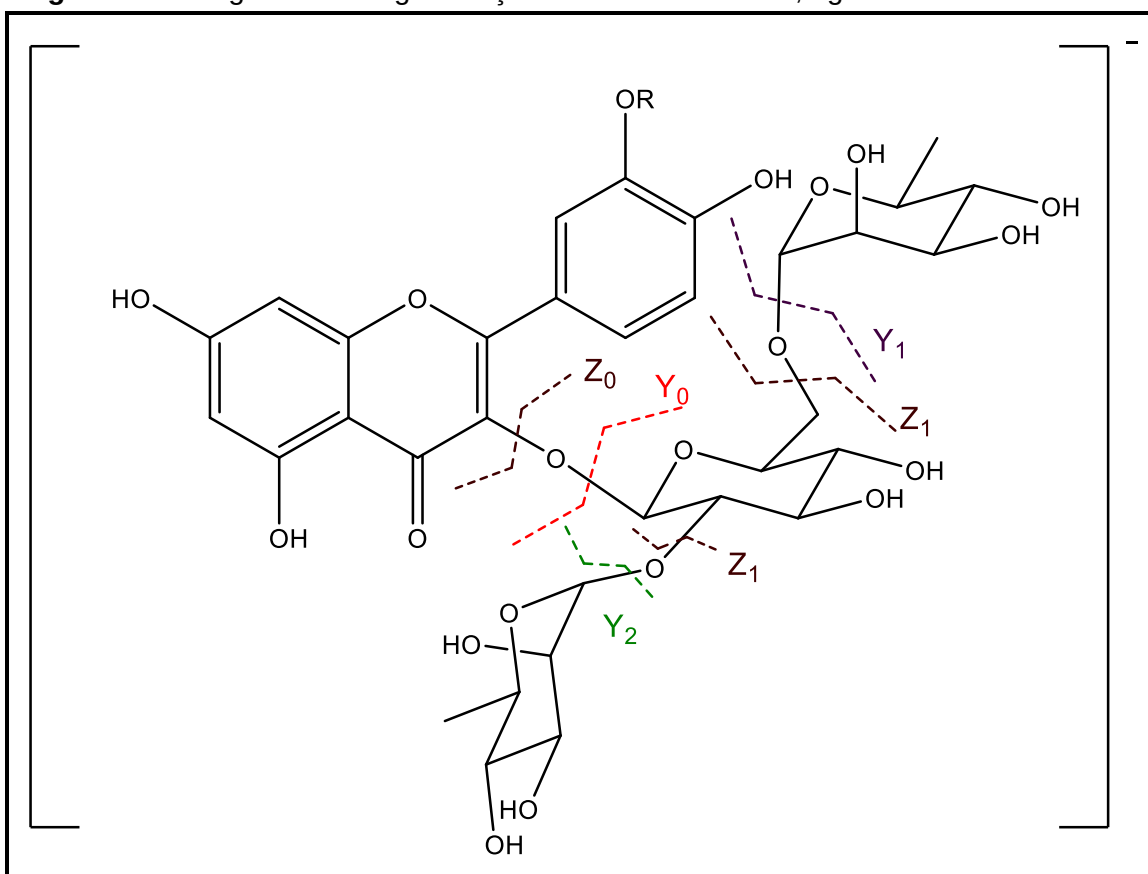
Figura 23 – Espectro ESI-MS/MS (modo negativo) de 4.



Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental (Seção 3.2)

Na Figura 23, é apresentado o espectro ESI-MS/MS (modo negativo) para a substância **4**. O padrão de fragmentação corroborou com a hipótese dos açúcares ligados devido à presença do íon Z_1 , segundo o diagrama da Figura 24 (VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Figura 24 – Diagrama de fragmentação de flavonóis 3-*O-di, triglicosídeos*.



Adaptado de VUKICS; GUTTMAN, 2010.

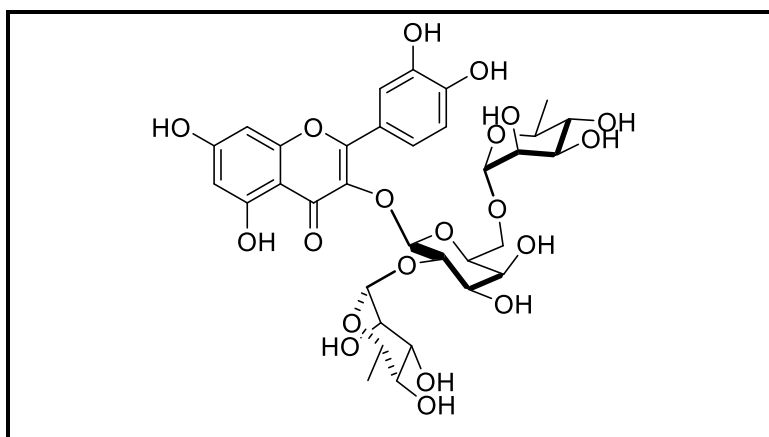
Segundo VUKICS e GUTTMAN (2010), uma característica que permite identificar e diferenciar flavonoides *O-diglicosídeos* de seus isômeros *di-O-glicosídeos*, é pelo padrão de fragmentação MS/MS das substâncias. Quando aplicada uma baixa ou meia energia no processo de fragmentação, observa-se como resultado uma clivagem heterolítica da ligação do *hemi-acetal* (O – C) (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004; ABLAJAN et al., 2006).

Outro fato interessante, é identificar as interligações glicosídicas. Quando existe a presença de ligações 1→2, foi definido uma alta abundância relativa dos íons Y_1^- e/ou Z_1^- (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004). Nesse caso, no espectro MS/MS do íon de m/z 755 da substância **4**, observa-se o íon de m/z 591 $[M-H-164]^-$, identificado

como o fragmento Z_1^- (100% abundância relativa) corroborando a hipótese da ligação 1→2 entre a ramnose e a galactose nessa substância (**4**). Por outro lado, ABLAJAN et al., (2006) demonstraram a presença do íon $[Y_0-H]^-$ com uma alta abundância relativa (~100%) também característica dos flavonoides *O*-diglicosídeos e observado para a substância **4** no íon em m/z 300.

Com todos os dados analisados e pela comparação com dados da literatura (KITE et al., 2011) foi confirmada a estrutura da substância **4** como sendo a quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo [(2"→1")- α -L-ramnopiranosil-[(6"→1''')- α -L-ramnopiranosil]] (Figura 25). Essa substância está sendo reportada pela primeira vez para a espécie *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018).

Figura 25 – Estrutura do flavonoide **4**.

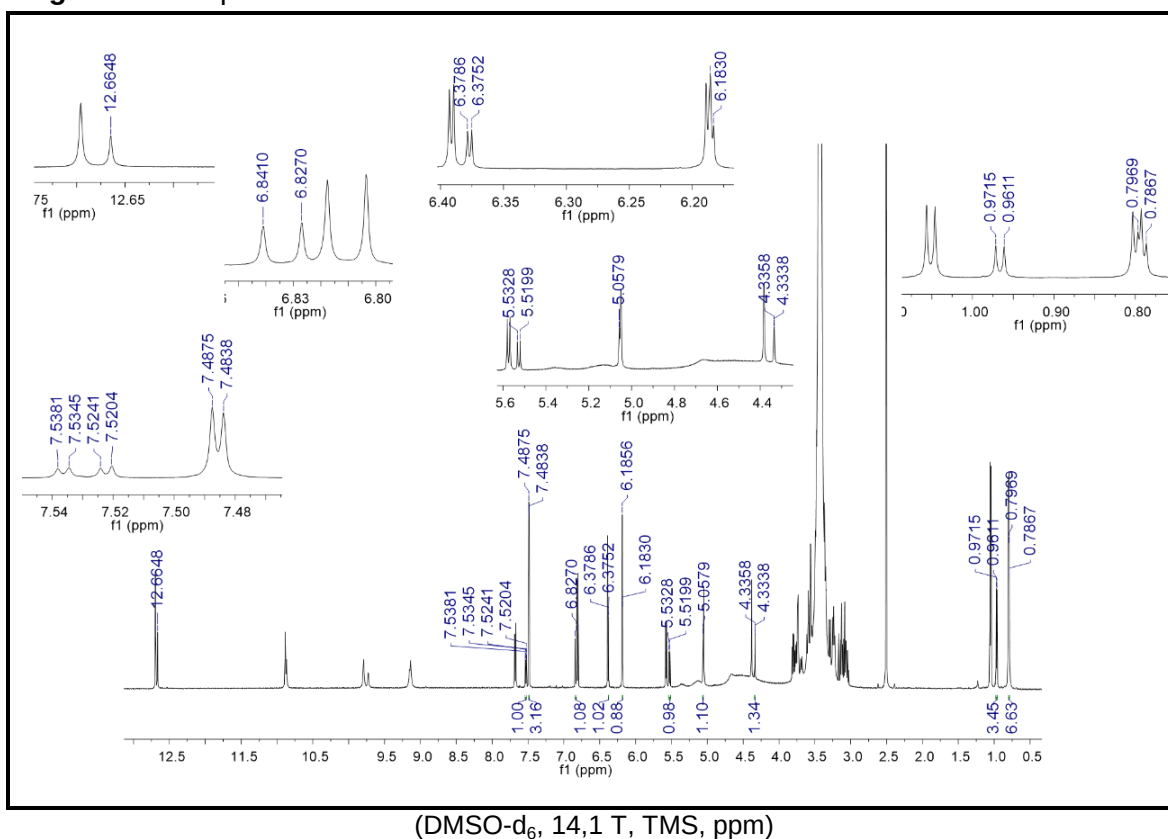


4.2.2.2 Identificação da substância **5**.

Como observado no espectro de RMN de 1H de **4** (Figura 14, Pagina 65), evidenciou-se a presença de uma mistura das substâncias com sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de flavonoides derivados da quercetina. (HARBORNE, 1996). Dessa mistura pôde-se também identificar a substância **5**. No espectro de RMN de 1H de **5** (Figura 26; Tabelas 6–7, Paginas 99–101); observou-se um sinal em δ_H 12,66 o que sugere que a substância possui a hidroxila C-5 quelada à carbonila C-4. Sinais em δ_H 7,53 (1H; dd, $J = 2,2; 8,4$ Hz), em δ_H 7,48 (1H; d; $J = 2,2$ Hz) e em δ_H 6,83 (1H; d; $J = 8,4$ Hz) foram atribuídos ao H-6' e H-2' e H-5' do anel B. Um duplete em δ_H 6,38 (1H; d; $J = 2,0$ Hz) atribuído ao H-8 acoplado com o duplete H-6, δ_H 6,18 (1H; d; $J = 2,0$ Hz) (HARBORNE, 1996), indicando assim que o anel A está

trissubstituído. Na região entre δ_H 4,00 e δ_H 5,70 foram atribuídos os três H anoméricos em δ_H 5,53 (1H; d; $J = 7,7$ Hz) característico de anomérico com uma configuração β . Outros sinais em δ_H 5,06 (1H; d; $J = 0,8$ Hz) e δ_H 4,33 (1H; d; $J = 1,2$ Hz) sugerem a presença de anoméricos com uma configuração α . Os demais sinais de hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares, foram observados entre δ_H 3,00 e δ_H 4,00. Devido a sobreposição de sinais dos dois compostos, além do sinal do solvente, os deslocamentos químicos foram atribuídos com ajuda dos espectros *g*HSQC e *g*HMBC (Figuras 27 e 28, respectivamente).

Figura 26 – Espectro RMN 1H de 5.



Os deslocamentos químicos em δ_H 0,97 (3H; d; $J = 6,2$) e δ_H 0,79 (3H; d; $J = 6,1$), foram atribuídos a dois grupos metila, sendo possível propor que o flavonoide apresenta açúcares do tipo deoxihexose (Tabelas 6–7, Páginas 99–101) (HARBORNE, 1996). Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos a partir dos espectros *g*HSQC (Figura 27) e *g*HMBC (Figura 28).

Figura 27 – Mapa de contorno gHSQC de 5.

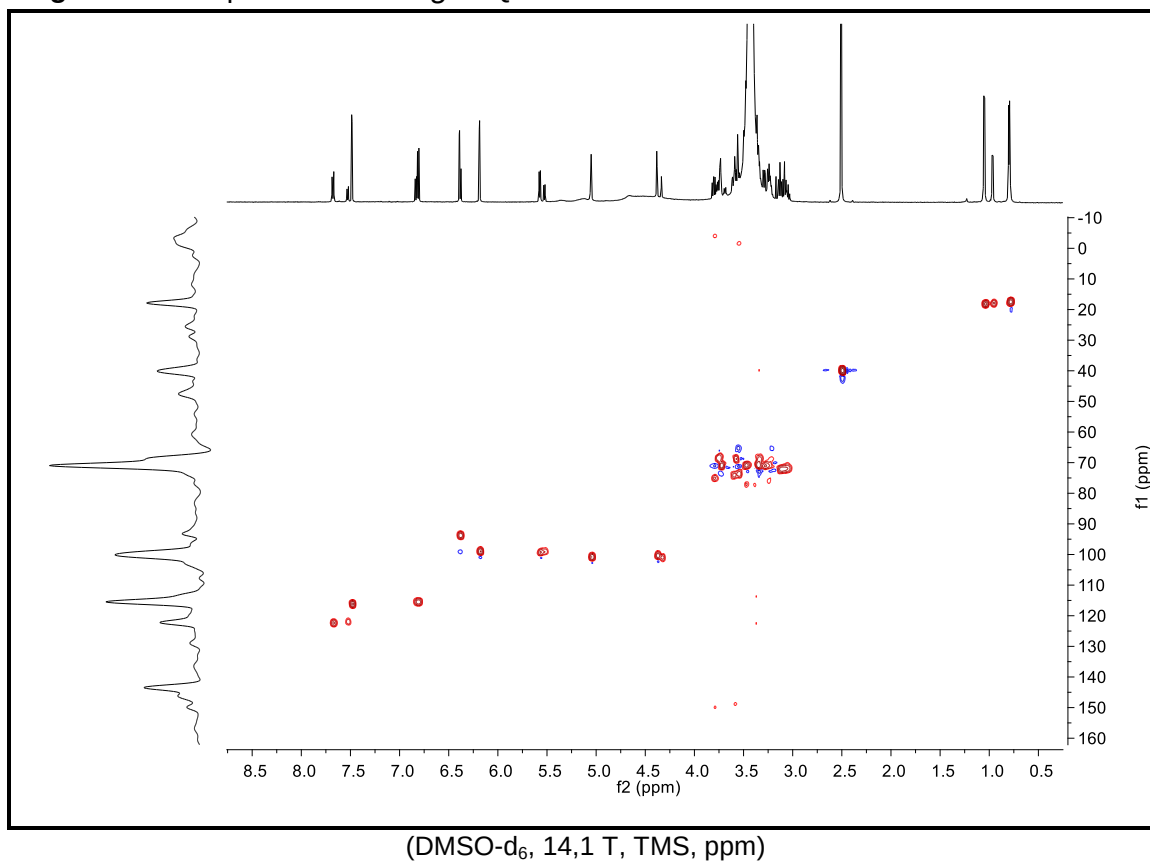


Figura 28 – Mapa de contorno gHMBC de 5.

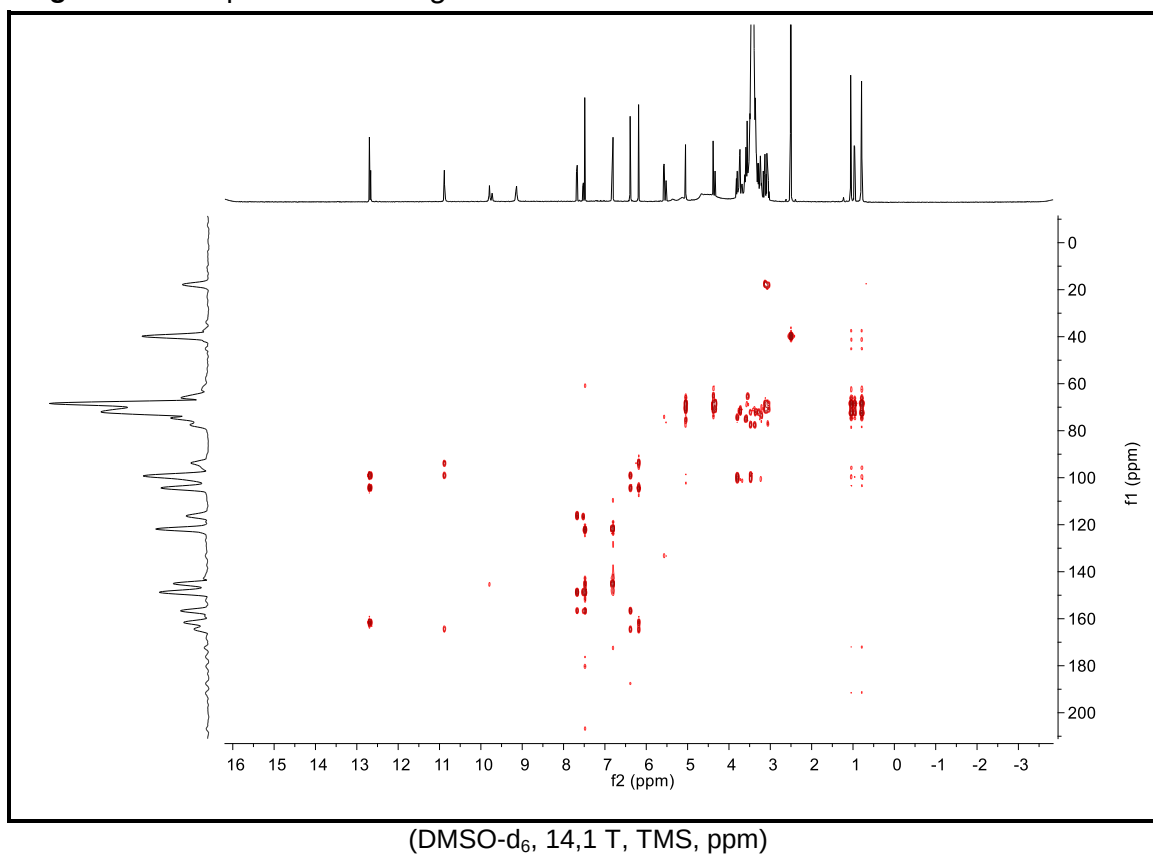


Figura 29 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,53 de **5**.

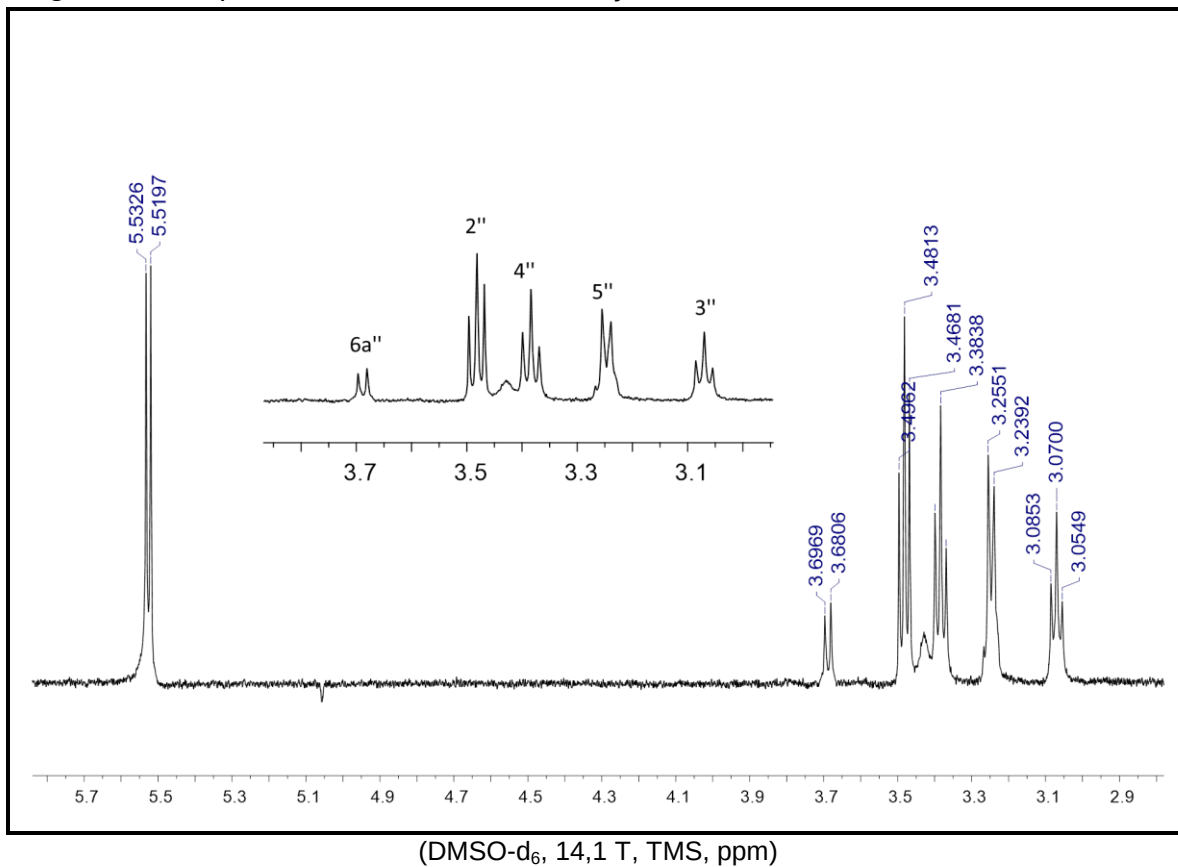


Figura 30 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,06 de **5**.

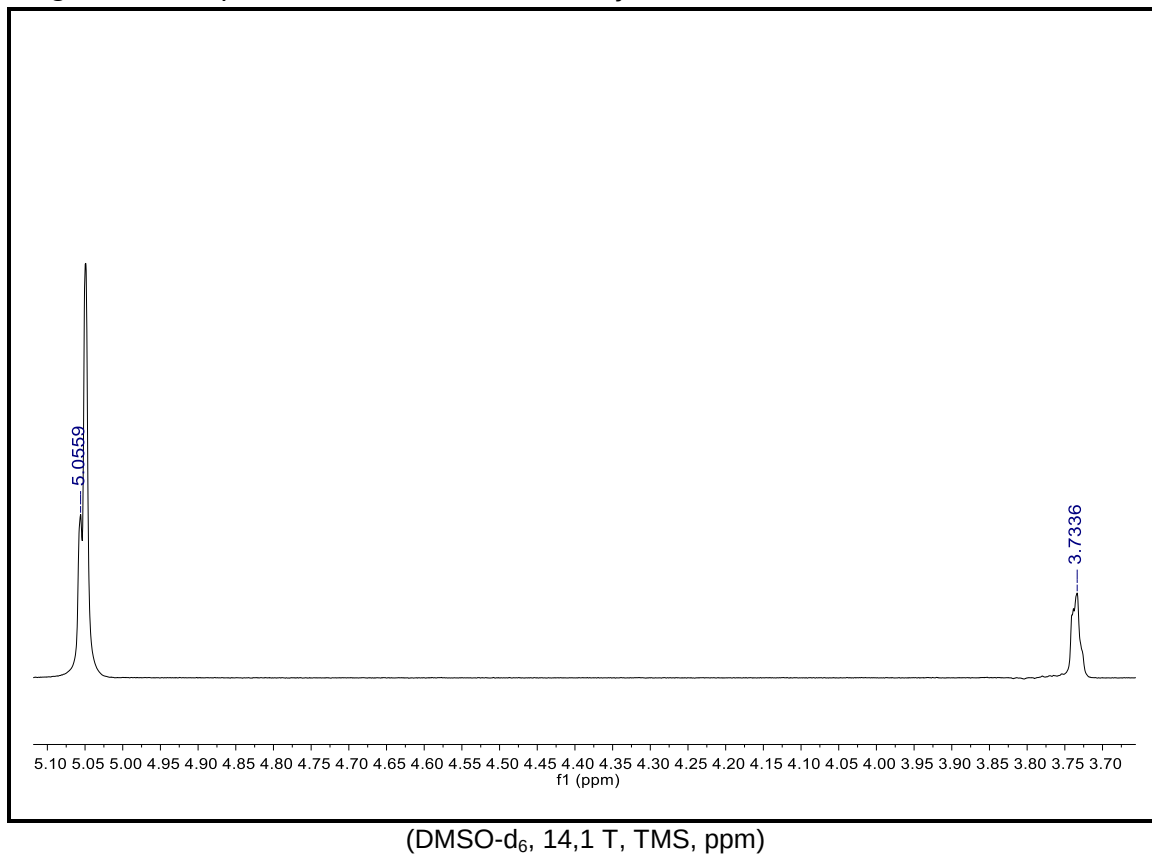
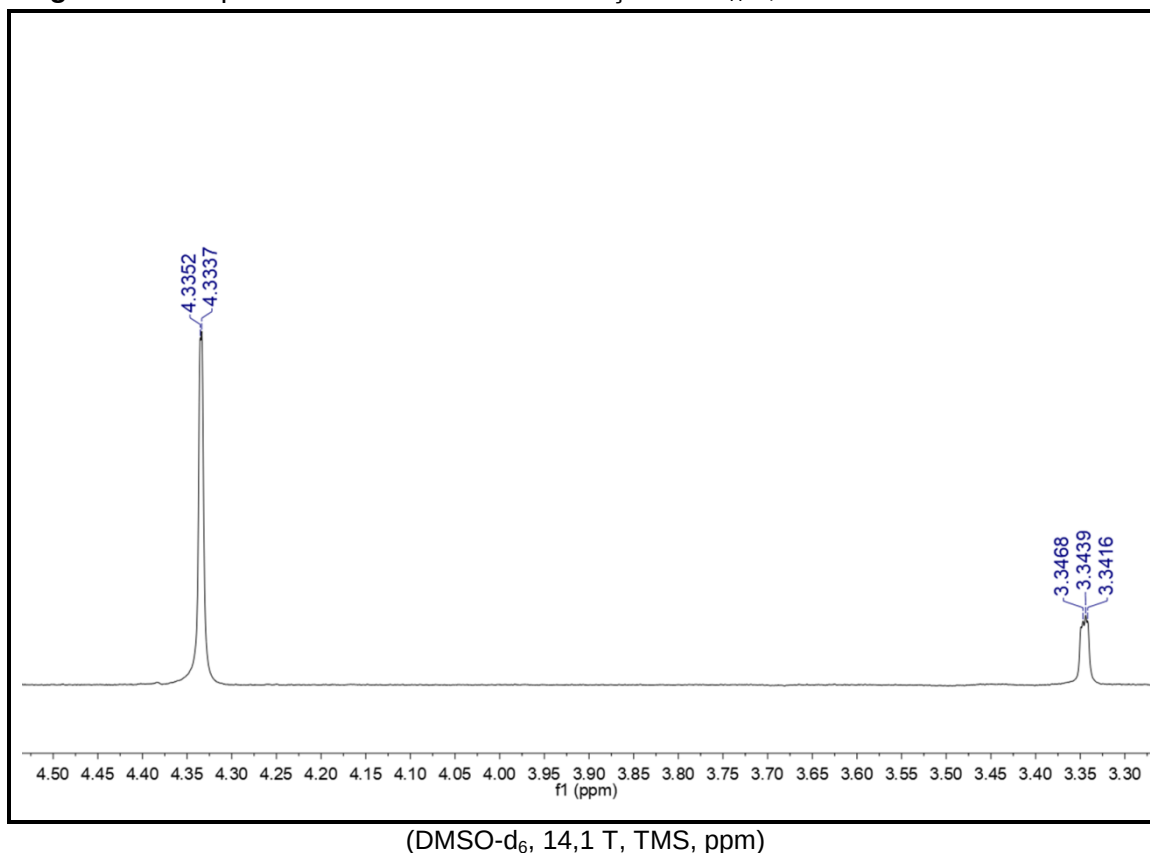
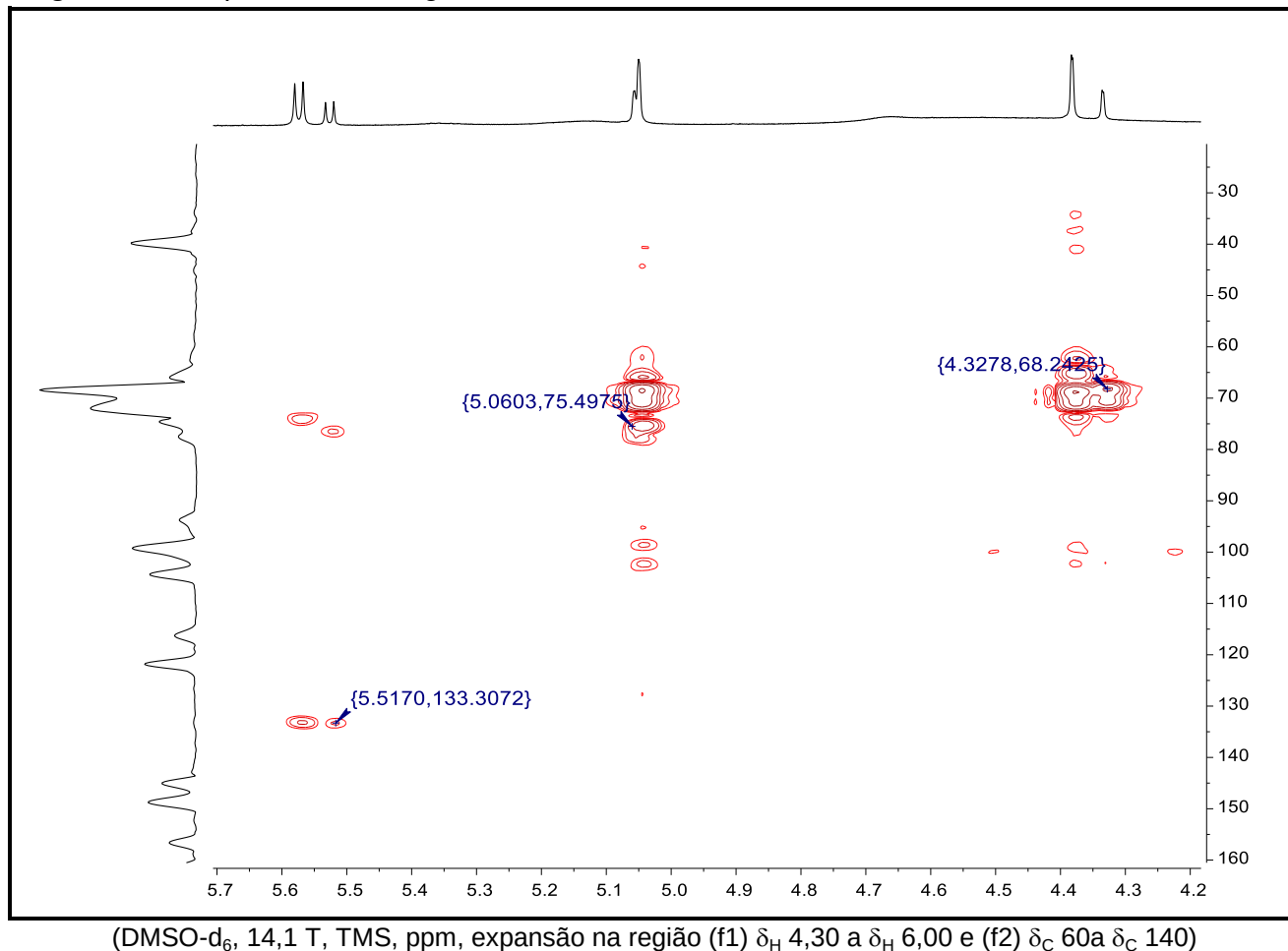


Figura 31 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,33 de **5**.

A natureza dos açúcares foi determinada através dos experimentos TOCSY 1D, onde irradiou-se cada um dos hidrogênios anoméricos e foi confirmado o sistema de spins de cada unidade de açúcar. Esses experimentos possibilitaram atribuí-los a uma unidade de glicose e duas de ramnose (Figuras 29–31, Páginas 75–76). Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C foram atribuídos a partir dos mapas de contorno *gHSQC* e *gHMBC* (Figuras 27 e 28, Página 73, respectivamente; Tabelas 6–7, Páginas 99–101).

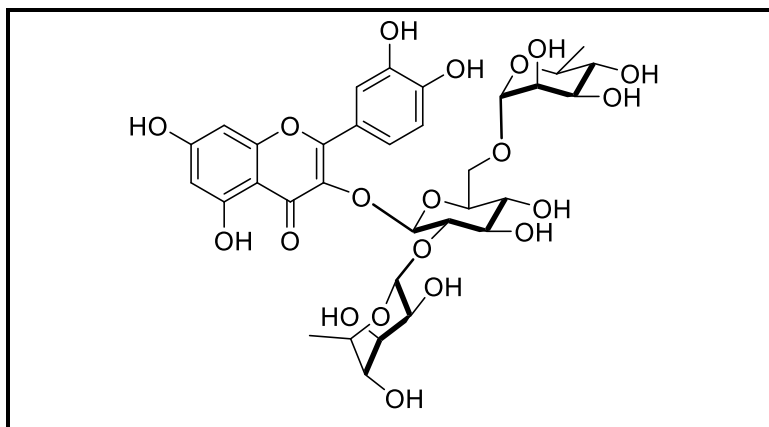
Para determinar as posições dos açúcares na aglicona, foi analisada a expansão do mapa de contorno *gHMBC* (Figura 32), onde verificou-se as correlações a longa distância ($^2J - ^3J$). O sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,53 (H-1"glc) com o carbono em δ_C 133,3 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,06 (H-1''') com o carbono em δ_C 75,5 (C-2'') da glicose. No entanto o hidrogênio anomérico em δ_H 4,33 (H-1''') com o carbono em δ_C 68,2 (C-6'') da glicose, indica que as duas unidades de ramnose encontram-se unidas à glicose pelas posições 2'' e 6'', respectivamente.

Figura 32 – Mapa de contorno gHMBC de **5**.



Comparação com dados da literatura (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003) confirmou a estrutura do composto **5** como sendo a quercetina 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo (2''→1''')-α-L-ramnopiranosil-[(6''→1''')-α-L-ramnopiranosil]) (Figura 33).

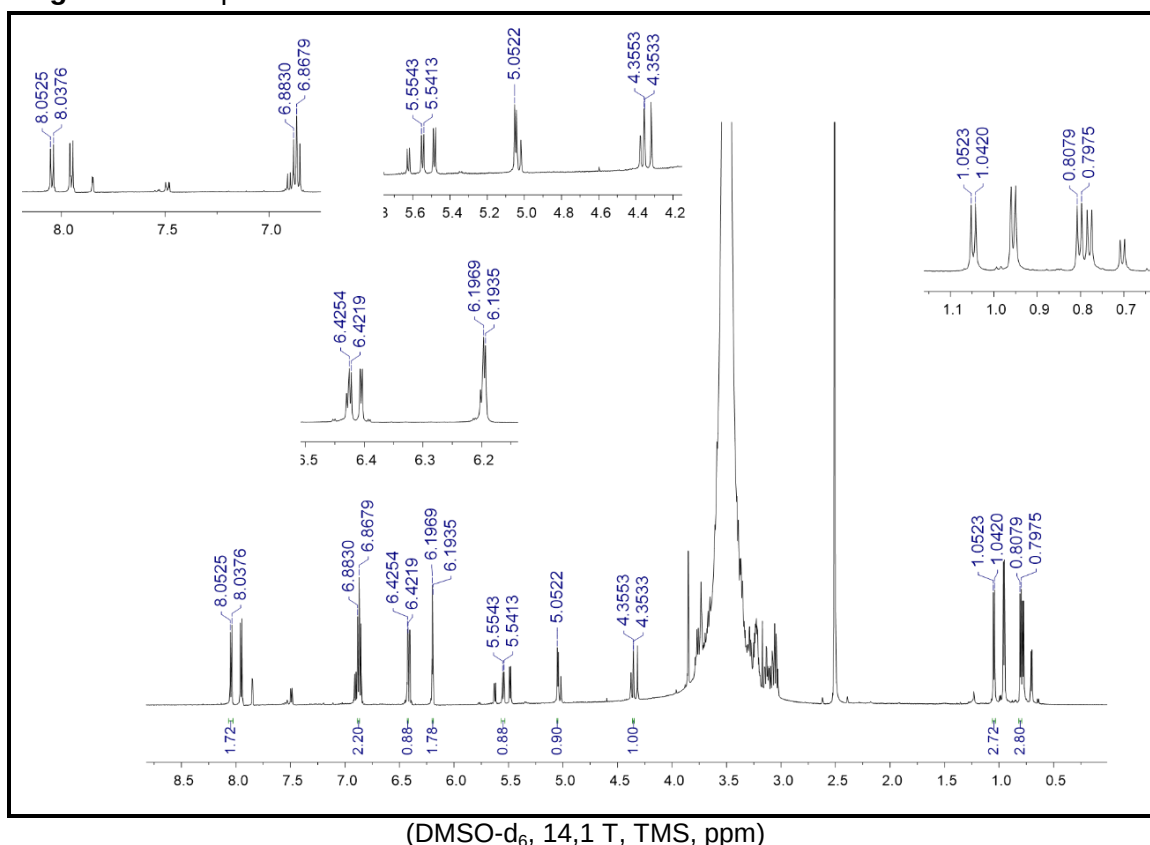
Figura 33 – Estrutura do flavonoide **5**.



4.2.2.3 Identificação de **6**.

No espectro de RMN de ^1H da substância **6** também observa-se uma mistura de isômeros (Figura 34; Tabelas 6–7, Páginas 99–101). Os sinais de deslocamentos químicos observados na região de hidrogênios aromáticos são característicos de flavonoides derivados do canferol. Entre δ_{H} 12,60 e δ_{H} 12,70 são evidentes sinais característicos da hidroxila ligadas ao C-5 queladas com a carbonila do C-4. O sinal em δ_{H} 8,04 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) acopla com o sinal em δ_{H} 6,86 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) e foram atribuídos ao H-2' - H-6' e H-3' - H-5' do anel B. Por outro lado, o duplete em δ_{H} 6,40 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) correspondente com o H-8, acopla com o H-6 em δ_{H} 6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) (HARBORNE, 1996), indicando assim que o anel A está trissubstituído.

Figura 34 – Espectro RMN ^1H de **6**.



Entre δ_H 4 e δ_H 5,7 encontram-se vários sinais de H anoméricos em δ_H 5,55 (1H; d; $J = 7,8$ Hz) sugerindo configuração β . Outros sinais em δ_H 5,05 (1H; s) e em δ_H 4,35 (1H; d; $J = 1,2$ Hz) sugerindo duas unidades glicosiladas com configuração α , unido à presença de dois sinais em δ_H 1,05 (3H; d; $J = 6,2$ Hz) e em δ_H 0,80 (3H; d; $J = 6,2$ Hz) correspondentes a duas metilas, permitiu propor um flavonoide com dois açúcares do tipo deoxihexose. Os demais sinais de hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares, foram observados entre δ_H 3,00 e δ_H 4,00. Os deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C foram atribuídos com ajuda dos espectros *g*HSQC (Figuras 35) e *g*HMBC (Figura 36).

Figura 35 – Mapa de contorno *g*HSQC de 6.

