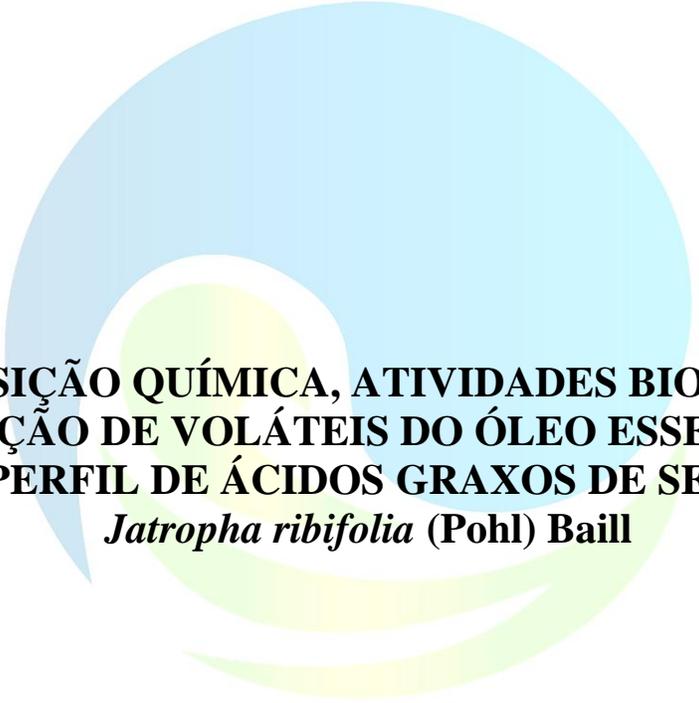


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS



**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS,
COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
RAÍZES E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE SEMENTES DA**
Jatropha ribifolia (Pohl) Baill

CELIA ELIANE DE LARA DA SILVA

PGRN

Pós-Graduação em Recursos Naturais

Dourados - MS
Abril - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS,
COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS
RAÍZES E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE SEMENTES DA
Jatropha ribifolia (Pohl) Baill.**

**Acadêmico: Celia Eliane de Lara da Silva
Orientador: Euclésio Simionatto**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Setor de Ciências Exatas da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados - MS
Abril - 2013

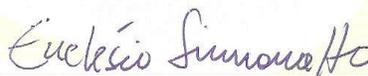
CELIA ELIANE DE LARA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES
BIOLÓGICAS, COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS RAÍZES E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS
DO ALBÚMEN DE SEMENTES DA *JATROPHA RIBIFOLIA*
(POHL) BAILL**

Este exemplar compreende a
redação final da dissertação de
mestrado defendida por Celia
Eliane de Lara da Silva.

Dourados, 12 de abril de 2013.

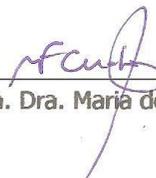
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Euclésio Simionatto – presidente



Prof. Dr. Jorge Luíz Raposo Junior



Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos

FICHA CATALOGRÁFICA

S579c Silva, Célia Eliane de Lara da

Composição química, atividades biológicas, composição de voláteis do óleo essencial das raízes e perfil de ácidos graxos de sementes da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill./ Celia Eliane de Lara da Silva, Dourados, MS: UEMS, 2013.

96p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Euclésio Simionatto.

1.*Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. 2. Oléo essencial. 3. Investigação fitoquímica. I.Título.

CDD 20.ed. 631.521

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

Obrigado meu Deus pelo amor que colocou em meu coração pela natureza.

Obrigado Rogério Cesar de Lara da Silva, pelo apoio e por tornar meus dias tão especiais com sua presença iluminada.

Obrigado mãe, Laura Povodeniak de Lara, por sempre me tratar como o ser mais especial e capaz do mundo.

Obrigado minha irmã Edineia por todos os empurrõezinhos.

Obrigado Prof. Wiliam Ferreira da Costa, Edson Marques dos Reis, Prof^a Kelly Mari Pires de Oliveira e Adriana Araújo pela colaboração nas etapas deste trabalho.

Agradeço ao CPQBA da Unicamp pela parceria.

Agradeço ao meu coorientador Sandro Minguzi, que através de sua busca etnobotânica me apresentou a espécie estudada.

Agradeço especialmente ao meu orientador Euclésio Simionato.

RESUMO

Este trabalho foi composto pela investigação inédita dos constituintes e bioatividade do óleo da raiz da planta *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill, da família Euphorbiaceae, do gênero *Jatropha*, o qual possui mais de 200 espécies. O estudo elucidativo da composição química ocorreu através do isolamento de frações do óleo pela técnica de separativa de cromatografia em camada delgada (CCD) e confirmação pela técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), índice de Kovats, RMN e IV. Raízes frescas foram coletadas e trituradas para extração do óleo essencial em extrator tipo Clevenger por um período de 12h. O rendimento médio obtido de óleo foi de 0,16 % (m/m). A avaliação de atividade antibacteriana, pelo método de microdiluição em caldo, indicou qualitativamente e quantitativamente o potencial antibacteriano do óleo essencial da espécie em questão frente à bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. O óleo apresentou atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* (CIM 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *P. aeruginosa* (CIM 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com ausência de ação bactericida. Apresentou ação fungistática, inibindo o crescimento de todas as leveduras, com CIM de 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. albicans*, 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. krusei* e 2028 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. glabrata*, e também potencial fungicida, com resultados positivos frente à todas as linhagens fúngicas. Através da GC-MS foi possível determinar um total de 61 compostos, sendo estes confirmados pelo índice de retenção de Kovats obtido através do uso de uma série de alcanos de cadeia linear (C7-C30) e por comparação de espectros através da biblioteca de ADAMS e NIST. Os compostos majoritários presentes no óleo foram os terpenos β -pineno (composto majoritário 9.16 %), isoeugenol metil éter (8,54 %), β -vatireno (8.34 %), α -gurjuneno (6.98 %), 4,11,11-tetrametil-7- tetraciclo [6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol (6,64 %), α -pineno (6.35 %), p-ment-1-en-8-ol (5,24 %), canfeno (4.34 %), tricicleno (3.79 %) e dehidro aromadendreno (3.52%), seguidos por aldeídos e álcoois. Através da técnica de HS-SPME-GC-MS e o uso de diferentes tipos de revestimento de fase extratora, tais como polidimetilsiloxano 100 μm (PDMS), poliacrilato 85 μm (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno 65 μm (PDMS/DVB) e Carbowax/DVB 85 μm (CW/DVB) com tempo de extração de 15 s no *headspace* foi possível a determinação de 10

compostos voláteis não identificados diretamente no óleo, sendo estes o 2,3,4-trimetil-2-ciclopenten-1-one; α -felandreno; 3-careno; trans-*p*-menta-2,8-dienol; pinocanfone; 3-pinanone; verbenone; 1,3,3-trimetil-2-(2-metil-ciclopropil)-ciclohexeno; 2,4 diisocianato-1-metilbenzeno e (6-hidroximetil-2,3-dimetilfenil) metanol. A fibra que apresentou os melhores resultados na extração de compostos voláteis foi a CW/DVB 85 μ m. Os ácidos graxos predominantes para o albúmen da semente analisados por GC-FID foram o linoléico (C18:2n-6) com 72,82 %, o oléico (C18:1n-9) com 9,99 %, esteárico (C18:0) com 5,6 % e palmítico (C16:0) com 4,81 %.

PALAVRAS-CHAVE: plantas medicinais; compostos voláteis; terpenos; lipídios.

ABSTRACT

This work was composed for the novel investigation the chemical constituents and bioactivity of the oil from the plant *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill roots, family Euphorbiaceae, *Jatropha* genus, which has more than 200 species. The study elucidating the chemical composition occurred by insulating oil fractions by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), Kovats Index, RMN and IR. Fresh roots were collected and crushed to extract the essential oil extractor Clevenger type for a period of 12 hours. The average yield was 0.16 % (m / m). The evaluation of anti-bacterial activity by the broth microdilution method indicated qualitatively and quantitatively the antimicrobial potential of essential oil of the species in question against the Gram positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeast. The oil showed anti-bacterial activity against the *P. aeruginosa* (MIC 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and *S. aureus* (MIC 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$), with no bactericidal action. Showed fungal inhibition, inhibiting the growth of all yeasts, with MICs of 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. albicans* 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. tropicalis*, 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. krusei* and 2028 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. glabrata*, and also the fungicide potential with positive results front of all the fungi. Through the GC-MS was possible to determine a total of 61 compounds, which are confirmed by the Kovats retention index obtained through the use of a series of straight chain alkanes (C7-C30) and for comparing the mass spectra with ADAMS and NIST library. The major compounds present in the oil were terpenes β -pinene (major compound 9.16%), isoeugenol metil éter (8,54%), β -vatiene (8.34%), α -gurjunene (6.98%), 4,11,11-tetramethyl -7- tetracyclo [6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol (6,64 %), α -pinene (6.35%), p-ment-1-en-8-ol (5,24 %), camphene (4.34 %), tricyclene (3.79 %) and aromadendrene dehydro (3.52 %), followed by aldehydes and alcohols. Through the technique of HS-SPME-GC-MS and using different types of coating extraction phase, such as polydimethylsiloxane 100 μm (PDMS), polyacrylate 85 μm (PA), polydimethylsiloxane / divinylbenzene 65 μm (PDMS / DVB) and Carbowax / DVB 85 μm (CW / DVB) with extraction time of 15 s in the *headspace* was possible to determine 10 unidentified volatile compounds directly in the oil, these being the 2,3,4-trimethyl-2-cyclopenten-1-one ; α -phellandrene, 3-carene, trans-p-mint-2,8-dienol; pinocanfone; 3-pinanone, verbenone, 1,3,3-trimethyl-2-(2-methyl-cyclopropyl)-cyclohexene,

2,4-diisocyanate and 1-methylbenzene (6-hydroxymethyl-2,3-dimethylphenyl) methanol. The fiber showed better results in the extraction for volatile compounds was CW/DVB 85 μm . The predominant fatty acids for the albumen of the seed analyzed by GC-FID were linoleic (C18:2n-6) with 72.82 %, oleic (C18:1n-9) 9.99 %, stearic (C18:0) 5.6 % and palmitic (C16:0) 4.81.

KEY-WORDS: medicinal herbs, volatile compounds, terpenes, lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biossíntese dos terpenos e fenilpropanóides pela via mevalonato	6
Figura 2 Formação e classificação dos grupos terpênicos	6
Figura 3 Estruturas terpênicas	7
Figura 4 Exemplos de monoterpênicos	8
Figura 5 Estruturas sesquiterpênicas	8
Figura 6 Estrutura do Taxol e da Marrubiina	9
Figura 7 Biossíntese dos fenilpropanóides	10
Figura 8 2,6-trans-farnesil-pirofosfato	10
Figura 9 Formação de carbocátions derivados do FPP	11
Figura 10 Sesquiterpenos acíclicos	12
Figura 11 Esqueletos originados pelo cátion bisabolila	12
Figura 12 Biossíntese de germacranos	13
Figura 13 Síntese de germacranos	14
Figura 14 Sesquiterpenos bicíclicos	15
Figura 15 Anel lactônico	15
Figura 16 Esqueletos sesquiterpenos lactônicos	15
Figura 17 Formação do aduto	16
Figura 18 Biotransformação do taginino	17
Figura 19 Sesquiterpenos germacranos	17
Figura 20 Estruturas de germacranos	18
Figura 21 Estrutura de um furanoelíngolidos	18
Figura 22 Biossíntese de eremantolidos	19
Figura 23 Planta <i>Jatropha ribifolia</i> (Pohl) Baill	29
Figura 24 Raízes da <i>J. ribifolia</i>	46
Figura 25 Óleo da raiz da <i>J. ribifolia</i>	46
Figura 26 Montagem das microplacas para os ensaios biológicos	49
Figura 27 Perfil cromatográfico do óleo da <i>J. ribifolia</i> obtido por GC-MS	51
Figura 28 Percentual dos quimiotipos de óleo volátil da <i>J. ribifolia</i>	54
Figura 29 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS do constituinte A isolado	54
Figura 30 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS do constituinte B isolado	54
Figura 31 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS do constituinte A isolado	55
Figura 32 Estrutura química do dehidro-aromadendrene (A), 4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol (B) e (8S-cis)-5(1H)-Azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metylethylidene) (C)	55
Figura 33 Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo obtido por GC-MS e voláteis determinados por HS-SPME-GC-MS da <i>J. ribifolia</i> L. Nota: * compostos identificados somente na fração de voláteis do óleo [4] 2,3,4-trimetil-2-ciclopenten-1-one; [7] α -felandreno; [11] 3-careno; [13] trans- <i>p</i> -menta-2,8-dienol; [23] pinocanfona; [25] 3-pinanone; [28] verbenona; [29] 1,3,3-trimetil-2-(2-metil-ciclopropil)-ciclohexeno; [33]	72