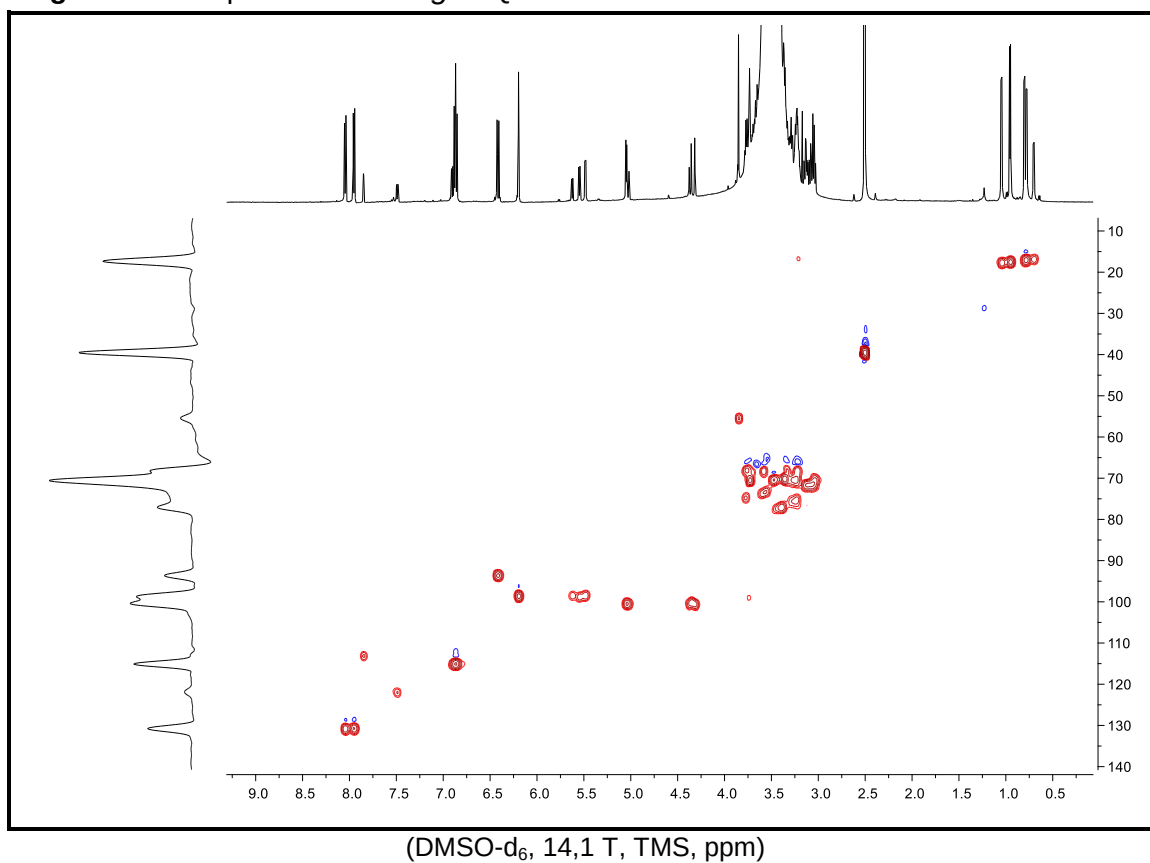
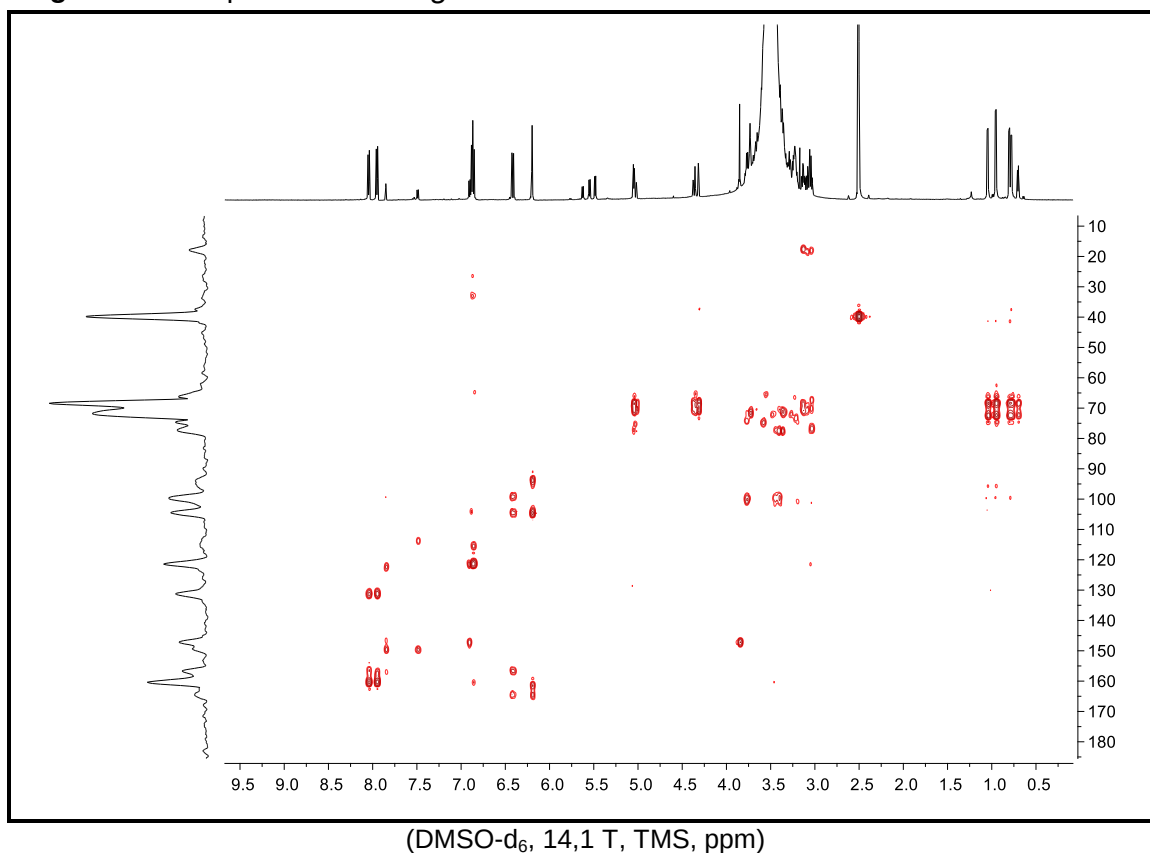


Figura 36 – Mapa de contorno gHMBC de 6.



Através dos experimentos TOCSY 1D foi determinada a natureza dos açúcares. Irradiou-se cada um dos hidrogênios anoméricos e foi confirmado o sistema de spins de cada unidade de glicosídica. Esses experimentos fizeram possíveis atribuí-los a uma unidade de galactose e duas de ramnose (Figuras 37 – 40).

As posições dos açúcares na aglicona, foi determinado analisando a expansão do mapa de contorno gHMBC (Figura 41), onde pode-se observar as correlações a longa distância ($^2J - ^3J$). O sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,55 (H-1"gal) com o carbono em δ_{C} 132,7 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,05 (H-1''') com o carbono em δ_{C} 77,3 (C-4'') da galactose. No entanto o hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,35 (H-1''') com o carbono em δ_{C} 65,3 (C-6'') da galactose, indicando que as duas unidades de ramnose encontram-se unidas à galactose pelas posições 4'' e 6'', respectivamente.

Figura 37 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,55 de **6**.

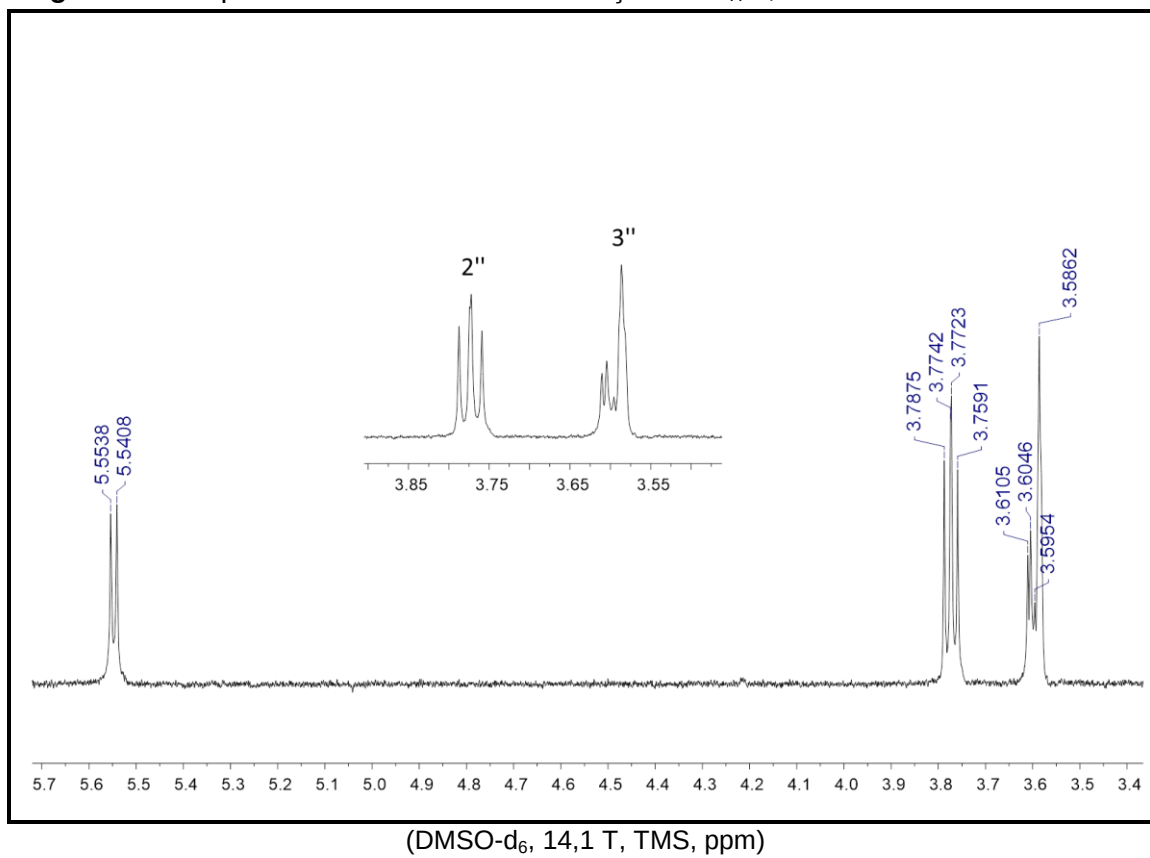


Figura 38 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,05 de **6**.

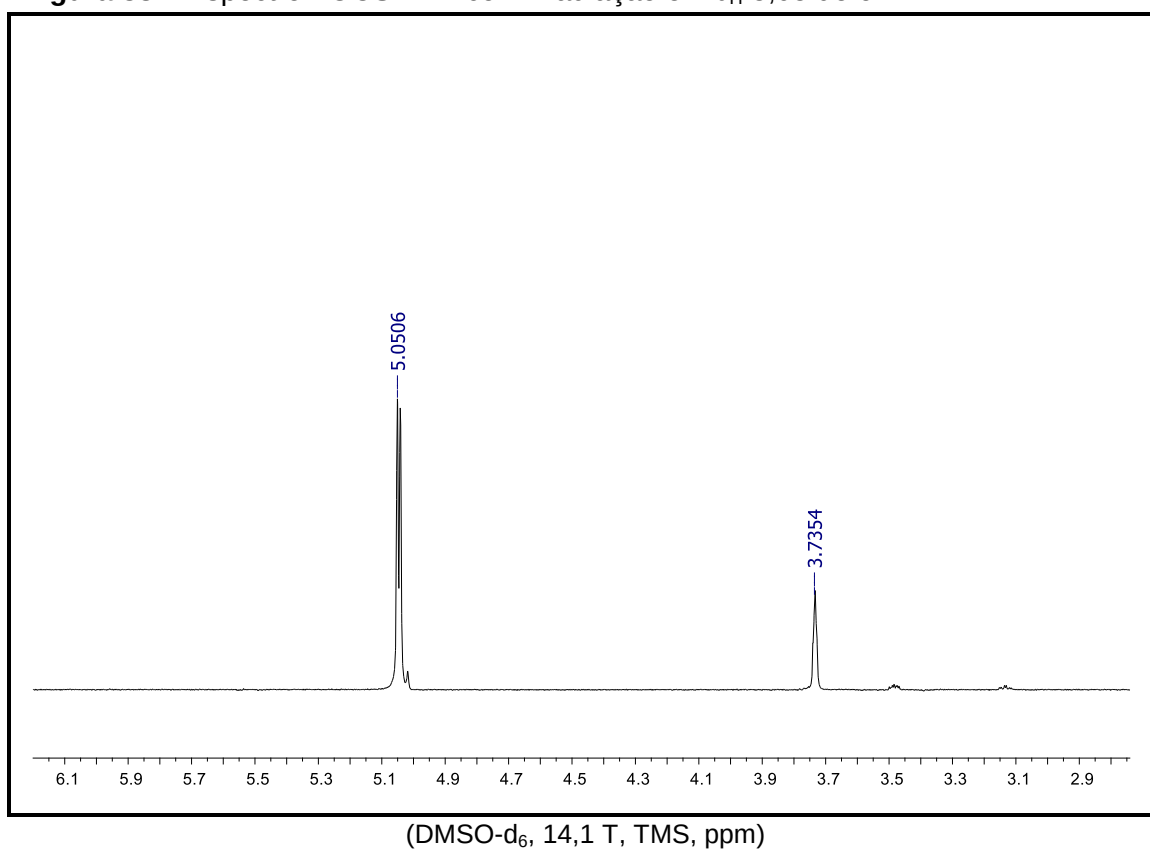


Figura 39 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 0,80 de **6**.

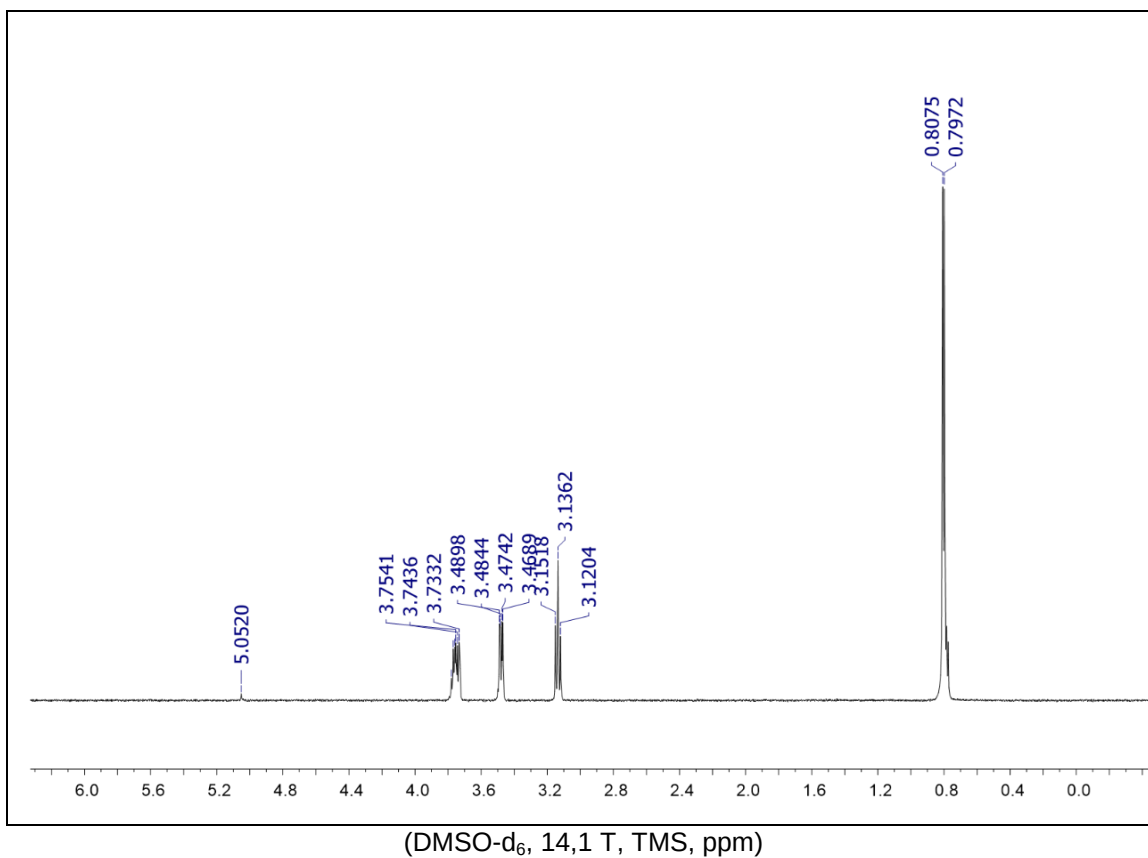


Figura 40 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,35 de **6**.

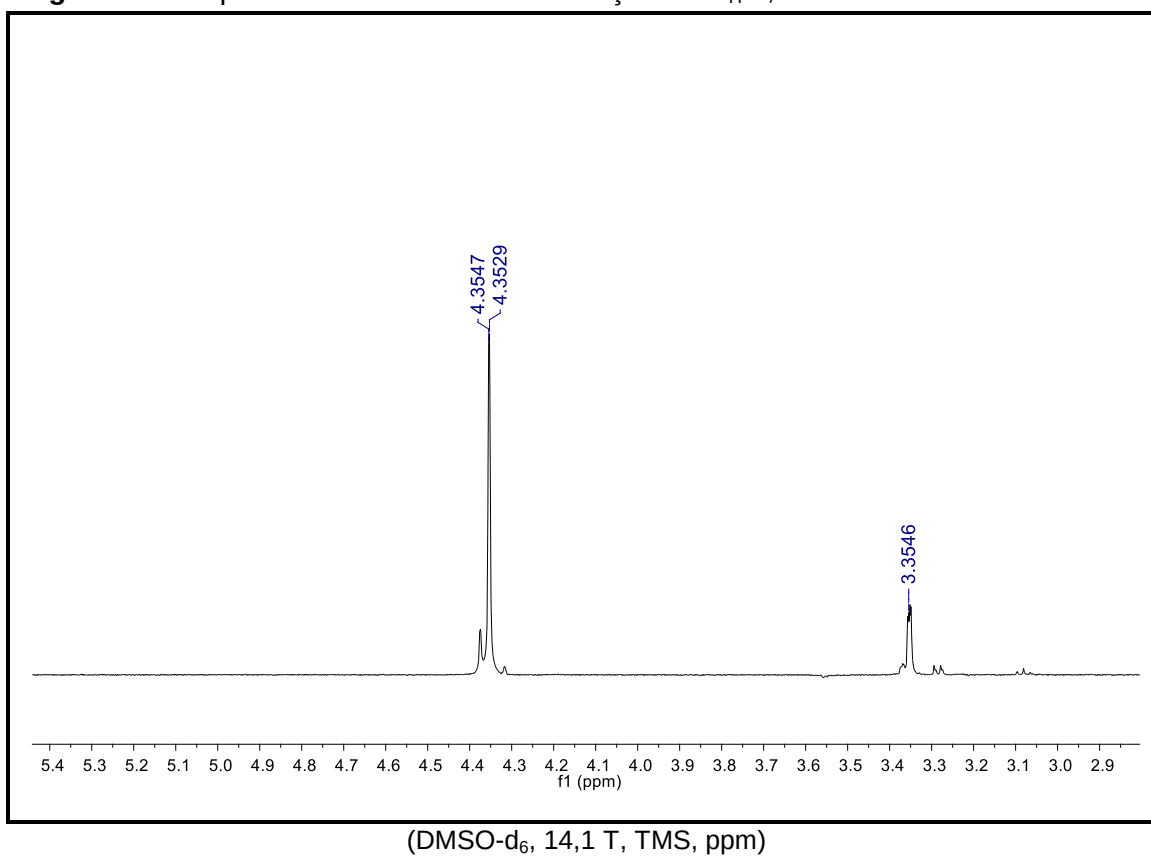
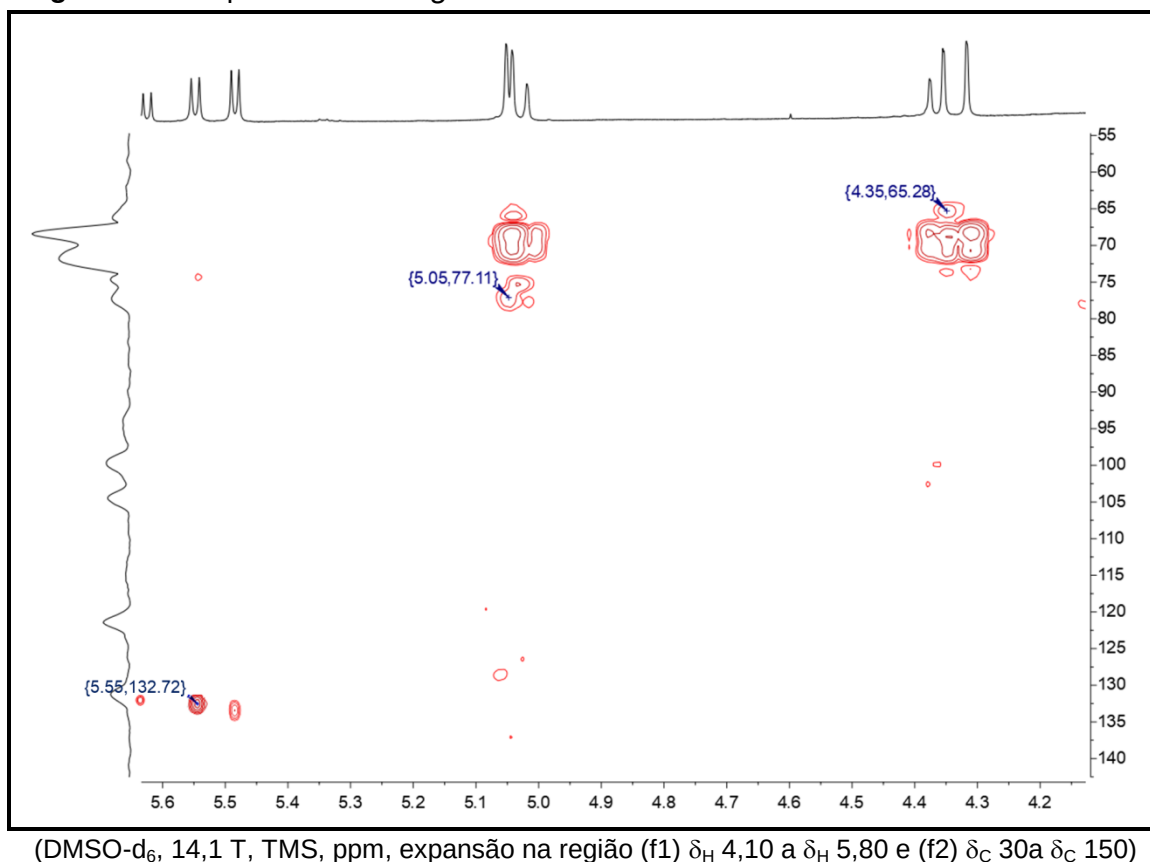
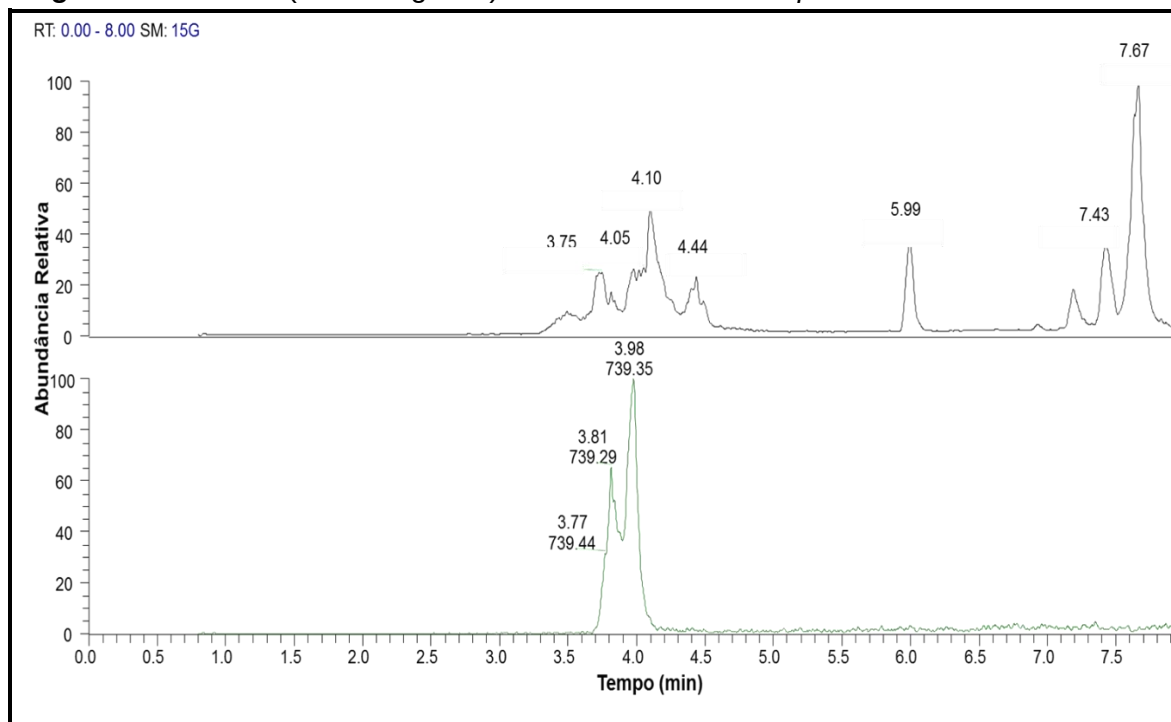


Figura 41 – Mapa de contorno gHMBC de **6**.

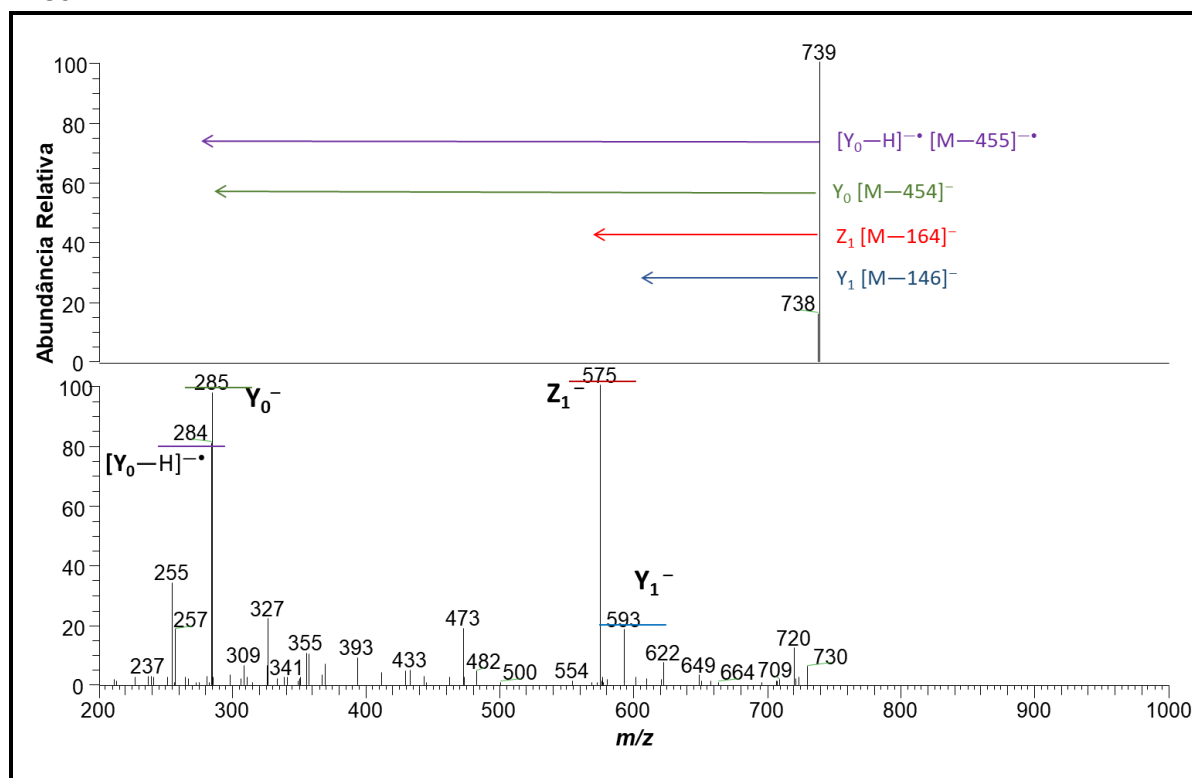
Com o objetivo de identificar a estrutura da substância isolada, o experimento de LC-MS modo negativo (Figura 42), confirmou a massa de dois isômeros, com tempos de retenção em $t_R = 3,81$ min e $t_R = 3,98$ min. Na Figura 43, apresentou-se o espectro de massas de ESI-MS/MS (modo negativo) para o íon m/z 739 (substância **6**) mostrando um padrão de fragmentação de derivado do canferol. O espectro de massas ESI-MS/MS apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 739, $[M-H]^-$ e três fragmentos significativos em m/z 285 $[Y_0]^-$ e em m/z 284 $[Y_0-H]^-$, identificando a aglicona do canferol e m/z 575 $[M-164]^-$ correspondente ao íon Z_1 (VUKICS e GUTTMAN, 2010). O íon em m/z 284 é produto de uma clivagem homolítica via radical da ligação 3-O-glicosídica (ABLAJAN et al., 2006) (Figura 44, Pagina 85).

Figura 42 – LC-MS (modo negativo) do extrato de *J. aethiopica*. Íon extraído m/z 739.



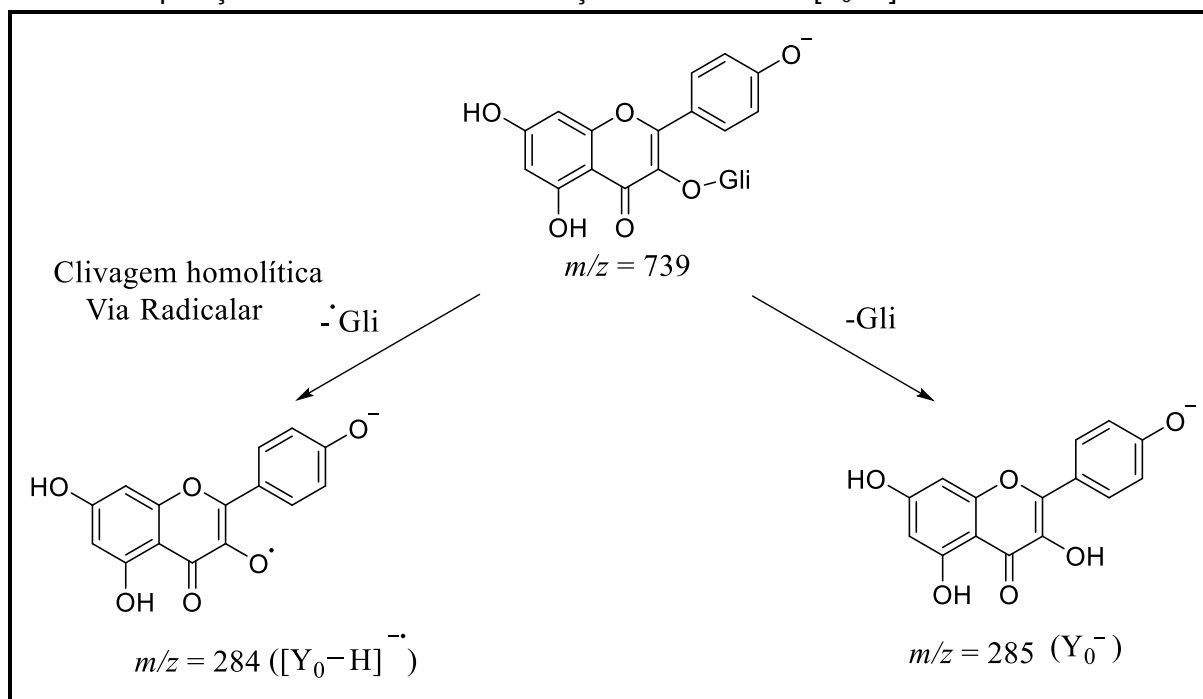
Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental (Seção 3.2)

Figura 43 – ESI-MS/MS (modo negativo) do extrato de *J. aethiopica*. Íon extraído m/z 739.



Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental (Seção 3.2)

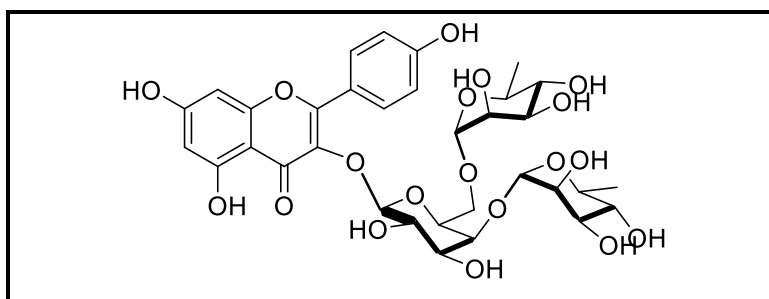
Figura 44 – Diagrama de fragmentação do íon m/z 739 com clivagem homolítica via radical na posição 3-O-Glicosídeo e formação do íon radical $[Y_0-H]^-$.



Adaptado de ABLAJAN et al., 2006.

Esse composto foi isolado da espécie *Jatropha aethiopica*, espécie em estudo do presente trabalho, e descrito pela primeira vez na literatura (GAMIOTEA-TURRO, et al., 2018). A substância **6** foi descrita como canferol 3-O- β -D-galactopiranosídeo (4" $\rightarrow$ 1''')- α -L-ramnopiranosil-[(6" $\rightarrow$ 1''')- α -L-ramnopiranosil] (Figura 45).

Figura 45 – Estrutura do flavonoide **6**.



4.2.2.4 Identificação de **7**.

Como observado no espectro de RMN de ^1H de **6** (Figura 34, Pagina 78), evidenciou-se a presença de uma mistura de isômeros derivados do canferol. Entre δ_{H}

12,60 e δ_H 12,70 foram evidenciadas sinais característicos da hidroxila ligadas ao C-5 queladas com a carbonila do C-4. O sinal em δ_H 7,95 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) acopla com o sinal em δ_H 6,88 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) e foram atribuídos aos H-2' - H-6' e H-3' - H-5' da substância identificada (Figura 46; Tabelas 6–7, Páginas 99–101). Dupletos em δ_H 6,42 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) fez acoplamento com o H-6 em δ_H 6,19 (2H, d, $J = 2,0$ Hz)] (HARBORNE, 1996), sugerindo que o anel A está trissubstituído.

Entre δ_H 4,20 e δ_H 5,60 encontram-se sinais de H anoméricos. Deslocamentos químicos em δ_H 5,48 (1H; d; $J = 7,3$ Hz), em δ_H 5,04 (1H; s) e em δ_H 4,31 (1H; d; $J = 1,1$ Hz) correspondem aos H anoméricos identificados para substância 7. O valor das constantes de acoplamento (J) dos anoméricos sugeriu a configuração β , para a primeira unidade glicosídica e configuração α para as outras duas. Dois sinais em δ_H 0,95 (3H; d; $J = 6,2$ Hz) e em δ_H 0,78 (3H; d; $J = 6,2$ Hz) correspondentes a duas metilas, sugeriu dois açúcares do tipo deoxihexose. Os restantes sinais de hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares foram observados entre δ_H 3,00 e δ_H 4,00. Os deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C foram atribuídos com ajuda dos espectros $gHSQC$ (Figuras 47) e $gHMBC$ (Figura 48) (Tabelas 6–7, Página 99–101).

Figura 46 – Espectro RMN 1H de 7.

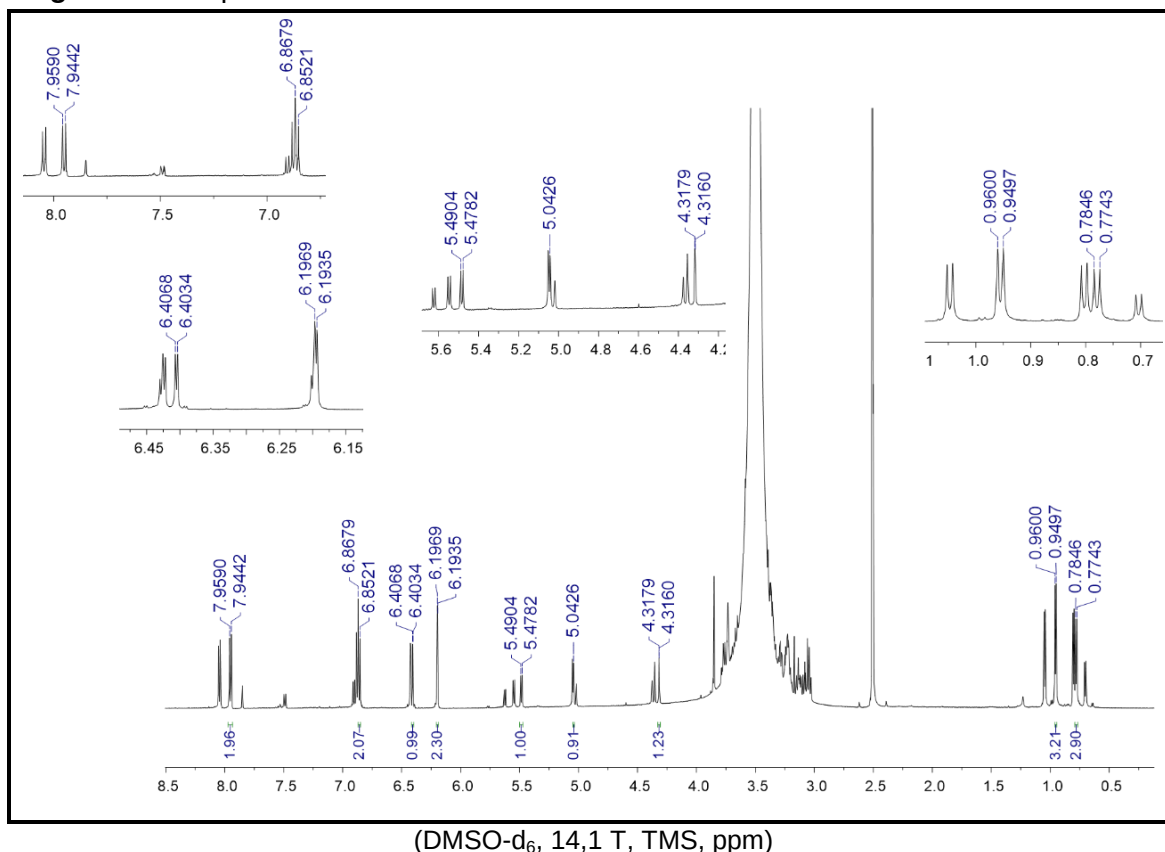


Figura 47 – Mapa de contorno gHSQC de 7.

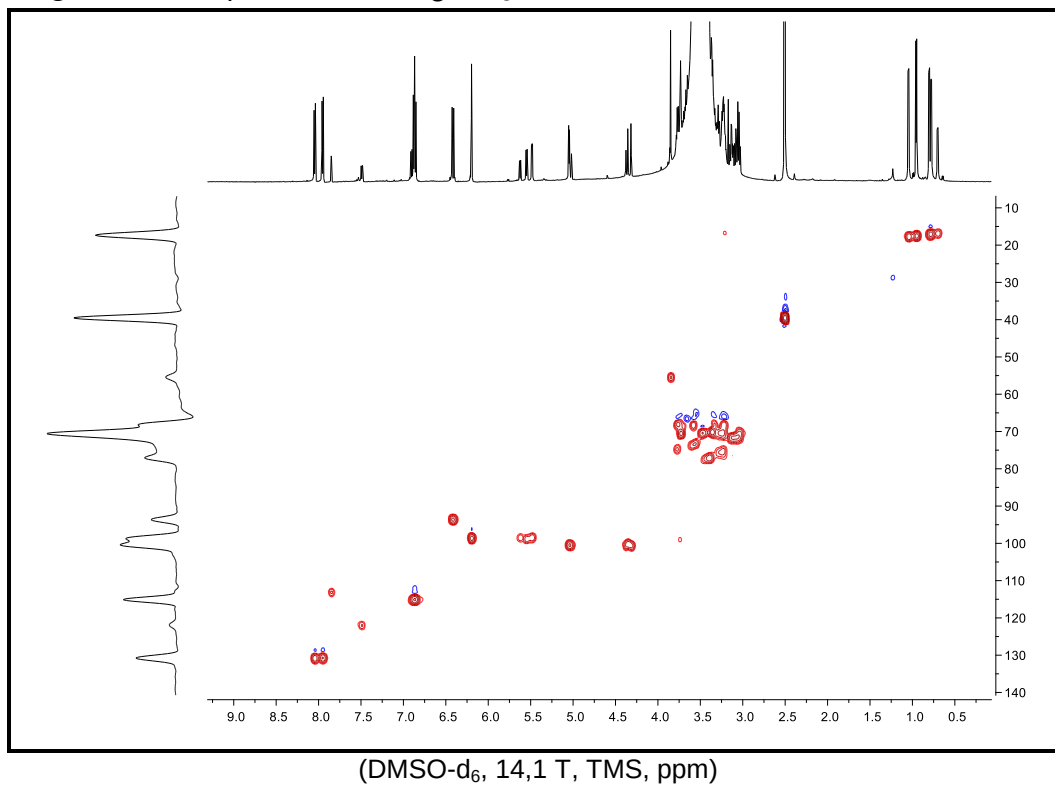


Figura 48 – Mapa de contorno gHMBC de 7.

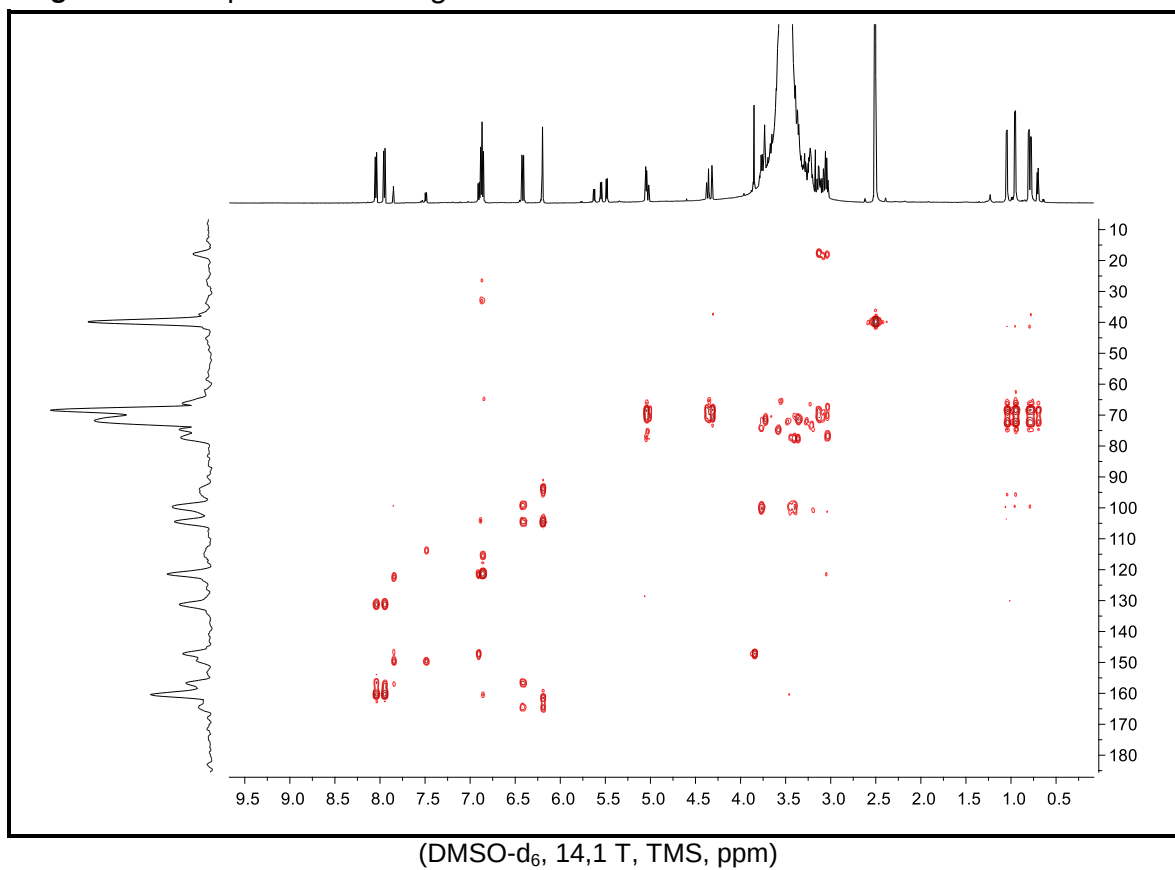


Figura 49 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,48 de **7**.

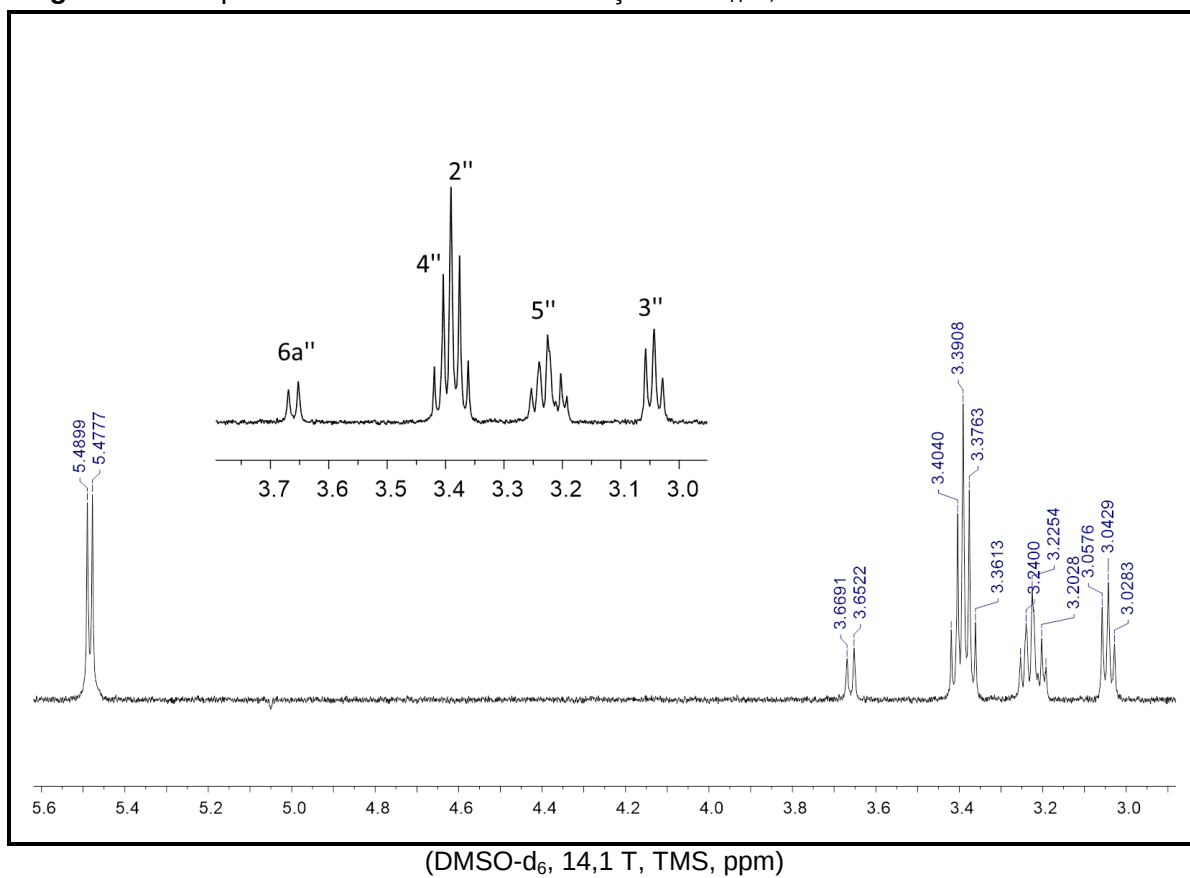


Figura 50 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 5,04 de **7**.

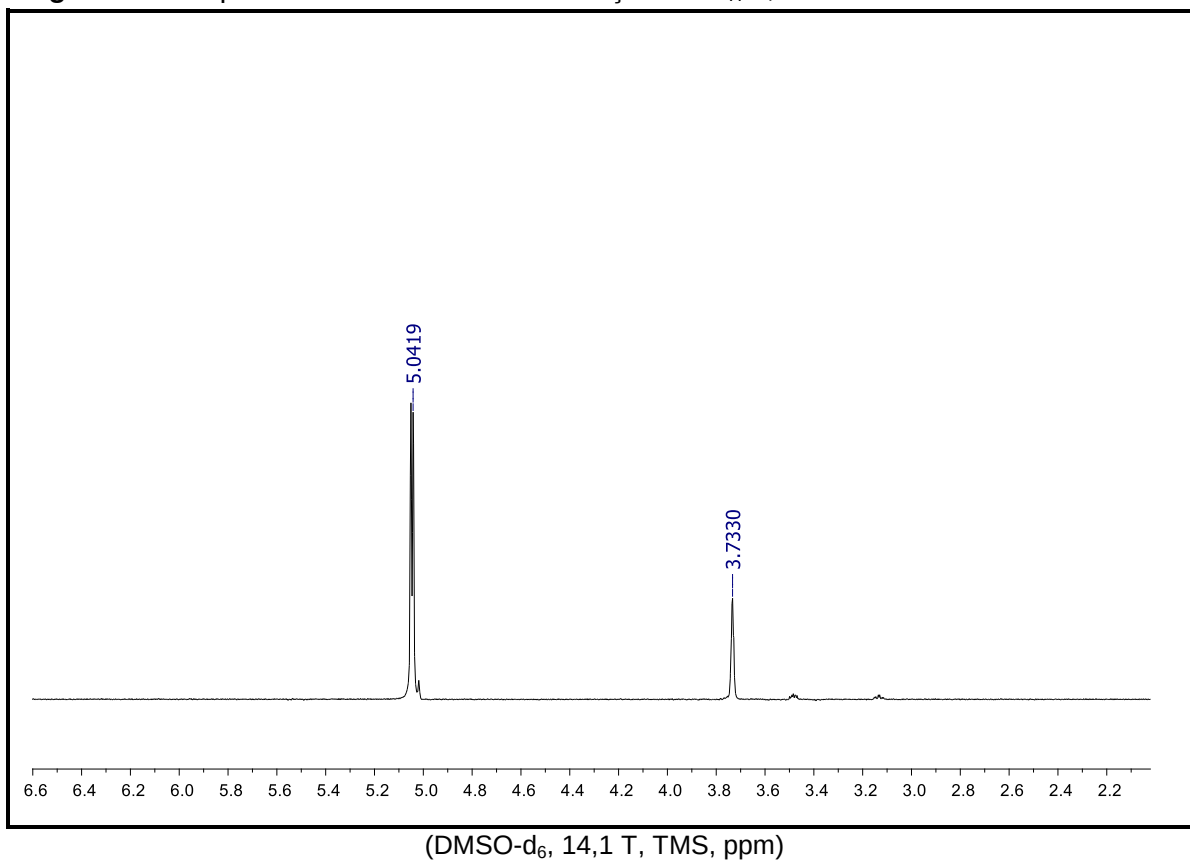


Figura 51 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 0,78 de **7**.

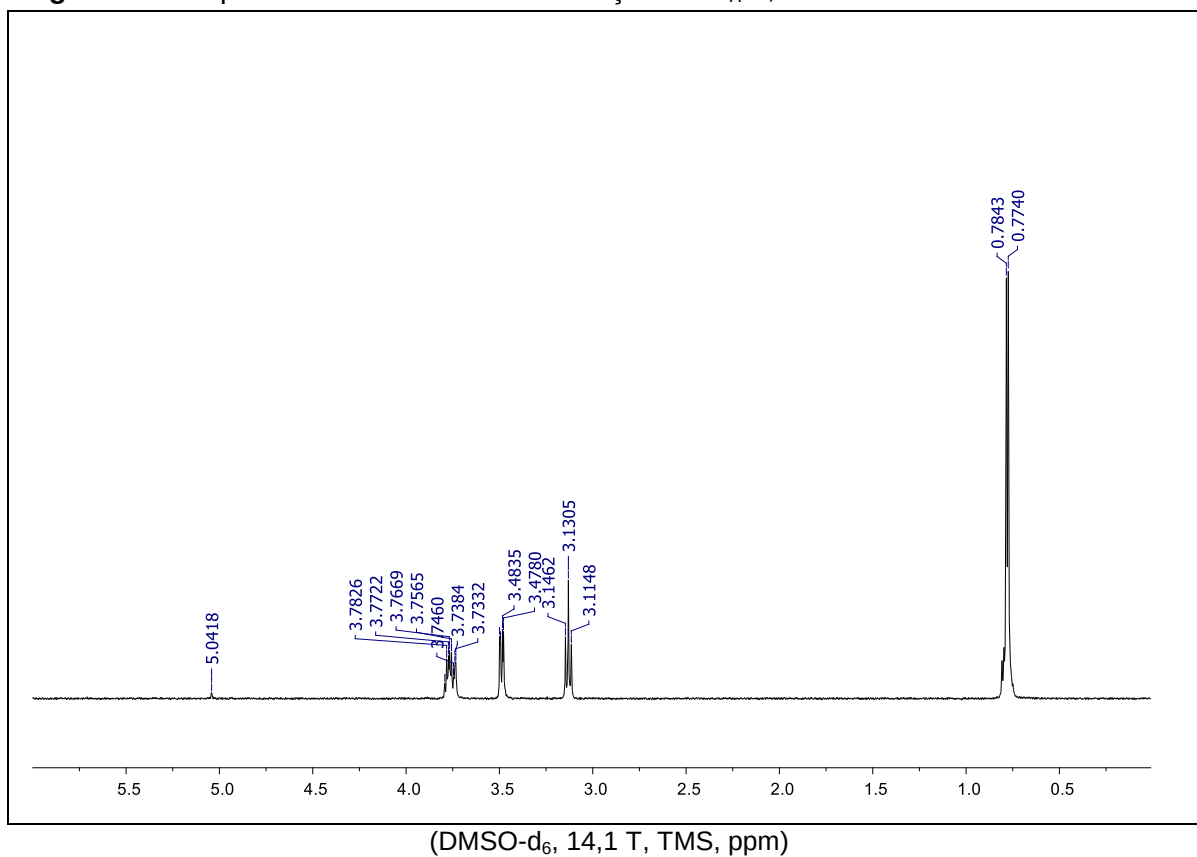
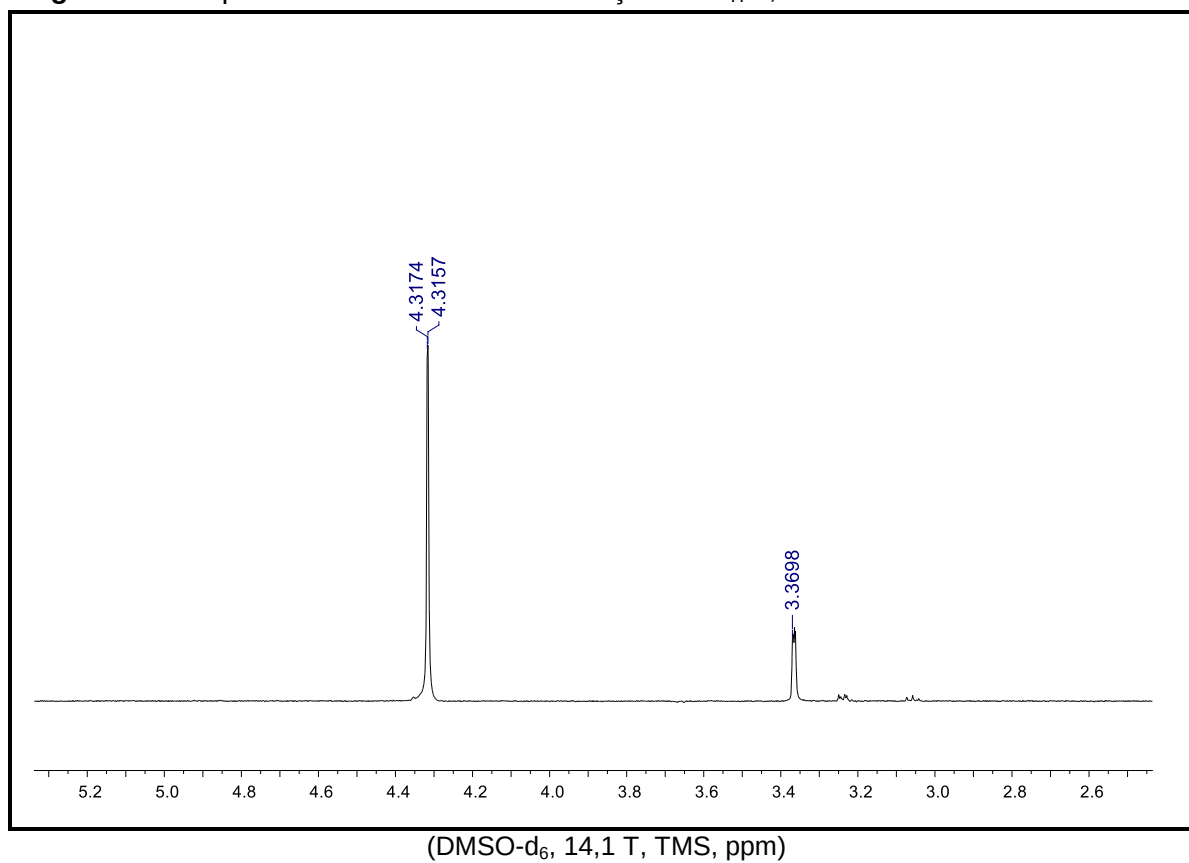


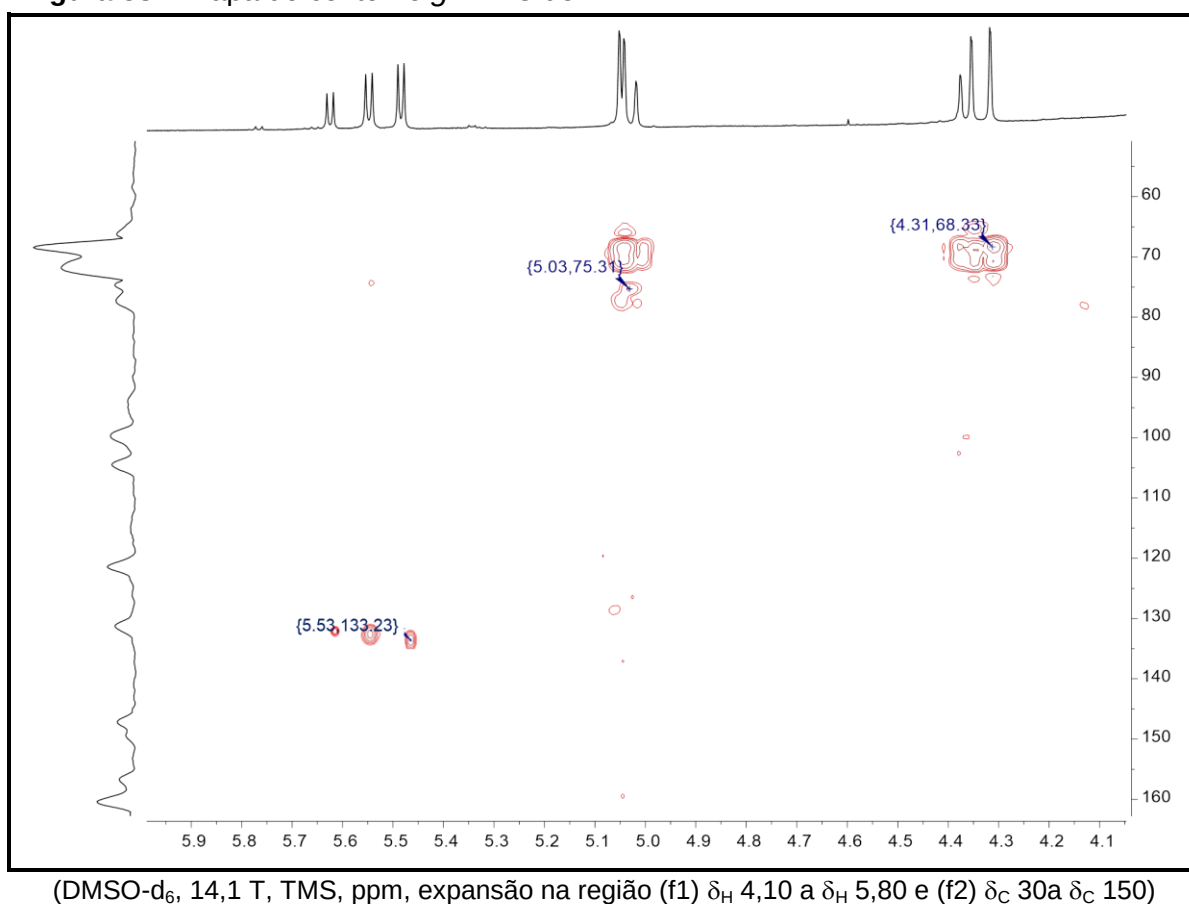
Figura 52 – Espectro TOCSY 1D com irradiação em δ_H 4,31 de **7**.



Através dos experimentos TOCSY 1D determinou-se a natureza dos açúcares irradiando os hidrogênios anoméricos sendo atribuídos a uma unidade de glicose e duas de ramnose (Figuras 49–52).

Na sequência determinou-se as posições dos açúcares na aglicona, através da expansão do espectro *g*HMBC (Figura 53), onde mostram-se as correlações a $^2J - ^3J$. O sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,48 (H-1"glc) com o carbono em δ_C 133,2 (C-3), e entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,04 (H-1''') com o carbono em δ_C 75,3 (C-2'') da galactose. No entanto o hidrogênio anomérico em δ_H 4,31 (H-1''') com o carbono em δ_C 68,3 (C-6'') da glicose, indicando que as duas unidades de ramnose encontram-se unidas à glicose pelas posições 2'' e 6'', respectivamente.

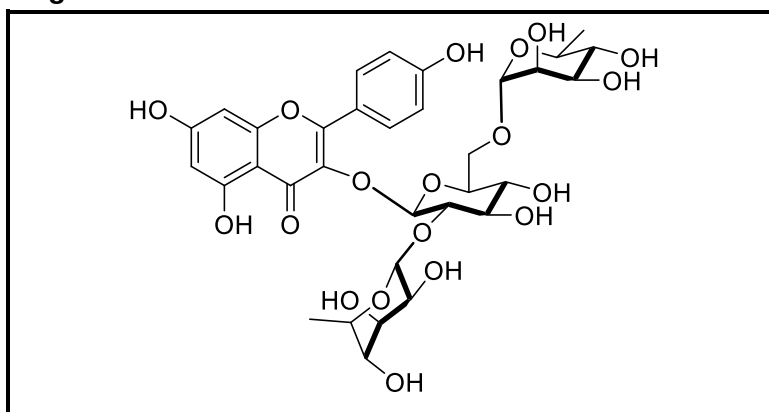
Figura 53 – Mapa de contorno *g*HMBC de **7**.



(DMSO- d_6 , 14,1 T, TMS, ppm, expansão na região (f1) δ_H 4,10 a δ_H 5,80 e (f2) δ_C 30a δ_C 150)

A substância **7** foi descrita como canferol 3-O- β -D-galactopiranosídeo (2'' $\rightarrow$ 1''')- α -L-ramnopiranosil-[(6'' $\rightarrow$ 1''')- α -L-ramnopiranosil] (Figura 54) (KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003).

Figura 54 – Estrutura do flavonoide 7.



4.2.2.5 Identificação de **8**

No espectro de RMN de ^1H de **8** (Figura 55, Tabelas 6–7, Páginas 99–101), observa-se sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. O sinal em δ_{H} 7,55 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) apresenta um hidrogênio com acoplamento em *meta* que foi atribuído ao H-2'; outro sinal indicando o acoplamento dos hidrogênios em *orto/meta* em δ_{H} 7,53 (1H, dd, $J = 2,2; 8,3$ Hz) ao H-6' e o sinal de deslocamento químico em δ_{H} 6,84 (1H, d, $J = 8,3$ Hz) referente ao acoplamento em *orto* do H-5'. Dois dupletos com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,39 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) indicam hidrogênios *meta*-acoplados atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6 do anel A do flavonoide, confirmando a aglicona da quercetina. Os sinais em δ_{H} 5,35 (1H, d, $J = 7,4$ Hz) e δ_{H} 4,38 (1H, d, $J = 1,1$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos sugerindo que o composto possui dois glicosídeos. A constante de acoplamento do sinal em δ_{H} 5,35 ($J = 7,4$ Hz) indica uma configuração β para o açúcar (HARBORNE, 1996) e o sinal em δ_{H} 4,38 ($J = 1,1$ Hz) com configuração α , característica da ramnose. Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C foram atribuídos a partir dos experimentos de mapa de contorno *g*HSQC e *g*HMBC (Figuras 56 e 57, respectivamente). Fazendo uma comparação com padrões presentes no laboratório, foi possível identificar a substância **8** como quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")- β -D-glucopiranoside (rutina) (Figura 58).

Figura 55 – Espectro RMN ^1H de **8**.

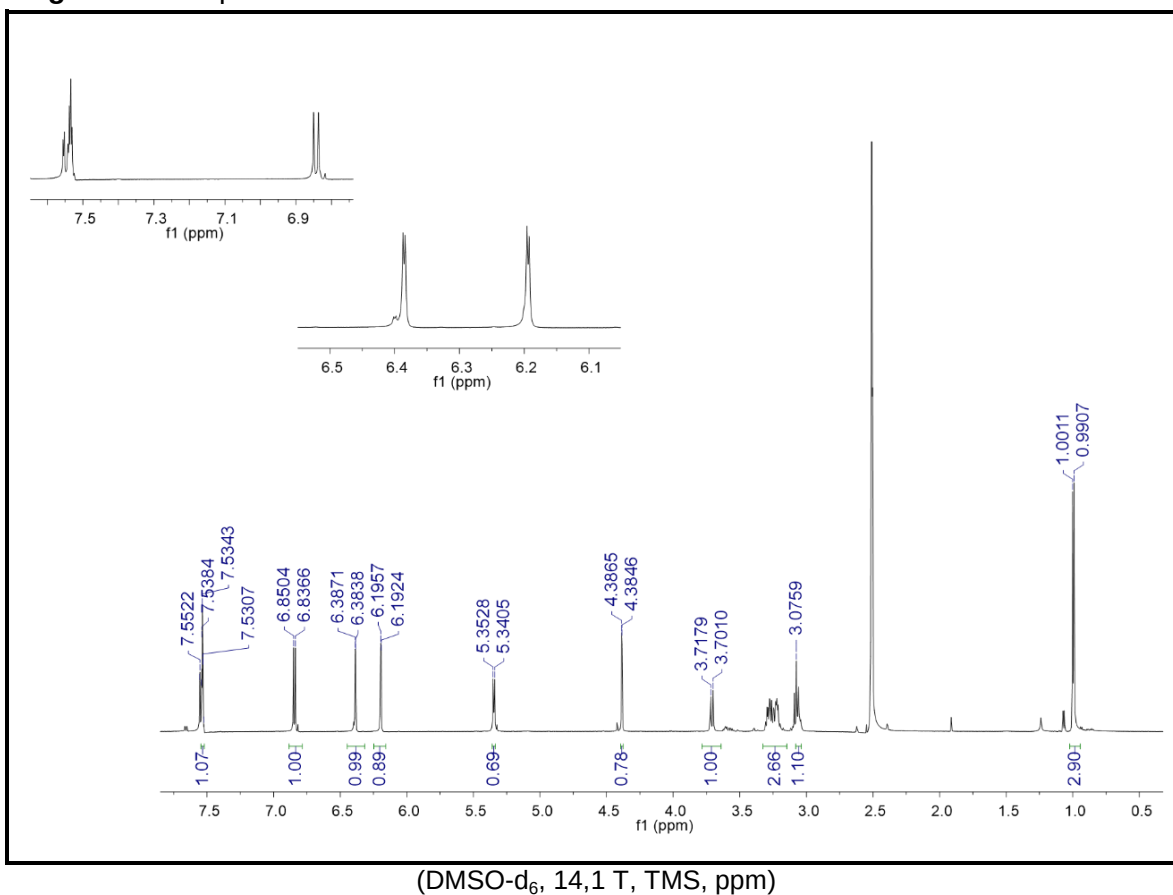


Figura 56 – Mapa de contorno gHSQC de **8**.

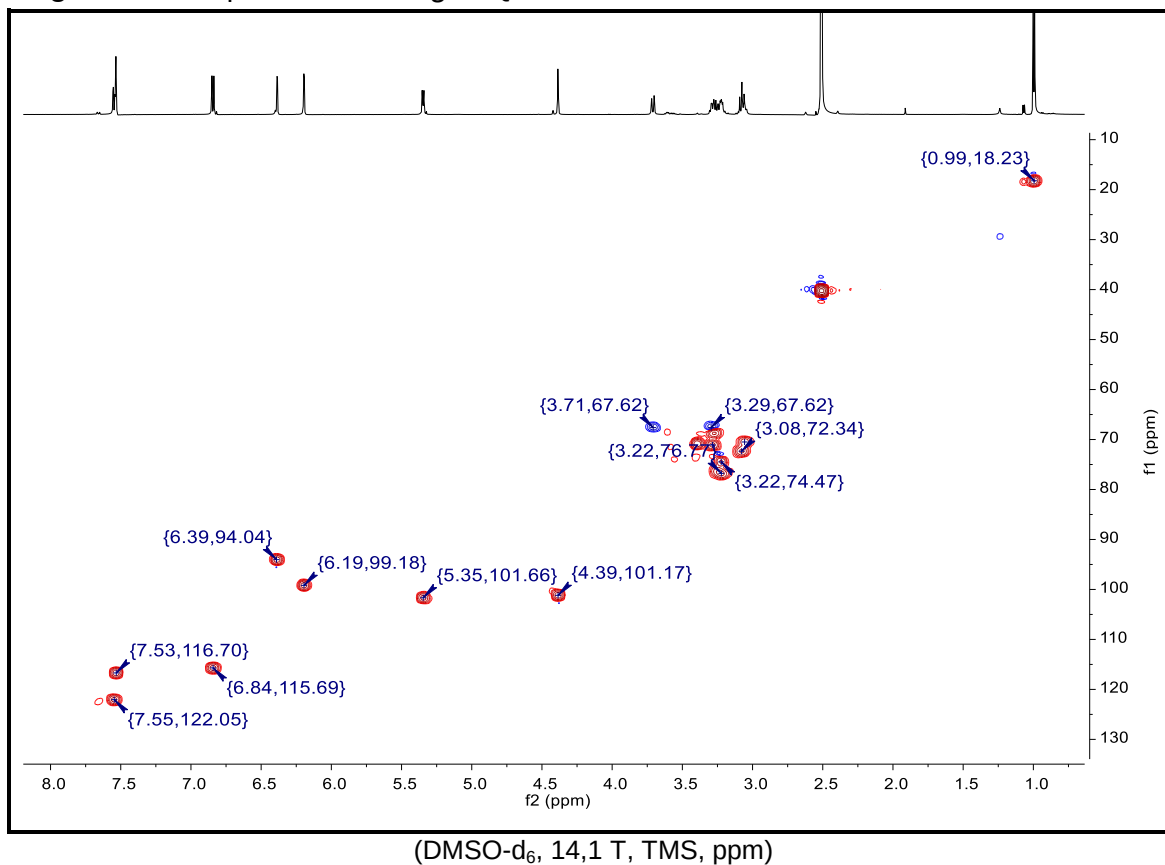
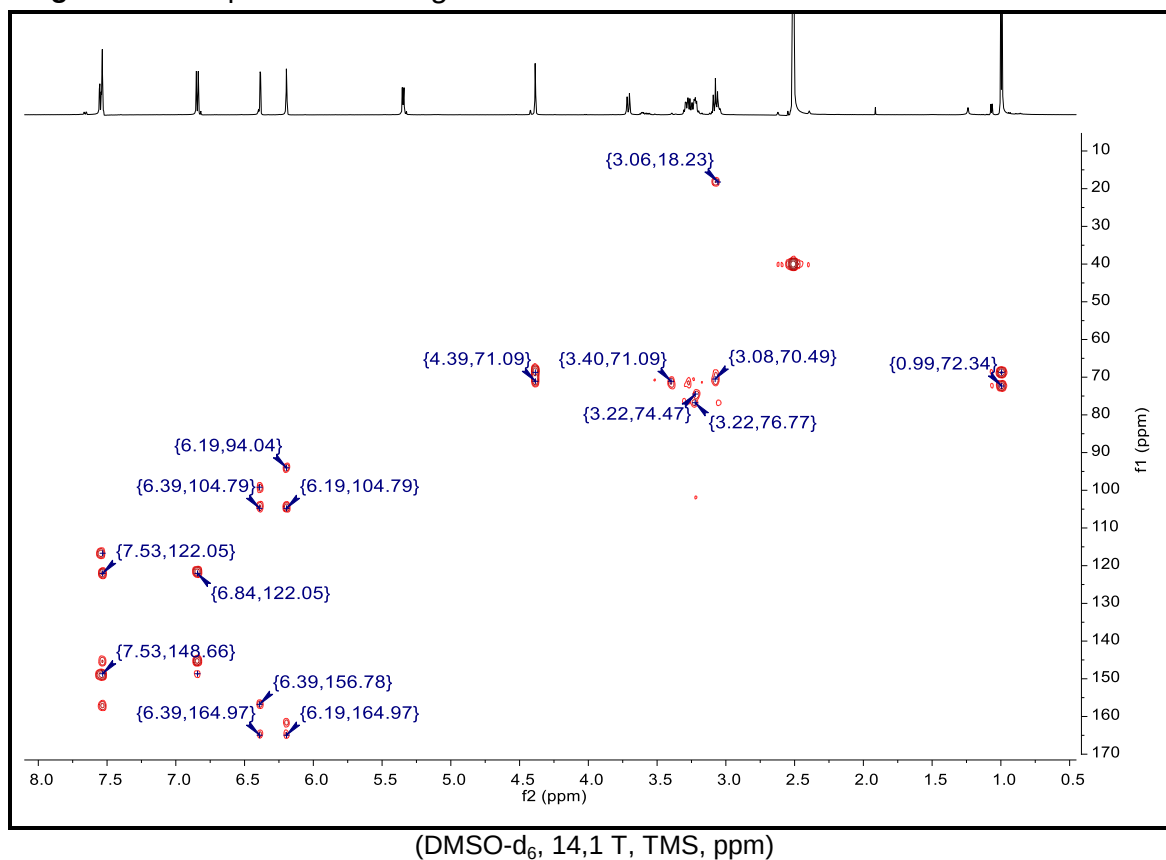
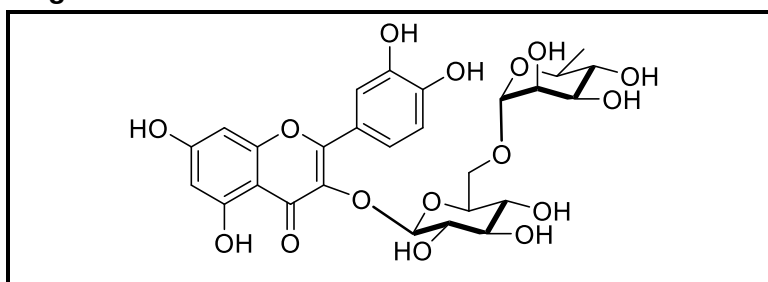


Figura 57 – Mapa de contorno gHMBC de 8.**Figura 58** – Estrutura da rutina 8.

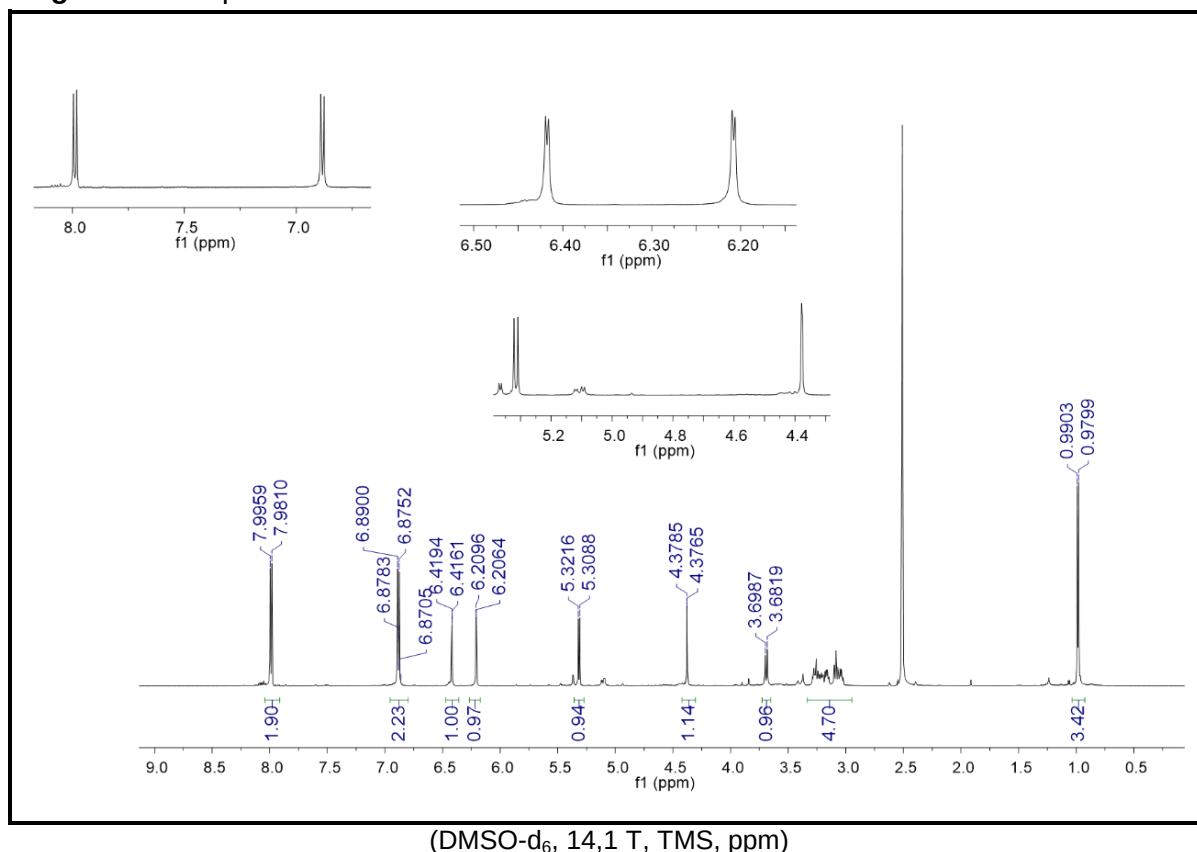
A rutina foi anteriormente identificada em sementes moídas de *J. curcas* (OSKOUÉIAN, et al., 2011), assim como nas folhas da espécie *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018). Num estudo conduzido por LEE e JEUNE (2013) foi demonstrado o efeito da rutina sobre o tratamento e as complicações da diabetes. Entre outras atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos (PATHAK; PATHAK; SINGLA, 1991). Além disso, sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual

(PATHAK; PATHAK; SINGLA, 1991; MARQUES-BECHO; MACHADO; de OLIVEIRA, 2009).

4.2.2.6 Identificação de **9**.

O espectro de RMN de ^1H de **9** (Figura 59, Tabelas 6–7, Pagina 99–101), forneceu sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado do canferol. O sinal em δ_{H} 7,99 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) apresenta um acoplamento em *orto* que foram atribuídos aos H-2' e H-6' do anel B do flavonoide enquanto que os deslocamentos químicos em δ_{H} 6,88 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) de hidrogênios acoplados em *orto*, foram atribuídos aos H-3' e H-5' respectivamente. Dois dupletos com deslocamentos químicos em δ_{H} 6,39 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) indicam hidrogênios *meta*-acoplados atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6 do anel A do flavonoide, confirmando a aglicona da canferol.

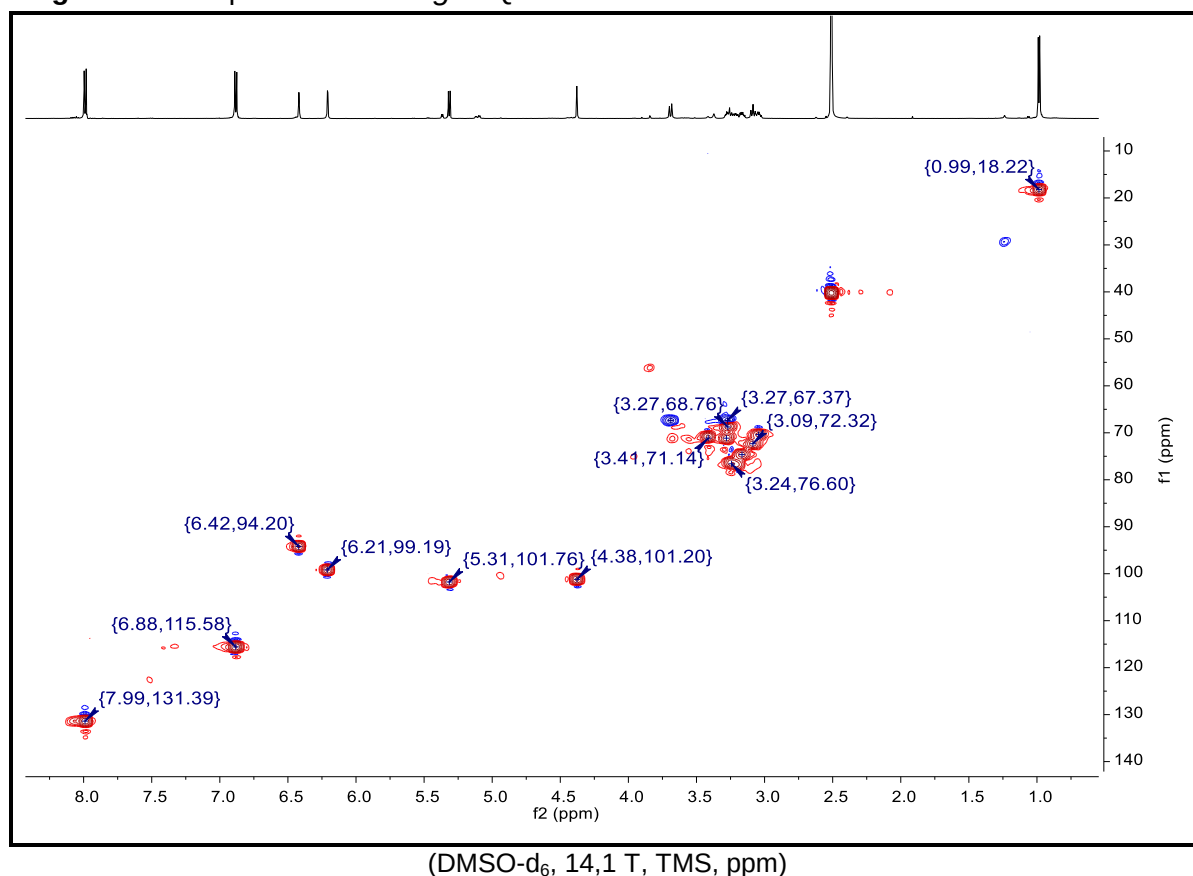
Figura 59 – Espectro RMN ^1H de **9**.