2,4 diisocianato-1-metilbenzeno e [39] (6-hidroxi-metil-2,3-dimetilfenil) metanol	
Figura 34 Porcentagem da composição das classes químicas majoritárias para óleo e fração de voláteis da <i>J. ribifolia</i> L.	74
Figura 35 Perfil cromatográfico para ácidos graxos obtidos do óleo do albúmen da <i>J. ribifolia</i> L. analisados por GC-FID	84
Figura 36 Cromatograma de íons totais da fração 1 obtido por GC-MS	90
Figura 37 Cromatograma de íons totais da fração 2 obtido por GC-MS	90
Figura 38 Cromatograma de íons totais da fração 3 obtido por GC-MS	91
Figura 39 Cromatograma de íons totais da fração 4 obtido por GC-MS	91
Figura 40 Cromatograma de íons totais da fração 5 obtido por GC-MS	92
Figura 41 Cromatograma de íons totais da fração 6 obtido por GC-MS	92
Figura 42 Avaliação do perfil cromatográfico de voláteis do óleo essencial da <i>Jatropha ribifolia</i> (Pohl) Baill obtido por HS-SPME-GC-MS. Fibras: polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, poliacrilato (PA) 85 µm, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm e Carbowax/DVB (CW/DVB) 85 µm.	93
Figura 43 Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo essencial obtido por GC-MS e compostos isolados de frações obtidas por CCD	94
Figura 44 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração 1 isolada do óleo essencial por CCD. Composto sugerido: Dehidro aromadendrene	94
Figura 45 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração 2 isolada do óleo essencial por CCD. Composto sugerido: (8S-cis)- 5(1H)-Azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimethyl-4-(1-methylethylidene).	95
Figura 46 Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração 3 isolada do óleo essencial por CCD. Composto sugerido: 7-Tetraciclo [6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol, 4,4,11,11-tetrametil	95
Figura 47 Espectro de infra-vermelho para Fração 2 isolada do óleo da <i>J. ribifolia</i> por CCD. Bandas características de carbonila (C=O) em 1715 cm ⁻¹ , para alcanos (CH) em 2921,35 e alcanos (CH ₃) em 1398,88, bandas de ligação C=C do anel aromático em 1486,11 cm ⁻¹ e um CH ₂ alifático em 804,68 cm ⁻¹	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da <i>J. ribifolia</i> (Pohl) Baill. obtida por GC-MS	52
Tabela 2. MIC E CBM do óleo essencial da raiz da <i>Jatropha ribifolia</i> (Phol) Baill. frente à diferentes cepas bacterianas (μml^{-1})	56
Tabela 3. MIC e CFM do óleo essencial da raiz da <i>Jatropha ribifolia</i> (Phol) Baill. frente a diferentes cepas fúngicas (μml^{-1})	57
Tabela 4. Atividade antiproliferativa do óleo da <i>J. ribifolia</i> frente à células neoplásicas (GI_{50})	58
Tabela 5. Composição química e fração de voláteis do óleo essencial da <i>J. ribifolia</i> (Phol) Baill. identificados por GC/MS e HS-SPME-GC-MS.	68
Tabela 6. Percentual de ácidos graxos do óleo da <i>J. ribifolia</i> (Pohl) Baill. obtido por GC-FID	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABM - Atividade bactericida mínima
- AFM - Atividade fungicida mínima
- ATCC - American Type Culture Collection
- C - Carbono
- CCD - Cromatografia em camada delgada
- CDB - Convenção da Diversidade Biológica
- CG-EM - Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas
- CIM - Concentração inibitória mínima
- CLAE/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
- CP - Cromatografia em papel
- CW/DVB - Carbowax/divinilbenzeno
- DL₅₀ - Dose letal média
- FID - Detector de ionização de chama, do inglês *flame ionization detection*
- FPP - Pirofosfato de farnesila
- G - grama
- GC - Cromatografia à gás ou em fase gasosa
- GGPF - Geranil geranil pirofosfato
- GPP - Pirofosfato de geranila
- HS-SPME - Microextração em fase sólida no *headspace* da amostra do inglês Solid Phase Micro-Extraction
- GI₅₀ - Concentração necessária para que ocorra 50% de inibição do crescimento
- KI - Índice de Kovats
- IV - Infravermelho
- J - Constante de acoplamento
- M - Metro
- MHz – Megahertz
- Min - Minuto
- MS - Espectrometria de massa do inglês mass spectrometry

NIST - National Institute of Standard Technology

OE - Óleo essencial

PA - Poliacrilato

PDMS/DVB - Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PDMS - Polidimetilsiloxano

Q.s.p - quantidade suficiente para

RMN de ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S - Segundo

SPME - Microextração em fase sólida do inglês Solid phase micro-extraction

SRB – Sulforrodamina B

TCA - Ácido tricloro acético do inglês trichloroacetic acid

TMS - Tetrametilsilano

UFC/ml - Unidade formadora de colônia por mililitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Revisão de literatura	1
1.1 Plantas medicinais	1
1.2 Óleos essenciais	2
1.3 Estruturas químicas de óleos essenciais	5
1.4 Reatividade de esqueletos sesquiterpênicos	10
1.5 Atividade biológica de óleos essenciais	19
1.6 Métodos de extração de óleos voláteis	22
1.7 Identificação de compostos voláteis vegetais	25
1.8 Família Euphorbiaceae	28
1.9 Espécie <i>Jatropha Ribifolia</i> (Pohl) Baill	29
1.10 Objetivos	30
1.10.1 Objetivo geral	30
1.10.2 Objetivos específicos	30
1.11 Referências	30
CAPÍTULO II	
Composição química e atividades biológicas do óleo essencial e de frações isoladas da raiz da <i>J. Ribifolia</i> (Pohl) Baill	42
Resumo	43
Abstract	44
2.1 Introdução	44
2.2 Materiais e métodos	45
2.3 Resultados e discussão	51
2.4 Conclusão	58
2.5 Referências	59
CAPÍTULO III	
Composição química de voláteis do óleo essencial obtido de raízes da <i>J. ribifolia</i> (Pohl) Baill por HS-SPME-GC-MS e HS-SPME-GC-FID	62

Resumo	63
Abstract	64
3.1 Introdução	64
3.2 Materiais e métodos	66
3.3 Resultados e discussão	68
3.4 Conclusão	74
3.5 Referências	75
CAPÍTULO IV	
Avaliação do perfil de ácidos graxos do albúmen da semente da <i>J. ribifolia</i> (Pohl) Baill	79
Resumo	80
Abstract	80
4.1 Introdução	81
4.2 Materiais e métodos	82
4.3 Resultados e discussão	84
4.4 Conclusão	85
4.5 Referências	86
APÊNDICE	89

CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Conhecer a riqueza da biodiversidade de um país é a melhor maneira de lutar pela sua preservação. O estudo das plantas medicinais envolve várias áreas, sendo uma pesquisa multidisciplinar, perpassa a etnobotânica, a fitoquímica, a química, a farmacologia, a biologia molecular entre outras, favorecendo desde a população que às utiliza de forma tradicional até o desenvolvimento farmacológico, biotecnológico, bem como a sua preservação. O estudo multidisciplinar com as plantas envolve os relatos etnobotânicos, que documenta o conhecimento empírico, práticas e saberes populares amplamente utilizados nas pesquisas científicas como fitoquímica e farmacológica. Desde a antiguidade as pessoas usufruem das finalidades terapêuticas das plantas³ e essa cultura popular favoreceu a descoberta de muitos princípios ativos extraídos de espécies vegetais e reconhecidos pela ciência.⁴⁰ A preservação da medicina tradicional utilizando a fitoterapia, assim como a divulgação do conhecimento empírico dos povos antigos sobre a cura pelas plantas, é uma forma de preservar a cultura de cada região, como a indígena, muito presente em nosso estado e a medicina alternativa.⁴² Em muitos países subdesenvolvidos, o único recurso terapêutico de várias pessoas são as plantas e seu uso tradicional. Mas com a criação dos medicamentos sintéticos e a industrialização, a fitoterapia popular foi deixada em segundo plano.^{79,102}

A OMS (Organização Mundial da Saúde) incentivou a prática da medicina tradicional na “1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica”, considerando que 80 % da população mundial utiliza a fitoterapia popular. Nesse sentido, alguns municípios criaram formas de preservar essa prática, e ainda implantá-la ao serviço público de saúde. O “Programa Fitoterápico Farmácia Viva no SUS Betim” é um exemplo de contribuindo para a preservação dos costumes através da prática de uso das plantas e conseqüentemente da flora brasileira.^{40,44}

Plantas medicinais são definidas como plantas que possuem atividade biológica, com um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana.¹¹³ A produção de plantas medicinais apresenta muitas oportunidades, estende-se desde a produção e extração de óleos essenciais, indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos, fitoterápicos, fitofármacos, corantes, entre outros, além de contribuir para a preservação das espécies.³⁹

O passado e a atual dependência das plantas como uma fonte medicamentosa, impulsionam os estudos etnofarmacológicos na pesquisa da eficácia, segurança e descoberta de drogas potenciais.⁵¹ Com 55 mil espécies catalogadas, a biodiversidade do Brasil representa 20% da fonte mundial para substâncias bioativas de acordo com a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), sendo o maior portador de espécies endêmicas do mundo, fazendo parte dos países megabiodiversos.^{58,113} No Estado do Amazonas foi catalogado mais de 260 plantas utilizadas por comunidades na medicina popular, esse conhecimento empírico desencadeia e aumenta as investigações científicas no Brasil,^{64,90} levando à importantes descobertas para a medicina científica.¹¹³

Estudos têm mostrado várias atividades biológicas de produtos naturais. Da espécie *Catharanthus roseus* (L.) foram isolados mais de 60 alcalóides, como a vincristina, com ação antineoplásica comprovada.¹¹³ Famílias como a *Guttiferae* e a *Clusiaceae* possuem espécies com grande número de metabólitos secundários biologicamente ativos como flavonóides, benzofenonas, xantonas,⁸⁰ como a espécie *Kielmeyera coriacea* da família *Guttiferae* que possui comprovada ação antidepressiva.¹³⁸

As plantas medicinais atuam através de substâncias ativas, que agem fisiologicamente no organismo, podendo modificá-lo, por meio de ações terapêuticas ou profiláticas. Propiciam-nos a descoberta de novos princípios ativos, para promover benefícios e evitar os males do corpo. Uma planta pode conter um ou mais princípios ativos ou bioativos. Os bioativos são substâncias do metabolismo secundário das plantas, que formam diversas classes de compostos, como flavonóides, alcalóides, fenilpropanos e terpenos. Muitos destes compostos formam os óleos essenciais das plantas.¹¹³

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas produzem compostos primários e secundários. Os compostos primários são macromoléculas, como os lipídios e carboidratos, utilizados pelas plantas para suas funções

vitais. Os compostos secundários são produzidos para sua sobrevivência frente a situações adversas, como estresse hídrico, atração de insetos polinizadores e defesa contra predadores. Os óleos essenciais (OEs) fazem parte do metabolismo secundário das plantas, recebem o termo de óleos voláteis, essência e óleos etéreos. São denominados óleos etéreos por serem solúveis em solventes orgânicos, como o éter.^{106,125} Os óleos essenciais podem ser encontrados em todos os órgãos ou partes da planta, e são produzidos por estruturas especializadas, como os pêlos glandulares e tricomas, uma espécie de cápsula, que pode ser rompida naturalmente pela planta ou em processos de extração.^{113,117} Os OEs são definidos como substâncias líquidas de plantas aromáticas, hidrofóbicas, odoríferas, com aroma agradável e intenso, sabor acre à picante, geralmente incolor ou levemente amarelado, que permanecem em estado líquido com aspecto oleoso em temperatura ambiente, por isso denominados óleos. São solúveis em solventes apolares e pouco solúveis em água, formados por compostos de baixa massa molecular, o que os torna altamente voláteis, conferindo aroma às plantas. São instáveis na presença da luz, ar, altas temperaturas e umidade.^{113,116} A International Standard Organization (ISO) define os óleos voláteis como compostos extraídos de plantas pelo método extrativo por arraste a vapor por hidrodestilação ou por compressão dos pericarpos de frutos cítricos.^{113,116}