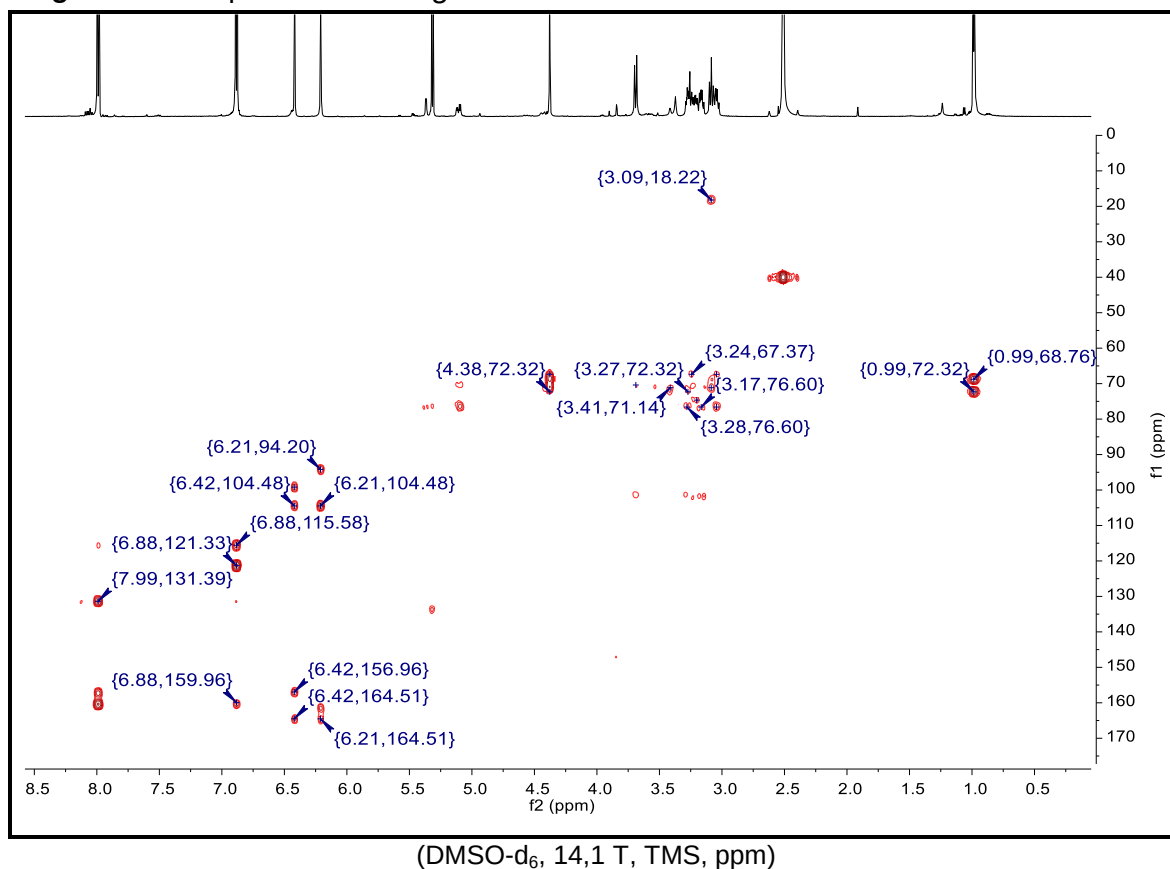
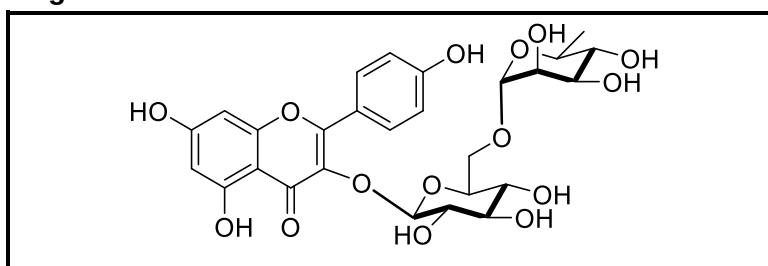
A constante de acoplamento do sinal em δ_H 5,31 (1H, d, $J = 7,3$ Hz) indica uma configuração β para o açúcar (HARBORNE, 1996) e do sinal em δ_H 4,37 (1H, d, $J = 1,5$ Hz) com configuração α .

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C foram atribuídos a partir dos experimentos de mapa de contorno de $gHSQC$ (Figura 60) e $gHMBC$ (Figura 61). A posição da glicose na aglicona foi determinada pelo experimento $gHMBC$ que mostraram correlações a longa distância entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ_H 5,31 (H-1"glc) com o carbono em δ_C 133,6 (C-3). Portanto, diante dos dados apresentados de 1H e ^{13}C , sugerimos para essa substância a estrutura do canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1" $\rightarrow$ 6")]- β -D-glucopiranosídeo (canferol 3-O-rutinosídeo) (Figura 62).

Figura 60 – Mapa de contorno $gHSQC$ de **9**.



Essa substância está sendo reportada pela primeira vez por GAMIOTEA-TURRO et al. (2018) na espécie *J. aethiopica*. A atividade antioxidante do canferol 3-O-rutinosídeo foi demonstrada por CARDOSO et al (2005) apresentando um valor de $IC_{50} = 62,3 \pm 0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esse valor foi considerado médio quando comparado com flavonoides que apresentam o grupo catecol no anel B (CARDOSO et al., 2005).

Figura 61 – Mapa de contorno gHMBC de **9**.Figura 62 – Estrutura do canferol rutinosídeo **9**.

4.2.2.7 Identificação de **12**

O espectro de RMN de ^1H de **12** (Figura 63, Tabelas 6–7, Páginas 99–101), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, característicos de um flavonoide derivado da quercetina. Os sinais em δ_{H} 7,68 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) e em δ_{H} 7,54 (1H, dd, $J = 2,2; 8,6$ Hz) foram atribuídos ao H-2' e H-6' do anel B do flavonoide, respectivamente. Outro sinal com deslocamento químico em δ_{H} 6,88 (1H, d, $J = 8,6$ Hz) correspondeu ao H-5'. Dois dupletos em δ_{H} 6,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e em δ_{H} 6,19

(1H, d, $J = 2,0$ Hz) foram atribuídos aos H-8 e H-6 do anel A quando está trissubstituído (HARBORNE, 1996). Diante os resultados a estrutura da substância **12** é a quercetina (Figura 64).

Figura 63 – Espectro RMN ^1H de **12**.

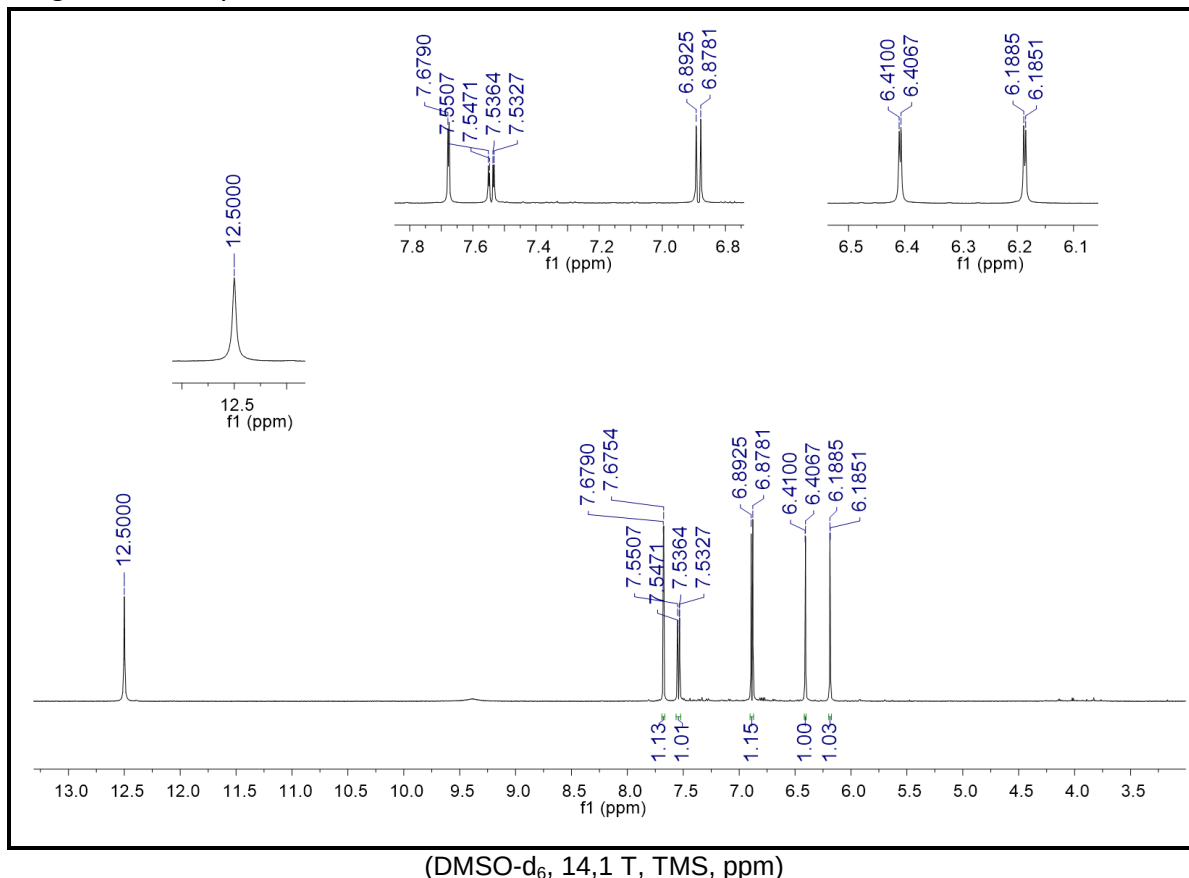
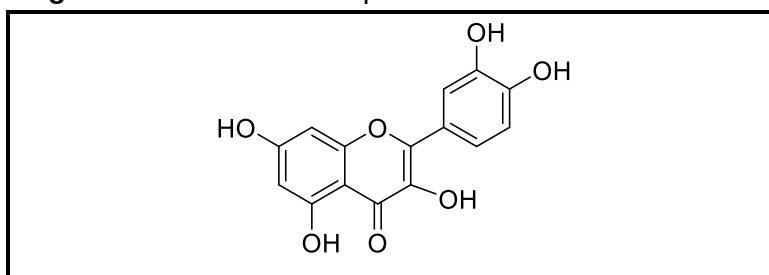


Figura 64 – Estrutura da quercetina **12**.



A quercetina é um flavonoide encontrado em muitas espécies de plantas, sendo também identificada em sementes moídas de *J. curcas*, nas folhas de *J. nana* (OSKOUÉIAN, et al., 2011; SABANDAR, et al., 2013) e folhas de *J. aethiopica* (GAMIOTEA-TURRO et al., 2018).

A quercetina é um importante flavonóide com uma enorme gama de atividades farmacológicas como antimicrobiano (GAIKWAD, et al., 2012), suprimindo a tolerância à glicose, reduzindo o colesterol e triglicérides no plasma, aumentando a atividade da glucoquinase hepática e provavelmente aumentando a liberação de insulina direta em ratos diabéticos (GAIKWAD; MOHAN; RANI, 2014).

Todas as substâncias isoladas no presente trabalho estão sendo descritas pela primeira vez na literatura para a espécie de *J. aethiopica*.

Apesar da grande quantidade de flavonóis isolados e identificados a partir das plantas, nem a família Euphorbiaceae nem o gênero *Jatropha*, apresentam um número significativo dessas substâncias numa única espécie (VEITCH; GRAYER, 2008). No presente trabalho foram isolados e caracterizados 7 flavonoides e identificados outros 14 a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*.

Os flavonoides apresentam uma ampla importância em vários campos, como exemplo: são utilizados pelos botânicos para classificação taxonômica (HAVSTEEN, 2002). Eles regulam o crescimento das plantas pela inibição da exocitose do ácido indolacético da auxina, bem como pela indução da expressão gênica influenciam outras células biológicas de várias maneiras (PARTRIDGE; KEEN, 1976). Os flavonoides inibem ou matam muitas cepas bacterianas (el-GAMMAL; MANSOUR, 1986), inibem importantes enzimas virais, como a transcriptase reversa e a protease (WANG, 1994), e destroem alguns protozoários patogênicos (HAVSTEEN, 2002). No entanto, sua toxicidade para as células animais é baixa. Os flavonoides são componentes funcionais importantes de muitas preparações herbáceas e de insetos para uso medicinal, por exemplo, própolis e mel, que têm sido usadas desde tempos antigos. Os profissionais da medicina têm recomendado o uso de flavonoides puros para tratar muitas doenças comuns, devido à sua capacidade comprovada de inibir enzimas específicas, para simular alguns hormônios e neurotransmissores, e para eliminar os radicais livres (HAVSTEEN, 2002).

Tabela 6 – Dados de RMN ^{13}C dos flavonoides isolados 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12.

		4	5	8	12	6	7	9
Quercetina ^{4,5,8,12}	2	157,0	158,2	158,2	148,3	156,4	157,5	156,6
Canferol ^{6,7,9}	3	133,7	134,4	134,4	136,7	132,7	133,2	133,5
	4	176,5	177,1	177,1	176,7	176,9	177,0	177,3
	5	160,9	161,7	161,7	157,5	161,5	161,6	161,2
	6	99,0	98,8	98,8	99,6	98,6	98,6	98,7
	7	164,0	164,0	164,0	164,5	164,5	164,6	164,1
	8	94,0	93,6	93,6	95,0	93,7	93,6	93,8
	9	156,	157,4	157,4	161,4	156,7	156,6	156,9
	10	105,	104,5	104,5	104,4	104,4	104,5	104,5
	1'	121,9	121,6	121,6	123,7	121,3	121,4	121,3
	2'	116,2	115,3	115,3	116,5	130,9	130,8	130,7
	3'	145,8	144,7	144,7	145,7	115,1	115,0	115,2
	4'	149	148,6	148,6	148,0	160,4	160,2	159,7
	5'	115,5	114,8	114,8	116,9	115,1	115,0	115,3
	6'	122,3	122,2	122,2	122,0	130,9	130,8	130,7
		Galactose	Glicose	Glicose	-	Galactose	Glicose	Glicose
3-O-Gal/Glc	1"	99,2	99,2	103,3	-	98,9	98,6	101,5
	2"	73,7	75,5	74,3	-	74,7	70,2	74,4
	3"	75,0	75,9	75,9	-	68,3	70,6	76,4
	4"	68,3	71,1	71,1	-	77,3	76,9	70,2
	5"	69,1	76,6	76,6	-	73,6	68,1	75,7
	6"	68,5	67,1	67,1	-	65,3	68,3	66,8
		(2"→1'') Ramno	(2"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno		(4"→1'') Ramno	(2"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno
	1'''	100,8	100,8	101,1	-	100,5	100,4	100,5
	2'''	70,9	70,9	70,7	-	70,3	67,9	70,2
	3'''	71,1	70,9	70,9	-	70,3	70,3	70,6
	4'''	72,1	72,0	72,6	-	71,5	71,8	72,1
	5'''	68,5	68,4	68,4	-	68,1	74,8	68,2
	6'''	17,5	17,6	16,4	-	17,2	17,0	17,3
		(6"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno	-	-	(6"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno	-
	1''''	101,0	100,9	-	-	100,2	100,5	-
	2''''	70,8	70,8	-	-	70,2	70,2	-
	3''''	71,0	76,0	-	-	70,5	75,4	-
	4''''	72,1	71,7	-	-	71,4	71,3	-
	5''''	71,0	71,0	-	-	70,5,7	75,4	-
	6''''	18,2	17,6	-	-	17,8	17,4	-

DMSO-d₆, 14,1 T

Tabela 7 – Dados de RMN ^1H dos flavonoides isolados 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12.

		4	5	8	12	6	7	9
Quercetina ^{4,5,8,12}	2	-	-	-	-	-	-	-
Canferol ^{6,7,9}	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-
	6	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,24 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,1)	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,0)
	7	-	-	-	-	-	-	-
	8	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,38 <i>d</i> (2,0)	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,47 <i>d</i> (2,0)	6,40 <i>d</i> (2,0)	6,42 <i>d</i> (2,1)	6,39 <i>d</i> (2,0)
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
	1'	-	-	-	-	-	-	-
	2'	7,48 <i>d</i> (2,2)	7,48 <i>d</i> (2,2)	7,55 <i>d</i> (2,2)	7,73 <i>d</i> (2,2)	8,04 <i>d</i> (8,9)	7,95 <i>d</i> (8,9)	7,99 <i>d</i> (8,9)
	3'	-	-	-	-	6,86 <i>d</i> (9,5)	6,87 <i>d</i> (9,1)	6,88 <i>d</i> (8,9)
	4'	-	-	-	-	-	-	-
	5'	6,81 <i>d</i> (8,5)	6,83 <i>d</i> (8,4)	6,84 <i>d</i> (8,3)	6,94 <i>d</i> (8,5)	6,86 <i>d</i> (9,5)	6,87 <i>d</i> (9,1)	6,88 <i>d</i> (8,9)
	6'	7,68 <i>dd</i> (2,2; 8,5)	7,53 <i>dd</i> (2,2; 8,4)	5,35 <i>d</i> (7,4)	7,60 <i>dd</i> (2,2; 8,5)	8,04 <i>d</i> (8,9)	7,95 <i>d</i> (8,9)	7,99 <i>d</i> (8,9)
		Galactose	Glicose	Glicose		Galactose	Glicose	Glicose
3-O-Gal/Glc	1"	5,57 <i>d</i> (7,7)	5,53 <i>d</i> (7,7)	5,35 <i>d</i> (7,4)	-	5,55 <i>d</i> (7,8)	5,48 <i>d</i> (7,3)	5,31 <i>d</i> (7,3)
	2"	3,79 <i>dd</i> (7,7; 9,2)	3,48 <i>dd</i> (8,9; 7,9)	3,06 <i>m</i>	-	3,77 <i>dd</i> (7,8; 9,1)	3,36 <i>dd</i> (7,3; 9,0)	3,07 <i>m</i>
	3"	3,58 <i>dd</i> (9,2; 3,4)	3,07 <i>dd</i> (9,2; 9,1)	3,21 <i>m</i>	-	3,59 <i>m</i>	3,04 <i>t</i> (8,8)	3,20 <i>m</i>
	4"	3,61 <i>dd</i> (3,4; 3,2)	3,38 <i>t</i> (8,9)	3,26 <i>m</i>	-	3,40 <i>d</i> (3,5)	3,39 <i>t</i> (8,8)	3,26 <i>m</i>
	5"	3,77 <i>m</i>	3,24 <i>m</i>	3,28 <i>m</i>	-	3,59 <i>m</i>	3,22 <i>m</i>	3,27 <i>m</i>
	6 ^{au}	3,56 <i>ddd</i> (11,0; 8,1; 3,8)	3,43 <i>m</i>	3,38 <i>m</i>	-	3,54 <i>m</i>	3,66 <i>d</i> (10,1)	3,40 <i>m</i>
	6 ^{bu}	3,22 <i>ddd</i> (3,8)	3,69 <i>d</i> (9,8)	3,70 <i>d</i> (10,1)	-	3,34 <i>m</i>	3,41 <i>d</i> (10,1)	3,68 <i>d</i> (10,1)

Tabela 7 – Continuação.

		4	5	8	12	6	7	9
		(2"→1'') Ramno	(2"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno	-	(4"→1'') Ramno	(2"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno
	1''	5,05 s	5.06 d (0,8)	4,38 d (1,1)	-	5,05 s	5.04 s	4,37 d (1,5)
	2''	3,74 m	3,72 d (5,5)	3,04 m	-	3,73 d (1,2)	3,76 dd (1,2; 9,4)	3,03 m
	3''	3,49 dd (9,4; 3,1)	3,48 dd (9,4; 3,1)	3,21 m	-	3,47 dd (9,4; 3,3)	3,49 dd (9,3; 3,2)	3,15 m
	4''	3,13 t (9,4)	3,76 m	3,23 m	-	3,13 dd (9,4; 9,5)	3,13 t (9,4)	3,21 m
	5''	3,77 m	3,13 d (9,4)	3,27 m	-	3,76 m	3,77 dd (6,2; 9,4)	3,26 m
	6''	0,80 d (6,1)	0,79 d (6,1)	0,98 d (6,24)	-	0,80 d (6,2)	0,78 d (6,2)	0,98 d (6,24)
		(6"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno	-	-	(6"→1'') Ramno	(6"→1'') Ramno	-
	1'''	4,38 d (1,3)	4,33 d (1,2)	-	-	4,35 d (1,2)	4,31 d (0,7)	-
	2'''	3,34 dd (1,4; 3,2)	3,34 dd (1,4; 1,4)	-	-	3,36 dd (1,5; 1,5)	3,37 dd (1,4; 1,5)	-
	3'''	3,29 dd (3,3; 9,4)	3,25 dd (3,5)	-	-	3,28 dd (3,3; 9,3)	3,23 dd (9,3; 4,0)	-
	4'''	3,08 t (9,4)	3,05 t (9,5)	-	-	3,08 t (9,3)	3,06 dd (9,3; 4,2)	-
	5'''	3,36 m	3,24 m	-	-	3,33 m	3,23 m	-
	6'''	1,05 d (6,2)	0,97 d (6,2)	-	-	1,05 d (6,2)	0,95 d (6,2)	-

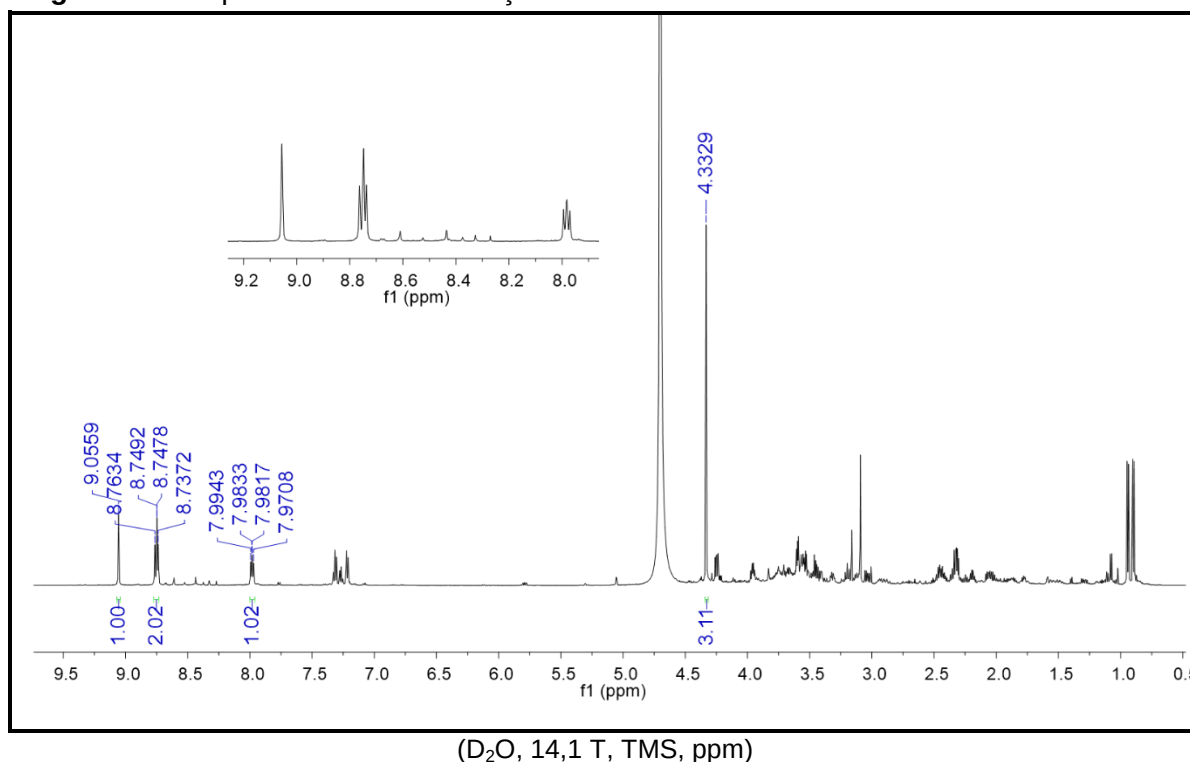
DMSO-d₆, 14,1 T

4.2.3 Identificação dos compostos nitrogenados

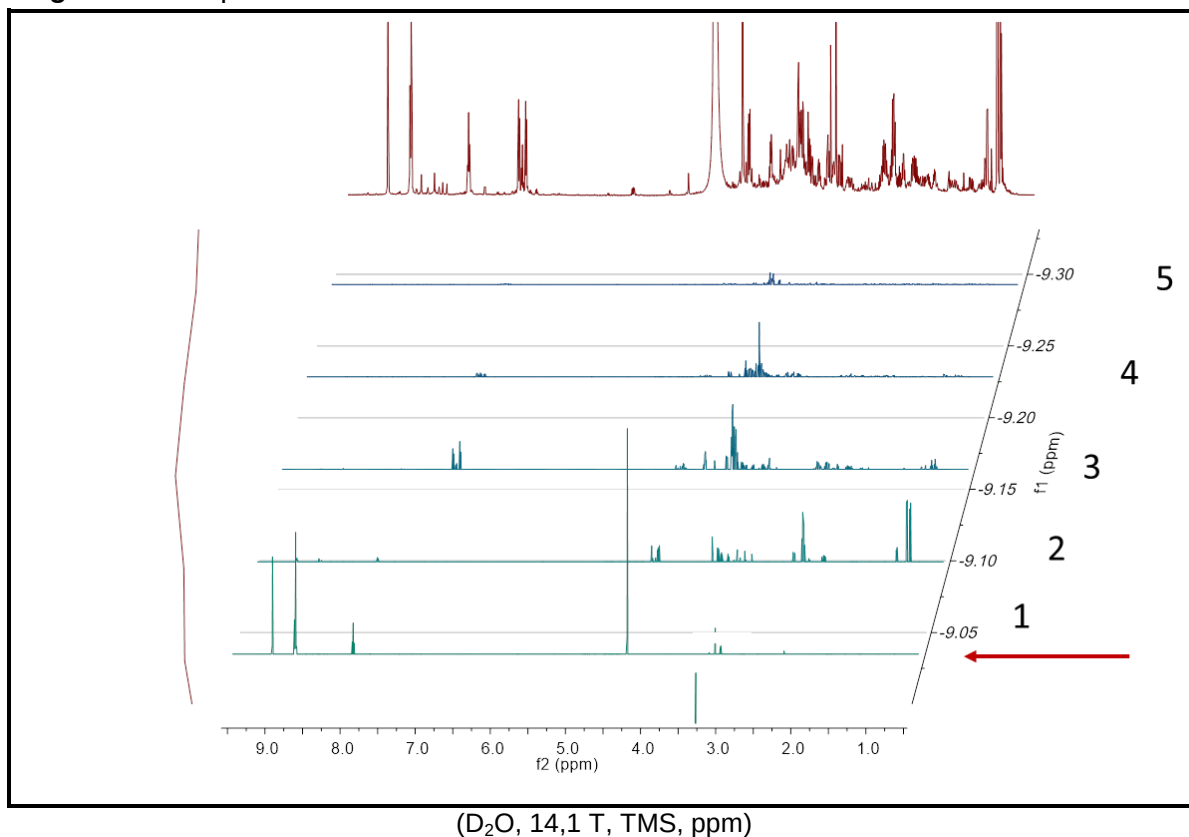
4.2.3.1 Identificação de **1**

Do fracionamento por CLAE-DAD semipreparativo do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* foi obtida a fração nitrogenada (**FCN**). A partir dessa fração, foi isolada a substância identificada como G-160 a qual forneceu um espectro de hidrogênio (Figura 65), que aparentemente seria de uma mistura de substâncias o que foi confirmado pelo experimento DOSY (Figura 66).

Figura 65 – Espectro RMN ^1H da fração G-160.



A técnica DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) foi desenvolvida por MORRIS e JOHNSON (1992). DOSY é uma técnica não-invasiva baseada na metodologia dos ecos de spin com gradientes de campo magnético pulsados (PFGSE) e permite discriminar e caracterizar os componentes de uma mistura (SOUZA; LAVERDE JR., 2002). Nesse espectro, os deslocamentos químicos de hidrogênio apresentam-se em uma dimensão e os coeficientes de difusão moleculares na outra. No DOSY, observaram-se valores de difusão muito próximos pelo que foi difícil atribuir alguns sinais.

Figura 66 – Espectro DOSY da mistura G-160.

A substância **1** foi identificada da mistura de G-160. No espectro de RMN de ^1H (Figura 65, Pagina 101), evidenciou sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos mais desblindados que aqueles comuns para flavonoides e compostos fenólicos. Quatro sinais que integram para um próton cada, foram observados em δ_{H} 9,06; δ_{H} 8,75; δ_{H} 8,74 e δ_{H} 7,98. Os valores altos de deslocamento químico, assim como a largura dos sinais, sugeriu a presença de nitrogênio na estrutura.

Foram realizados os espectros de nitrogênio ($g\text{HMBC}-^{15}\text{N}$) (Figura 67) que corroboraram, junto com os dados de deslocamento químico observados no espectro de ^1H , a presença de nitrogênio na molécula e mostraram a correlação do nitrogênio (δ_{N} 200,00) com os hidrogênios em δ_{H} (9,06; 8,76; 8,74; 7,98 e 4,33), confirmando que este N pertence a esta molécula.

As análises dos espectros forneceram na região de hidrogênios aromáticos os sinais em δ_{H} 9,06 (1H, s); δ_{H} 8,76 (1H; d; $J = 8,0$ Hz); δ_{H} 8,74 (1H; d; $J = 7,8$ Hz); δ_{H} 7,98 (1H; dd; $J = 8,0$; 7,8 Hz) e uma sinal de hidrogênio alifático em δ_{H} 4,33 (3H, s). O mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (Figura 68) forneceu as correlações a 1J sendo apresentadas na Tabela 8 (Pagina 105).

Figura 67 – Mapa de contorno $g\text{HMBC-}^{15}\text{N}$ da mistura G-160.

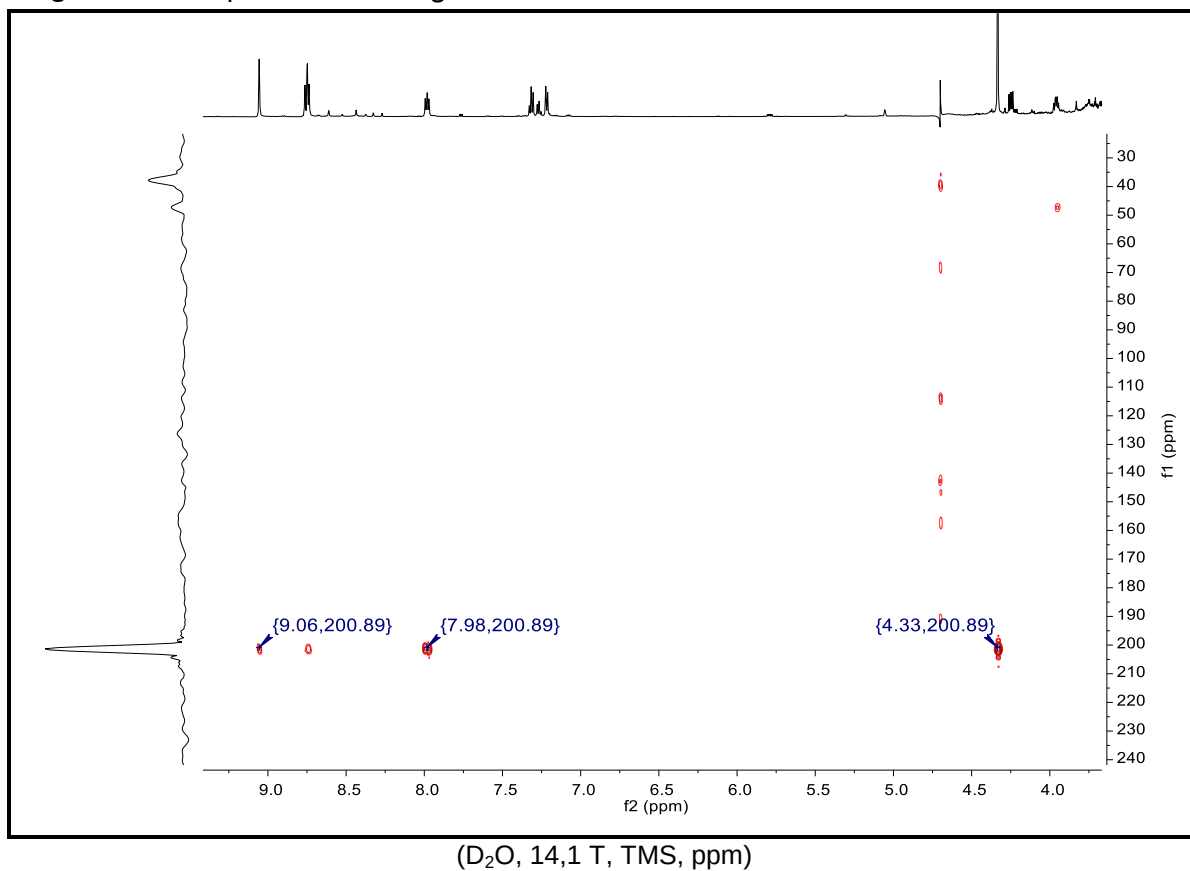


Figura 68 – Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ da mistura G-160.

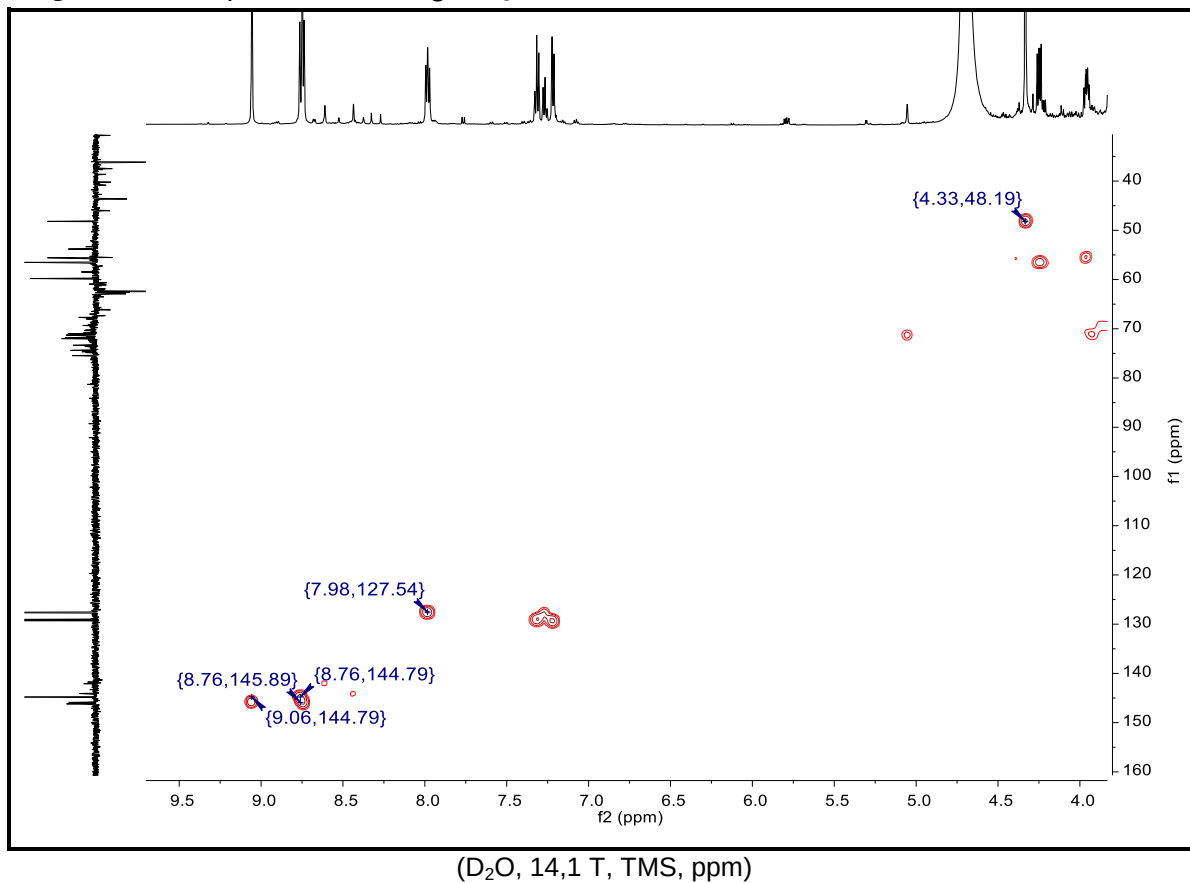
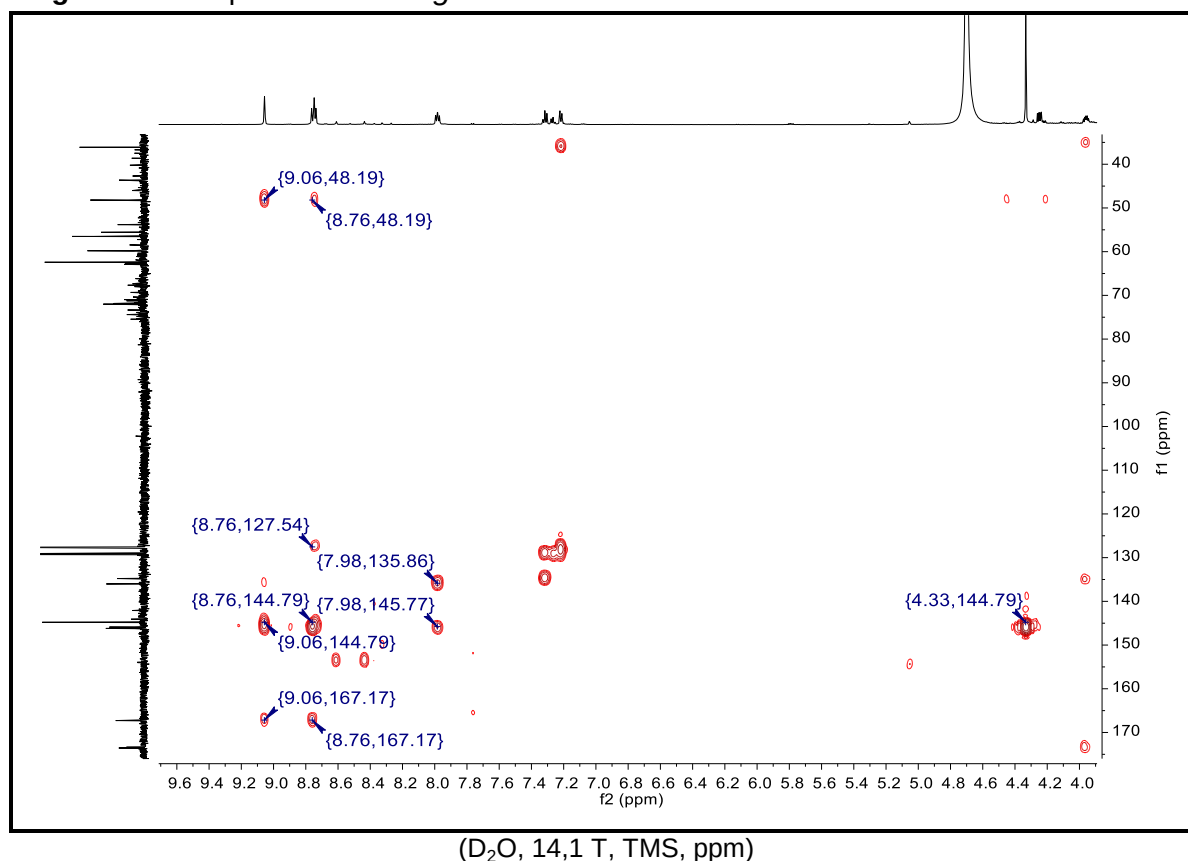


Tabela 8 – Dados da RMN ^1H e ^{13}C da substância **1** ($C_d = 9,04$) da mistura G160

	^1H RMN (δ , (H; m; J (Hz)))	^{13}C RMN (δ)	$g\text{HMBC}$ (δ 2J e 3J)	TOCSY 1D (δ)
1	-	-		
2	9,06 (1H; s)	144,8	48,2; 135,9; 167,2	
3	-	135,9		
4	8,74 (1H; d; 7,8)	144,8	145,9; 144,8; 167,2	
5	7,98 (1H; dd; 7,8; 8,0)	127,5	135,9; 144,8	9,06; 8,76; 8,75
6	8,76 (1H; d; 8,0)	145,9	48,1; 145,9; 167,2	
7	-	167,2		
8	4,33 (3H; s)	48,2	144,8; 145,9	

D₂O; 14,1 T

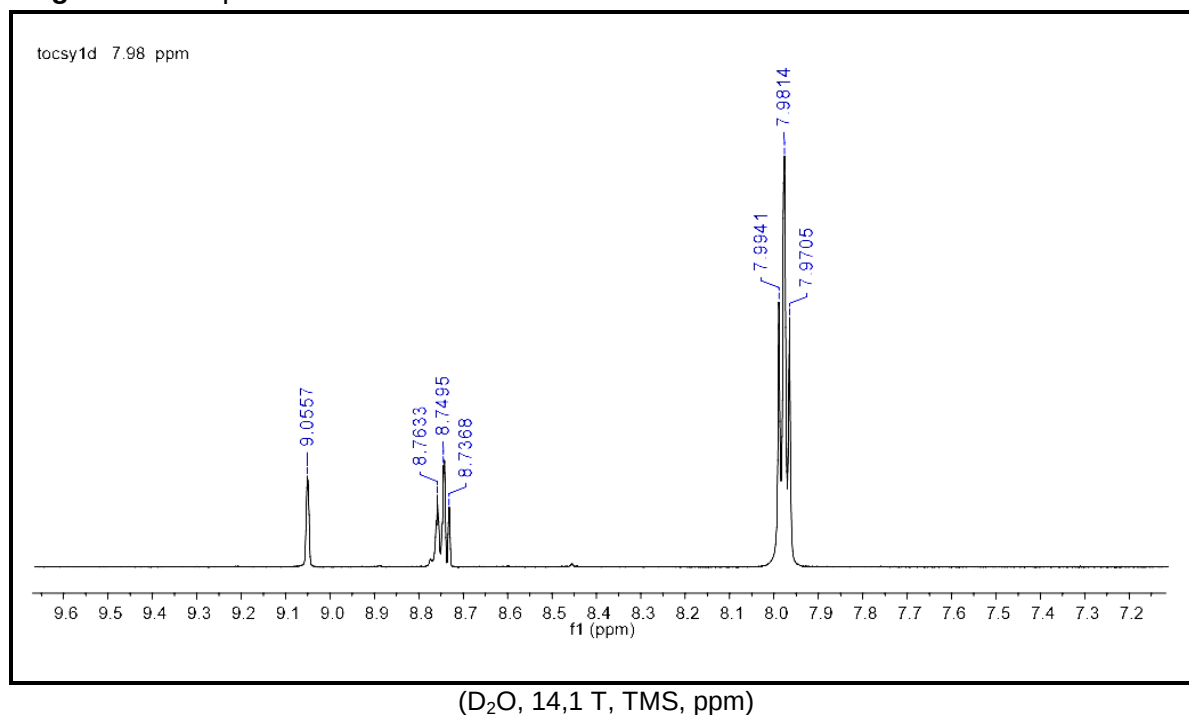
No mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (Figura 69) foram observadas correlações dos hidrogênios aromáticos com o carbono da carbonila em δ_C 167,2. Por outro lado, o sinal em δ_H 4,33 (3H, s) acopla diretamente com o carbono em δ_C 48,2, correspondendo à metila ligada diretamente a um nitrogênio. Esse sinal apresenta correlação a 3J com o carbono em δ_C 144,8 o qual está fazendo ligação direta com o hidrogênio de deslocamento químico δ_H 9,06. Diante das evidências, foi proposta a presença de um grupo amida na estrutura da molécula.

Figura 69 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ da mistura G-160.

Outras correlações foram fornecidas a 2J e a 3J sendo destacados: o sinal do hidrogênio em δ_H 9,06 faz correlações com o carbono da carbonila em δ_C 167,2 (C-7), com o carbono em δ_C 135,9 (C-3) e com o carbono da metila (CH_3) em δ_C 48,2. A metila em δ_H 4,33 apresenta correlações com os carbonos em δ_C 144,8 (C-2) e δ_C 145,9 (C-6). Também foi observado as correlações à 2J e à 3J dos hidrogênios nas posições C-5 e C-6. A correlação do H-5 (δ_H 7,98) com os carbonos em δ_C 135,9 (C-3) e com o carbono em δ_C 144,8 (C-4) enquanto que o H-4 δ_H 8,74 mostrou correlação com os carbonos em δ_C 145,9 (C-6) e com o δ_C 144,8 (C-2).

No experimento TOCSY 1D (Figura 70) quando o sinal em δ_H 7,98 foi irradiado, observa-se que houve o seguinte sistema de spins composto pelos sinais em δ_H 9,06; 8,76; 8,74; 7,98, confirmando que estes hidrogênios pertencem ao anel aromático.

Figura 70 – Espectro TOCSY 1D da substância **1**.



O espectro de massas, (Figura 71), apresentou o íon em m/z 137,0361 (cald. m/z 137,0709, err. = 0,99), molécula $[M]^+$ sugerindo que a substância possui fórmula $C_7H_9N_2O^+$ e na Figura 72 mostra-se o espectro MS/MS do íon m/z 137.

Figura 71 – Espectro de massas mistura G-160.

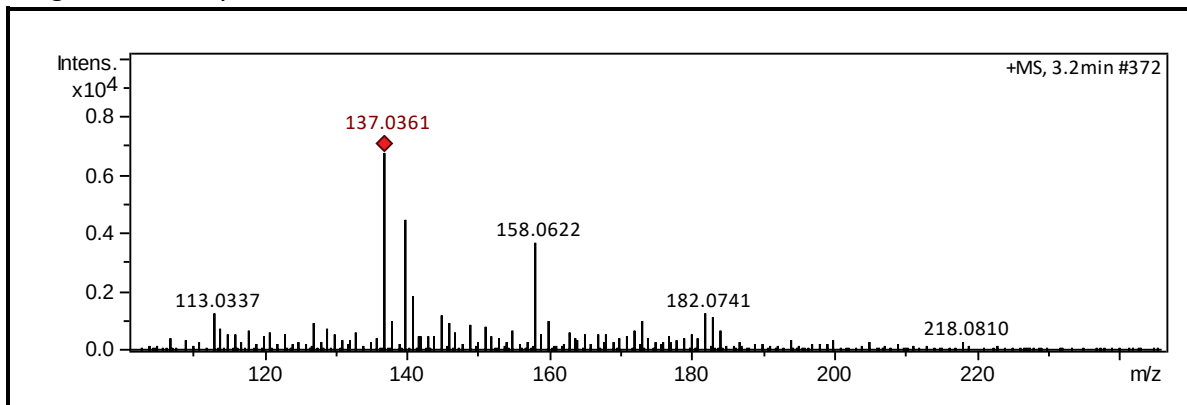
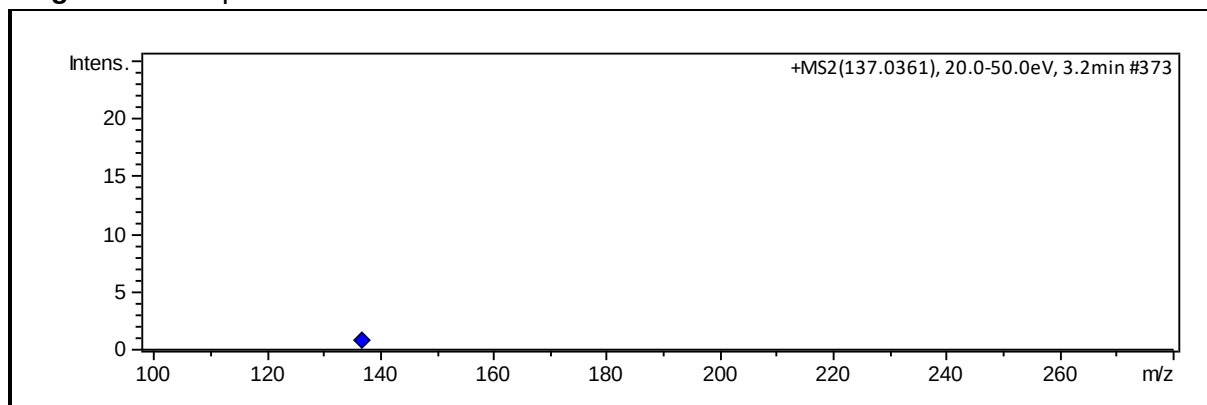
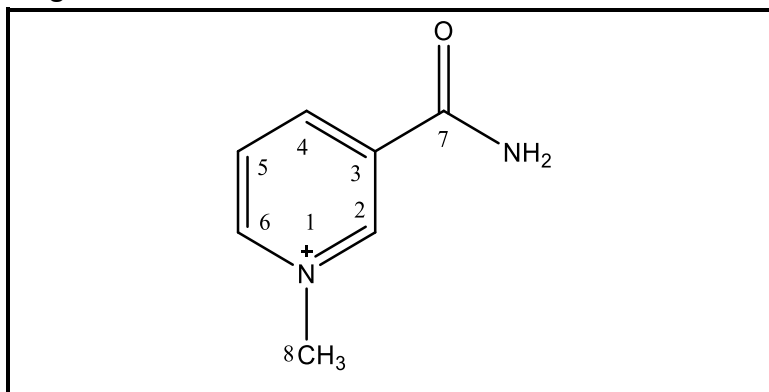


Figura 72 – Espectro de massas MS² do íon m/z 137.



Sendo assim, esta molécula foi determinada como sendo a 3-carboxiamida-1-metilpiridinium (Figura 73).

Figura 73– Estrutura da substância 1.



Essa substância não foi identificada até essa data como produto natural. Um estudo de relação estrutura atividade foi realizado com vários sais de amônio quaternário para estudar a influência do tamanho e a carga das substâncias como substitutos dos transportadores colina e acetilcolina neuronal. Essas substâncias são direcionadas para uso em doenças onde a colina e a acetilcolina desempenham um papel importante (GELDENHUYS; ALLEN; LOCKMAN, 2010). Outras substâncias da família da nicotinamida, tem sido estudadas na ligação com enzimas catalizadoras na síntese de moléculas mensageiras de íons Ca^{2+} . Esses derivados mostram um papel significativo da porção de nicotinamida e do grupo aromático dos compostos para reconhecimento de substrato pelo sítio ativo (DONG et al., 2011).

4.2.3.2 Identificação de **2**

A substância **2** foi identificada da mistura G-160. O experimento DOSY (Figura 66, Pagina 103) auxiliou a identificar os sinais pertencentes a **2**. Porém, a superposição de sinais da substância **2** com outras na mistura tornou muito difícil a elucidação estrutural da substância. No espectro de RMN de ^1H (Figura 74), a região entre δ_{H} 1,0 e δ_{H} 4,5, do espectro de ^1H , mostrou-se complexa. Dois dupletos em δ_{H} 0,90 (3H; d; $J = 7,0$ Hz), em δ_{H} 0,94 (3H; d; $J = 7,0$ Hz) e um multiplete em δ_{H} 2,18 (1H; m) correspondem a duas metilas e um metino que formam o grupo isopropila. Quatro grupos metilenos (CH_2) e quatro hidrogénios metínicos (CH) também foram identificados (Tabela 9, Pagina 110).

No mapa de contorno ($g\text{HMBC}-^{15}\text{N}$) (Figura 75), observou-se correlações de nitrogénio com hibridação sp^3 (aminas) com hidrogénios da molécula demonstrando a presença desse átomo na substância **2**.

Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C , assim como as correlações carbono – hidrogénio a 1J e $^2J-^3J$, respectivamente, puderam ser atribuídos a partir dos mapas de contorno $g\text{HSQC}$ (Figura 76) e $g\text{HMBC}$ (Figura 77) (Tabela 9, Pagina 110).

No experimento TOCSY 1D (Figura 78) quando o sinal em δ_{H} 4,24 foi irradiado, observa-se que houve o seguinte sistema de spins composto pelos sinais em δ_{H} 2,45; 2,32; 2,05 confirmando o sistema de spin dessa parte da molécula.

Figura 74 – Espectro RMN ^1H da substância **2** identificada da mistura de G-160.

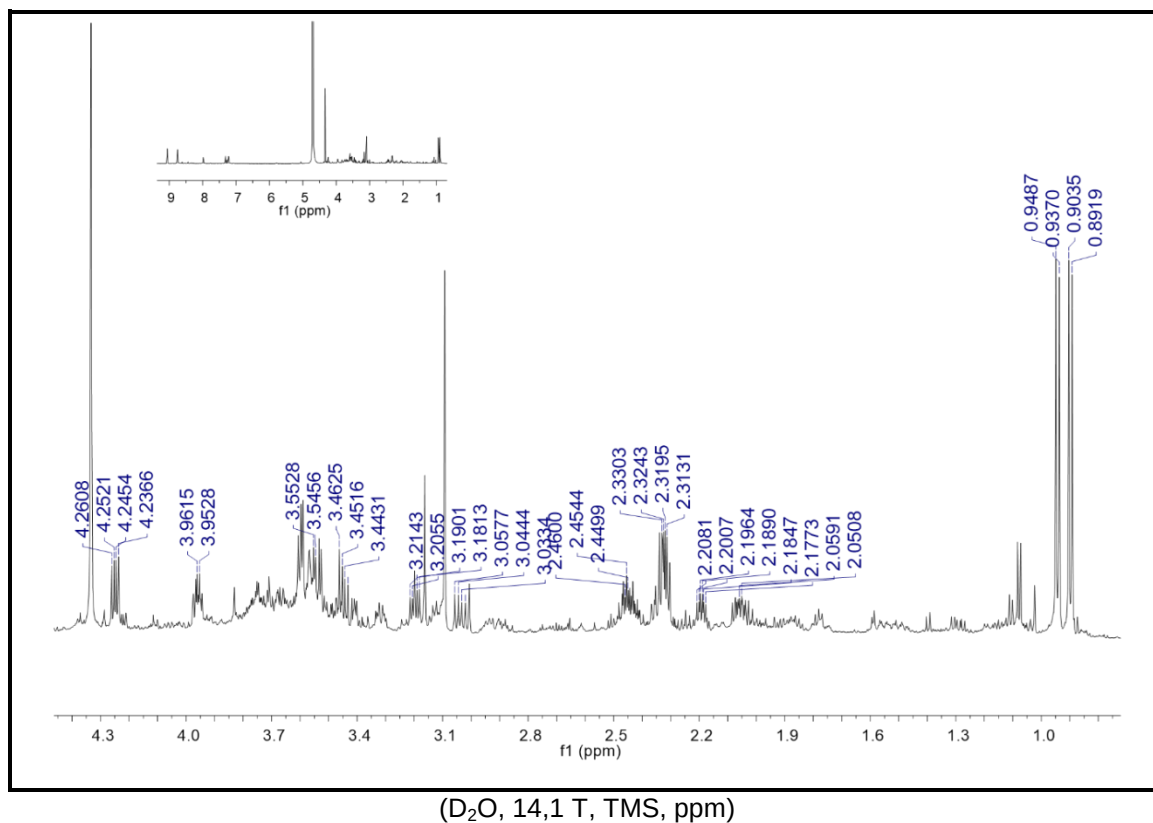


Figura 75 – Mapa de contorno gHMBC- ^{15}N da substância **2** na mistura G-160.

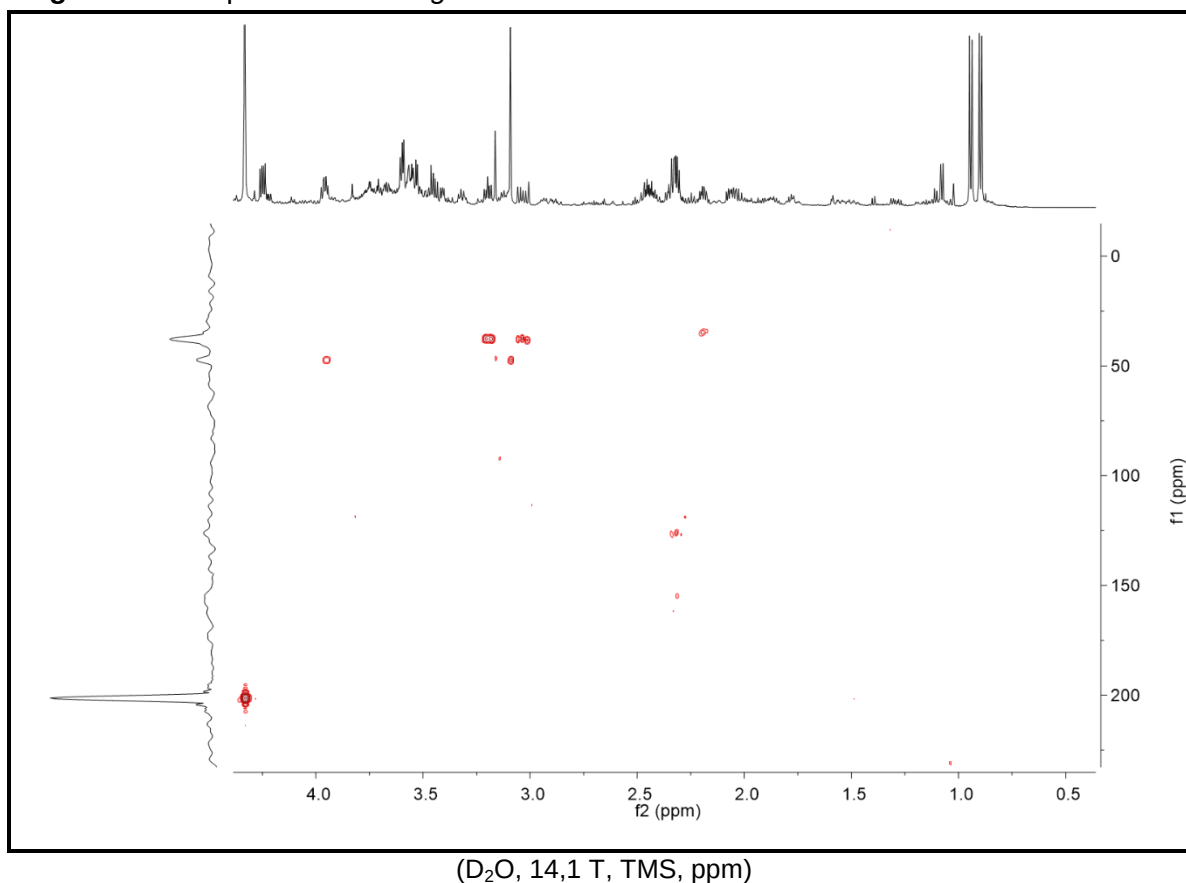


Tabela 9 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **2** ($C_d = 9,10$).

	^1H RMN (δ , (m; J (Hz)))	^{13}C RMN (δ)	$g\text{HMBC}$ (δ)
1	3,45 (1H; d; 6,5) 3,55 (1H; d; 6,5)	62,4 (CH_2)	
2	-	173,4	
3	2,32 (2H; dd; 3,9; 3,6)	29,3 (CH_2)	24,6; 56,5; 182,0
4	2,05/2,45 (1H; m) 2,45 (1H; t; 7,0)	24,6 (CH_2)	56,5; 182,0 29,3; 56,5
5	4,24 (1H; d; 6,5)	56,5 (CH)	24,6; 182,0
6	3,04 (1H; dd; 8,0; 5,3) 3,20 (1H; dd; 8,0; 5,3)	36,1 (CH_2)	55,6; 173,4
7	3,96 (1H; m)	55,6 (CH)	36,1; 173,4
8	3,01 (1H; d; 5,5)	45,9 (CH)	
9	-	177,6	
10	3,59 (1H; d; 4,4)	59,7 (CH)	16,6; 17,7; 173,4
11	2,18 (1H; m)	29,0	16,6; 17,7; 59,7
12	0,90 (3H; d; 7,0)	16,6 (CH_3)	17,7; 29,0; 59,7
13	0,94 (3H; d; 7,1)	17,7 (CH_3)	16,6; 29,0; 59,7

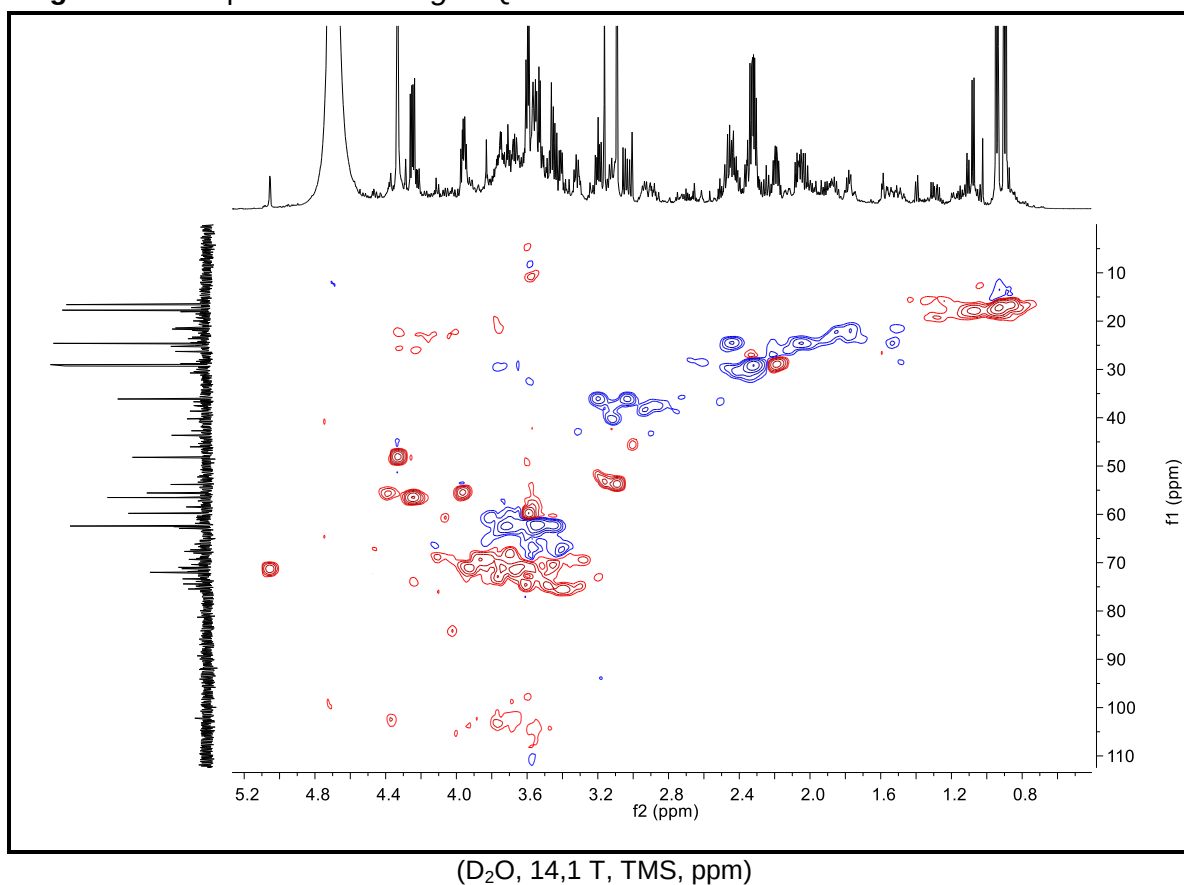
D₂O, 14,1 T**Figura 76** – Mapa de contorno $g\text{HSQC}$ da mistura G-160.

Figura 77 – Mapa de contorno gHMBC da mistura G-160.

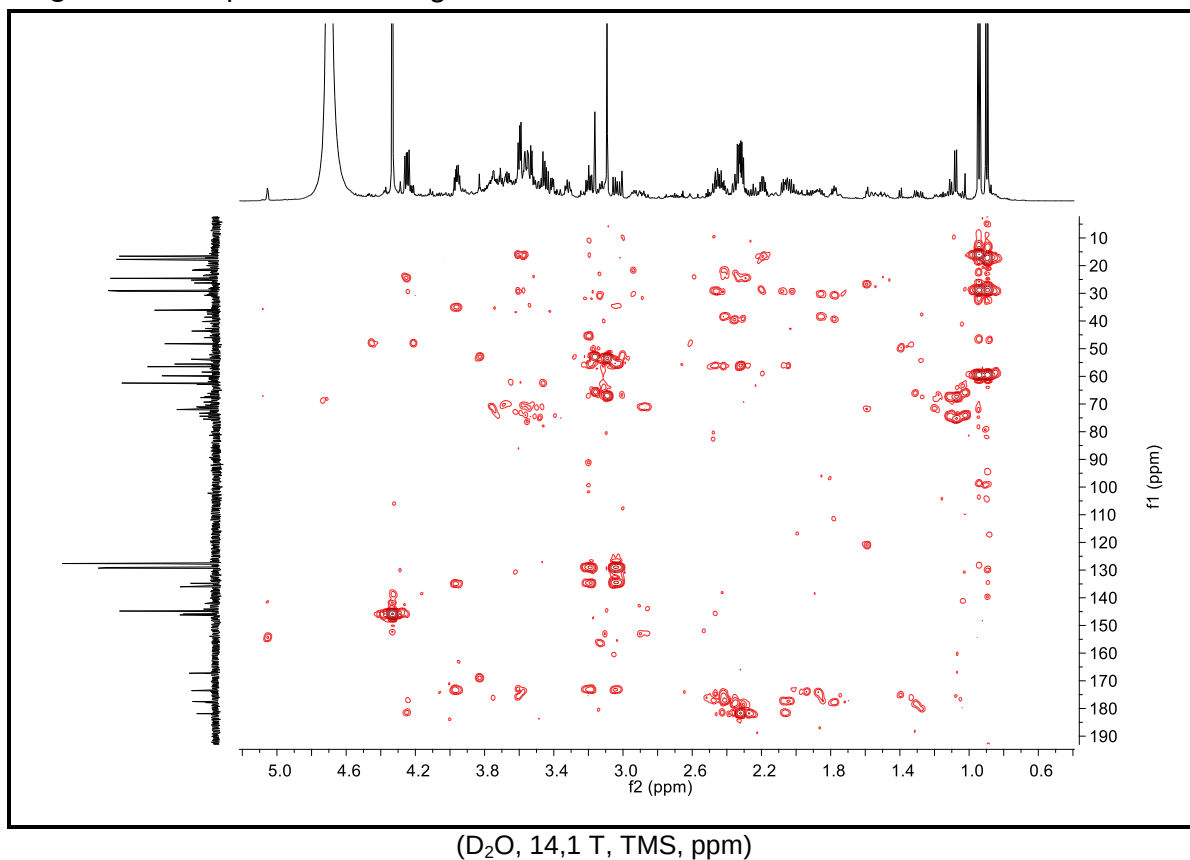


Figura 78 – Espectro TOCSY 1D da substância **2**, irradiado em δ_{H} 4,24.

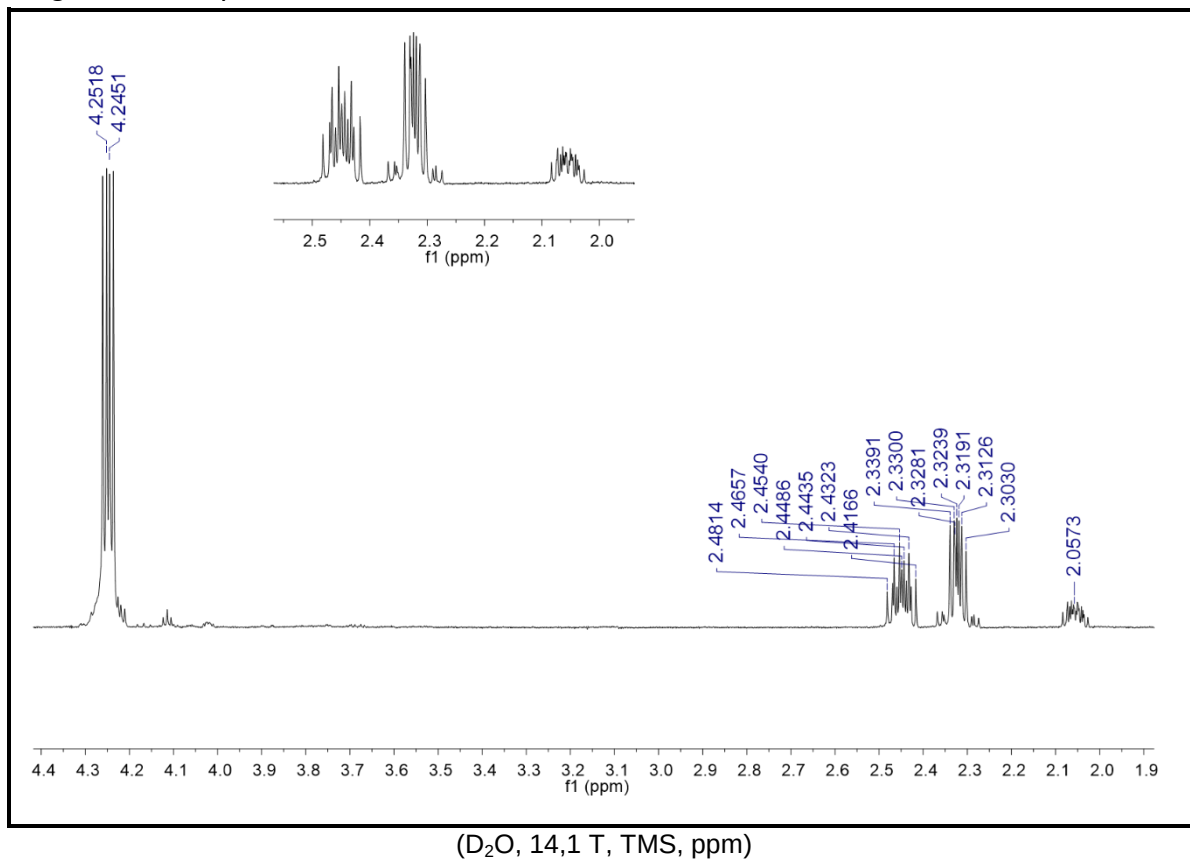


Figura 79 – Espectro TOCSY 1D da substância **2**, irradiado em δ_H 3,20.

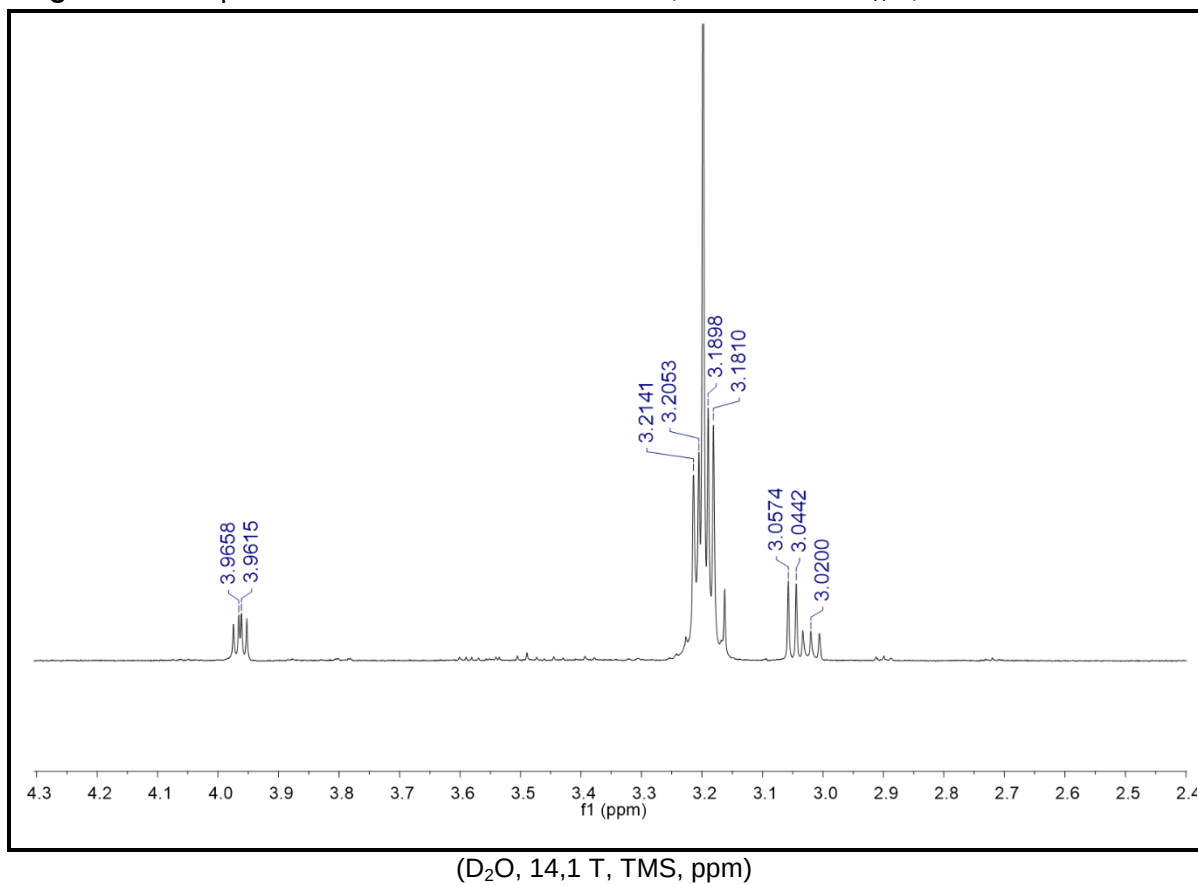
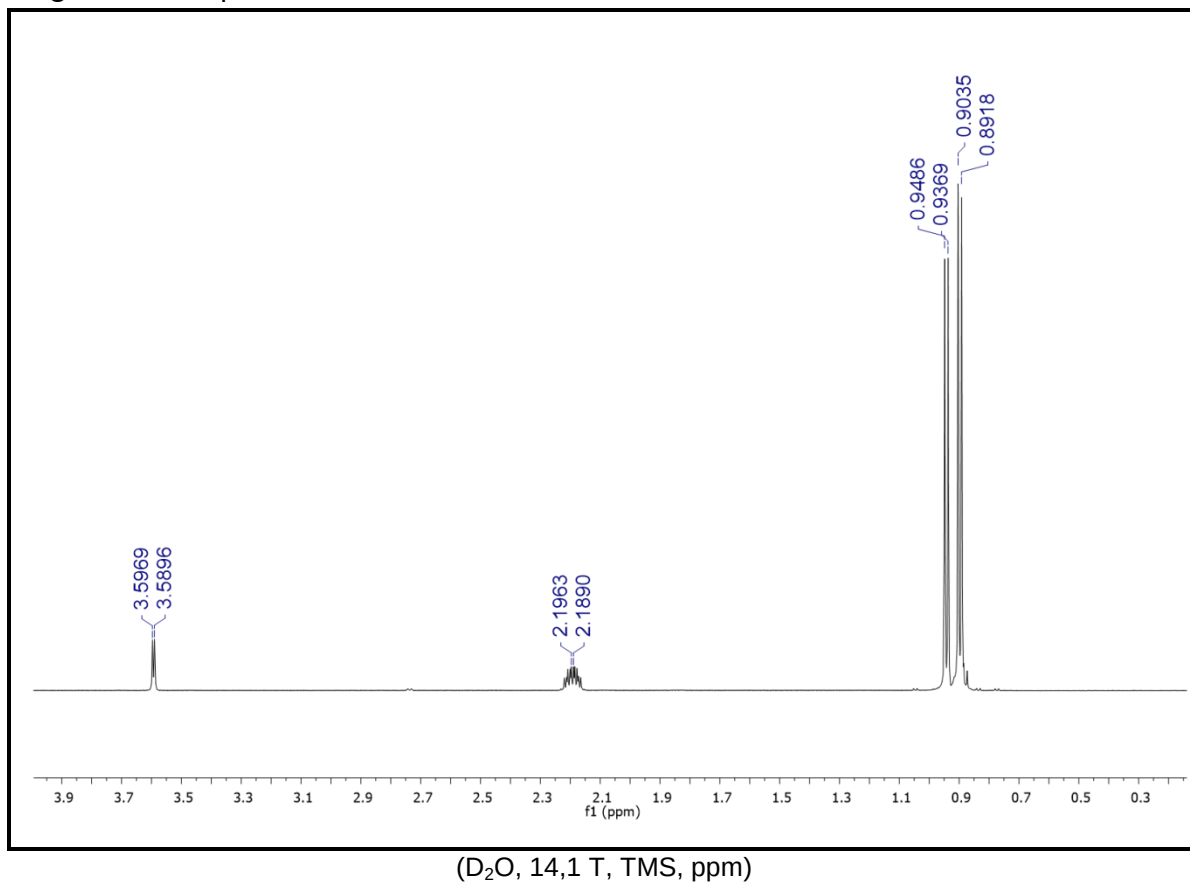


Figura 80 – Espectro TOCSY 1D da substância **2**, irradiado em δ_H 0,90.



Por outro lado, quando foi irradiado o sinal em δ_H 3,20, pode-se observar o sistema de spins composto pelos sinais em δ_H 3,96; 3,05; 3,02 os quais correspondem com outra parte da molécula (Figura 79). Por último, foi irradiado o sinal em δ_H 0,90 e determinou-se o sistema de spins composto pelos sinais em δ_H 0,94; 2,18; 3,59 (Figura 80).

O espectro de massas (Figura 81) apresentou o íon em m/z 305,1067 (cald. m/z 305,2111, err. = 0,99), molécula protonada $[M+H]^+$ sugerindo que a substância possui fórmula $C_{13}H_{29}N_4O_4$ e na Figura 82 é apresentado o espectro MS/MS do íon m/z 305.

Figura 81 – Espectro de massas mistura G-160.

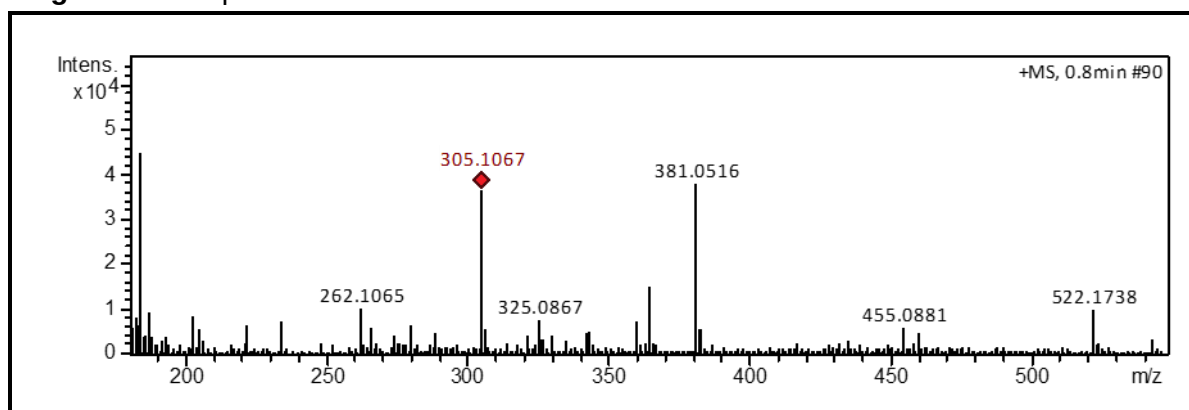
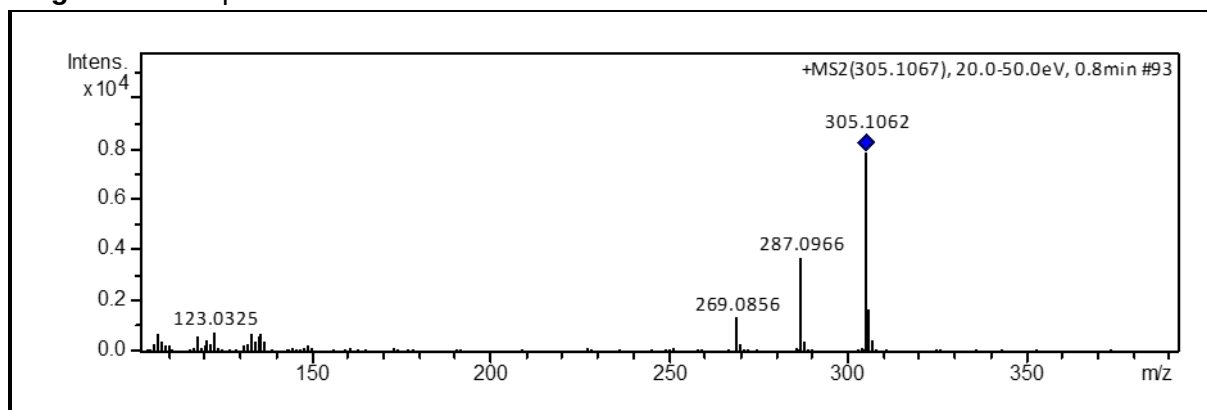
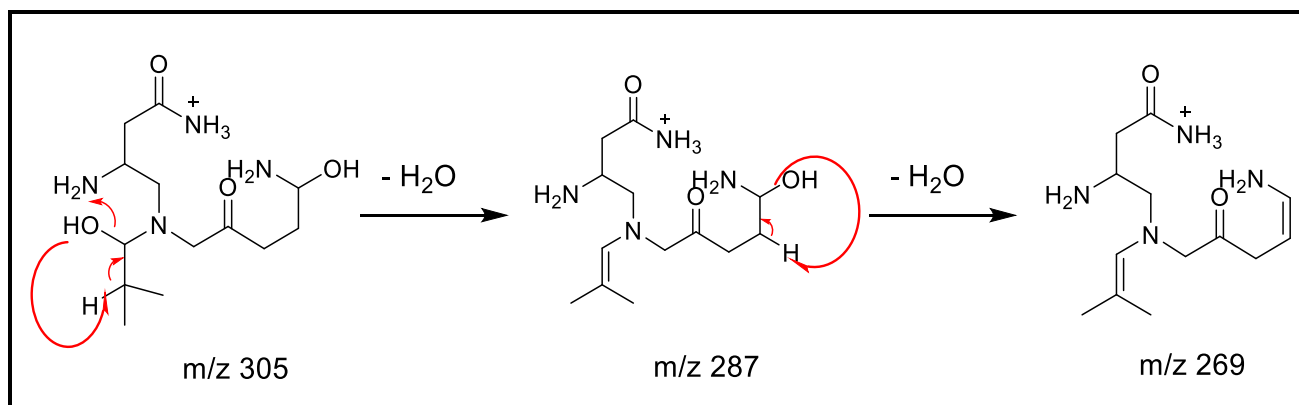


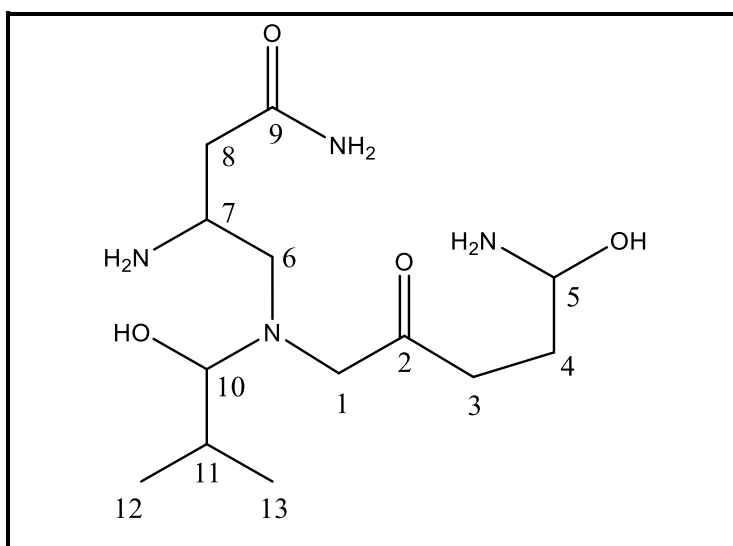
Figura 82 – Espectro de massas MSMS do íon m/z 137.



O padrão de fragmentação da substância **2** com íons em m/z 287 $[M+H - H_2O]^+$ e m/z 269 $[M+H-2(H_2O)]^+$ representa as perdas de duas moléculas de água, produto da desidratação da molécula segundo o diagrama proposto (Figura 83).