Os OEs possuem uma composição complexa, podendo conter mais de 300 constituintes químicos, com enorme diversidade estrutural, sendo as moléculas terpênicas majoritárias, seguida dos fenilpropanóides, com a presença ou não de vários grupos funcionais, como álcoois, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos e aldeídos.^{93,113}

Alguns fatores influenciam no rendimento e composição química dos óleos voláteis. São fatores intrínsecos, como a parte da planta a ser extraída, o estágio de desenvolvimento e a forma de colheita. Dependendo do local de onde é obtido o óleo essencial, como cascas, raízes, caule, folhas e sementes, pode apresentar variações na sua composição, características físico-químicas e organolépticas. O óleo da canela (*Cinnamomun zeylanicum*) é rico em aldeído cinâmico se extraído da casca, e em eugenol e cânfora se obtido das folhas e raízes.⁷⁹ O teor de óleo do manjeriço (*Ocimum basilicum L.*) aumenta se a planta for colhida no período da manhã e anterior ao estágio de floração.⁵⁶ As folhas menores da hortelã possuem mais essência que as maiores. O método de colheita e os procedimentos de pós-colheita podem levar a variações na composição do óleo. As raízes devem ser lavadas com água ozonizada ou hipoclorada, para eliminação de microorganismos, e secas para evitar fungos, o que leva à queda do rendimento de

óleo.^{80,113} O óleo volátil requer cuidados após a extração, como a desumidificação com compostos hidrofílicos, como o sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), purificação por filtração em sílica gel, armazenamento em frasco âmbar e hermeticamente fechado, evitando assim a exposição ao ar, degradação pela luz e umidade por ação oxidante e transformações químicas. A temperatura de armazenamento deve permanecer abaixo de 20° C para evitar perdas de voláteis termolábeis.⁸⁰

Há fatores extrínsecos, como a época da colheita, o horário e as condições edafoclimáticas, que também podem levar a variações nos compostos presentes no óleo.⁸⁰ A temperatura influencia diretamente na quantidade de essências nos pêlos glandulares. Algumas plantas quando recebem menor quantidade de água aumenta o teor de essência, uma forma de compensar o estresse hídrico. As partes subterrâneas das plantas como os rizomas, devem ser colhidas na primavera ou em outubro. Quando o interesse é o OE, deve-se evitar a colheita próxima das 12h, período em que estes estão em quantidades reduzidas, o ideal é realizar a colheita no período da manhã, quando há maior variedade e quantidade de constituintes.^{15,56}

A multiplicidade química na composição torna os óleos voláteis produtos valiosos, tanto para o meio científico como comercial, pois conferem à eles diversas bioatividades e podem ser empregados em várias áreas. Os óleos essenciais têm sido utilizados desde a antiguidade, com relatos de uso a 4.500 A.C, por povos chineses e egípcios, estes acreditavam que suas propriedades aromáticas levavam a cura do corpo e do espírito, também usado como flavorizante para alimentos e curativo para muitas enfermidades. As crescentes pesquisas na área têm descoberto diversas aplicações para os OEs, além de inúmeras ações terapêuticas, como antimicrobianos e antioxidantes para alimentos e pesticidas atóxicos, devido à baixa toxicidade e amplo espectro de ação.¹⁰⁸

A aromacologia (ou aromatologia) ressurgiu como novas linhas de pesquisa com os óleos essenciais, e tem feito grandes descobertas de atividades biológicas através dos estudos dos efeitos neurofisiológicos, contribuindo com a área farmacêutica na busca de novos princípios ativos.¹⁰⁸

A investigação dos constituintes dos óleos etéreos teve início no século XIX. No Brasil, com a chegada do pesquisador alemão Theodor Peckolt, em 1847, foram publicados vários trabalhos sobre os OEs de plantas terapêuticas, através de uma investigação sistematizada, começando pelos relatos populares e após com a comprovação da bioatividade dos mesmos,

fornecendo dados sobre o teor e composição dos mesmos.^{102,108} Em um de seus trabalhos falou sobre o óleo da sapucainha (*Carpotroche brasiliensis*), usado como inseticida, parasiticida e no combate à lepra.¹² Em 1969 foi criado por farmacognosistas o International Symposium on Essential Oils, para analisar e divulgar as descobertas sobre os OEs.

Comercialmente há 300 óleos essenciais de importância mundial, estando o Brasil entre os quatro maiores produtores do mundo. Um dos primeiros óleos essenciais de importância comercial no país foi o óleo do pau-rosa, da espécie *Aniba roseadora*, de que é extraído o linalol, um monoterpene de alto valor, intensamente utilizado em perfumaria como fixador. Sua exploração para exportação em grande escala teve início em 1925, uma extração predatória que levou à quase extinção da espécie. Na década de 60, com a obtenção do linalol sintético e a escassez da espécie, houve uma brusca diminuição das exportações.^{12,39}

1.3 ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos voláteis são constituídos na sua grande maioria por substâncias com esqueletos terpênicos e fenilpropanóides, podendo estes ser hidrocarbonetos simples ou conter grupos funcionais oxigenados, como cetonas, álcoois e aldeídos e nitrogenados. Podem apresentar ainda estruturas de cadeia aberta ou cíclica, saturada ou aromática. Uma espécie produtora de óleo essencial pode apresentar vários quimiotipos. Quimiotipos ou raça química são espécies de plantas semelhantes morfológicamente, mas que devido à diferenciação na composição química recebem denominações diferentes ou subespécies.¹⁹ Pode ter um constituinte majoritário, como por exemplo, o anetol que representa 90% dos constituintes do óleo da *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) ou uma mistura complexa com centenas de constituintes.¹⁰⁸

A origem dos terpenos e fenilpropanóides pode ser esclarecida pelo metabolismo da glicose (Figura 1).^{113,116}

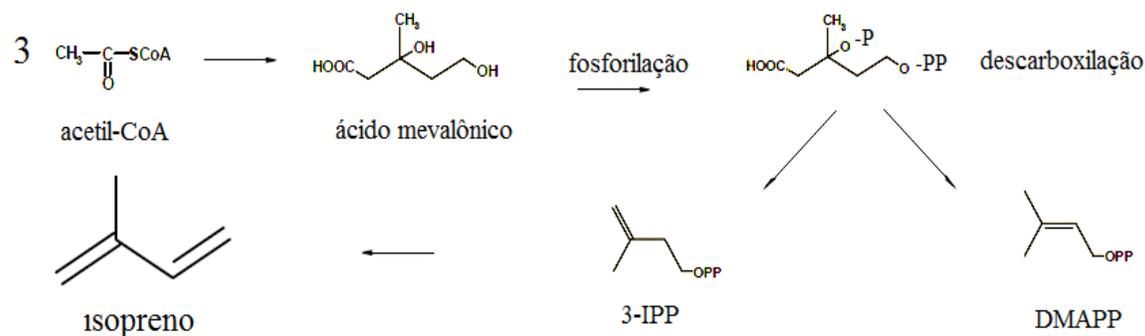


Figura 1 – Biossíntese dos terpenos e fenilpropanos pela via mevalonato

Os terpenos, também denominados terpenóides e isoprenóides, são substâncias que são originadas pela fusão de isoprenos. É uma das maiores classes de compostos naturais, encontrados em todas as partes das plantas, sua fórmula geral é $(C_5H_8)_n$, com mais de 30.000 tipos descritos.³ Muitos terpenos tem sido utilizados como protótipos para produção de compostos sintéticos e novos fármacos através da simplificação molecular. Quando estes são formados a partir de precursores sintetizados pela rota do ácido mevalônico, contêm em sua estrutura básica unidades isoprênicas (Figura 2).³⁵

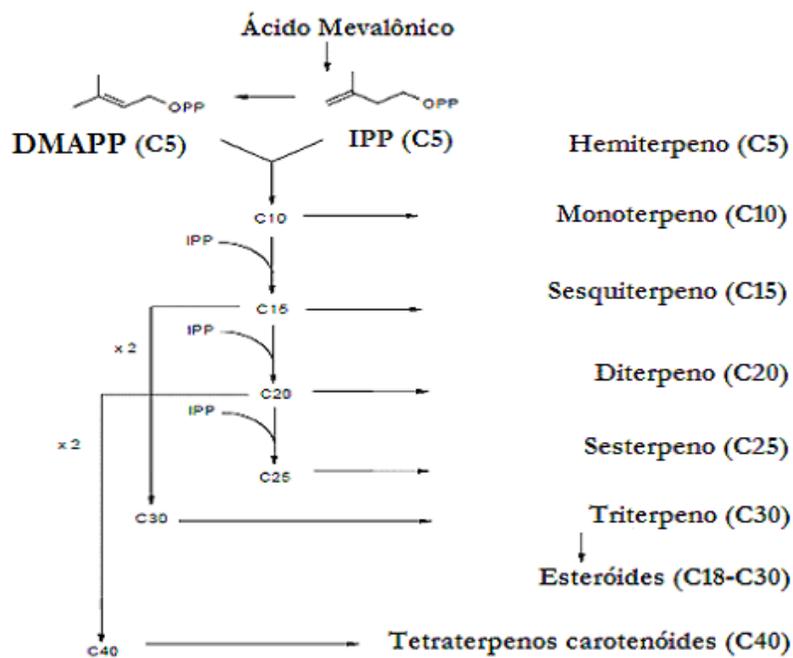


Figura 2: Formação e classificação dos grupos terpênicos

O isopreno é a unidade básica que possibilita a formação dos diversos grupos terpênicos, sendo os precursores terpênicos o pirofosfato de isopentilalila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), como ilustrado na Figura 2.³⁵ Os terpenos são classificados quanto ao número de unidades isoprênicas e podem apresentar esqueleto acíclico ou com diferentes ciclizações (Figura 3).

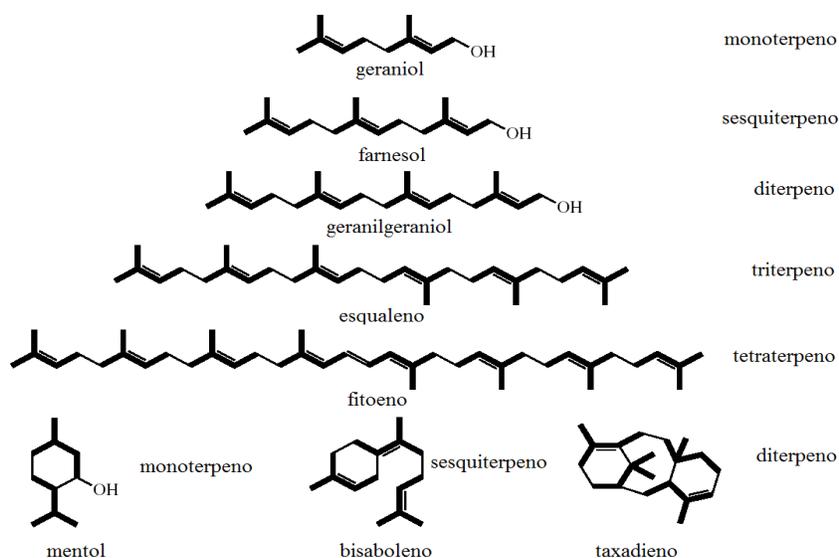


Figura 3 – Estruturas terpênicas

Os grupos terpênicos possuem as seguintes características:³⁵

- Hemiterpenos - são constituídos por uma unidade isoprênica (5C), sendo sua estrutura terpênica mais simples.
- Monoterpenos - são as moléculas de maior abundância nos OEs, representando cerca de 90% dos constituintes,¹¹³ formados pela justaposição de duas unidades isoprênicas. O composto comum para formação dos monoterpenos é o pirofosfato de geranila (GPP), com uma ligação dupla, o que possibilita reações com formação de isômeros, gerando diversos tipos monoterpênicos. Podem apresentar cadeias abertas, cíclicas ou bicíclicas, oxigenadas ou não. Na Figura 4 observamos as diferentes cadeias monoterpênicas, como o mentol, um monoterpeno monocíclico, com um álcool (COH) ligado ao carbono secundário. Um monoterpeno acíclico é o geraniol, sendo um álcool alifático, presente em muitas espécies de plantas, um dos compostos majoritários do óleo de rosas e no óleo do capim citronela (*Cymbopogon nardus*), sendo

precursor de outros terpenos, como o citral e α -terpineol, este último apresenta ação hipotensora. O timol é um fenol com uma hidroxila ligada ao anel aromático. O α -felandreno é um hidrocarboneto monocíclico insaturado e o citral que é um aldeído alifático insaturado.^{113,117}