Figura 83 – Diagrama do padrão de fragmentação proposto para a substância **2**.

Sendo assim, esta molécula foi determinada como sendo a *N*-(7-aminobutilamida)-*N*-(10-hidroxi-10-isopropil)-*N*-2-oxo-5-amino-5-pentanol (Figura 84). A substância **2** foi isolada pela primeira vez nesse trabalho.

Figura 84 – Estrutura da substância **2**.

Como observado, a estrutura da substância **2** não apresenta conjugação das duplas ligações, assim como com os grupos cromóforos e por essa razão, não pode-se dizer que o espectro de UV dessa substância apresenta características similares ao da substância **1**. Portanto, a substância **2** não foi identificada no perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* (Figura 6, Pagina 54), porém, encontra-se em mistura com a substância **1**.

Foi realizada uma revisão na literatura, na tentativa de encontrar propostas de estruturas para a substância **2** em vários site. No Scifinder encontrou-se duas estruturas de produtos comerciais entre 85 – 89 % de semelhança, porém, não tinha referências. Em

outras bases de dados como Dictionary of Natural Products e o KNApSACK Core System, não foram encontradas estruturas semelhantes. Portanto, essa substância está sendo descrita pela primeira vez no presente trabalho.

É interessante destacar que vários derivados nitrogenados foram estudados pelas suas propriedades biológicas. Dentre elas a atividade hipoglicemiante tem-se destacado. MARLES e FARNSWORTH (1995) estudaram a atividade antidiabética de algumas plantas, assim como os seus constituintes ativos. As substâncias nitrogenadas são uma das classes identificadas e discutidas a sua atividade. Esses resultados nos levaram a realizar um estudo mais minucioso da fração nitrogenada a partir das folhas de *Jatropha aethiopica*.

4.3 Análises por LC-ESI-MS.

Devido às dificuldades no isolamento tanto das substâncias nitrogenadas quanto dos isômeros dos flavonoides, foi projetado o estudo por LC-ESI-MS do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* para tratar de identificar a maior quantidade de metabólitos presentes no extrato.

A diversidade química está diretamente associada à alta variabilidade nas propriedades físico-químicas intrínsecas dos produtos naturais, isso torna a separação, detecção e identificação de substâncias nessas matrizes naturais extremamente desafiadoras (WOLFENDER et al., 2015). Portanto, uma única técnica analítica não é suficiente para uma análise abrangente de um metaboloma complexo, pelo que a utilização de múltiplas tecnologias é necessária. Por conseguinte, o uso combinado das técnicas de separação por CLAE e o poder de detecção da espectrometria de massas, permitiram que o LC/MS se tornasse numa técnica hifenada muito usada (WOLFENDER et al., 2015; RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

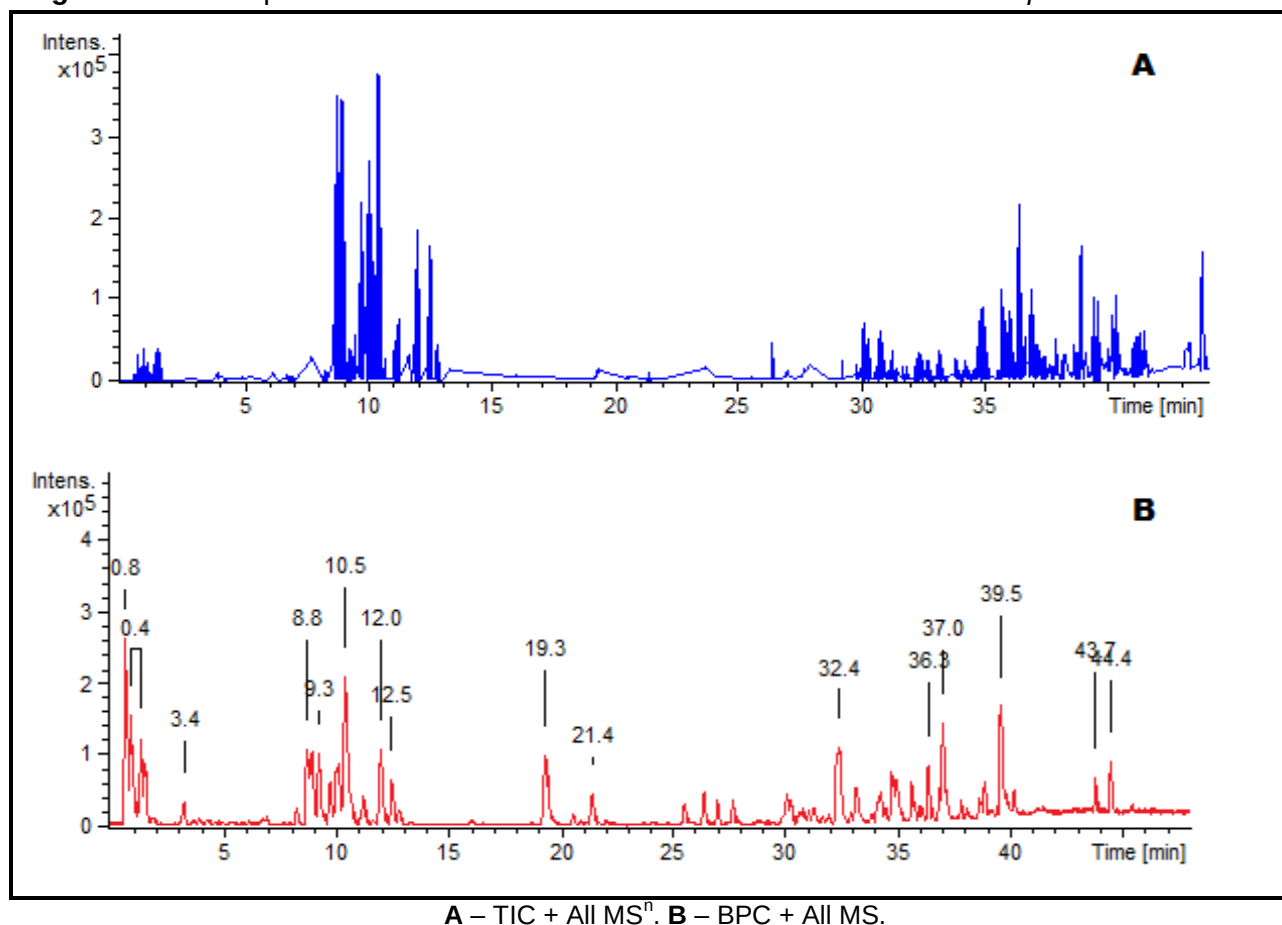
Atualmente, a ionização por eletro pulverização a pressão atmosférica (ESI) é considerada a técnica de ionização suave, de modo que os íons moleculares são observados quase intactos. Essa técnica está sendo considerada de referência e facilita a interface com técnicas de separação como LC. Mesmo com um instrumento de detecção muito sofisticado, o CLAE é útil para remover as interferências da amostra que influenciam a ionização. O desafio neste equipamento é eliminar o solvente mantendo o nível de vácuo adequado no espectrómetro de massa e em simultâneo gerar íons em fase

gasosa (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013). Finalmente para a identificação e proposta dos compostos encontrados, os dados de massas de alta resolução, assim como os dados de MS/MS foram comparados às bases de dados Scifinder, Dicionário de Produtos Naturais e METLIN.

Para a análise por espectrometria de massas foi selecionado o modo positivo devido ao prévio conhecimento da presença de compostos nitrogenados além dos compostos fenólicos, os quais também são ionizados nesse modo. Essas classes de compostos são protonados através da adição de um ácido fraco que levaria a ionização da molécula protonada $[M+H]^+$ (modo positivo) (KEBARLE; VERKERK, 2009)

O perfil metabólico do extrato etanólico das folhas *J. aethiopica* apresentou uma boa resolução na separação cromatográfica dos compostos (Figura 85) permitindo identificar no espectro de massas de primeira ordem os sinais dos íons moleculares das moléculas protonadas $[M+H]^+$.

Figura 85 – Perfil por LC-ESI-MS do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*.



Na análise dos espectros de ESI-MS/MS pode-se observar algumas classes distintas de metabólitos sendo flavonoides. Outra classe de compostos identificadas foram os derivados do ácido cinâmico (Figura 86, Pagina 118). Nos espectro ESI-MS/MS observou-se a presença de vários isômeros de flavonoides derivados da quercetina, do canferol e da isoramnetina. Porém, alguns desses compostos não haviam sido identificados em espécies de *Jatropha*, assim como na família Euphorbiaceae.

O padrão de fragmentação permitiu identificar os principais açúcares como hexoses, e deoxihexoses, demonstrando a presença de vários isômeros com tempos de retenção muito parecidos (Tabela 10, Pagina 119). Essa característica, limitou a separação e/ou identificação das substâncias. Na tabela 11 (Pagina 122) são apresentadas propostas para as estruturas dos metabólitos identificados.

Outra classe de substâncias detetada no início do cromatograma (t_R 0,5 – 3,5 min) foram os compostos nitrogenados, (conforme seção 4.2.3). Apesar da análise realizada dos fragmentos do espectro MS/MS e a comparação feita com o descrito na literatura para o gênero e a família, não foi possível identificar todas as substâncias do cromatograma LC-MS devido a muitas não serem descritas ainda na literatura.

Por outro lado, com base no perfil cromatográfico CLAE-DAD (Figura 5, Pagina 55) realizado para o estudo da atividade hipoglicemiante do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, assim como das frações Frç-01 e Frç-02, foi feito a otimização e a análise até os 15 minutos do perfil cromatográfico, pois nesta região encontrava-se os metabólitos pertencente a fração Frç-01 que forneceu melhor atividade hipoglicemiante (veja seção 4.4.1.3). A Figura 86 apresenta os espectros representativos de ESI-MS/MS para distinguir as classes de metabólitos por meio de identificação da aglicona. Observa-se que os metabólitos existentes são predominantemente os flavonoides, ácidos fenolicos e os compostos nitrogenados (alguns isolados e descritos na seção 4.2).

Figura 86 – Espectros representativos de ESI-MS/MS para distinguir as classes de metabólitos por meio de identificação da aglicona.

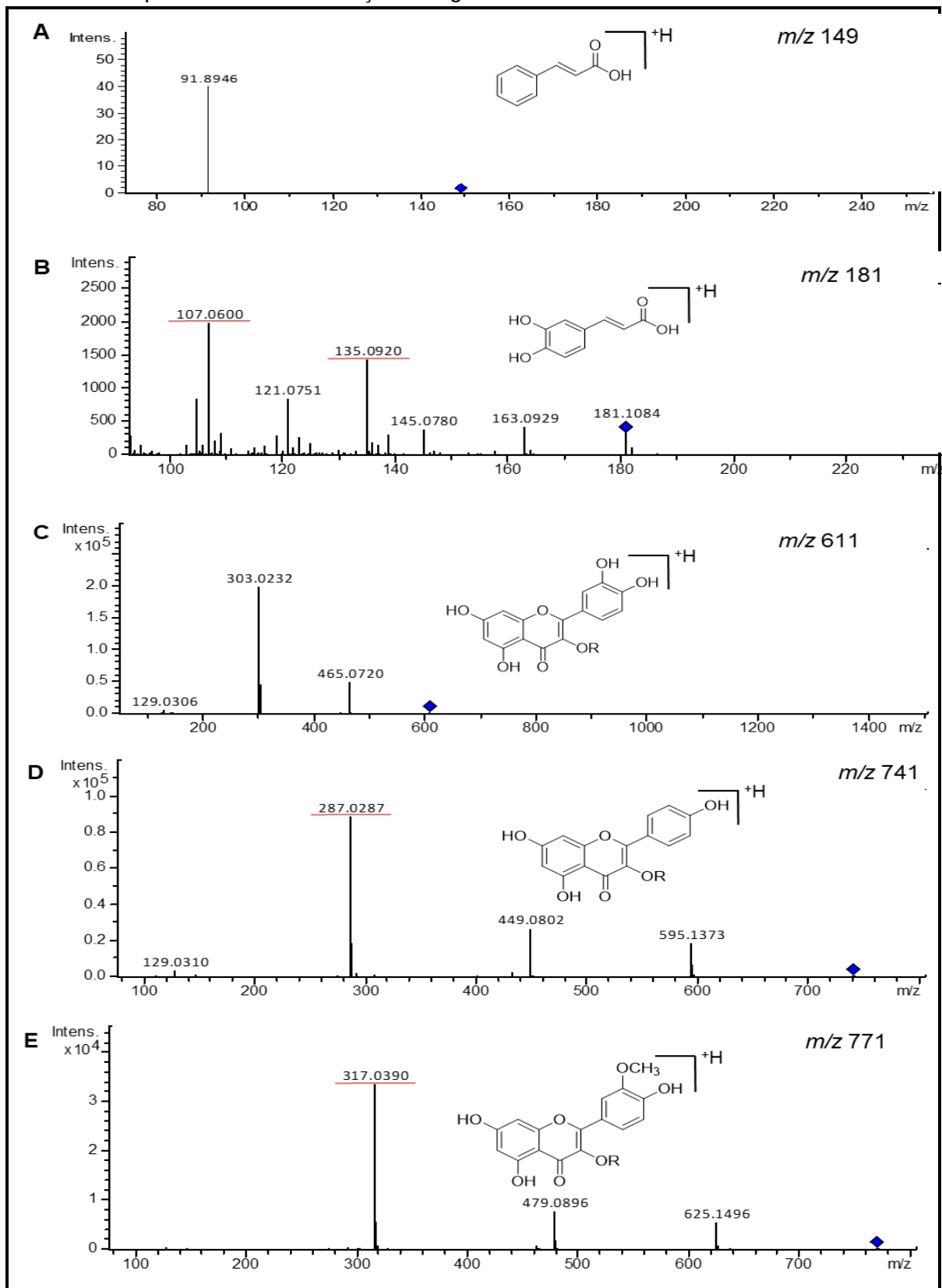


Tabela 10 – Proposta de identificação dos compostos a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* por LC-MS e MS/MS.

Tr (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentação de Íons (m/z)	Composto	Literatura
MISCELANEAS				
00.80	305.1067	305, 287, 269	<i>N</i> -(7-aminobutilamida)- <i>N</i> -(10-hidroxi-10-isopropil)- <i>N</i> -2-oxo-5-amino-5-pentanol (2)	Seção 4.2.3.2
01.00	294.1281	276, 258, 230	NI	
01.10	268.0794	136, 119	NI	-
01.50	310.0986	310, 166	NI	-
03.20	137.	137	1-metil-1-piridina-3-carboxamida (1)	Seção 4.2.3.1
03.40	158.0608	158, 141	NI	-
FLAVONOIDES				
08.70	757.1956	611 [M+H-146] ⁺ ; 465 [M+H-146-146] ⁺ 303 [M+H-146-146-162] ⁺	Quercetina-3- <i>O</i> -L-ramnopiranosil-(1→2)- <i>O</i> -[L-ramnopiranosil-(1→6)]-D-glicopiranosideo (13)	KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003
	757.1962		Derivado Quercetina triglicosilado	
08.80	757.1977	611; 465; 303	Derivado Quercetina triglicosilado	
08.90	757.2065	611, 465, 303	Derivado Quercetina triglicosilado	-
09.00	757.1965	611 [M+H-146] ⁺ ; 465 [M+H-146-146] ⁺ 303 [M+H-146-146-162] ⁺	Quercetina-3- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil-(1→3)- <i>O</i> -[α-L-ramnopiranosil-(1→6)]-D-galactopiranosideo (14)	INADA et al, 1993

Tabela 10 – Continuação.

Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons de fragmentação (m/z)	Composto	Literatura
FLAVONOIDES				
09.00	757.1992	611, 465, 303	Derivado Quercetina triglicosilado	-
09.1	757.1949	611, 465, 303	Quercetina-3-O-(2,6-di-ramnopiranosilgalactopiranosideo (15))	YASUKAWA; SEKINE; TAKIDO, 1989
09.50	611.1577	465 [M+H-146] ⁺ 303 [M+H-146-162] ⁺	Quercetina 3-O-ramnopiranosil-(1→6)-galactopiranosideo (16)	ZALLOCCI; POMILIO, 1994
	611.0927	465, 303	Derivado Quercetina diglicosilado	-
09.70	741.1899	595 [M+H-146] ⁺ ; 449 [M+H-146-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-146-162] ⁺	Canferol-3-O-L-ramnosil-(1→2)-O-[L-ramnopiranosil-(1→6)]-D-galactopiranosideo (17)	SAKUSHIMA et al., 1980
09.80	741.1984	[M+H-146] ⁺ ; 449 [M+H-146-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-146-162] ⁺	Canferol-3-O-L-ramnopiranosil-(1→4)-O-[L-ramnopiranosil-(1→6)]-D-galactopiranosideo (6)	GAMIOTEA-TURRO et al., 2018
	741.2088	595, 449, 287	Derivado canferol triglicosilado	-
09.90	741.2034	595 [M+H-146] ⁺ ; 449 [M+H-146-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-146-162] ⁺	Canferol 3-(2 ^G -ramnopiranosilrutinosideo) (7)	KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003
10.00	741.2064	595, 449, 287	Derivado canferol triglicosilado	-
10.10	741.1943	595, 449, 287	Derivado canferol triglicosilado	-
	611.1236	465 [M+H-146] ⁺ ; 303 [M+H-146-162] ⁺	Rutina (18)	ZALLOCCI; POMILIO, 1994
10.20	741.1993	595, 449, 287	Derivado canferol triglicosilado	-
	611.1323	465, 303	Derivado Quercetina diglicosilado	-

Tabela 10 – Continuação.

Tr (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons de fragmentação (m/z)	Composto	Literatura
10.30	771.2138	625 [M+H-146] ⁺ ; 479 [M+H-146-146] ⁺ ; 317 [M+H-146-146-162] ⁺	Isoramnetina-3-O-(2,6-di-ramnopiranosilgalactopiranosideo) (19)	YASUKAWA; SEKINE; TAKIDO, 1989
10.40	771.2138	625, 479, 317	Derivado ramnetina triglicosilado	-
	611.1385	465, 303	Derivado Quercetina diglicosilado	-
10.50	1221.2843	611, 465, 303	Artefato formado na fonte de ionização	-
	611.1367	465, 303	Derivado Quercetina diglicosilado	-
11.10	625.1412	479 [M+H-146] ⁺ ; 317 [M+H-146-162] ⁺	Isoramnetina-3-O-rutinosideo (20)	ZALLOCCI; POMILIO, 1994
11.20	625.0610	479, 317	Derivado ramnetina diglicosilado	-
11.30	595.1358	449 [M+H-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-162] ⁺	Canferol 3-O-rutinosideo (21)	ZALLOCCI; POMILIO, 1994
	595.2302	449, 287	Derivado do Canferol diglicosilado	-
11.90	595.1562	449 [M+H-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-162] ⁺	Canferol 3-neohesperidosideo (22)	KAZUMA; NODA; SUZUKI, 2003
12.00	595.1359	449, 287	Derivado do Canferol diglicosilado	-
12.10	595.1443	449 [M+H-146] ⁺ ; 287 [M+H-146-162] ⁺	Canferol 3-O- α -L-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactopiranosideo (23)	KITE et al., 2011
12.50	625.1827	479, 317	Derivado ramnetina diglicosilado	-
12.60	625.15137	479, 317	Derivado ramnetina diglicosilado	-
12.60	625.1538	479, 317	Derivado ramnetina diglicosilado	-
12.80	479.0642	317 [M+H-162] ⁺	Isoramnetina 3-O-galactopiranosideo (24)	ZALLOCCI; POMILIO, 1994
12.90	479.0922	317 [M+H-162] ⁺	Isoramnetina 3-O-glicopiranosideo (25)	ABLAJAN et al, 2006

Tabela 11 – Estruturas propostas de flavonoides do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* identificadas por CLAE-ESI-HRMS/MS.

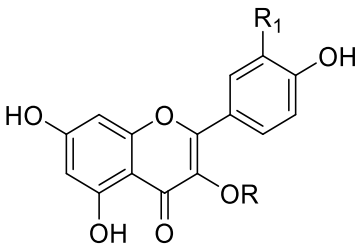
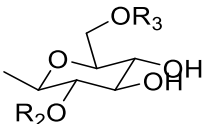
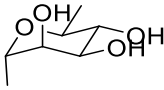
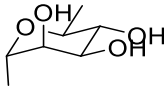
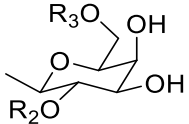
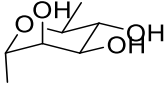
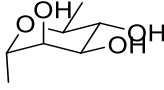
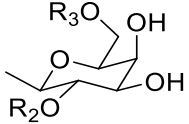
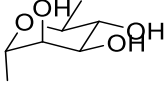
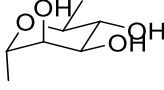
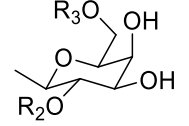
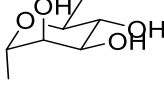
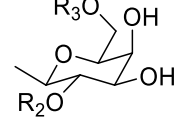
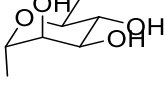
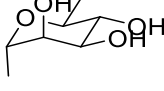
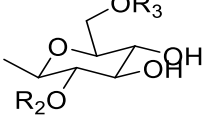
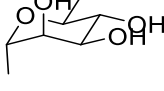
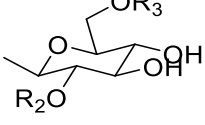
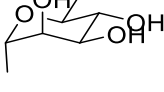
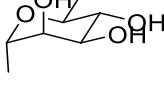
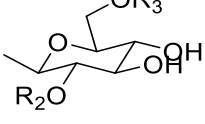
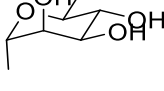
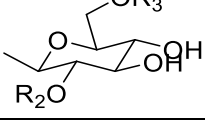
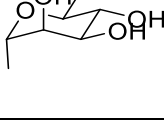
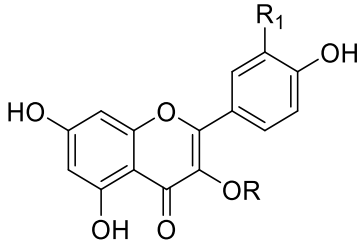
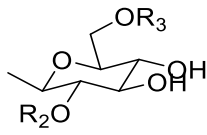
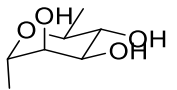
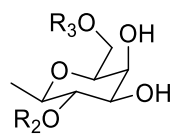
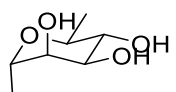
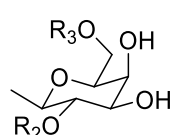
				
Composto	R	R ₁	R ₂	R ₃
13		OH		
14*		OH		
15		OH		
16		OH	H	
17		H		
18		-OH	H	
19		-OCH ₃		
20		-OCH ₃	H	
21		H	H	

Tabela 11 – Continuação.

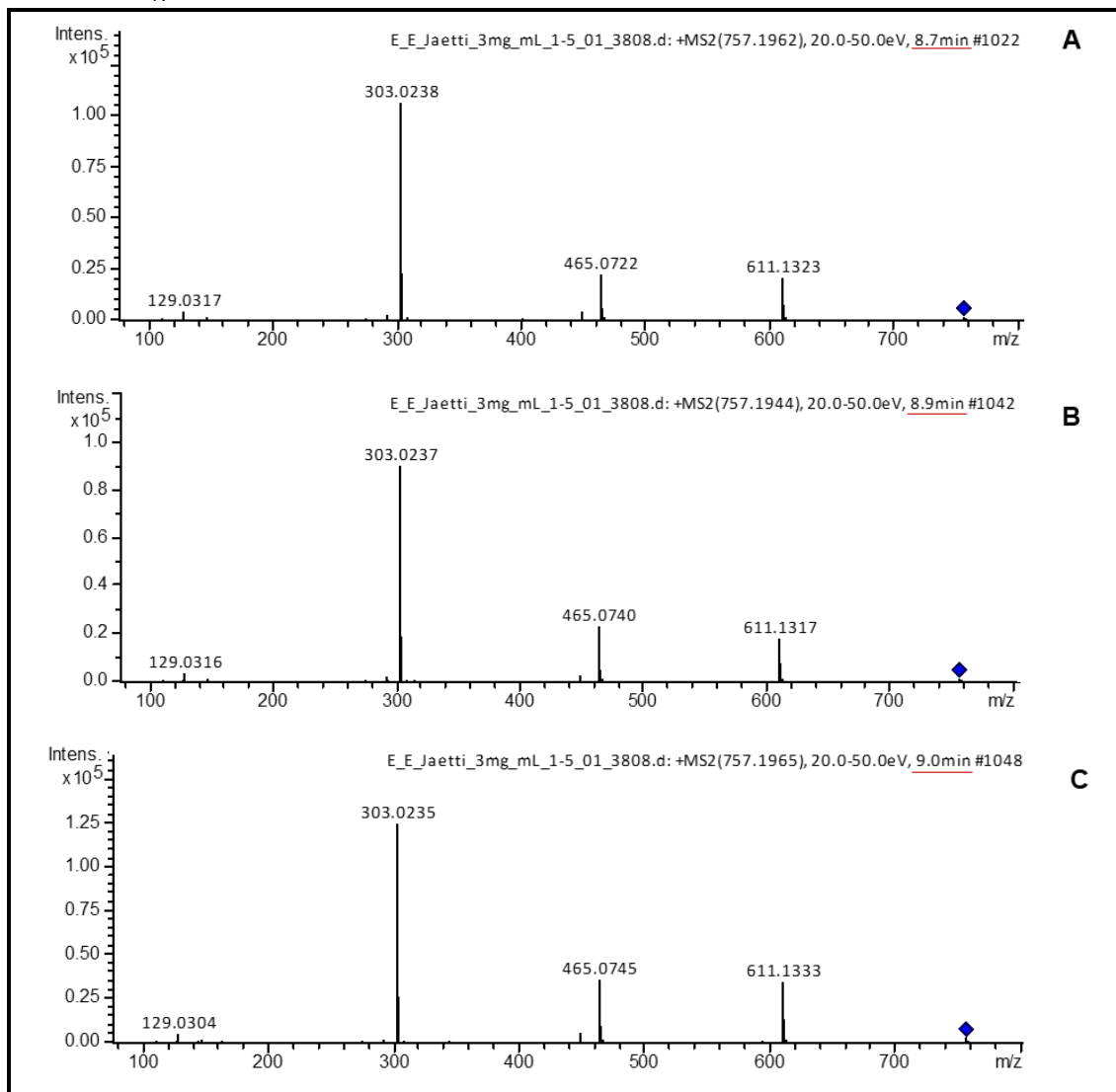
				
Composto	R	R ₁	R ₂	R ₃
22		H		H
23		H	H	
24		-OCH ₃	H	H
25		-OCH ₃	H	H

* No composto **14**, o substituinte ramnose encontra-se na posição C₃ da galactose no lugar de estar na posição R₂.

Apesar das múltiplas opções de substâncias propostas para cada relação m/z a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, acreditamos que a diferença entre eles seja nas hexoses existentes (glicose, galactose, alose) ou (raminose, quinovose), mais do que nas diferenças das posições dos substituintes. No entanto, as diferenças observadas nos tempos de retenção para os *tri* e *di*-glicosídeos, sugerem diferenças na polaridade das substâncias e portanto, pode-se indicar diferenças nas posições que ocupam os glicosídeos na aglicona (isômeros de posição) ou pelas próprias características dos substituintes. Por essa razão, sugerimos desenvolver técnicas cromatográficas mais específicas para a separação desses compostos e atingir uma melhor caracterização dos metabólitos.

A análise da fragmentação dos íons das substâncias com relação m/z 757 permitiu identificar a natureza dos grupos glicosídicos assim como, da aglicona segundo a eliminação dos monossacarídeos com perdas consecutivas de 146 Da (deoxihexose), 146 Da (deoxihexose) e 162 Da (hexose), respectivamente. O pico base em todos os casos foi m/z 303 corresponde com a quercetina (Figura 87, A – C)

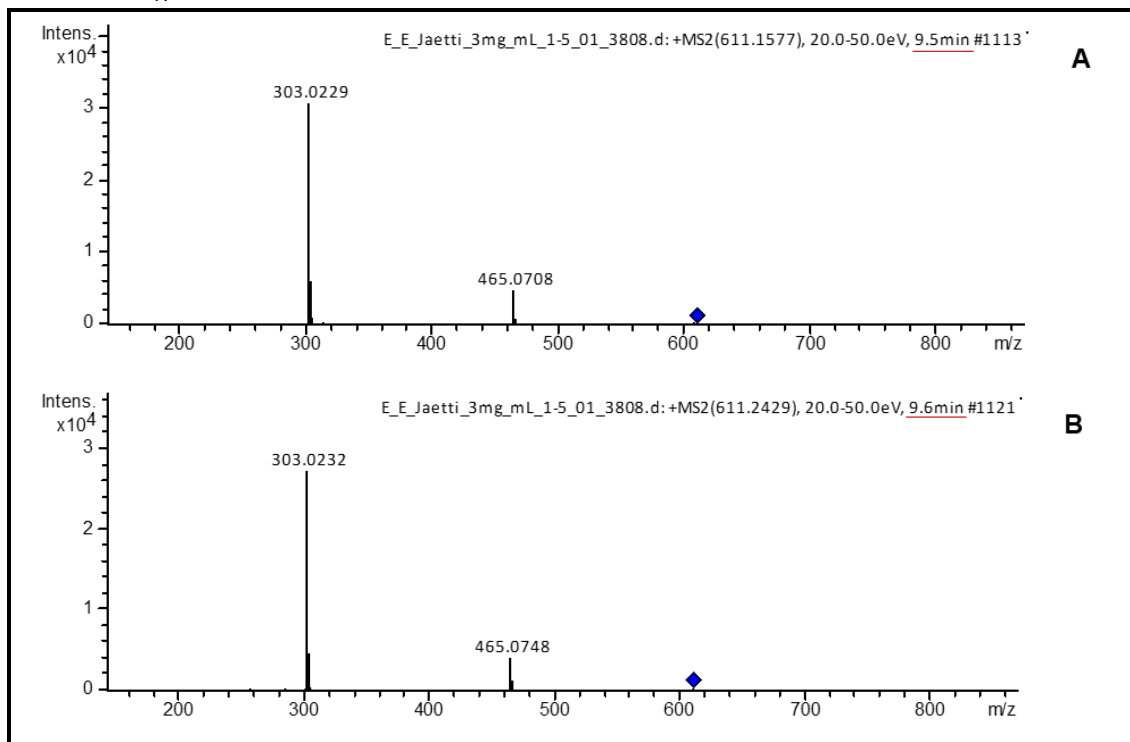
Figura 87 – Espectros ESI-MS/MS para os íons precursoros m/z 757 (A – C) com diferente t_R .



Observa-se em todos os espectros MS/MS da Figura 87, que os picos de m/z 611, m/z 465 e m/z 303, apresentam a mesma relação de intensidade. Esse fato pode indicar que a variação entre as substâncias encontra-se num centro estereogênico das unidades glicosídicas.

Na fragmentação dos íons das substâncias com relação m/z 611, determinou-se um comportamento similar ao anterior (Figura 88). Nesse caso, as perdas das unidades glicosídicas foram identificadas como 146 Da (deoxihexose) seguida de 162 Da (hexose), respectivamente, com a presença do pico base em m/z 303 o que corresponde com a aglicona da quercetina.

Figura 88 – Espectros ESI-MS/MS para os íons precursoros m/z 611 (A – B) com diferente t_R .



Outros flavonoides *tri* e *di*-glicosilados foram identificados apresentando o canferol como aglicona, respectivamente. Nos fragmentos com relação m/z 741 e m/z 595, permitiu-se observar o pico base em m/z 287 o que demonstrou a presença dessa aglicona (Figura 89).

A ramnetina ou isoramnetina, foram outras agliconas de flavonoides identificadas nos espectros de MSMS. O pico base em m/z 317, foi característico nas fragmentações observadas para m/z 771, m/z 625 e m/z 479, dos flavonoides *tri*, *di* e *mono*-glicosilados, respectivamente (Figura 90).

Figura 89 – Espectros ESI-MS/MS para os íons precursoros m/z 741 (A – B) e m/z 595 (C – D) com diferente t_R .

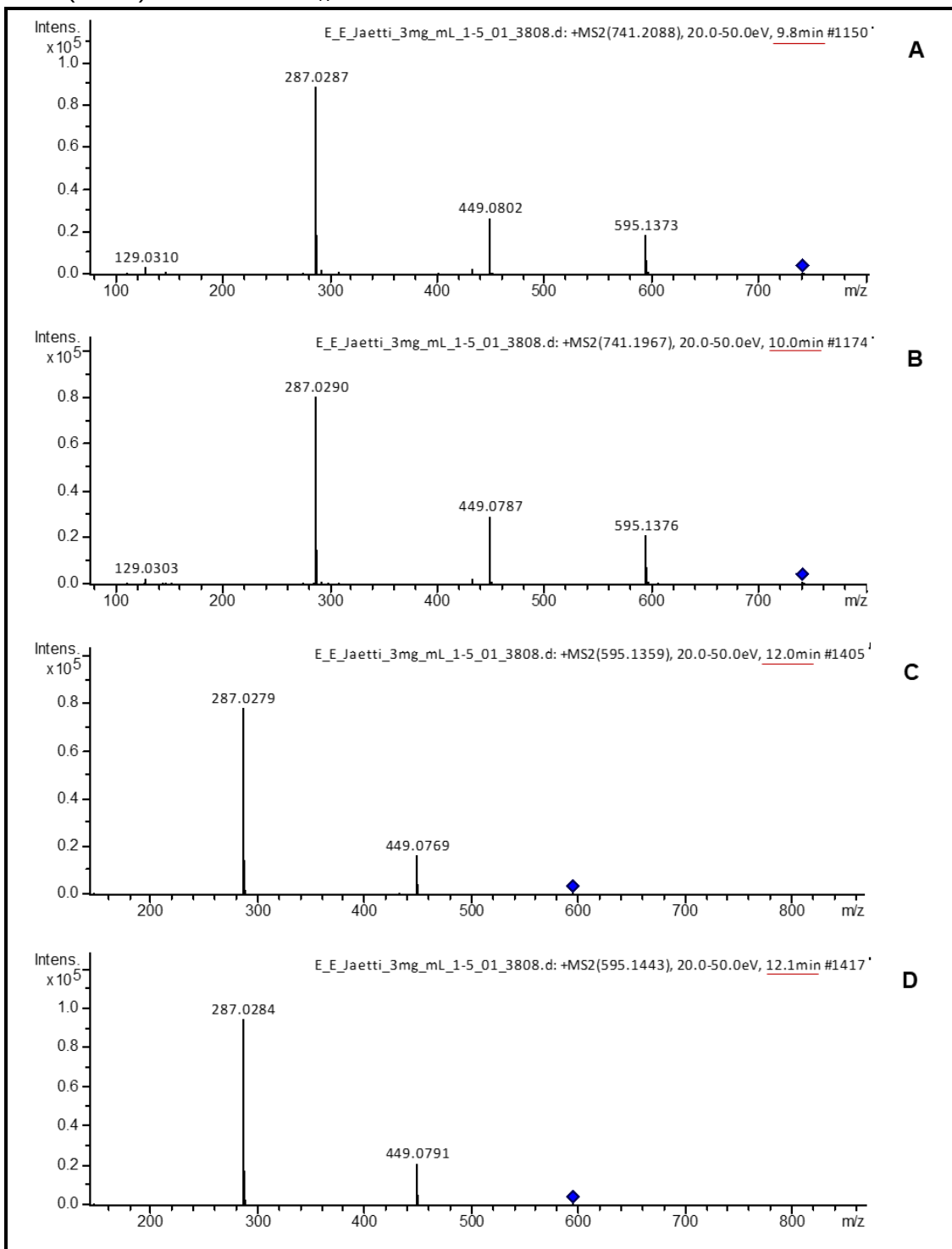
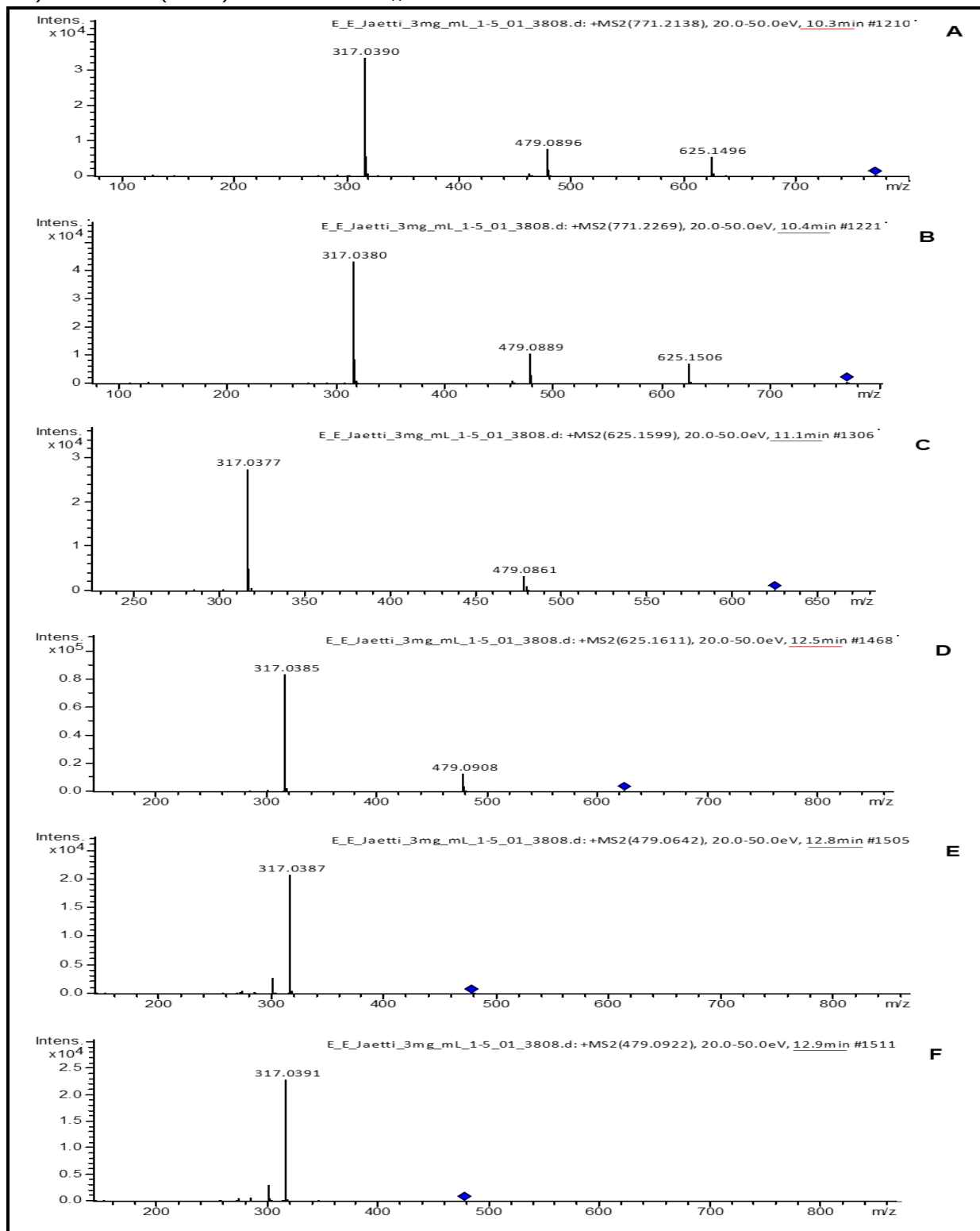


Figura 90 – Espectros ESI-MS/MS para os íons precursores m/z 771 (A – B), m/z 625 (C – D) e m/z 479 (E – F) com diferente t_R .

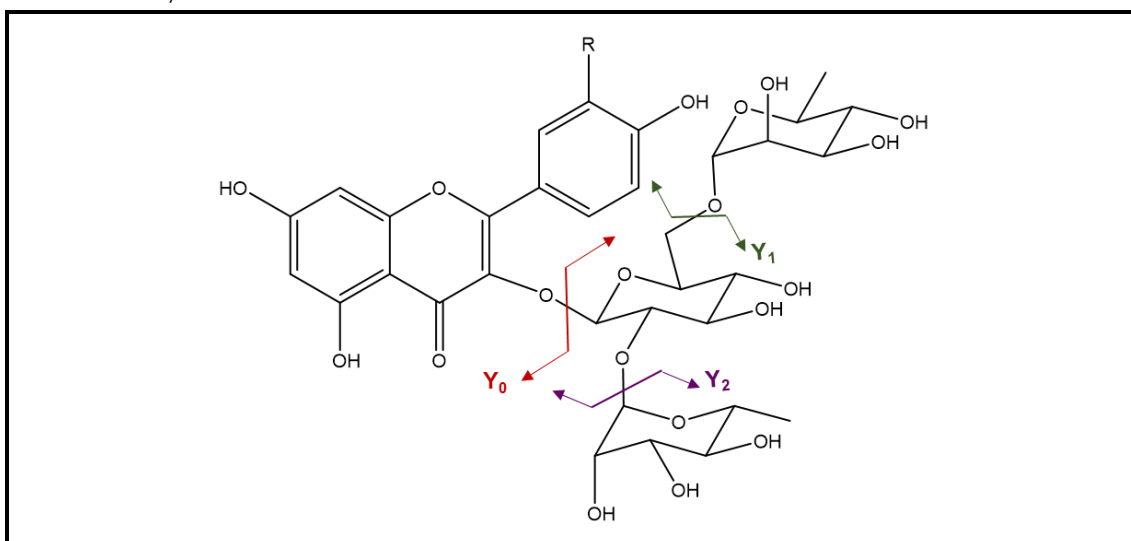


Na literatura é discutido, embora os padrões de fragmentação possam teoricamente variar com o equipamento utilizado, que a rota principal de fragmentação dos flavonóis é independente do modo de ionização usado (MARCH et al., 2007; WOLFENDER; TERREAUX; HOSTETTMANN, 2000). Porém, outras trocas significativas podem ser observadas dada a abundância relativa dos íons fragmentos quando existe a troca do equipamento (WARIDEL et al., 2001; de RIJKE et al., 2003; MARCH et al., 2007).