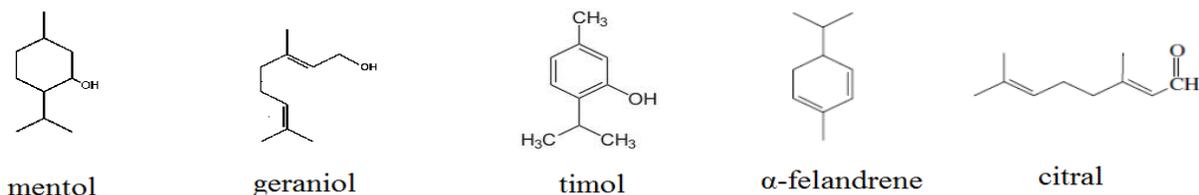


Figura 4 - Exemplos de monoterpenos

c) Sesquiterpenos - é uma classe de terpenos em que possui grande número de estruturas diferenciadas, todas com 3 unidades isoprênicas, podendo ser acíclicas, monocíclicas, bicíclicas ou lactonas sesquiterpênicas. Nos óleos essenciais são encontrados sesquiterpenos de cadeia cíclica não oxigenados (aromadendreno, β -cariofileno, β -elemeno) e oxigenados (espatulenol, globulol e α -cadinol). O α -bisadolol é um exemplo sesquiterpênico de um álcool monocíclico insaturado, com a hidroxila ligada ao carbono saturado, que faz parte da composição do óleo da camomila. O cadaleno é um exemplo de sesquiterpeno de cadeia bicíclica e o farneseno de cadeia aberta (Figura 5).¹¹⁷

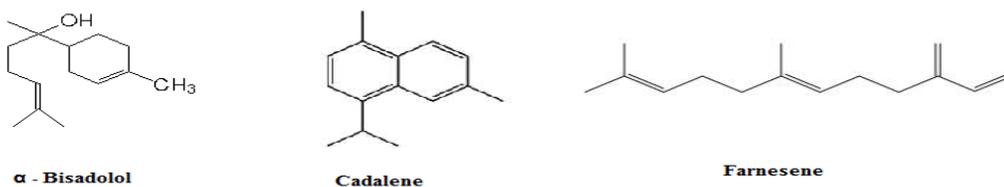


Figura 5 - Estruturas sesquiterpênicas

d) Diterpenos - contém em sua estrutura 4 unidades de isoprenos. Seu precursor comum é o geranylgeranilpifosfato (GGPF), um diterpeno acíclico formado pela adição de uma unidade isoprênica (C5) ao farnesil (C15), possuindo 20 carbonos em sua estrutura, geralmente de cadeia cíclica. É um grupo terpênico bastante complexo, pois apresenta grande diversidade de esqueletos, sendo classificado em vários subgrupos de acordo com sua ciclização como:

cembreno, casbreno, jatrofano e latirano (macrocíclicos); clerodanos, clauranos, labdanos, neoclerodanos (esqueleto bicíclico); cauranos (rígido esqueleto tetracíclico); podocarpanos (esqueleto tricíclico); halimanos, taquilobanos e sarquipetalanos (policíclicos). São poucos os diterpenos de cadeia aberta, o fitol é um exemplo. São mais facilmente extraídos por solventes orgânicos, pois são menos voláteis, com maior número de carbonos (C₂₀). Os diterpenos macrocíclicos tem sido investigados quanto à eficácia como moduladores da multirresistência a fármacos (MDR), pela presença de vários grupos funcionais e estruturas diferenciadas.⁴⁷ Um importante diterpeno isolado das cascas da *Taxus brevifolia Nutt.*, é o taxol (Figura 6-A), com ação antitumoral comprovada para câncer de pulmão, mama, ovário e leucemia, sendo este sintetizado, modificado em laboratório e patentiado pela indústria farmacêutica. A marrubiína é um exemplo de sesquiterpeno de cadeia cíclica, com ação antidiabética, antihipertensiva, também patentada pela ação antiasmática (Figura 6-B).^{9, 17, 84, 117, 124}

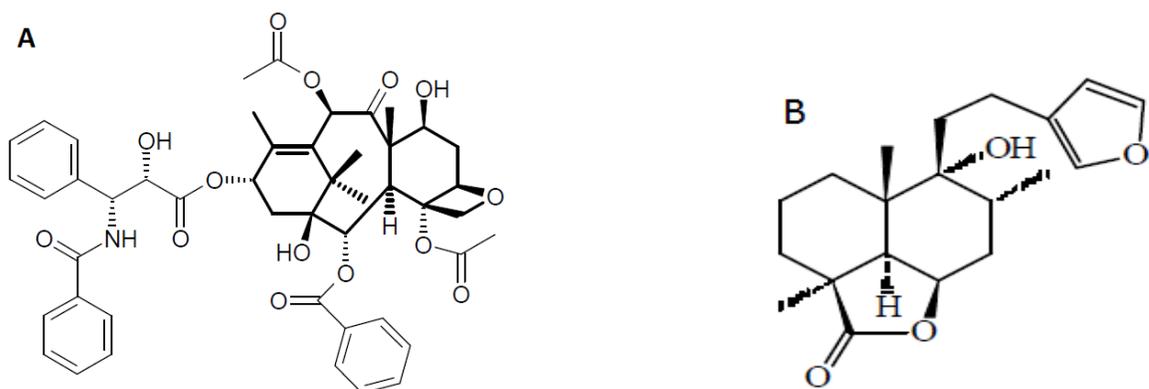


Figura 6 - Estrutura do taxol e da marrubiína

Os fenilpropanos são compostos que contém em seu esqueleto principal um anel benzênico (aromático) com uma cadeia alquílica lateral (C₆-C₃), caracterizado também por uma hidroxila na posição orto do anel. São biossintetizados pela via do ácido chiquímico, que forma a fenilalanina, e através da enzima fenilalanina amônialiase (PAL), importante enzima reguladora da formação dos compostos fenólicos, forma o ácido cinâmico, estrutura básica precursora dos fenilpropanóides e também classificado como fenilpropanóide. A Figura 7 expõe a biossíntese dos fenilpropanóides encontrados em óleos essenciais.

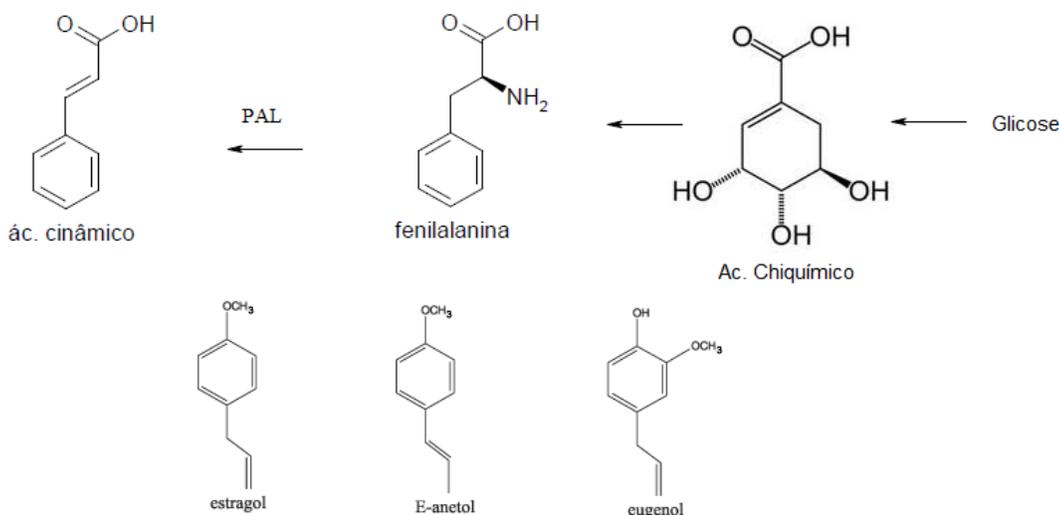


Figura 7 - Biossíntese dos fenilpropanóides

1.4 REATIVIDADE DE ESQUELETOS SESQUITERPÊNICOS

Há mais de 1000 tipos de sesquiterpênos descritos em óleos essenciais.¹¹³ É uma classe que se destaca pela complexidade de suas estruturas, e tem como unidade básica de origem o pirofosfato de farnesila (FPP), (Figura 8), que por sua vez é formado por ³ unidades isoprenas. O FPP apresenta um esqueleto carbônico maior e a presença de três duplas ligações, gerando uma gama de estruturas diferenciadas, com cadeias lineares, monocíclicas, bicíclicas e tricíclicas.^{65, 75,132} Assim, esta classe tem sido alvo de estudos para síntese de novos compostos, através de métodos clássicos, reações de isomerização, ciclização, funcionalizações, rearranjos enzima-dependente e também por novos mecanismos biotecnológicos, como a biotransformação envolvendo microorganismos, originando múltiplos produtos sesquiterpênicos bioativos. Atualmente já foram identificados mais de 200 tipos diferentes de esqueletos devido a presença de centros assimétricos nas moléculas de sesquiterpenos, sendo comum a isomerização, formando maior número desses produtos.^{8,14,15, 86}

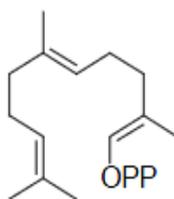


Figura 8 - 2,6-*trans*-farnesil-pirofosfato

O precursor FPP, através de rearranjos, origina três compostos catiônicos, o cátion *E, E*-farnesila, *E*-nerolidila e *E, Z*-farnesila. Esses formam carbocátions que originam a maioria dos esqueletos sesquiterpênicos através de ciclizações estruturais por ataques eletrofilicos, ocorrendo o deslocamento das duplas ligações, surgindo os esqueletos farnesila, germacrila, guailla, eudesmila, humulila, cariofilila, bisabolila, carotila, *cis*-germacrila cadilila e *cis*-humulila (Figura 9).⁶⁵

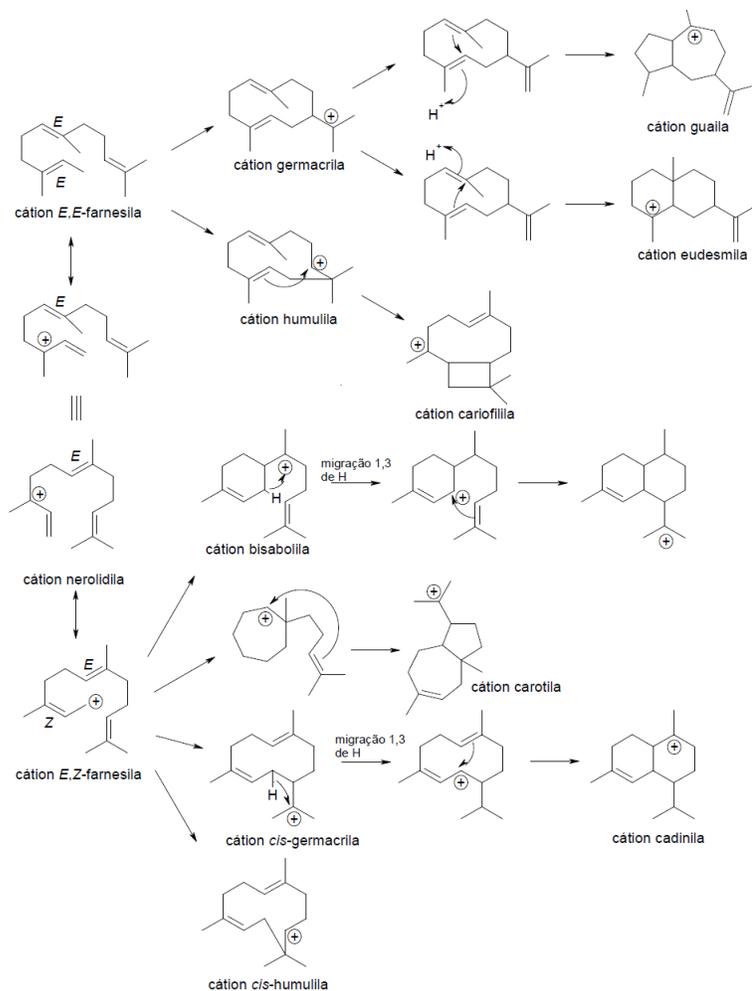


Figura 9 - Formação de carbocátions derivados do FPP

O nerolidol e o farnesol são exemplos de álcoois sesquiterpênicos de cadeia aberta, com fórmula $C_{15}H_{26}O$, ambos com três duplas ligações em seus esqueletos. O que os diferencia é a posição da dupla ligação e da hidroxila. O nerolidol possui um carbono assimétrico. (Figura 10).⁸⁹