No caso das unidades glicosídicas, das análises LC/MSⁿ geralmente, não pode-se obter informação da estereoquímica dos carbonos. No entanto, se o flavonoide é O-glicosilado, o tipo de açúcar pode ser diferenciado segundo a eliminação das unidades glicosídicas dado pelo valor de *m/z*; ex. hexoses (162 Da), deoxihexose (146 Da) e pentose (132 Da), respectivamente (FERRERES et al., 2007; VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Na figura 91, é apresentado um diagrama de fragmentação que permitiu explicar os íons fragmentos observados nos espectros MS/MS dos flavonoides identificados a partir do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*. Em todos os espectros observados, os flavonóis identificados nesse trabalho, apresentam padrões de fragmentação relacionados a perda das unidades glicosídicas, portanto, o diagrama ajudou no estabelecimento das propostas.

Figura 91 – Diagrama de fragmentação de flavonoides. Adaptado de VUKICS; GUTTMAN, 2010.



Como observados nas figuras 87 – 90, os flavonóis identificados no extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* são *tri*, *di* e *mono*-glicosilados. O padrão de fragmentação desses flavonóis permitiu identificar as unidades glicosídicas como deoxihexoses (–146 Da) e hexose (–162 Da). Portanto, a nossa proposta em todos os casos corresponde com as quebras na posição Y_1 ou Y_2 , indistintamente, seguida da posição Y_0 dependendo do grau de glicosilação dos flavonoides.

Por definição, dois ou mais açúcares podem estar unidos à aglicona por posições diferentes formando monossacarídeos e são denominados *di-O*-glicosídeo ou *di-C,O*-glicosídeo. Porém, também podem estar ligados na mesma posição e serem definidos como *O*-*diglicosídeo* ou *C,O*-*diglicosídeo* (VUKICS; GUTTMAN, 2010). Essa nomenclatura ajudou a definir se os glicosídeos encontram-se ligados ou não.

Por outro lado, as unidades glicosídicas podem estar unidas à aglicona por qualquer uma das posições hidroxiladas da aglicona, porém, certas posições são mais favorecidas (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Por exemplo, para as flavonas, flavonols, flavanonas e isoflavonas, a posição 7-hidroxi é a favorecida. No caso da 3-hidroxi é para flavonols preferentemente (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; CUYCKENS; CLAEYS, 2004; WILLIAMS, 2006). Segundo ABLAJAN et al., (2006) e VUKICS; GUTTMAN (2010), as posições dos glicosídeos na molécula da aglicona podem ser previstos de acordo à relação das intensidades entre os picos dos fragmentos obtidos no espectro de MS/MS no modo negativo.

Dados da literatura indicam que os flavonóis *di-O*-glicosilados mostram um comportamento espectral de massas diferente aos flavonóis *O*-*diglicosilados*. Eles podem ser facilmente diferenciados com base nas características dos espectros no UV, bem como pelas características de fragmentações no espectro de massas (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004; VUKICS; GUTTMAN, 2010). É descrito na literatura que nos isômeros *di-O*-glicosilados, o íon Y_1^+ apresenta-se como pico base (100% de abundância relativa) e o íon Y_0^+ com uma intensidade média (~30%). Já no caso dos *O*-*diglicosilados*, o íon Y_0^+ apresenta a maior abundância relativa (100%) (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004).

Quanto aos flavonoides são 3-*O*-glicosilados, eles apresentam uma abundância relativa dos íons produtos formados superior à abundância relativa dos íons produtos decorrentes da fragmentação de flavonoides 7-*O*-glicosilados, principalmente para o íon Y_0^+ (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004; VUKICS; GUTTMAN, 2010). No

entanto, os métodos baseados na detecção da presença ou ausência de íons de fragmentos distintos são preferidos às técnicas que dependem apenas das mudanças de intensidade relativa observadas para os compostos isoméricos (VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Na seção 4.2.2.1, foi discutido o padrão de fragmentação no modo negativo para os flavonoides *tri*-glicosilados isolados e identificados do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*. Esse resultado, unido ao reportado nessa seção, justificam as junções dos flavonóis *tri*-, *di*-, e *mono*-glicosilados, identificados por LC-MS apresentando a substituição na posição 3-O- da aglicona, assim como as unidades glicosídicas encontram-se ligadas.

O estudo por LC-ESI-MS do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*, mostrou a grande quantidade de isômeros de flavonoides presentes no extrato, assim como corroborou com as estruturas dos metabolitos isolados e identificados na seção 4.2. Apesar de não terem sido identificadas todas as substâncias presentes no EE, principalmente nos menores tempos de retenção do cromatograma, pôde-se verificar a presença das substâncias nitrogenadas que foram isoladas na seção 4.2.3.

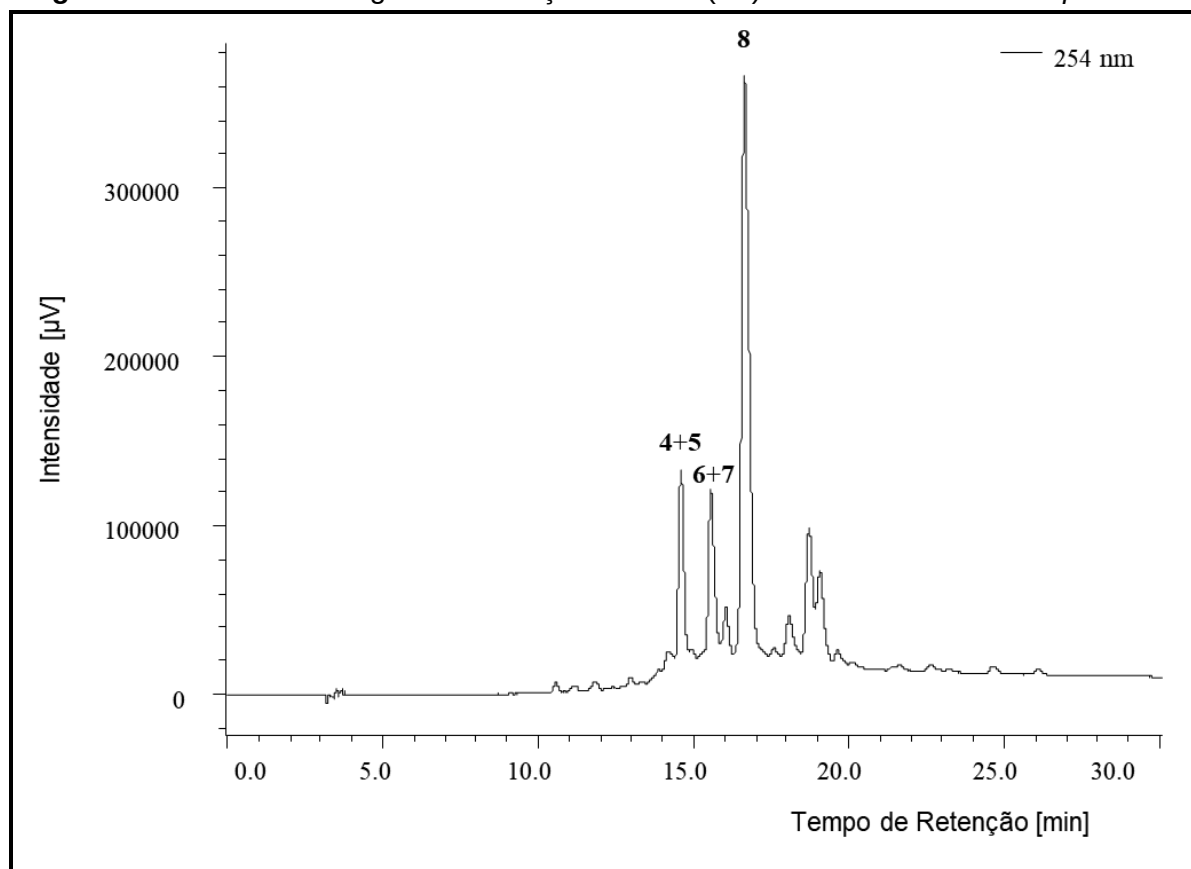
As análises realizadas também demonstraram a complexidade das frações estudadas, Frç-01 (**FCN**) e Frç-02 (**FF**), devido aos diferentes isômeros identificados para cada relação *m/z* em tempos de retenção muito próximos. Mediante análise destes resultados, percebemos a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias para o isolamento desses metabolitos.

4.4 Quantificação no extrato etanólico (EE) e na fração fenólica (FF) das substâncias isoladas.

A quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopiranosídeo e a quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glicopiranosídeo (**4+5**), o canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopiranosídeo e o canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glicopiranosídeo (**6+7**) e a rutina (**8**) foram os metabolitos de maior absorção do extrato etanólico (**EE**) e da fração fenólica (**FF**) (Figuras 5 e 92, Páginas 55 e 131, respectivamente), e foram quantificados tanto no **EE** quanto na **FF**. As substâncias **4+5** e **8** foram quantificadas usando a curva da quercetina, e no caso

de **6+7**, pela curva do canferol. No entanto, o ácido protocatecuico (**3**) foi quantificado apenas no **EE**, pois essa substância não foi identificada na fração fenólica (**FF**). A quantificação dos metabolitos foi realizada utilizando um padrão de calibração externo (RIBANI et al., 2004; ROBARDS, 2003), quercetina (**Q**), canferol (**K**) e o ácido protocatecuico (**AcP**). Os padrões utilizados foram confirmados através da coinjeção deles por CLAE-DAD e a comparação dos espectros de UV.

Figura 92 – Perfil cromatográfico da fração fenólica (**FF**) das folhas de *J. aethiopica*.



Coluna Thermo Hypersil Gold (250 x 4,6 mm, 5 μm), 5 – 65 % de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1 % de TFA; solvente B: MeOH acidificado com 0,1 % de TFA), 25°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹.

Fonte: Cromatograma adaptado de GAMIOTEA-TURRO et al., (2018)

4.4.1 Linearidade e sensibilidade.

A linearidade é a habilidade do método oferecer uma resposta diretamente proporcional à quantidade da substância de interesse da amostra dentro de um intervalo determinado (MARCUCCI, 2011). Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AGÊNCIA, 2003), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r^2)

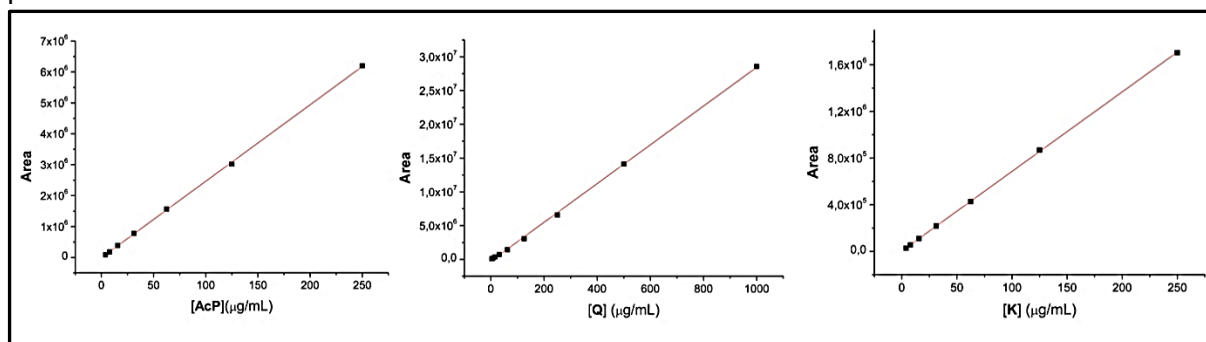
deve ser 0,99, entretanto para fitoterápicos o valor de 0,98 é considerado aceitável.

A sensibilidade do método corresponde à quantidade mínima de um analito produzir uma resposta significativa (MARCUCCI, 2011).

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração a ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações de rotina no laboratório (MARCUCCI, 2011).

Sete níveis de concentrações foram utilizados para a construção das curvas analíticas de cada padrão a partir dos valores das áreas dos picos ($1000 - 7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as curvas dos flavonoides e $500 - 3,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a curva do ácido protocatecuico) (Figura 93).

Figura 93 – Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa das soluções padrões.



AcP (Ácido protocatecuico), Q (Quercetina) e K (Canferol).

Na Tabela 12 são apresentados os parâmetros estatísticos que determinaram a linearidade das curvas analíticas.

Tabela 12 – Parâmetros das curvas analíticas dos padrões.

Padrão	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Fator de correlação (r^2)	Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AcP	-6515,75	24723,10	0,9999	3,90-500	0,09	0,27
Q	-248245,06	28685,63	0,9994	7,77-1000	0,10	0,28
K	3559,659	6817,94665	0,9999	7,77-1000	0,08	0,23

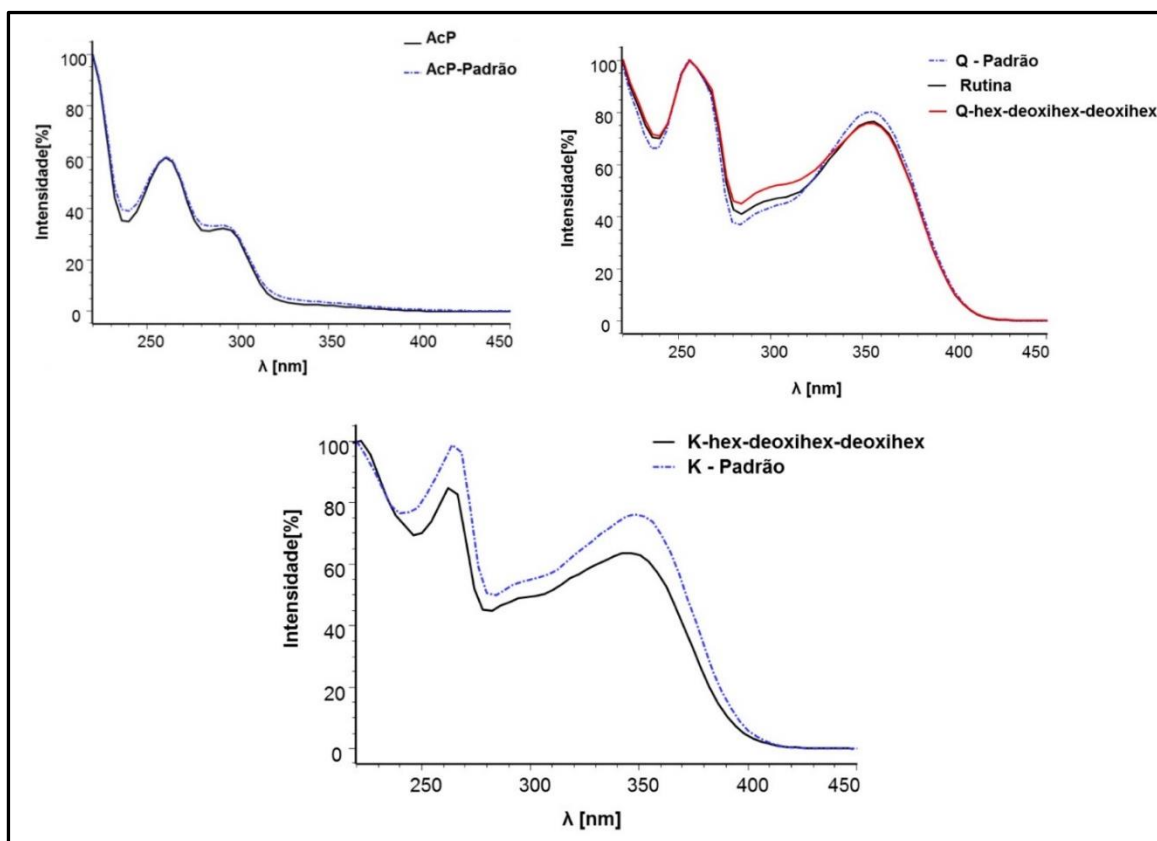
Ácido protocatecuico (AcP), quercetina (Q) e canferol (K)

Os valores de fator de correlação obtido para cada curva cumpriram com o proposto pela ANVISA ($r^2 > 0,99$) (AGÊNCIA, 2003) e demonstraram a linearidade do método analítico proposto para a quantificação dos metabólitos.

4.3.2 Seletividade.

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (MARCUCCI, 2011; RIBANI et al., 2004). A seletividade pode ser avaliada de várias maneiras e uma delas é pela similaridade na comparação dos espectros de UV dos padrões com os espectros dos picos obtidos durante a análise do extrato e das frações de *J. aethiopica* (Figura 94).

Figura 94 – Espectros de UV dos padrões comparados com os compostos isolados no laboratório.



Como se observa na comparação dos espectros no UV dos padrões utilizados e as substâncias isoladas, eles apresentam coincidências nos máximos de absorção. Portanto, segundo a ANVISA (AGÊNCIA, 2003), o método analítico apresenta seletividade o que possibilitou a quantificação das substâncias.

4.3.3 Precisão.

A precisão expressa o grau de dispersão ou de similaridade que se obtém quando uma amostra homogênea é analisada repetidamente, utilizando um mesmo método. Quanto mais próximo estiverem os valores entre si, maior será a precisão (RIBANI et al., 2004; ROBARDS, 2003).

As amostras foram injetadas em triplicata (com três níveis de concentrações diferentes) em três dias diferentes, a fim de se determinar a precisão intra-dia e inter-dia em relação aos t_R e às áreas dos picos cromatográficos. Nas Tabelas 13 e 14 apresentam-se os valores obtidos. As variações dos parâmetros foram inferiores ao limite de 5% estabelecido pela regulamentação brasileira (RE 899/03) (AGÊNCIA, 2003).

Tabela 13 – Dados de desvio padrão para as determinações intra-dia e inter-dia na quantificação do Ácido protocatecuico (AcP).

Padrão	Tempo de retenção (DPR %)		Área do pico (DPR %)	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
		62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
AcP	0,015	0,006	1,88	1,08
		15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
AcP	0,02	0,006	0,30	0,53
		3,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
AcP	0,02	0,006	0,28	0,70

Tabela 14 – Dados de desvio padrão para as determinações intra-dia e inter-dia na quantificação da rutina (R).

Padrão	Tempo de retenção (DPR %)		Área do pico (DPR %)	
	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
		250,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
R	0,006	0,025	0,82	0,94
		62,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
R	0,006	0,046	2,21	2,53
		15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		
R	0,040	0,017	0,59	0,98

Segundo ANVISA (AGÊNCIA, 2003), para considerar um método analítico como preciso, os valores de desvio padrão tanto para o tempo de retenção quanto para a área do pico devem estar abaixo de 5%. Para o método analítico proposto nesse estudo, cumpriu-se o estabelecido. Portanto, foi demonstrada a precisão do método.

4.3.4 Exatidão.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro (MARCUCCI, 2011; ROBARDS, 2003). Esse valor foi avaliado em três níveis de concentração (baixa, média e alta) pela taxa de recuperação dos dois compostos isolados (Tabela 15) e foi calculado utilizando a seguinte fórmula: % de recuperação = $[(Cf / Cnf + Cpd)] \times 100$, onde *Cf* corresponde à concentração fortificada, *Cnf* corresponde à concentração não fortificada e *Cpd* corresponde à concentração do padrão adicionado.

Tabela 15 – Porcentagem de recuperação dos metabólitos no extrato etanólico (EE) e fração fenólica (FF) das folhas de *J. aethiopica*.

(AcP) Exatidão (%)		
Conc. add ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EE	FF
3,90	94,97 $\pm$ 0,28	-
15,62	97,30 $\pm$ 0,30	-
62,50	91,42 $\pm$ 1,89	-
(Rutina) Exatidão (%)		
Conc. add ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EE	FF
15,62	90,24 $\pm$ 0,59	99,03 $\pm$ 1,47
62,50	98,20 $\pm$ 2,21	103,04 $\pm$ 1,38
250,00	100,62 $\pm$ 0,82	101,62 $\pm$ 0,64

A taxa de recuperação para cada padrão foi considerada dentro da taxa percentual aceitável de 80 – 120 % determinada pela (AGÊNCIA, 2003). Portanto, a determinação das substâncias isoladas apresentou uma exatidão dentro dos parâmetros recomendados podendo, desta forma, ser proposto como método analítico para a quantificação das substâncias em estudo.

4.3.5 Quantificação dos compostos isolados.

Os teores dos metabólitos isolados e identificados no extrato etanólico (EE) e na fração fenólica (FF) foram determinados pela interpolação das áreas nas curvas de calibração (Tabela 16).

Tabela 16 – Teor dos compostos isolados no extrato etanólico (EE) e fração fenólica (FF) das folhas de *J. aethiopica*.

Substância	Padrão	Concentração (mg g ⁻¹) ± DPR	
		EE	FF
3	AcP	2.057 ± 0.006	-
4+5	Q	19,94 ± 0.15	10.05 ± 0.01
6+7	K	12.73 ± 0.08	9.79 ± 0.32
8	Q	29.98 ± 0.24	41.88 ± 0.37

Ácido protocatecuico (**3**); quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-[α -L-ramnopiranosil-(1→6)]- β -D-galactopiranosídeo (**4**); quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-[α -L-ramnopiranosil-(1→6)]- β -D-glicopiranosídeo (**5**); canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1→4)-[α -L-ramnopiranosil-(1→6)]- β -D-galactopiranosídeo (**6**); canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-[α -L-ramnopiranosil-(1→6)]- β -D-glicopiranosídeo (**7**); rutina (**8**); **AcP**: Ácido protocatecuico; **Q**: quercetina; **K**: canferol.

O processo de quantificação permitiu analisar quantitativamente os metabólitos isolados do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*. Estudos posteriores de determinação da toxicidade e/ou atividade biológica dessas substâncias ajudará na proposta de possíveis formulações feitas a partir das folhas dessa planta. Por outro lado, futuramente, podem ser feitas análises das doses das substâncias isoladas, assim como o que foi reportado por LEE e JEUNE (2013) para a rutina (ver seção 4.4.1.4).

4.4 Atividades biológicas.

4.4.1 Efeito hipoglicêmico e anti-hiperglicêmico do tratamento com *J. aethiopica*.

Diabetes mellitus é uma doença debilitante e muitas vezes fatal, com incidência crescente nas populações em todo o mundo. Uma investigação científica de remédios fitoterápicos tradicionais para diabetes pode fornecer pistas valiosas para o desenvolvimento de drogas alternativas e estratégias terapêuticas. As alternativas são claramente necessárias devido à incapacidade das terapias atuais para controlar todos os aspectos patológicos do diabetes, e o alto custo e a baixa disponibilidade das terapias atuais para muitas populações, particularmente nos países em desenvolvimento (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

No presente experimento utilizou-se a estreptomicina para induzir o diabetes. Segundo SILVA et al. (2011), concentrações acima de 50 mg kg⁻¹ de peso dos animais, provocam diabetes tipo 1 devido a diminuição da área ocupada pelas ilhotas

pancreáticas. Neste caso, utilizou-se uma concentração de 150 mg kg^{-1} de estreptozotocina (STZ) pelo que pode-se sugerir que foi induzida a diabetes tipo 1.

Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados para investigar o potencial da atividade hipoglicêmica do extrato etanólico e das frações enriquecidas de compostos nitrogenados (**FCN**) e fenólicos (**FF**) de *J. aethiopica*.

Após a indução do diabetes, os grupos diabéticos mostraram um aumento nos níveis de glicose em relação ao grupo controle. O tratamento com o **EE** durante 14 dias conduziu a uma diminuição dos níveis de glicose no grupo STZEXT (camundongos diabéticos tratados com extrato etanólico) quando comparado com os grupos STZSAL (camundongos diabéticos tratados com solução salina) e STZMET (camundongos diabéticos tratados com metformina) (Tabela 17).

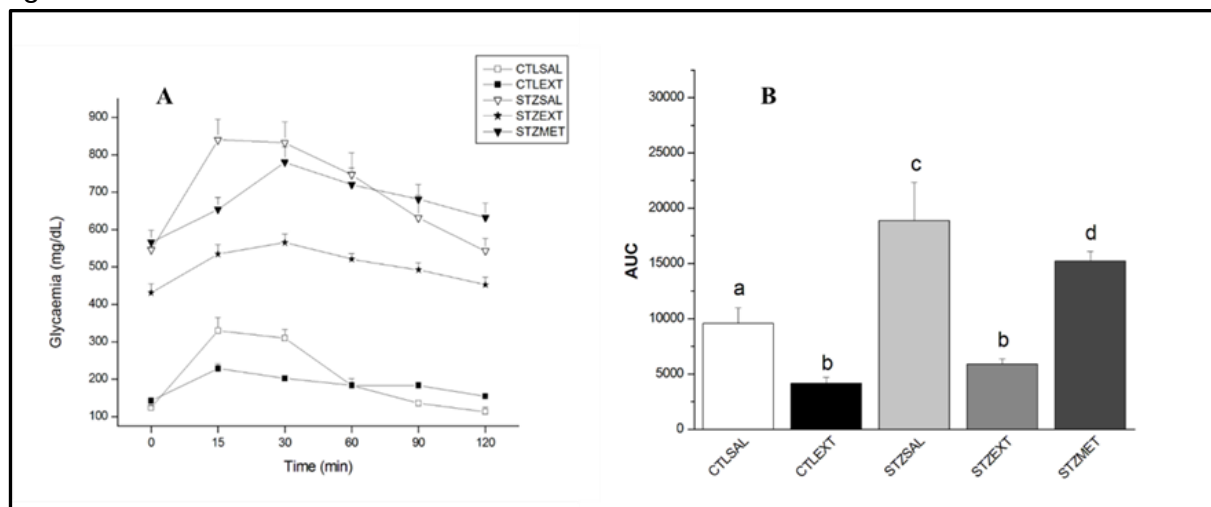
Na figura 95, o gráfico A representa o pico da glicemia durante o teste de oGTT durante 120 min. Sendo que aos 15 min. observou-se o incremento do pico da glicemia e após esse tempo começa a diminuição desse parâmetro. O Teste de Tolerância à Glicose Oral mostrou uma melhora na tolerância à glicose no grupo STZEXT em relação aos grupos STZSAL e STZMET mostrando um efeito hipoglicemiante importante do extrato. Outro dado importante a considerar é o fato de que o tratamento com **EE** no grupo CTLEXT não diminuiu os níveis de glicose a níveis suficientes para provocar um estado hipoglicêmico. Entretanto, o comportamento do oGTT deste grupo apresentou uma diminuição do pico de glicemia que pode ocorrer devido a uma diminuição da taxa de absorção de glicose pela inibição das enzimas α -glucosidase ou a uma ingestão mais rápida de glicose nas células, ou por uma combinação dos dois fatores (Figura 95 A e B).

Tabela 17 – Efeito do extrato etanólico (**EE**) de *J. aethiopica* (500 mg kg^{-1} por peso) sobre os níveis de glicose em camundongos normoglicêmicos e diabéticos depois de 14 dias de tratamento.

Grupo	Dia 1	Dia 7	Dia 14
CTLSAL	$134 \pm 5,6^a$	$128 \pm 5,8^a$	$131 \pm 7,0^a$
CTLEXT	$138 \pm 5,0^a$	$132 \pm 6,0^a$	$129 \pm 4,3^a$
STZSAL	$413 \pm 19,8^b$	$522 \pm 18,7^{b*}$	$550 \pm 27,9^{b**}$
STZEXT	$415 \pm 38,8^b$	$386 \pm 15,0^{c*}$	$380 \pm 24,7^{c**}$
STZMET	$415 \pm 19,8^b$	$529 \pm 22,4^{b*}$	$566 \pm 35,0^{b**}$

Os valores são da média $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos obtidos a partir de ANOVA seguido pelas prova post de Tukey. $P < 0,05$; $n = 8$ /grupo. **CTLSAL**: Camundongos não diabéticos tratados com solução salina; **CTLEXT**: camundongos não diabéticos tratados com **EE**; **STZSAL**: camundongos diabéticos tratados com solução salina; **STZEXT**: camundongos diabéticos tratados com **EE**; **STZMET**: camundongos diabéticos tratados com metformina; *diferença significativa dentre os dias 1 e 7 do próprio grupo; **diferença significativa dentre os dias 1 e 14 do próprio grupo.

Figura 95 – Efeito do tratamento com EE de *J. aethiopica* na concentração de 500 mg kg⁻¹.



A – Tolerância à glicose; **B** – Área sob a curva - AUC. **CTLSAL** - camundongos não diabéticos tratados com solução salina; **CTLEXT** - camundongos não diabéticos tratados com extrato etanólico; **STZSAL** - camundongos diabéticos tratados com solução salina; **STZEXT** - camundongos diabéticos tratados com extrato etanólico; **STZMET**- camundongos diabéticos tratados com metformina.

Os dados expressam-se como média $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas obtidas por ANOVA seguido pelo post test de Tukey. $P < 0,05$; $n = 8$ / grupo.

O gráfico B (Figura 95) representa os dados relacionados com quanto tempo o animal demora em adsorver a glicose em excesso. Portanto, os valores diferentes das letras indicam a taxa de adsorção de cada um. Nesse caso, os camundongos diabéticos tratados previamente com o **EE**, adsorveram melhor a glicose em excesso que aqueles tratados com a metformina.

4.4.1.2 Efeito do tratamento do extrato etanólico (EE) de *J. aethiopica* (500 mg kg⁻¹ por via oral) no metabolismo lipídico em camundongos.

Como mostrado na Tabela 18, o tratamento com o **EE** de *J. aethiopica* causou uma melhoria significativa no metabolismo lipídico. A diminuição do TC, VLDL-colesterol e triglicérides e o aumento do colesterol HDL é importante para prevenir algumas doenças causadas pelo DM. Alguns estudos demonstraram que o tratamento com algumas plantas medicinais é capaz de diminuir e melhorar o metabolismo lipídico, melhorando e prevenindo doenças cardiovasculares e aterosclerose, provavelmente devido à presença de metabólitos secundários como flavonoides, saponinas, alcaloides e outros (TUORKEY, 2016; VAREDA et al., 2014).

Tabela 18 – Efeito do tratamento de extrato bruto de *J. aethiopica* (500 mg kg⁻¹ por via oral) em parâmetros de soro após 14 dias de tratamento.

	CTLSAL	CTLEXT	STZSAL	STZEXT
Proteína total (g/dL)	5,4 ± 0,1 ^a	5,2 ± 0,2 ^a	4,4 ± 0,1 ^b	3,6 ± 0,2 ^c
Urea (mg/dL)	46,4 ± 3,5 ^a	44,6 ± 2,3 ^a	44,9 ± 2,8 ^a	44,7 ± 2,2 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	133,8 ± 11,4 ^a	123,9 ± 7,7 ^a	156,5 ± 11,9 ^a	113,7 ± 9,0 ^b
Colesterol total (mg/dL)	117,1 ± 5,4 ^a	108,7 ± 4,5 ^a	103,0 ± 6,7 ^a	80,6 ± 4,8 ^b
HDL-Colesterol (mg/dL)	45,6 ± 1,9 ^a	45,1 ± 1,7 ^a	27,4 ± 1,7 ^b	34,3 ± 1,8 ^c
VLDL- Colesterol (mg/dL)	26,7 ± 2,3 ^a	24,8 ± 3,0 ^a	31,3 ± 1,7 ^a	20,7 ± 2,7 ^b

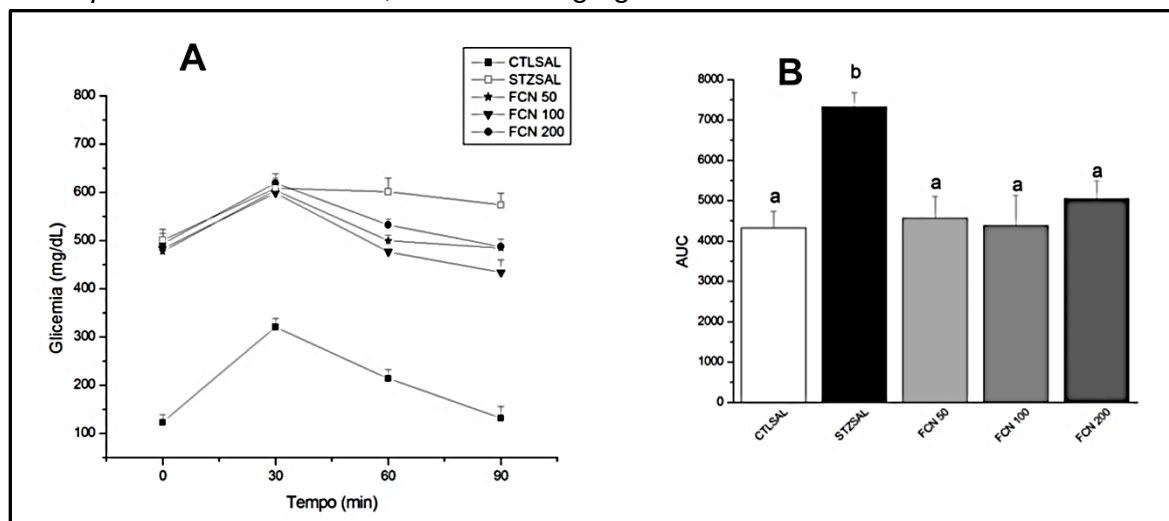
CTLSAL - camundongos não diabéticos tratados com solução salina; CTLEXT - camundongos não diabéticos tratados com extrato etanólico; STZSAL - camundongos diabéticos tratados com solução salina; STZEXT - camundongos diabéticos tratados com extrato etanólico. Os valores são médias ± DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os diferentes grupos obtidos a partir da ANOVA seguida pelo teste de Tukey. P < 0,05; n = 8 / grupo.

Devido aos resultados obtidos para o **EE**, foi sugerido realizar os testes tanto para a fração de compostos nitrogenados (**FCN**) quanto para a fração de fenólicos (**FF**) propondo um estudo biodirigido das folhas de *J. aethiopica*.

4.4.1.3 Efeito hipoglicêmico das frações de compostos nitrogenados (FCN) e fenólica (FF) de *J. aethiopica*.

Devido aos dados promissores apresentados com do **EE**, avaliou-se também a ação hipoglicêmica de **FCN** e **FF** obtidas de *J. aethiopica*. O cálculo da dose foi realizado através do oGTT utilizando três doses diferentes de cada fração (50, 100 e 200 mg kg⁻¹). A oGTT mostrou que o grupo diabético tratado com 50 mg kg⁻¹ da fração de compostos nitrogenados (**FCN**) não apresentou diferença estatística em comparação com 100 e 200 mg kg⁻¹. Por esta razão, adotou-se a dose de 50 mg kg⁻¹ (Figuras 96 A e B). A oGTT após tratamento agudo com a fração fenólica (**FF**) mostrou que a dose de 200 mg kg⁻¹ foi mais efetiva do que 50 e 100 mg kg⁻¹ e foi adotada para o resto dos experimentos (Figuras 97 A e B).

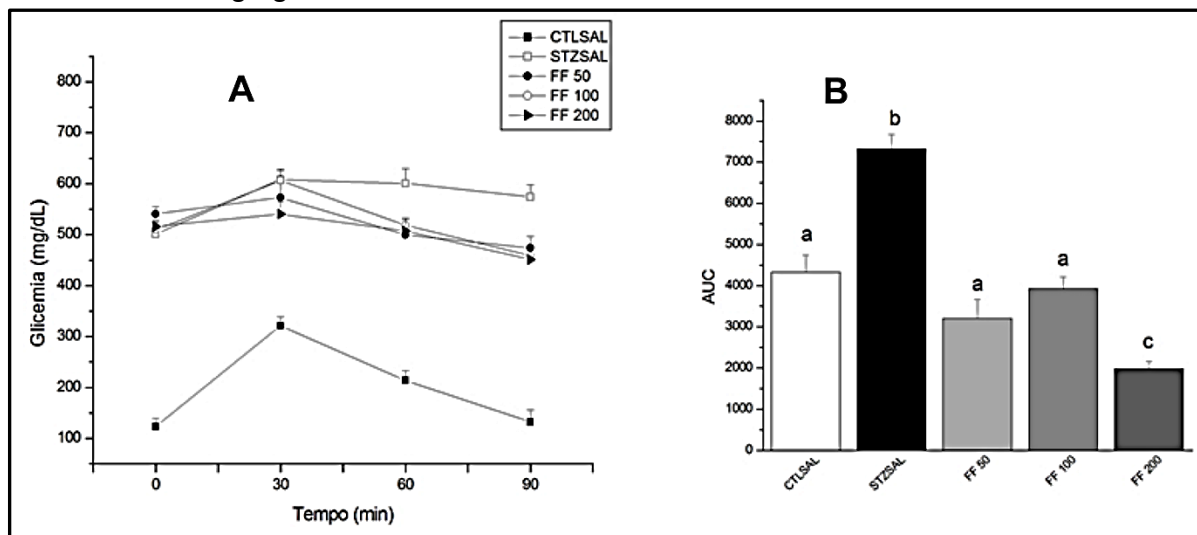
Figura 96 – Efeito da fração de compostos nitrogenados (**FCN**) do tratamento de *J. aethiopica* nas doses de 50, 100 e 200 mg kg⁻¹.



A - Tolerância à glicose; **B** - Área sob a curva – AUC.

Os dados são expressos como médias $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; $n = 10$ / grupo.

Figura 97 – Efeito da fração fenólica (**FF**) do tratamento de *J. aethiopica* nas doses de 50, 100 e 200 mg kg⁻¹.



A - Tolerância à glicose; **B** - Área sob a curva – AUC.

Os dados são expressos como médias $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; $n = 10$ / grupo.

A análise dos valores de glicemia final em grupos diabéticos tratados com compostos nitrogenados (**FCN**) ou a fração fenólica (**FF**) apresentou redução em relação aos valores iniciais, mostrando um efeito hipoglicêmico claro (Tabela 19). Após o tratamento por 7 dias, o oGTT foi realizado para analisar o efeito de cada fração em um

tratamento agudo. Os resultados mostraram que após a administração de glicose, todos os grupos apresentaram um pico de níveis de glicose após 15 minutos. Por outro lado, FCN50, FF200 e STZMET mostraram um melhor controle de glicose em relação ao grupo STZSAL, diminuindo a glicemia de 30 min (Figura 98 A e B).

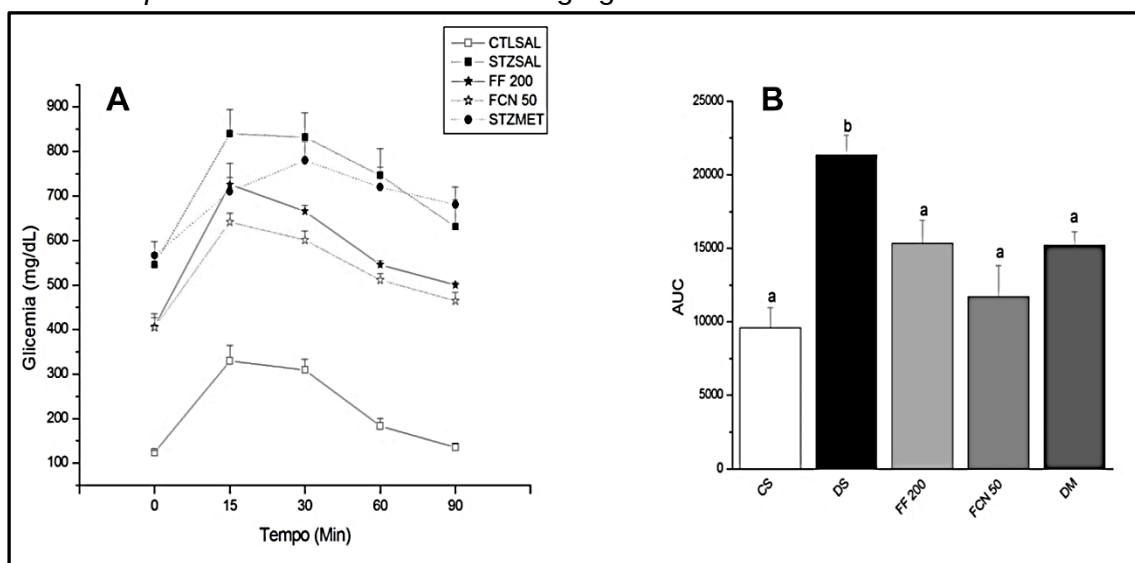
Tabela 19 – Efeito das frações de compostos nitrogenados (**FCN**) e fenólica (**FF**) nos níveis de glicose no sangue (mg dL^{-1}) após 7 dias de tratamento.

Grupo	INICIAL	FINAL
CTLSAL	$123,3 \pm 15,8^a$	$134,0 \pm 17,4^a$
STZSAL	$500,7 \pm 22,0^b$	$546,3 \pm 25,9^b$
FCN50	$477,4 \pm 16,1^b$	$404,0 \pm 21,1^c$
FF200	$516,1 \pm 10,9^b$	$406,0 \pm 28,2^c$

FCN - (50 mg kg^{-1} por via oral); **FF** - (200 mg kg^{-1} por via oral)

Os valores são expressos como médias $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 8$ / grupo.

Figura 98 – Efeito das frações de compostos nitrogenados e fenólica do tratamento de *J. aethiopica* nas doses de 50 e 200 mg kg^{-1} .



A - Tolerância à glicose; **B** - Área sob a curva – AUC.

Os dados são expressos como médias $\pm$ DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$; $n = 10$ / grupo.

4.4.1.4 Efeito dos compostos nitrogenados (FCN) e fenólicos (FF) das folhas de *J. aethiopica* no metabolismo lipídico.

O tratamento com as duas frações (**FCN** e **FF**) proporcionou um efeito benéfico no metabolismo lipídico em relação à redução de TC, TG, VLDL e aumento nos níveis de

HDL nos grupos FCN50 e FF200 (Tabela 20). As frações dos compostos nitrogenados e fenólica foram citados devido à sua potente atividade como moléculas hipolipidêmicas em estudos experimentais que previnem doenças cardíacas causadas por uma condição hiperglicêmica crônica (HE et al., 2016, LEE e JEUNE, 2013). Os níveis de ureia em pacientes diabéticos estão aumentados devido a um estresse por geração de radicais livres associado a hiperglicemia que causa disfunção renal. Além disso, a ureia é um produto do metabolismo das proteínas e o aumento dos níveis de ureia no sangue pode ser utilizado como indicador da degradação excessiva da proteína (TUORKEY, 2016). Nossos dados mostraram que o tratamento com ambas frações reduziu os níveis de ureia em relação aos grupos CTLSAL e STZSAL mostrando um possível efeito protetor e prevenindo doenças renais causadas por hiperglicemia crônica.

Tabela 20 – Efeito das frações dos compostos nitrogenados e fenólicos de *J. aethiopica* em parâmetros séricos após 7 dias de tratamento.

	CTLSAL	STZSAL	FCN50	FF200
Proteína total g/dL	5,1 ± 0,2 ^a	4,2 ± 0,2 ^b	4,4 ± 0,3 ^b	4,3 ± 0,2 ^b
Urea mg/dL	44,1 ± 3,6 ^a	43,2 ± 2,4 ^a	31,1 ± 3,3 ^b	33,8 ± 4,3 ^a
Triglicerídeos mg/dL	131,2 ± 11,4 ^a	154,5 ± 11,7 ^a	102,5 ± 7,7 ^b	93,1 ± 13,4 ^b
Total-Colesterol mg/dL	115,1 ± 5,3 ^a	101,0 ± 6,6 ^a	81,9 ± 5,7 ^a	80,1 ± 6,8 ^b
HDL-Colesterol mg/dL	44,4 ± 1,9 ^a	26,3 ± 1,6 ^b	34,4 ± 1,7 ^c	31,3 ± 1,8 ^b
VLDL-Colesterol mg/dL	25,6 ± 2,3 ^a	30,3 ± 1,4 ^a	20,4 ± 1,4 ^a	18,6 ± 2,3 ^b

Os valores são médias ± DPR. Diferentes letras indicam diferenças significativas de ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p <0,05; n = 8 / grupo.

A atividade hipoglicêmica das plantas medicinais pode estar relacionado com a presença de metabólitos secundários tais como compostos nitrogenados e fenólicos os quais já foram isolados e testados quanto ao seu efeito hipoglicêmico (CHEN et al., 2014, GRANADOS et al., 2015, EL-BAZ et al., 2014, GAIKWAD; MOHAN; RANI, 2014, DE SOUSA et al., 2004). Por exemplo, a berberina é um alcaloide tipo isoquinolina isolado das raízes e casca de tronco de plantas do gênero *Berberis* (Berberidaceae) que tem sua atividade hipoglicêmica devido à capacidade de diminuir a absorção de glicose pelo intestino (CHEN et al., 2014), assim como alguns compostos fenólicos como o ácido protocatecuico (ANDRADE-CETTO e CÁRDENAS, 2010). Este ácido é um dos principais compostos de polifenóis complexos, que é abundantemente formado e absorvido no intestino grosso como resultado da metabolização microbiana (KAY; MAZZA; HOLUB, 2005). Além disso, estudos publicados na literatura têm relatado resultados obtidos após investigação em disfunção cardíaca induzida por diabetes, onde

o efeito atenuante do ácido protocatecuico foi demonstrado (SEMAMING et al., 2014). Vários flavonoides (aglicona ou glicosilada) são responsáveis pelos efeitos hipoglicêmicos além das propriedades hipoglicemiantes (GRANADOS et al., 2015, EL-BAZ et al., 2014, GAIKWAD; MOHAN; RANI, 2014, DE SOUSA et al., 2004). Os flavonoides glicosilados têm sido eficazes na redução dos níveis de glicose no sangue em ratos normais e diabéticos após um tratamento agudo

A rutina (9) é o principal glicosídeo flavonol identificado e isolado tanto do EE quanto da FF das folhas de *J. aethiopica* ($29,98 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$ EE e $41,88 \pm 0,37 \text{ mg g}^{-1}$ FF). Embora os efeitos da rutina no tratamento e nas complicações do diabetes tenham sido demonstrados em um estudo conduzido por LEE e JEUNE (2013), a concentração utilizada em seu estudo foi de apenas 5 mg kg^{-1} . De fato, essa concentração é muito baixa em comparação com a concentração de rutina no extrato etanólico e na fração fenólica de *J. aethiopica*, quantificada em nosso estudo. Vale ressaltar que a alta concentração de flavonoides triglicosídeo e rutina ($62,65 \pm 0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ em EE e $61,72 \pm 0,23 \text{ mg kg}^{-1}$ em FF) contribui para a atividade hipoglicemiantehipoglicêmica e potente hipolipidêmica observada em ambos os grupos, o extrato etanólico e a fração fenólica dessas folhas.

A população de Cuba utiliza desta espécie na medicina tradicional até o momento, sem dados científicos comprovados. Portanto, os resultados deste trabalho com o estudo da atividade hipoglicemiante do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, é importante para justificar o uso desta espécie pela população de Cuba.

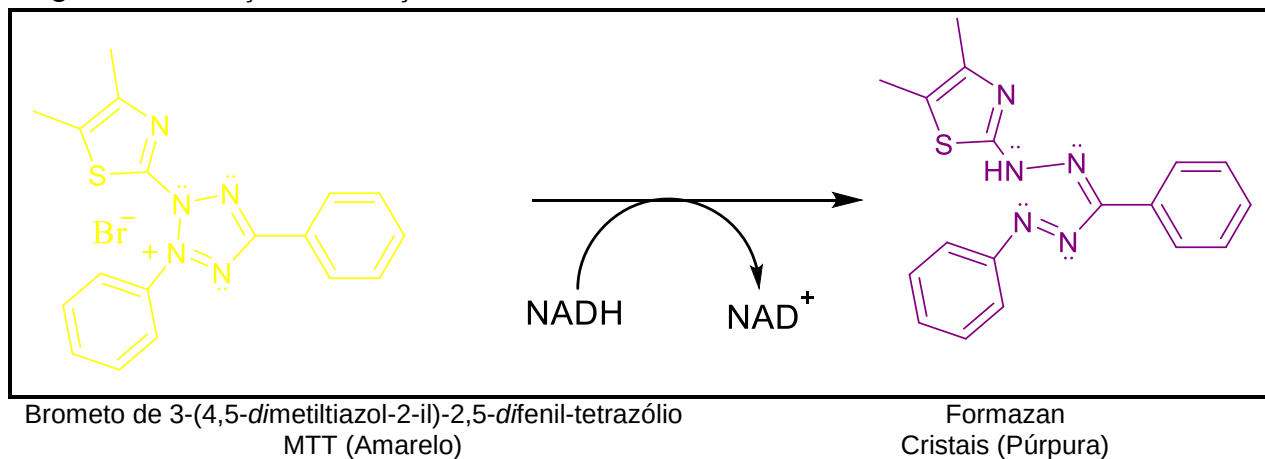
4.4.2 Determinação da citotoxicidade.

Os ensaios biológicos do efeito inibitório pelo método MTT de crescimento celular causado pelo extrato *J. aethiopica* e a cisplatina (controle positivo) foram realizados *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais murinos, LP07 (adenocarcinoma de pulmão) e células tumorais humana, MCF7 (câncer de mama humana).

Para esse ensaio colorimétrico, foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico, presente no sal de MTT (brometo de 3-((4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (amarelo). Devido à ação de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias ativas, elas provocam a redução do grupo

tetrazólico com posterior formação de cristais de formazan de cor **púrpura** (MOSMANN, 1983) (Figura 99).

Figura 99 – Reação de redução do MTT ao formazan.



Uma maior intensidade da coloração púrpura, é indicativo de uma maior quantidade de células viáveis, portanto, menor a citotoxicidade do extrato.

A concentração citotóxica do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* para 50 % das células (IC_{50}) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal e estão apresentados na Tabela 21 e na Figura 100.

Tabela 21 – Valores de citotoxicidade para o EE das folhas de *J. aethiopica*.

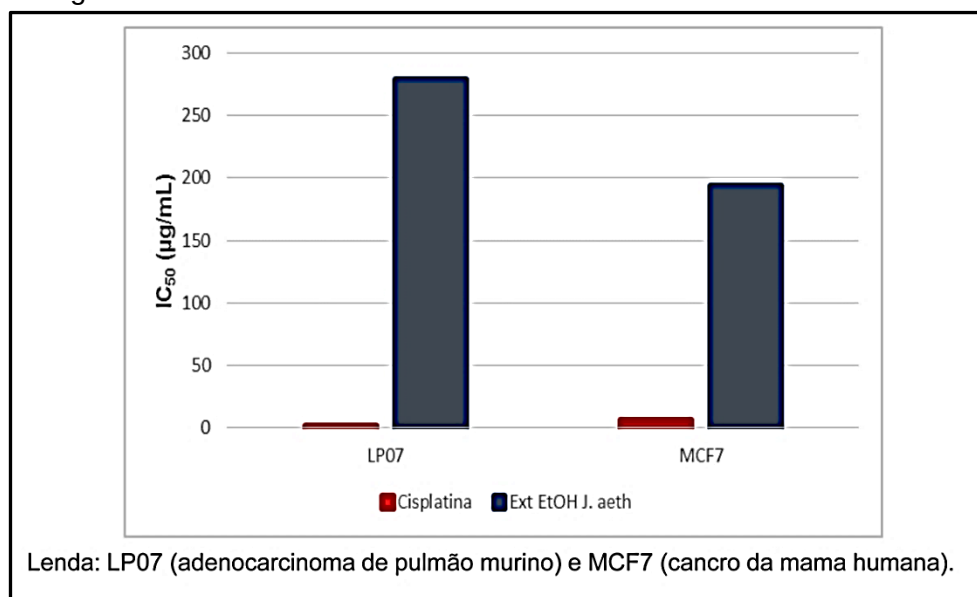
	IC_{50} ($\mu g.mL^{-1} \pm DPR^a$)	
	LP07	MCF7
Cisplatina	$1,29 \pm 0,40$	$5,88 \pm 4,30$
EE	$279,13 \pm 2,92$	$193,92 \pm 15,93$

LP07 (adenocarcinoma de pulmão) e MCF7 (cancro da mama humana).

^aDPR = Desvio Padrão Relativo

A maioria dos medicamentos anticancerígenos foi descoberta através de análises aleatórias de materiais vegetais. Sabe-se que diferentes linhagens celulares podem exibir sensibilidades diferentes ao mesmo tempo quando tratado com o mesmo extrato de planta, portanto, a utilização do extrato bruto com várias linhagens de células é o primeiro passo na determinação das células de câncer mais sensíveis (OSKOUÉIAN, et al., 2011).

Figura 100 – Gráfico comparativo entre os valores de IC_{50} para as linhagens tumorais.



O Instituto Nacional do Câncer requer um valor IC_{50} menor que $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos brutos ativos contra células cancerosas (BOIK, 2001). Portanto, uma vez que um extrato apresente um valor de IC_{50} inferior ou igual à exigência do Instituto Nacional do Câncer para células MCF-7, este pode ser considerado uma fonte promissora de compostos bioativos que podem, na sequência serem purificados para o desenvolvimento de drogas anticâncer (OSKOUÉIAN, et al., 2011).

Segundo BOIK (2001), o resultado dos testes de citotoxicidade para o extrato etanólico (**EE**) das folhas de *J. aethiopica* para ambas linhagens das células tumorais não podem ser considerados como uma fonte promissora de compostos bioativos. Entretanto, esses valores sugerem especificidade do EE frente a diferentes linhagens celulares.

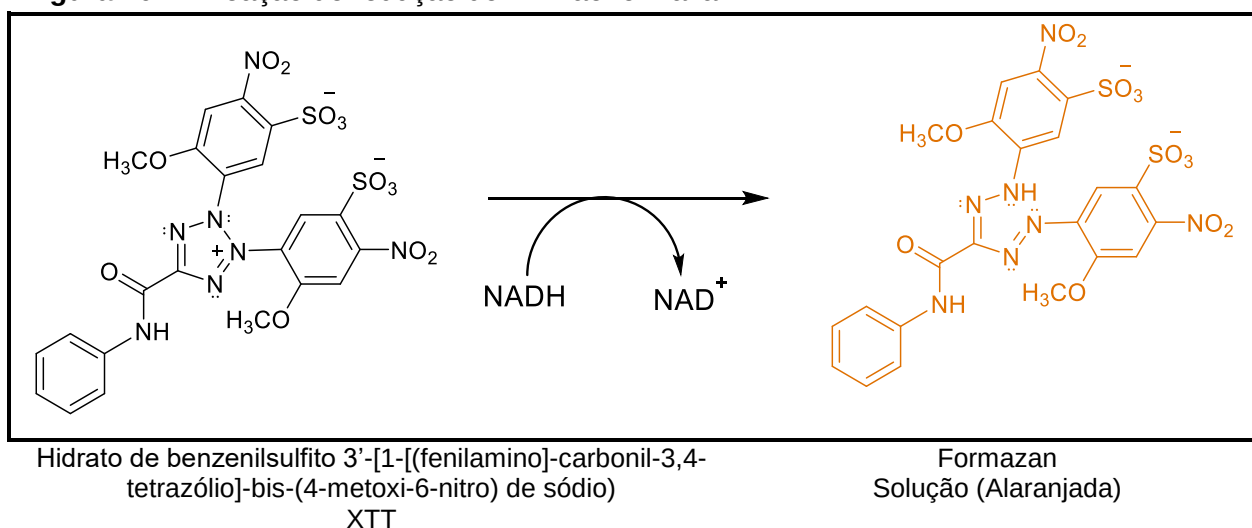
Por outro lado, na literatura encontram-se referências da atividade antitumoral de metabolitos isolados (proteínas, diterpenos e flavonoides) de espécies de *Jatropha* apresentando valores de IC_{50} inferiores a 10 Mm (LIN, et al., 2003; THEODULOZ, et al., 2009; ARANGO, et al., 2012). Alguns derivados desses metabólitos têm sido identificados no extrato etanólico de *J. aethiopica* no presente trabalho. Por isso, o isolamento, elucidação estrutural e os testes biológicos das substâncias isoladas, serão de muita importância para avaliar o potencial antitumoral da espécie em estudo. (ALMEIDA, 2005).

Portanto, depois de termos analisado os dados de atividade biológica do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica*, tanto hipoglicemiante quanto de citotoxicidade frente a linhagens tumorais, foi recomendada a avaliação da viabilidade celular frente a uma linhagem normal (GMO7492A) para podermos sugerir o uso de tinturas das folhas de *J. aethiopica* com segurança.

4.4.3 Determinação da citotoxicidade em células normais.

O teste de citotoxicidade está dado pela clivagem de XTT (Hidrato de benzenilsulfito 3'-[1-[(fenilamino)-carbonil-3,4-tetrazólio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) de sódio] de sódio) pelas enzimas desidrogenase de células metabolicamente ativas produzindo o produto formazan altamente colorido que é solúvel em água (Figura 101). Este fato aumenta a sensibilidade do processo de absorção quando comparado com outros métodos onde são gerados cristais (ROEHM et al., 1991). Esse é um ensaio recomendado para screenings complexos de substâncias químicas por apresentar um índice confiável para avaliar atividade mitocondrial e, assim, a viabilidade e função celulares (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; ROEHM et al., 1991).

Figura 101 – Reação de redução do XTT ao formazan.

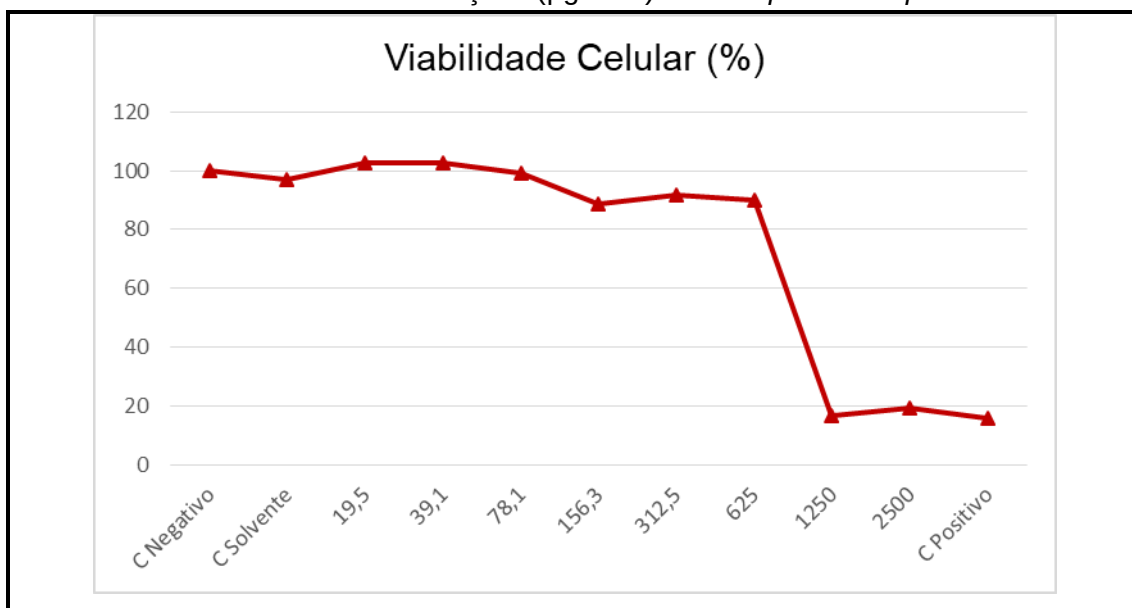


Estudos sugerem que a redução do corante XTT ocorre na superfície da célula, quando que as oxirredutases mitocondriais contribuem para a resposta do sal. Assim, fica então postulado que o XTT é capaz de medir o estado redox de nucleotídeos de

piridina na célula (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005), produzindo um formazan altamente colorido e alaranjado (ROEHM et al., 1991).

Os resultados de viabilidade celular do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica*, pelo sal de XTT estão representados na Figura 102.

Figura 102 – Viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de humano (GM07492A) tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Jatropha aethiopica*.



* significativamente diferente do c negativo $P < 0,05$

** significativamente diferente do c negativo $P < 0,01$

*** significativamente diferente do c negativo $P < 0,001$

Em suma, com os resultados obtidos a partir do extrato etanólico das folhas de *Jatropha aethiopica* foi possível observar citotoxicidade sobre a linhagem celular testada (GM07492A) em concentrações igual ou superior a $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato avaliado. Foi realizado o cálculo do IC_{50} (concentração que inibe 50% de crescimento) determinado para o EE ($\text{IC}_{50} = 690,3 \pm 18,1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O valor IC_{50} do **EE** corroborou os resultados dos testes realizados anteriormente com outras linhagens tumorais, a baixa citotoxicidade do extrato. Esse resultado permite propor o uso confiável do extrato de *J. aethiopica* como fitoterápico devido à não toxicidade do extrato.

5. CONCLUSÕES

O estudo químico e farmacológico da espécie *J. aethiopica* está sendo descrito pela primeira vez na literatura, assim, o estudo do extrato etanólico dessa espécie permitiu a identificação de metabólitos secundários, a quantificação de ácidos fenólicos e validação da atividade biológica pela qual a planta é utilizada.

Foram isoladas e identificadas doze substâncias das quais, uma está sendo descrita pela primeira vez na literatura (canferol 3-O- β -D-galactopiranosídeo (4" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil-[(6" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil] (**6**), assim como duas substâncias descritas pela primeira vez como produto natural: 3-carboxiamida-1-metilpiridinium (**1**) e N-(7-aminobutilamida)-N-(10-hidroxi-10-isopropil)-N-2-oxo-5-amino-5-pentanol (**2**). A caracterização foi possível com ajuda de experimentos de ressonância magnética nuclear como TOCSY 1D e DOSY e de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas acoplada (HPLC-ESI-IT-MS/MS).

A utilização da técnica HPLC-ESI-QTOF-MS/MS no modo positivo, possibilitou avaliar a composição química do extrato etanólico, com a identificação de vinte e cinco substâncias, além de outras ainda em fase de identificação.

Os teores no extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* de ácido protocatecuico (**3**), quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo -(2" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil-(6" $\rightarrow$ 1")-[α -L-ramnopiranosil] + quercetina 3-O- β -D- glicopiranosídeo-(2" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil-(6" $\rightarrow$ 1")-[α -L-ramnopiranosil] (**4+5**), canferol 3-O- β -D-galactopiranosídeo -(4" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil-(6" $\rightarrow$ 1")-[α -L-ramnopiranosil] + canferol 3-O- β -D- glicopiranosídeo-(2" $\rightarrow$ 1")- α -L-ramnopiranosil-(6" $\rightarrow$ 1")-[α -L-ramnopiranosil] (**6+7**) e rutina (**8**), foram 2,057; 19,94; 12,73 e 29,98 mg g⁻¹ de extrato etanólico, respectivamente. Esses teores na fração fenólica foram 10,05 (**5+6**), 9,79 (**7+8**) e 41,88 (**9**) mg g⁻¹ de fração.

O extrato etanólico apresentou uma atividade hipoglicemiante superior (380 mg kg⁻¹ b.w.) quando comparada com a metformina (566 mg kg⁻¹ b.w.) que é um dos remédios atualmente utilizado para o controle dos níveis de glicose em sangue. Tanto a fração de compostos nitrogenados quanto a fração fenólica, também mostraram atividade hipoglicemiante. As substâncias isoladas e/ou identificadas no extrato e nas frações

podem ser as responsáveis da atividade.

Tanto o teste com células tumorais quanto com células normais mostraram a baixa toxicidade do extrato etanólico das folhas de *J. aethiopica* o que sugere que o extrato não é citotóxico a concentrações menores de 690 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Esses resultados podem contribuir para a continuidade dos estudos a partir da infusão das folhas de *Jatropha aethiopica*.

REFERÊNCIAS

- ABLAJAN, K.; ABLIZ, Z.; SHANG, X-Y.; HE, J-M.; ZHANG, R-P.; SHI, J-G. Structural characterization of flavonol 3,7-*di*-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, p. 352-360, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2017.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMINAH, N. S.; KRISTANTI, A. N.; TANJUNG, M. Antioxidant activity of flavonoid compounds from the leaves of *Macaranga gigantea*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 6, p. 688- 692, 2014.
- AN, L. J.; GUAN, S.; SHI, G. F.; BAO, Y. M.; DUAN, Y. L.; JIANG, B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 436 - 443, 2006.
- ANDARY, C.; WYLDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapumgenistae*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1123-1127, 1982.
- ANDRADE-CETTO, A.; CÁRDENAS, R. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 93-97, 2010.
- AO, C.; DEBA, F.; TAKO, M.; TAWATA, S. Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. fil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 349 - 358, 2009.
- ARANGO, D.; PARIHAR, A.; VILLAMENA, F. A.; WANG, L.; FREITAS, M. A.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A. I. Apigenin induces DNA damage through the PKCd-dependent activation of ATM and H2AX causing down-regulation of genes involved in cell cycle control and DNA repair. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1571-1580, 2012.
- BAHADUR, B.; PULLAIAH, T.; MURTHY, G. V. S. Systematics of Indian *Jatrophas*. In: **Jatropha, challenges for a new energy crop**. New York: Springer, 2013, v. 2, chap. 10, p. 153-186.
- BANERJI, J.; DAS, B.; CHATTERJEE, A.; SCHOOLERY, J. N. Gadain, a lignin from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2323 - 2327, 1984.

- BAVILONI, P. D.; DOS SANTOS, M. P.; AIKO, G. M.; REIS, S. R. L.; LATORRACA, M. Q.; DA SILVA, V. C.; DALL'OGGIO, E. L.; DE SOUSA JR., P. T.; LOPES, C. F.; BAVIERA, A. M.; KAWASHITA, N. H. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae): Investigation in peripheral tissues. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 135–139, 2010.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127 - 152, 2005.
- BOIK, J. C. **Natural Compounds in Cancer Therapy**. Oregon Medical Press: Princeton, MN, USA; 2001, p. 149–190.
- BOHM, B. A. **Introduction to Flavonoids**. Harwood Reading: Amsterdam, 1999. 212 p.
- CHEN, C.; YU, Z.; LI, Y.; FICHNA, J.; STORR, M. Effects of Berberine in the Gastrointestinal Tract — A Review of Actions and Therapeutic Implications. **American Journal of Chinese Medicine**, v.42, no. 5, p. 1053-1070, 2014.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.
- DA SILVA F. D.; ARAÚJO, I. C.; COSTA, I. C.; RODARTE, C. V.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, E. C. Study of degumming process and evaluation of oxidative stability of methyl and ethyl biodiesel of *Jatropha curcas* L. oil from three different Brazilian states. **Renewable Energy**, v. 71, p. 495 - 501, 2014.
- DAS, B. AND VENKATAIAH, B. A minor coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*, **Biochemical Systematics and Ecology**, 29 (2), 213–214, 2001.
- DAS, B.; ANJANI, G. Gossypidien, a lignan from Stems of *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 51, p 115 - 117, 1999.
- DHALE, D. A.; BIRARI, A. R. Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* Linn. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, no. 7, p. 24-28, 2010.
- DE OLIVEIRA, J. S.; LEITE, P. M.; SOUZA, L. B.; MELLO, V. M.; SILVA, E. C.; RUBIM, J. C.; MENEGHETTI, S. M. P.; SUAREZ, P. A. Z. Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 449–453, 2009.
- DE RIJKE, E.; ZAPPEY, H.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triplequadrupole and ion-trap instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 45–58, 2003.
- DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of Kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829–832, 2004.

DEHGAN, B. Novel *Jatrophas* for Florida Landscapes. **Proceeding of the Florida State Horticultural Society**, v. 95, p. 277-280, 1982.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: a Review. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 88, p. 301-322, 2011.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Toxicity—A Review. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B: Critical Reviews, v. 13, no. 6, p. 476-507, 2010.

DEVAPPA, R. K.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical and nutritional evaluation of *Jatropha* protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutritional factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 911 - 919, 2008.

DONG, M.; SI, Y-Q.; SUN, S-Y.; PU, X-P.; YANG, Z-J.; ZHANG, L-R.; ZHANG, L-H.; LEUNG, F. P.; CHING-LAM, C. M.; KWONG, A. K. Y.; YUE, J.; ZHOU, Y.; KRIKSUNOV, I. A.; HAO, Q. LEE, H. C. Design, synthesis and biological characterization of novel inhibitors of CD38. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 3246 - 3257, 2011.

EL-BAZ, F. K.; ALY, H. F.; ABD-ALLA, H. I.; SAAD, S. A. Bioactive flavonoid glycosides and antidiabetic activity of *Jatropha curcas* on streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research**, v. 29, no. 2, p. 143-156, 2014.

EL-GAMMAL, A. A.; MANSOUR, R. M. A. Antimicrobial Activities of some flavonoid compounds. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 141, p. 561 - 565, 1986.

ENGELS, C.; GRÄTER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GÄNZLE, M.G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by Ultra High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Food Research International**, v. 46, p. 557-562, 2012.

FABREGA, H. JR. Ethnomedical implications of Wierzbicka's theory and method. **Emotion Review**, v. 4, p. 318-319, 2012.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; CAMARA, R. B. G.; CABRAL, B.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; MORETTI REBECCHI, I. M.; ZUCOLOTO, S. M.; OLIVEIRA ROCHA, H. A. AND MATHEUS DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M. F. *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, 14, 405-418, 2014.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTAO, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 214-223, 2007.

FUENTES-FIALLO, V. R.; GRANDA, M. M.; LEMES-HERNÁNDEZ, C. M.; RODRÍGUEZ-FERRADÁ, C. A. Estudios fenológicos en plantas medicinales XII. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 3, p. 87-92, 2001.

GAIKWAD, S. B.; MOHAN, G. K.; RANI, M. S. Phytochemicals for Diabetes Management. **Pharmaceutical Crops**, v. 5, p. 11-28, 2014.

GAIKWAD, R. S.; KAKDE, R. B.; KULKARNI, A. U.; GAIKWAD, D. R.; PANCHAL, V. H. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts of *Jatropha* species. **Current Botany**, v. 3, no. 3, p. 9-15, 2012.

GAMIOTEA-TURRO, D.; CAMAFORTE, N. A. P.; VALERINO-DIAZ, A. B.; ORTIZ-NUÑEZ, Y.; RINALDO, D.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R.; dos SANTOS, L. C. Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, no. 6, p. 1419-1427, 2018.

GARCIA, A.; DELGADO, G. Cytotoxic *cis*-Fused Bicyclic Sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1618-1621, 2006.

GELDENHUYS, W. J.; ALLEN, D. D.; LOCKMAN, P. R. 3-D-QSAR and docking studies on the neuronal choline transporter. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4870-4877, 2010.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae and Pandaceae**. Kew, v. 2, 2000, Royal Botanic Gardens, 560 p.

GRANADOS, S.; BALCÁZAR, N.; GUILLÉN, A.; ECHEVERRI, F. Evaluation of the hypoglycemic effects of flavonoids and extracts from *Jatropha gossypifolia* L. **Molecules**, v. 20, p. 6181-6193, 2015.

GULCIN, I.; GUNGOR SAT, I.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; IRFAN KUFREVIOGLU, O. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, p. 393-400, 2004.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology** v. 15, p. 686–699, 2005.

HARBORNE, J. B. **¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide**. In The flavonoids: advances in research since 1996. First edition; _____. Ed.; New York: Chapman and Hall Scientific Data Division. 1996, pp 441–497.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HE, K.; KOU, S.; ZOU, Z.; HU, Y.; FENG, M.; HN, B.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic effects of alkaloids from *Rhizomacoptidis* in diet-induced hyperlipidemic hamsters. **Planta Medica**, v. 82, no. 8, 690-697, 2016.

HELLER, J. **Physic nut *Jatropha curcas* L.**: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996, p. 13-15.

- INADA, A.; MURATA, H.; TANAKA, K.; SOMEKAWA, M. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants IV flavonoids and triterpenoids from *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss. **Japanese Journal of Pharmacognosy**, v. 47, no. 3, p. 301-304, 1993.
- INTA, A.; TRISONTHI, P.; TRISONTHI, C. Analysis of traditional knowledge in medicinal plants used by Yuan in Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 344-351, 2013.
- JANSEN, O.; ANGENOT, L.; TITS, M.; NICOLAS, J. P.; de MOL, P.; NIKIE'MA, J. B.; FREDERICH, M. Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 143–150, 2010.
- KAY, C. D.; MAZZA, G. J.; HOLUB, B. J. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. **The Journal of Nutrition**, v. 135, no. 11, 2582-2588, 2005.
- KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycoside from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 229-237, 2003.
- KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: from Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 898-917, 2009.
- KITE, G. C.; ROWE, E. R.; LEWIS, G. P.; VEITCH, N. C. Acylated flavonol tri- and tetraglycosides in the flavonoid metabolome of *Cladrastis kentukea* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 72, p. 372-384, 2011.
- KUMAR, J.; SINGH, S. P.; CHOUDHARY, G. K. Pharmacological evaluation of leaves of *Jatropha curcas* L. for anti-diabetic activity in alloxan induced diabetic rats. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86, no. 4, p. 387-391, 2016.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. -An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, no. 1, p. 1–10, 2008.
- LEE, Y.J.; JEUNE, K.H. The effect of rutin on antioxidant and anti-inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Applied Microscopy** v. 43, no. 2, p. 54-64, 2013.
- LIN, J.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacologica Sinuca**; v.24, no. 3, p. 241 -246, 2003.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The ultraviolet spectra of flavones and flavonols**. In: The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer Verlag, 1970, p. 41-164.
- MARCH, R. E; LI, H.; BELGACEM, O.; PAPANASTASIOU, D. High-energy and low energy collision-induced dissociation of protonated flavonoids generated by MALDI and by electrospray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 262, p. 51-66, 2007.

- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982, 113.
- MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of nontoxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, v. 62, p. 207-215, 1998.
- MARCUCCI, M.C. Validação de princípios ativos de plantas medicinales e fitoterápicos. **Farmacognosia, Coletânea Científica**, p. 271-293, 2011.
- MARINI, G. **Efeito do diabetes induzido por streptozotocin na matriz extracelular e no músculo estriado uretral em ratas prenhes**. 2014. Tese (Doutorado em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- MARIZ, S. R.; BORGES, A. C. R.; MELO-DINIZ, M. F. F.; MEDEIROS, I. A. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 346-357, 2010.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v.2, no.2, p.137-189, 1995.
- MARQUES-BECHO, J. R., MACHADO, H.; DE OLIVEIRA, M. G. Rutina–Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, no. 1, p. 21-25, 2009.
- MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Ed. UFC, 2004. 448 p.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, no. 3, p. 577-599, 2000.
- MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. JR. Diffusion-ordered two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, no. 8, p. 3139 - 3141, 1992.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, no. 1/2, p. 55-63, 1983.
- NAZEEMA, T. H.; GIRIJA S. Characterisation of the active antiproliferative principles of *Jatropha curcas* and *Jatropha gossypifolia* on Hela cell lines. **International Journal of Pharmacy Science**, v. 5, p. 346-355, 2013.
- NILE, S. H.; KO, E.Y.; KIM, D. H.; KEUM, Y. S. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 50-55, 2016.

- OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F.; MOITANETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.
- OSKOEIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; SAAD, W. Z.; RAHMAN, O. A.; HO, Y. W. Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 5955-5970, 2011.
- PARTHASARATHY, M. M.; SARADHIA, K. P. A coumarino-lignan from *Jatropha glandulifera*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 867-869, 1984.
- PARTRIDGE, J. E.; KEEN, N. T. Association of the phytoalexin kievitone with single-gene resistance of cowpeas to *Phytophthora vignae*. **Phytopathology**, v. 66, p. 426-429, 1976.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v. 57, no.5, p. 371-389, 1991.
- PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S.; MORVIN, J. E.; RAVICHANDRAN, K.; SAKTHIVEL, B. Documentation and quantitative analysis of the local knowledge on medicinal plants in Kalrayan Hills of Villupuram District, Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 7-20, 2014.
- RAHMAN, A. H. M. M.; AKTER, M. Taxonomy and Medicinal Uses of Euphorbiaceae (Spurge) family of Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v.1, no. 3, p. 74-80, 2013.
- RAVINDRANATH, N.; REDDY, M. R.; MAHENDER, G.; RAMU, R.; KUMAR, K. R.; DAS, B. Deoxypreussomerins from *Jatropha curcas*: are they also plant metabolites? **Phytochemistry**, v. 65, p. 2387-2390, 2004a.
- RAVINDRANATH, N.; REDDY, M. R.; RAMESH, C.; RAMU, R.; PRABHAKAR, A.; JAGADEESH, B.; DAS, B. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *J. curcas*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, no. 5, p. 608-611, 2004b.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, no.5, p. 771-780, 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RINALDO D.; BATISTA, J. M. JR.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; dos SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, no. 8, p. 726-733, 2010.
- ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1000, p. 657-691, 2003.

ROEHM, N. W.; RODGERS, G. H.; HATFIELD, S. M.; GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of Immunological Methods**, v.142, p. 257-265, 1991.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J-L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**. v. 1292, p. 2-18, 2012.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; dos SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 17-24, 2008.

ROIG Y MESA, J. T. **Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba**, 2a ed., La Habana: Ed. Científico-Técnico, 1974. p 554.

SALEEM, H.; AHMAD, I.; ASHRAF, M.; GILL, M. S. A.; NADEEM, M. F.; SHAHID, M. N.; BARKAT, K. In vitro studies on anti-diabetic and anti-ulcer potentials of *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, no. 1, p. 121-125, 2016.

SANKARA, S. S.; NAGARAJAN, S.; SULOCHANA, N. Flavonoids of the leaves of *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1690, 1971.

SABANDAR, C. W.; AHMAT, N.; JAAFAR, F. M.; SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SAK, K.; KASEMAA, K.; EVERAUS, H. Potentiation of luteolin cytotoxicity by flavonols fisetin and quercetin in human chronic lymphocytic leukemia cell lines. **Food Function**, v. 7, no. 9, p. 3815-3824, 2016.

SAKUSHIMA, A.; HISADA, S.; OGIHARA, Y.; NISHIBE, S. Studies on the constituents of Apocynaceae Plants. Gas chromatography-Mass Spectrometric determination of new flavonoid triglycosides from the leaves of *Cerbera manghas* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, no. 4, p. 1219-1223, 1980.

SANTOS, M. F.; CZECZKO, N. G.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS-FILHO, J. M.; ALENCAR, B. F. L.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C. A. P. M.; TRAUTWEIN, V. M.; HENRIQUES, G. S.; MAIA, J. M. E. A.; BITTENCOURT, R. C. A. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, no. 3, p. 2-7, 2006.

SARWAR, N.; GAO, P.; SESHASAI, S. R.; GOBIN, R.; KAPTOGE, S.; DI ANGELANTONIO, E.; INGELSSON, E.; LAWLOR, D. A.; SELVIN, E.; STAMPFER, M.; STEHOUWER, C. D.; LEWINGTON, S.; PENNELLS, L.; THOMPSON, A.; SATTAR, N.; WHITE, I. R.; RAY, K. K.; DANESH, J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, v. 375, p. 2215-2222, 2010.

- SEMAMING, Y.; KUMFU, S.; PANNANGPETCH, P.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. Protocatechuic acid exerts cardioprotective effect in type-1 diabetic rats. **Journal of Endocrinology**, v. 223, no. 1, p. 13-23, 2014.
- SILVA, M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.
- SONODA, M.; NISHIYAMA, T.; MATSUKAWA, Y.; MORIYASU, M. Cytotoxic activities from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 65-68, 2004.
- STAUBMANN, R.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; HIERMANN, A.; KARTNIG, T. A complex of 5-hydroxypyrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 337-338, 1999.
- SOUZA, A. A.; LAVERDE, A. JR. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudo de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, v. 25, no. 6, p. 1022-1026, 2002.
- SUJATHA, M., BAHADUR, B.; REDDY, T. P. Interspecific Hybridization in the Genus *Jatropha*. Em: **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop: genetic improvement and biotechnology**. New York: Springer, 2013, pp. 423-443.
- SWISŁOCKA, R.; KOWCZYK-SADOWY, M.; KALINOWSKA, M.; LEWANDOWSKI, W. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical studies of p-coumaric acid and alkali metal p-coumarates. **Spectroscopy**, v. 27, p. 35-48, 2012.
- THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J. A.; PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., Antiproliferative activity of jatrophone and jatropholone derivatives. **Planta Medica**, v. 75, p.1520- 1522, 2009.
- THOMAS, S. Pharmacognostic and phytochemical constituents of leaves of *Jatropha multifida* Linn. and *Jatropha podagrica* Hook. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, no. 2, p. 243-246, 2016.
- TUORKEY, M. J. Effects of *Moringa oleifera* aqueous leaf extract in alloxan induced diabetic mice. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 8, no.3, p. 109-117, 2016.
- VAREDA, P. M. P.; SALDANHA, L. L.; CAMAFORTE, N. A. P.; VIOLATO, N. M.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k / Akt insulin signaling pathway. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative. Medicine**, 2014, 1-11, 2014.
- VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 555-611, 2008.

VERMA, S.; GUPTA, A.; KUSHWAHA, P.; KHARE, V.; SRIVASTAVA, S.; RAWAT, A.K.S. Phytochemical evaluation and antioxidant study of *Jatropha curcas* seeds. **Pharmacognosy Journal**, v. 4, no. 29, p. 50-54, 2012.

VERMA, S.; SINGH, S.P. Current and future status of herbal medicines. **Veterinary World**, v. 1, no. 11, p. 347-350, 2008.

VITAGLIONE, P.; DONNARUMMA, G.; NAPOLITANO, A.; GALVANO, F.; GALLO, A.; SCALFI, L.; FOGLIANO, V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2043-2048, 2007.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, no. 1, p. 1-16, 2010.

WANG, J-N.; HOU, C-Y.; LIU, Y-L. Swertifranchaside, an HIV-Reverse Transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. **Journal of Natural Products**, v. 57, no. 2, p. 211-217, 1994.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WEBSTER, G. L. A. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 3-32, 1994.

WILLIAMS, C. A. **Flavone and flavonol O-glycosides**. In: Andersen OM, Markham KR, editors. Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2006, pp. 749–856.

WOLFENDER, J-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolites profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

WOLFENDER, J-L.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 41-54, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): World Health Statistics 2016. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. URL (http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en) (Access August 24th /2017).

YAO, I.; HAN, C.; CHEN, G.; SONG, X.; CHANG, Y.; ZANG, W. A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1318-321, 2012.

YASUKAWA, K.; SEKINE, H.; TAKIDO, M. Two flavonol glycosides from *Lysimachia fortunei*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2215-2216, 1989.

ZALLOCCI, E. M.; POMILIO, A. B. Evolution of flavonoids in the Phaseolinae. **Phytochemistry**, v. 37, no. 2, p. 449-453, 1994.