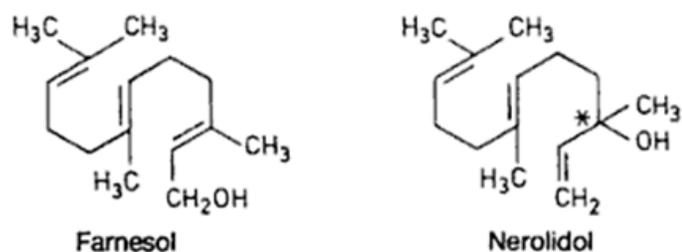


Figura 10 - Sesquiterpenos acíclicos

O cátion bisabolila gera seis novos sesquiterpenos, a maioria monocíclicos, através da movimentação do carbocátion e da ligação dupla. Os óxidos de bisabolol A e B são produtos da oxidação do α -bisabolol, gerados através da ciclização, com estereoquímicas diferentes que alteram a propriedade odorífera.^{35,41} O isômero α -bisabolol apresenta 4 formas isoméricas, o (-)- α -isabolol é o estereoisômero com importantes atividades biológicas, sendo um álcool monocíclico insaturado, opticamente ativo, presente em alto teor no óleo de várias espécies de plantas, como da cabreúva (*Myrocarpus fastigiatus*), camomila (*Matricaria recutita*) e é o composto majoritário (49,95%) no óleo das folhas do *Croton ceanothifolius*. Apresenta ação antiinflamatória, antimicótica, antibacteriana e antiespasmódica, age como bloqueador do sistema nervoso periférico, através do bloqueio dos canais de sódio, (Figura 11).^{4,51}

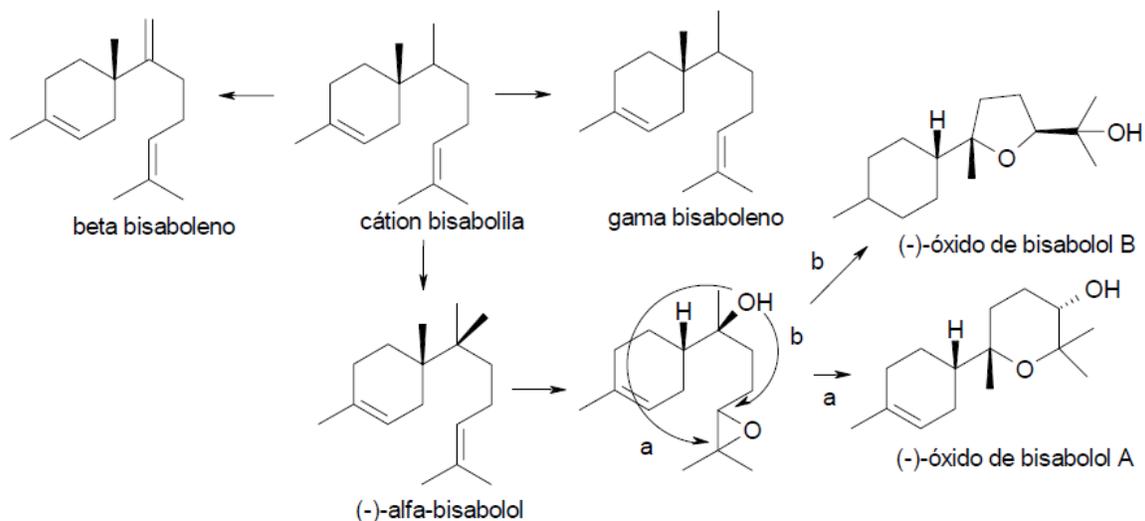


Figura 11 - Esqueletos originados pelo cátion bisabolila

Itoh desenvolveu um método para síntese de derivados germacranos obtidos por ciclização intramolecular induzida por ânion.⁴⁸ A reação inicia-se com o *Z, E*-farnesol, ocorre uma ciclização devido a um anel epóxido que é aberto por um ânion alílico estabilizado por um grupo fenilsulfito. A vantagem da ciclização estratégica de Itoh é o fácil acesso ao precursor acíclico requerido para formação de um sistema de anél com 10 membros. O método tem sido usado para preparação de ligação dupla do estereoisômero de hedicariol (Figura 12).^{22,72}

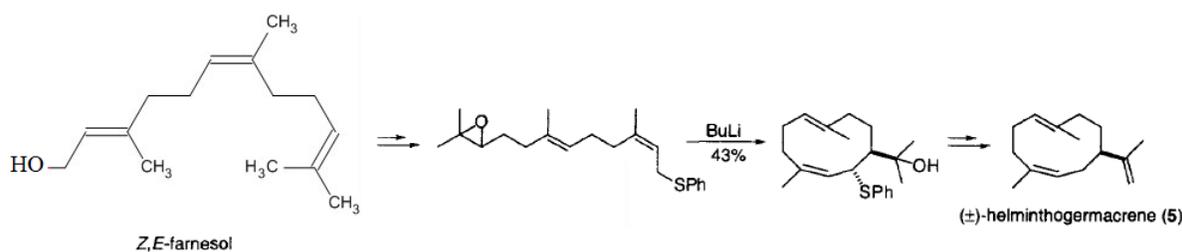


Figura 12- Biossíntese de germacranos

A Figura 13 mostra mecanismos de ciclização e rearranjos estruturais formando novos esqueletos sesquiterpênicos. O farnesil difosfato gera esqueletos intermediários altamente reativos devido à sua ionização e mudanças nas posições dos carbocátions. Um estudo sugeriu duas alternativas de desprotonação para a formação dos germacranos A e B.²² A captura do ânion difostato em C3 resulta em um carbocátion em C2, o qual pode gerar a ciclização do esqueleto em C1 e C10 (ocorre a formação do germacrano A ou B). Uma mudança do hidreto 1,3 e duas rotas de desprotonação do macrociclo geram os germacranos D ou C. Para uma mudança do hidreto em 1,2 com nova desprotonação podem gerar os germacranos C ou B. Com aquecimento, o germacrano C sofre um rearranjo formando o δ -Elemeno.^{22,32}

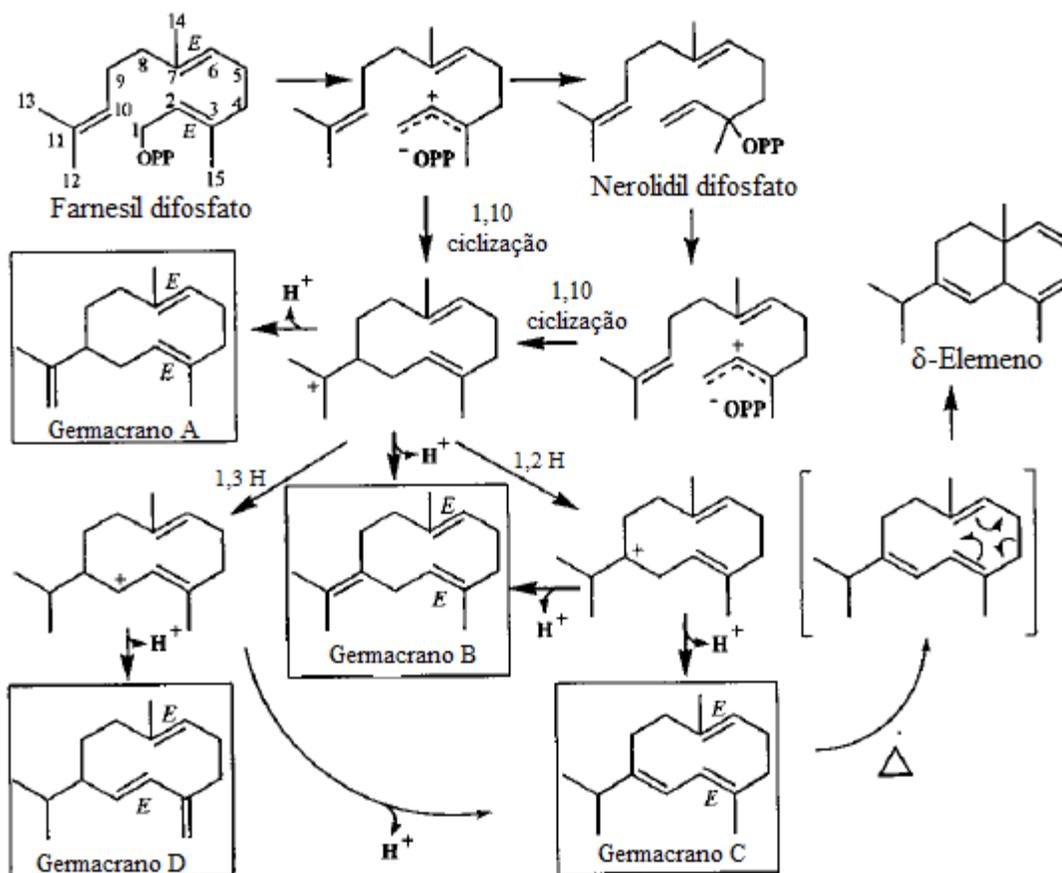


Figura 13- Síntese de germacranos

Os sesquiterpenóides, como o β -cariofileno, fazem parte das emissões biogênicas de hidrocarbonetos na atmosfera. Esses compostos possuem esqueletos altamente reativos, um dos motivos é a presença de duas ou mais ligações olefínicas. Os sesquiterpenos são compostos orgânicos voláteis (COVs) que ao serem liberados na atmosfera sofrem reações de oxidação e fotooxidação, contribuindo para a formação dos radicais OH, NO₃ e O₃.⁷⁸ O β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico, com atividade anti-inflamatória, citotóxica e antineoplásica. Este composto ao reagir com o ozônio forma os cetoaldeídos semivoláteis 3,3-dimetil- γ -metileno-2-(3-oxobutil)-ciclobutanobutanal e 3,3-dimetil- γ -oxo-2-(3-oxobutil)-ciclobutanobutanal e formaldeído. A Figura 14 expõe o esqueleto do β -cariofileno e outros sesquiterpênicos bicíclicos.^{77,45}

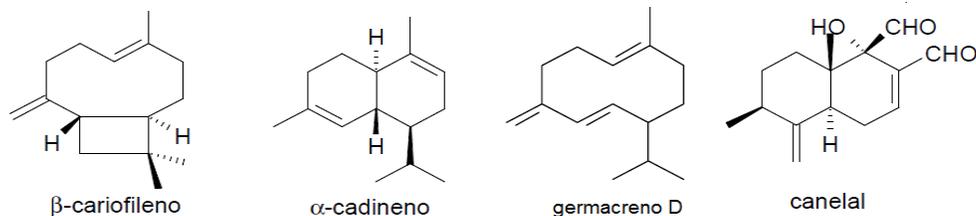


Figura 14 - Sesquiterpenos bicíclicos

Como sesquiterpenos de esqueleto tricíclico podemos citar os lactonas, um grupo grande de produtos naturais muito encontrado em espécies da família *Asteraceae*.²⁸ Essa classe é caracterizada pela presença de um anel lactônico em seu esqueleto carbônico terpenóide, geralmente α ou β -insaturado, com dupla ligação exo ou endocíclica. Esse anel lactônico ocorre através da transformação de uma metila em carboxila por uma reação de oxidação, a oxidação de um carbono adjacente e, finalmente, a desidratação entre os grupos carboxila e hidroxila formados. Suas estruturas apresentam várias funções orgânicas, como cetonas, aldeídos, álcoois, epóxidos, que conferem a esta classe alta reatividade (Figura 15).¹⁰⁵

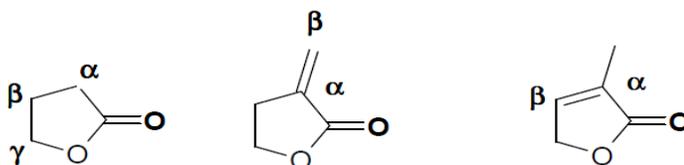


Figura 15 - Anel lactônico

Os principais esqueletos deste grupo com base em seus esqueletos carboxílicos são os germacrolidos, guaianolidos e eudesmanolidos (Figura 16). Os guaianolidos são considerados sesquiterpenos mais avançados biossinteticamente, por causa do alto nível de ciclização e reações de oxidação.⁸⁷

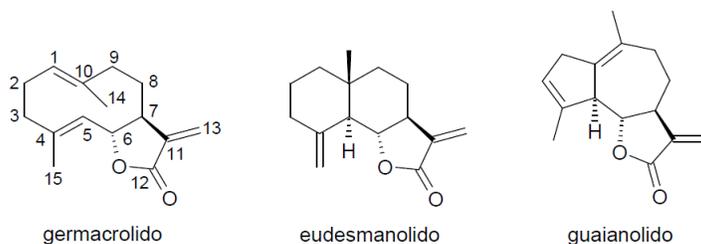


Figura 16 - Esqueletos sesquiterpenos lactônicos

Os sesquiterpenos lactônicos apresentam diversas ações terapêuticas, como gastroprotetora, antiinflamatória, antimicrobiana e citotóxica, mas na presença da cisteína pode reagir com a sulfedril (-SH), formando um composto que pode ser tóxico, o aduto (Figura 17), por isso pesquisadores têm buscado modificações estruturais para obtenção de derivados análogos atóxicos e com maior e melhor bioatividade.^{21,55,99}

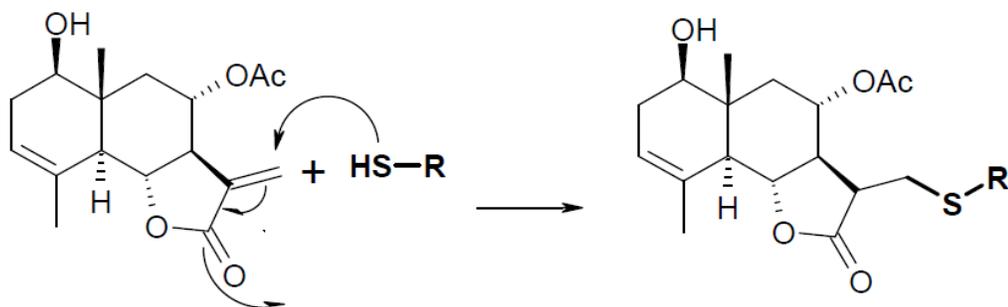


Figura 17- Formação do aduto

Por serem muito reativas, a classe das lactonas forma muitos compostos, que podem ser nocivos ao organismo, principalmente os que possuem uma insaturação exocíclica ligada a uma carbonila, como visualizado na Figura 17. Experimentos *in vitro* demonstraram que a atividade antitumoral dos sesquiterpenos lactonas deve-se à presença de um α -metileno- γ -lactona, alguns grupos funcionais ativos e uma α , β -insaturação, já as estruturas com apenas uma insaturação a atividade terapêutica não foi significativa.⁵⁴

No processo de biotransformação enzimática (Figura 18), utilizando o fungo *Aspergillus terreus* MT 5.3, o sesquiterpeno tagitinino gerou o composto 2, através de uma epoxidação incomum entre C4 e C5, uma ponte éter entre C3 e C10 e uma metoxilação em C1, sendo uma rota sintética que mimetiza o metabolismo secundário das plantas. Ambos os compostos foram testados quanto à sua atividade antineoplásica. O composto 1 que apresenta três α , β -insaturações em seu esqueleto, não demonstrou maior atividade antitumoral que o composto 2, com apenas duas insaturações, isto sugere que uma terceira insaturação não afetou a atividade citotóxica.⁹⁴

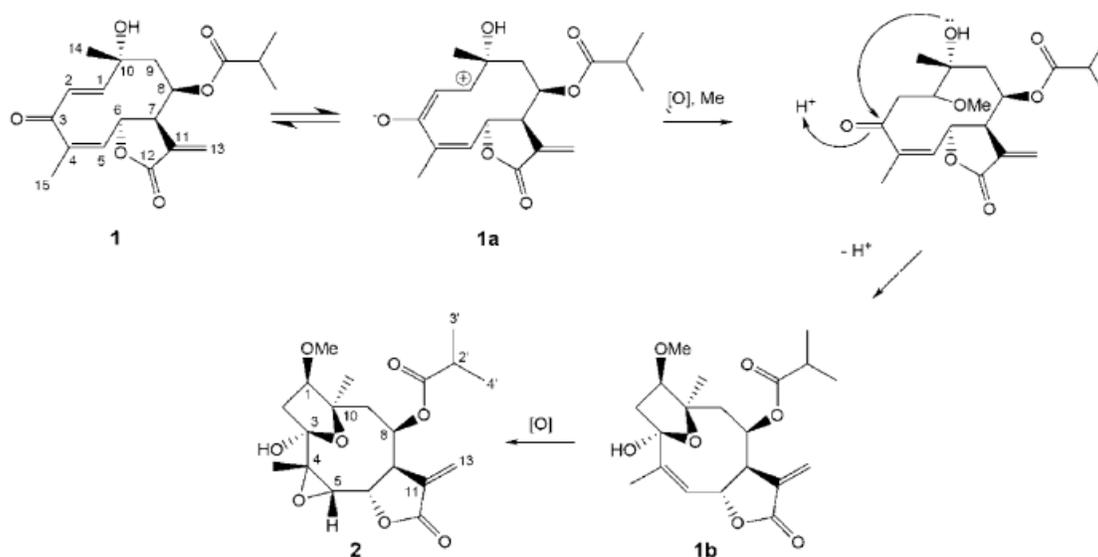


Figura 18-Biotransformação do tagitinino

A classe dos germacranos (ou germacrolidos) tem sido extensamente investigada pela química orgânica, pela ocorrência em várias espécies de plantas e detalhes em suas estruturas que proporcionam a formação de outros sesquiterpenos. Esta classe apresenta um anel de dez membros em seu esqueleto e duas duplas ligações (C=C) tipo *trans* (E) formado através de ciclização do FPP e reações de oxidação.⁷²

Os germacrolidos podem apresentar quatro diferentes conformações ocorridas pela mudança na posição da dupla ligação e da posição das metilas em C14 e C15, (Figura 19).⁷²

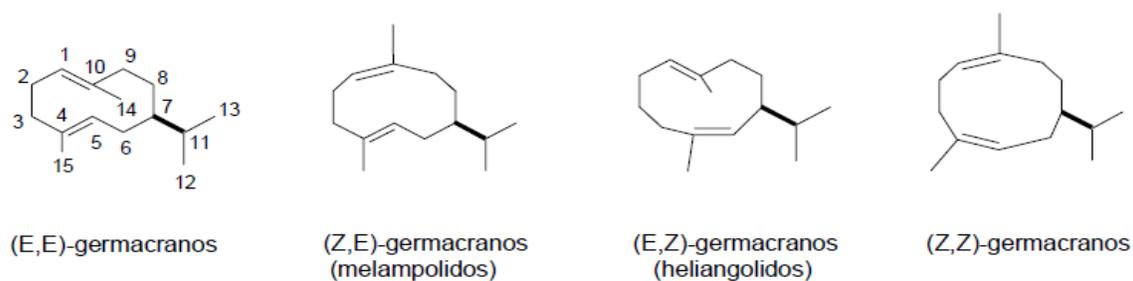


Figura 19 - Sesquiterpenos germacranos

Magio et al (2005),⁶⁵ através de estudos conformacionais por RMN, descobriu duas diferentes estruturas dos germacranos (2 e 3), obtidas através de uma reação oxidativa na estrutura 1, (Figura 20).

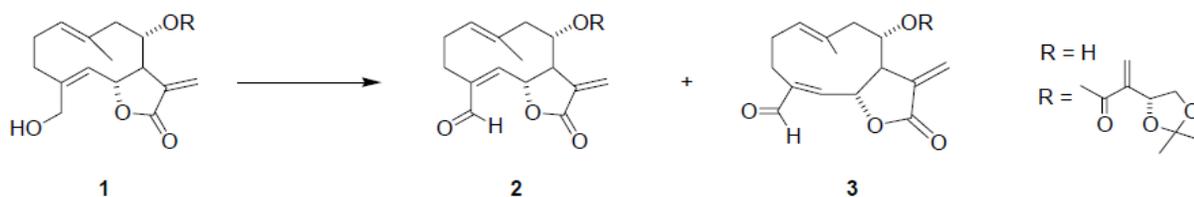


Figura 20 - Estruturas de germacranos

Os furanoeliangolidos pertencem a uma subclasse dos germacrolidos caracterizados por uma ponte entre C3 e C10, constituída por um átomo de oxigênio. Possuem várias atividades terapêuticas, como esquistomicida, antibacteriano, antifúngico, analgésico, antitumoral e citotóxico. O goiazensolido (9, R=MeAcr), pertencente à esta subclasse, possui intensa ação anti-inflamatória, que de acordo com estudos de estrutura-atividade, deve-se à presença dos grupos γ -lactona e a carbonila $\alpha,\beta,\delta,\gamma$ -insaturada (Figura 21).

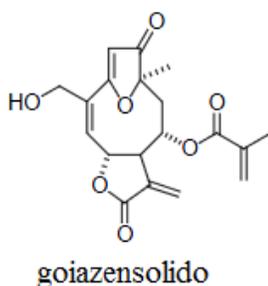


Figura 21 - Estrutura de um furanoeliangolidos

Através de uma adição de Michael,⁸⁶ uma alquilação desracemizante, em que ocorre uma adição conjugada de iminas quirais à alquenos eletronicamente deficientes, muito utilizada na síntese de produtos naturais, como os sesquiterpenos, o goiazensolido gera o eremantolido (12, R= C(CH₃)CH₂), com menor atividade anti-inflamatória (Figura 22-B).⁶⁸

Em laboratório, dois furanoeliangolidos, o 15-desoxigoiazensolido (A) e goiazensolido (B), reagiram com o reagente de Stryker, ocorrendo uma adição de hidreto seguida de ciclização, originando os eremantolidos A1 e B1. Do composto A obteve-se também o composto reduzido A2, a lactona B formou também o eramantolido B2 e o composto reduzido B3 (Figura 22). Essas mudanças reacionais aumentaram o rendimento dos produtos B1 e B2.⁶⁸

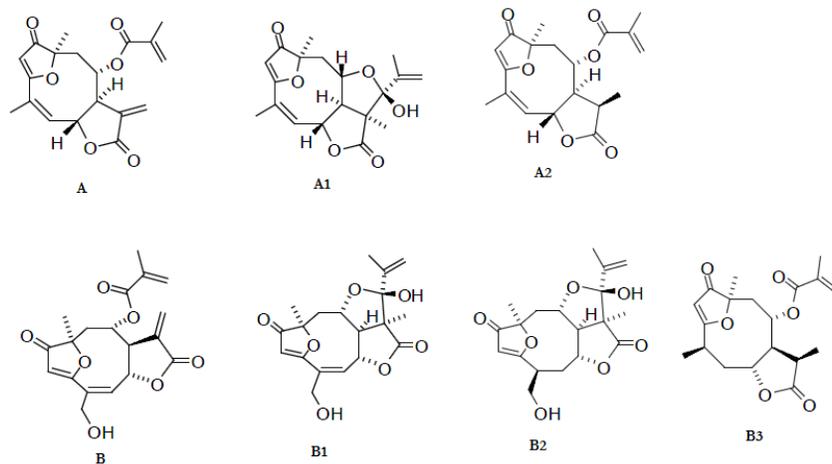


Figura 22 - Biossíntese de eremantolidos

Estudos avançados tangem ao esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelas sínteses sesquiterpênicas, bem como propor novos mecanismos para síntese laboratorial de moléculas sesquiterpênicas bioativas.^{14,32}

1.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os primeiros óleos essenciais utilizados pela humanidade, que se tem relatos, são das espécies *Cedrus trew species* (Cedar), *Cupressus sempervirens* L. (Cypress), *Commiphora Jacq. Species* (Myrrh) e *Papaver somniferum* L., utilizados para tratar diversas doenças. Na China e na Índia utilizavam óleos de canela, sândalo, gengibre, coentro e jasmim na forma de banhos e fumigação. No Egito há inscitos da utilização medicinal de óleos de artemísia, anis, angélica, cominho, almíscar, funcho e camomila, na forma de unguentos, curativos, etc., sendo os primeiros a extrair de forma rudimentar o óleo essencial por euflerage. Há indícios de que os persas obtiveram o primeiro óleo bruto por destilação utilizando a *Rosa Centifolia*.²⁷

Essa utilização empírica conduziu a uma investigação mundial com plantas aromáticas para a comprovação dessas ações e para a identificação e isolamento dos bioativos.¹³⁶ A complexidade e vasta gama de compostos dos OEs conferem à eles potencialidade terapêutica. Muitos triterpenos isolados são responsáveis por ação antiinflamatória, antineoplásica, gastroprotetora, hepatoprotetora e antitumoral.⁷ Os compostos fenólicos parecem ser responsáveis na maioria das vezes pela atividade antimicrobiana das plantas aromáticas.³⁰ Muitos biativos extraídos e isolados dos OEs são empregados em fitocosméticos, como o

camazuleno, mentol, cânfora e bisabolol. A crescente pesquisa fitoquímica tem confirmado várias atividades terapêuticas dos OEs como antissépticas, rubefacientes, secretolíticas, antibacteriana, antiviral, antioxidante,⁹⁵ antiinflamatória,⁷⁷ antinociceptiva,⁶⁷ antimicrobiana,³¹ antifúngica,^{96,125} e antiulcerogênica.^{74,122,123}

Araújo e colaboradores⁷ analisou a bioatividade de sete OEs, de diferentes espécies de plantas medicinais, contra vários agentes causadores de infecções oportunistas. Destacou-se a espécie *Cinnamomun zeylanicum* (canela), com significativa ação antimicrobiana, sendo mais eficaz que o antifúngico padrão. O composto majoritário é o cinamaldeído, seguido pelo α -pineno, limoneno, eugenol, ácido cinâmico, felandreno, ocimeno, β -cariofileno e safrol. As espécies *Coniza bonariensis* L. e *Lippia alba* N. E. Brown inibiram 61 e 44 % das cepas testadas, respectivamente. O óleo da canela também apresentou ação antiviral.⁶¹

O óleo volátil da folha do *Photinia serrulata* é comprovadamente citotóxico frente à três linhagens de células tumorais, apresenta como componentes principais o 10-*epi*- γ -eudesmol, pineno, sabineno, α -humuleno e o tujeno.⁵⁰

A essência do tomilho (*Thymus vulgaris* L.) exerce atividade antimicrobiana, carminativa, expectorante e espasmolítica. Seus compostos majoritários isolados são o timol e o carvacrol, prováveis princípios ativos com estas atividades.⁴⁹ O timol, isolado de vários OEs, como da manjerona (*Majorana maru* Linneus) e do orégano (*Oreganum maro* Linneus), possui significativa atividade antimicrobiana.¹¹³ O OE das partes aéreas da *Salvia lanigera* Poir apresenta potencial antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e atividade antioxidante superior aos três antioxidantes convencionais, o L-ascórbico, ácido *terc*-butil-4-hidroxi-tolueno (BHT) e ácido gálico, na mesma dosagem.^{113,123}

O OE de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) apresenta atividade antioxidante, cicatrizante, antinociceptiva, antiedematogênica, gastroprotetora e antineoplásica.¹⁰⁷

A noqueira (*Juglans regia* L) é uma árvore muito utilizada popularmente na Índia por suas propriedades curativas. O chá das folhas é utilizado como anti-helmíntico, para tratar a insuficiência venosa e hemorroidal, antidiarreico, depurativo, adstringente, fungicida e inseticida no armazenamento de grãos.^{26,76} O óleo de suas folhas tem como constituintes principais o *E*-cariofileno, α -pineno, germacreno D, β -pineno, α -humuleno, α -zingibereno, α -copaeno, limoneno, óxido de cariofileno, *ar*-curcumeno, δ -cadineno, *E*- β -farneseno, 1,8-cineol, γ -curcumeno e metil-salicilato que são possíveis agentes terapêuticos.^{90,128}

O *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) é uma planta aromática de longo uso na medicina tradicional como anti-helmíntico, bactericida, adstringente, digestiva, depurativa, diurética, laxante, detergente, estimulante tônico, inseticida e analgésica.^{20,63} No Brasil foi incluída nos fitoterápicos distribuídos pelo SUS (Sistema Único de Saúde) como bactericida e fungicida tópico,⁷³ seus compostos voláteis majoritários são o eugenol, timol e geraniol.¹⁰⁹

O óleo de copaíba extraído de espécies do gênero *Copaifera*, já foi considerado uma panaceia, usado como anti-inflamatório, antisséptico para feridas, antitumoral, antimicrobiano, antifúngico e outros,^{1,129} sendo mais tarde muitas dessas indicações comprovadas em laboratório. De acordo com pesquisas é constituído na sua maioria por sesquiterpenos, exercendo atividade bactericida contra vários tipos de bactérias, podendo ser utilizado na composição de resina dentária para prevenção das cáries,^{69,98,128} é analgésico,¹⁸ possui efeito protetor contra colite aguda e dano intestinal,⁸³ antiinflamatório,¹⁸ também teve ação antineoplásica comprovada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), por testes em animais.⁶⁰ Os diterpenos colavenol e o ácido hardwickico, isolados do óleos de *Copaifera langsdorfii*, são potentes antineoplásicos não tóxicos contra o carcinoma, testado em camundongos.⁵⁹ O tratamento *in vitro* e *in vivo* com o óleo puro da espécie *C. multijuga* reduz a formação de nódulos metastáticos no pulmão.⁵⁹ As espécies *Copaifera multijuga*, *Copaifera cearensis* e *Copaifera reticulata* apresentaram ação tripanossomicida pela inibição do crescimento do *Trypanosoma cruzi*.^{46,60}

Um legume muito usado no cotidiano alimentar como condimento é a cebola (*Allium cepa* L.), e o seu óleo essencial deste possui diversas propriedades biológicas comprovadas, tais como antibacteriana,⁴³ atividades antimutagênica,¹¹⁴ antioxidante,³⁶ conservante e antioxidante para alimentos.¹³⁷ Os componentes responsáveis pelas bioatividades são os organosulfurados.^{36,113}

Estudos com OE de espécies do gênero *Heracleum*, uma planta medicinal asiática, mostraram diferentes bioatividades dos óleos essenciais, como citotóxica, antioxidante, antimicrobiana, imunoestimulante e anticonvulsivante,^{13,29,104,134} Três espécies de *Heracleum* apresentaram a miristicina, (E)-anetole, hexilo butanoato de etilo e elemicin como principais constituintes. As espécies *H. transcausicum* e *H. pastinacifolium* apresentaram atividade antineoplásica contra três tipos de células de cancro humano e as espécies *H. pastinacifolium* e

H. persicum mostraram moderada atividade antitumoral e intensa ação antioxidante correlacionada com o teor de fenólicos totais dos óleos.⁸²

Uma propriedade encontrada no óleo essencial da *Achillea millefolium* L. (*Asteraceae*) quando testado em camundongos, é um significativo modulador da ativação de macrófagos comparado ao padrão LPS (lipopolissacarídeo-potente estimulador da produção de NO).¹¹

Um estudo com o óleo da *Copaíba cearensis* Huber, demonstrou ação antiinflamatória mais eficaz relativa ao óleo puro do que aos compostos isolados: bisabolol, ácido copálico e éster metílico do ácido solidago, e ação antisséptica mais potente do óleo bruto comparado ao composto majoritário, o timol, caracterizando uma ação sinérgica.³⁸

Um derivado fenólico, o gossipol, isolado do óleo de semente de algodão (*Gossypium sp.*), teve sua propriedade contraceptiva masculina confirmada em 1980, também se comprovou potente atividade antiviral contra o herpes genital, devido à estimulação da biossíntese de interferons.^{9,10,99}

Muitas propriedades dos OE, conhecidas popularmente por muito tempo, estão sendo comprovadas pela ciência, por meio da crescente pesquisa interdisciplinar, envolvendo a etnobotânica, a química e a farmacologia, que descobre inúmeros princípios ativos que podem significar esperança de cura para diversas doenças.

1.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais por serem altamente voláteis, hidrofóbicos e instáveis, podem ser afetados pelo método extrativo empregado, podendo causar alterações no perfil químico, pureza e rendimento. Dentre os métodos mais empregados, na extração do OE podemos citar a hidrodestilação, prensagem, extração a vapor, extração com solventes e fluido supercrítico.¹¹⁶ Mas para melhorar a qualidade do óleo, o rendimento e a viabilidade econômica foram feitas modificações nesses métodos e outros foram desenvolvidos, como extração subcrítica, extração por gás refrigerante, por micro-ondas e ultrassom. Também foram desenvolvidos métodos de microextrações com alta capacidade de concentração, como microextração em fase sólida (solid phase microextraction - SPME), extração sortiva em barras de agitação (SBSE - stir bar sorptive extraction), extração sortiva em fita (STE-sorptive tape extraction), extração dinâmica em fase sólida (SPDE - solid phase dynamic extraction). Estes últimos métodos possibilitam a obtenção de um perfil químico mais confiável, pois conseguem

extrair, de pequena amostra vegetal, substâncias altamente voláteis e não voláteis e em níveis de traços, assim são extremamente importantes nas pesquisas de substâncias voláteis. Esses métodos utilizam pouco ou nenhum solvente e empregam menor tempo de extração. São realizados por *headspace*, técnica que extrai substâncias necessariamente voláteis, ou de forma direta sobre o material vegetal.^{8,92,113, 119}

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Técnicas extrativas para óleos essenciais:^{113,116}

1.6.1 Arraste por vapor de água ou hidrodestilação: é o método mais utilizado na extração de óleos voláteis, pois a pressão do vapor da água é menor que a do óleo, assim os componentes são vaporizados e arrastados numa temperatura inferior pelo vapor de água até um condensador, onde são resfriados voltando ao estado líquido. Pode ser utilizado para materiais moles, como folhas e flores, mas também para cascas, raízes e caule. Para pequenas extrações, o material é triturado e colocado em balão de vidro, este é acomodado sobre uma manta térmica acoplada à um condensador, e este acoplado ao aparelho de Clevenger. Devido à instabilidade das essências à altas temperaturas e umidade, durante a extração ocorre reações de hidrólise, isomerização e oxidação, formando metabólitos indesejáveis e degradação de compostos. O processo é simples, e possibilita uma extração fracionada, pois os primeiros compostos evaporados são os mais hidrofílicos. Por empregar um longo tempo de extração, pode ocorrer a perda de compostos muito voláteis, de baixo peso molecular e que estão em quantidades traços, afetando o rendimento, a qualidade e tornando o método oneroso.^{8,113,116}

1.6.2 Prensagem ou Extrusão: este método consiste na aplicação da pressão sobre o material biológico. Por proporcionar alto rendimento é empregado na indústria para a extração de OE de frutas cítricas, por exemplo a laranja. Com a prensagem dos pericarpos dos frutos o óleo é separado juntamente com outras substâncias não voláteis, como lipídios, formando uma emulsão. Para purificação utiliza-se a decantação, centrifugação ou destilação, separando o óleo puro da emulsão.^{113,116,118}

1.6.3 Enfloração: é empregado para extrair óleos voláteis de flores através do contato com gordura animal ou vegetal inodora e pura. As pétalas são sobrepostas numa camada de gordura, em temperatura ambiente, por algumas horas, até o esgotamento da essência. As pétalas são trocadas sucessivamente até a saturação do material extrator. Após a saturação é adicionado álcool de cereais, em seguida este é destilado, e obtém-se um óleo com excelente qualidade, com

alto teor de pureza e conservação de suas propriedades, como o aroma, por isso é muito utilizada para produção de essências para perfumes. É ideal para essência de flores, que são termolábeis e altamente voláteis, pois não há aplicação de calor. Este método é lento, oneroso e extrai pequenas porções de óleo.^{108,116,119}

1.6.4 Extração com solventes orgânicos: o princípio deste método consiste na semelhança de polaridade entre o solvente extrator e os compostos a serem extraídos. Muito utilizado em extrações de escala laboratorial, onde o material vegetal sólido é colocado num extrator de Soxhlet, este é acoplado a um balão em que é colocado o solvente orgânico apolar (éter, diclorometano, hexano, etc.) num processo extrativo contínuo. A alta temperatura aplicada e o período de extração longo podem levar à degradação dos compostos e formação de artefatos indesejáveis. A extração com solventes orgânicos carrega pigmentos das plantas e óleos fixos, principalmente quando extraído de sementes. Após a extração óleo é purificado com a evaporação do solvente.^{113,119,126}

1.6.5 Fluido supercrítico (EFS): este método é baseado na utilização de um gás inerte como solvente, geralmente o gás Carbônico (CO₂), à temperatura e pressão críticas, isto é, na região crítica, em que a temperatura e pressão muito elevadas fazem com que o gás permaneça num fluxo entre gás e líquido, sendo denominado de fluido supercrítico. É um estado ideal para extração e separação de alguns compostos, como óleos essenciais, pois apresenta características físicas e de transporte peculiares, como baixa viscosidade e alta densidade, com difusão intermediária entre gases e líquidos, aumentando a permeação do fluido no material vegetal poroso. A alta difusibilidade e baixa temperatura tornam o método SFE vantajoso para extração de essências, pois conserva suas propriedades, como aromas, proporciona alto rendimento, não deixa traços de solvente no produto extraído, pois o solvente volta ao estado gasoso após a extração, obtendo um óleo essencial mais puro que nos demais métodos. Assim, este tem sido o método mais utilizado pelas indústrias que extraem óleos essenciais.^{8,71,115,}

1.6.6 Extração por Micro-ondas: O princípio deste método consiste na modificação das estruturas celulares para diminuir o tempo de extração da hidrodestilação convencional, é chamado de MAHD (*Microwave Assisted Hydrodistillation*). Este método acopla um forno de micro-ondas ao sistema de Clevenger, desta forma a energia das micro-ondas contribui para uma volatilização mais rápida dos compostos, pois interage com as moléculas polares do material vegetal, gerando calor interno, fazendo com que as células se rompam mais facilmente,

aumentando a exposição do material ao solvente e transferindo mais rapidamente a massa volátil, tornando a extração mais eficiente, por isso indicado na extração de frações voláteis.^{116,119,133} As micro-ondas também foram utilizadas como método extrativo sem a adição de água, aplicado sobre material vegetal fresco, denominado de MSD (*Microwave Steam Distillation*), sendo mais eficiente quando comparado à hidrodestilação convencional, devido ao “coeficiente de transferência de massa” ser seis vezes maior na MSD, obtendo o mesmo rendimento e perfil químico em menor tempo. Isto diminui o custo operacional e o impacto ambiental, pois economiza 85% de água.^{37,97,117,133}

1.6.7 Extração por Ultrassom: este método consiste na alteração das estruturas celulares da matriz vegetal através de ondas eletromagnéticas, que são vibrações mecânicas com frequência maior que 20 KHz. Com a incidência dessas ondas o material sofre um ciclo de compressão e expansão, provocando a quebra da parede celular, fazendo com que aumente a transferência da fração volátil para o solvente. É um método recente, mas tem sido utilizado para extração de compostos voláteis orgânicos.¹¹⁶

1.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Após a extração da fração volátil, esta é dessecada com Sulfato de Sódio Anidro (Na_2SO_4) e armazenada em frascos hermeticamente fechados, protegidas da luz e altas temperaturas.⁸

Após a extração é realizada a segunda etapa, sendo a identificação dos compostos voláteis. Para análise e identificação molecular são necessárias algumas técnicas analíticas que fornecerão um conjunto de dados espectrais para elucidação das estruturas químicas. Em primeiro lugar está a cromatografia, um método qualitativo e quantitativo, que consiste na separação e identificação de compostos por contato de uma fase móvel com uma fase estacionária, onde as substâncias ficam retidas por semelhanças de polaridade e por processo de sorção e adsorção, dependente do tipo de fase estacionária. Existem basicamente quatro tipos de cromatografia, sendo Cromatografia em Papel (CP), Cromatografia por Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna (GC - Gás Chromatography e HPLC - High performance liquid chromatography) e Eletroforese.^{23,112,116}

A CCD é um método simples e rápido, que utiliza uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária consiste numa placa recoberta por sílica ou outro composto, denominada de

cromatoplaça ou cromatofolha. A fase móvel é composta por um ou mais solventes e uma cuba cromatográfica. Uma pequena alíquota do óleo é espalhada de forma contínua na cromatoplaça, esta é acomodada na cuba previamente saturada com o sistema solvente para eluição da fase móvel por efeito de capilaridade. Após a cromatoplaça é retirada da cuba, e é usado um revelador físico que consiste numa câmara UV-VIS (luz ultravioleta na região do visível) propiciando a visualização de manchas de diferentes cores e posições, que representam cada composto da amostra, e um revelador químico, geralmente a vanilina, mais específico para terpenóides e fenilpropanos, onde é emerso ou borrifado sobre a placa e em seguida aquecido em chapa aquecedora. Obtêm-se então um perfil cromatográfico com manchas de colorações características de cada composto e diferentes tempos de retenção (RF), que permite a identificação ou até mesmo detecção de possíveis falsificações, através de comparações com dados da literatura.^{23,112,113,131}

A GC, desenvolvida em meados de 1950, é uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar compostos voláteis dos óleos essenciais, por ter um alto poder de separação dos compostos existentes na amostra. A GC consiste num cromatógrafo a gás, equipamento composto por um injetor, coluna capilar (até 100 metros) e um detector, que é um dispositivo sensível que favorece a ionização dos constituintes da amostra. A amostra utilizada é ínfima, em torno de 1-2 µL, esta é injetada por micro-seringa no injetor, segue para a coluna, fase estacionária, e é arrastada por um gás, fase móvel, até chegar ao detector. O detector proporciona uma resposta através de um sinal elétrico proporcional à quantidade da amostra eluída pela coluna cromatográfica. Um dos primeiros detectores criados é por Ionização de Chama (*FID-Flame Ionization Detector*), mas com o avanço na área surgiram outros mais eficientes, como Espectrômetro de Massa (*MS-Mass Spectrometry*), Infravermelho (*IR-Infrared Spectroscopy*) e técnicas mais sofisticadas como Cromatografia Acelerada (*Fast-GC*) e mais recentemente a GC Bidimensional (*GC-GC*), que permite analisar a composição de compostos enantioméricos da amostra e misturas complexas.^{23,112,116}

A cromatografia gasosa pode ser combinada com outras técnicas analíticas, como a espectrometria de massa (*GC-MS*), que é uma importante técnica qualitativa e quantitativa, fornece dados moleculares e estruturais dos compostos, por isso tem alta capacidade de diferenciação. Na década de 50 um espectrômetro de massa com fonte de ionização por impacto de elétrons (*IE – Elétrons Ionization*), foi acoplado ao GC, proporcionando uma importante

evolução nas análises dos óleos voláteis. Este método permitiu obter um cromatograma com informações estruturais dos compostos através da ionização e fragmentação da molécula, estes dados são interpretados por um programa, e posteriormente comparados aos dados espectrais da biblioteca do equipamento, onde se observa o tempo de retenção de cada composto, representado pelos “picos cromatográficos”. Para uma confirmação mais confiável calcula-se o Índice de Kovats (IK) utilizando os tempos de retenção fornecidos pelo cromatograma e de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Os valores de IK calculados são então comparados aos IK tabelados, neste momento também é observado a semelhança da fragmentação da molécula, obtida pelo MS, com o fornecido pela literatura.^{23,112,113,116}

O Infravermelho (IV) é uma técnica espectroscópica que pode ser usada em conjunto com um cromatógrafo a gás (GC-IV) e também ao MS. É uma técnica rápida, reprodutível e pode ser usada em estudos qualitativos e quantitativos dos constituintes de uma amostra, como na caracterização de compostos voláteis de óleos essenciais. No aparelho de IV, um feixe de energia radiante, que é a radiação infravermelha situada no espectro eletromagnético na região do visível e micro-ondas, ideal para caracterizar compostos orgânicos, é incidida sobre a amostra, que à absorve em diferentes comprimentos de onda, provocando vibrações moleculares que alteram momentaneamente as ligações atômicas, resultando em diferentes absorções para cada molécula, o que resultará num espectro com diferentes comprimentos de onda (λ) e frequência (ν), representado por bandas de absorção. As bandas fornecem o registro espectral da energia absorvida pela molécula num determinado intervalo de frequências, que caracteriza diferenças entre os constituintes químicos, grupo funcional, sistemas aromáticos e insaturações, contribuindo para a elucidação estrutural da molécula através da comparação do espectro com um padrão, isto é, substâncias que já tem seu espectro IV conhecido. Uma vantagem do CG-IR é que consegue diferenciar os isômeros, pois as diferenças nas posições dos grupamentos resultam em bandas de absorção também diferentes. Esta técnica não tem capacidade de dectar compostos em níveis de traço.^{23,112,116}

A ressonância magnética nuclear (RMN) também é uma técnica analítica espectroscópica, de grande importância para elucidação do esqueleto molecular de substâncias naturais. A amostra pura ou semi-purificada é exposta à um campo eletromagnético na frequência de rádio. Os núcleos que possuem campo magnético, os mais utilizados são o ^{13}C e ^1H , entram em ressonância e absorvem essa energia, que posteriormente é liberada gerando um

sinal elétrico. A frequência e a intensidade dos sinais permite obter um espectro de RMN, em que a frequência é representada pelos desvios químicos que são expressos em ppm (parte por milhão). Os diferentes desvios químicos do espectro representam os sinais de RMN que caracterizam cada grupo químico. A análise dos diferentes espectros obtidos por RMN possibilita identificar os tipos e quantidades de grupos químicos, sendo importante ferramenta para a elucidação de estruturas moleculares de compostos voláteis.^{34,62,112,116}

1.8 FAMÍLIA EUPHORBIACEAE

A família Euphorbiaceae, do gênero *Jatropha*, possui mais de 200 espécies,⁹¹ comumente encontradas nas regiões áridas e tropicais das Américas e introduzidas também em países asiáticos, africanos e sul da Índia.^{56,135} No Brasil são encontradas três espécies nativas de *Jatropha* no semi-árido brasileiro.¹¹⁰ Essas espécies são utilizadas para diversos fins, como planta medicinal, paisagismo, lenha e biodiesel.^{33,52} Alguns tipos de *Jatropha* são mais estudados, como é o caso da *J. Gossypifolia* e a *J. Curcas*.⁷⁰ A *J. curcas* L. ou vulgo pinhão-manso tem sido produzida em alguns países da África e da Ásia para uso comercial do óleo das sementes e propriedades terapêuticas,^{81,103} por ser altamente oleaginosa tem sido utilizada para produção de biodiesel.⁵³ Testes em animais e vegetais revelaram alta toxicidade, podendo ser utilizada como pesticida.²⁴ O pinhão-manso é resistente à diferentes condições edafoclimáticas, representando uma alternativa promissora na recuperação e proteção de áreas degradadas e podendo ser fonte de renda para agricultura familiar com a produção do óleo como biocombustível.⁵ O óleo desta espécie de *Jatropha* foi utilizado pela primeira vez na síntese de um polímero para revestimento de superfícies através de técnicas de micro-ondas, sendo este material altamente resistente à corrosões.² A *Jatropha gossypifolia* L., conhecida como pinhão-roxo, é usada popularmente como cicatrizante e anti-inflamatória, com algumas ações confirmadas experimentalmente, como cicatrizante, antimicrobiano, antineoplásico e hipotensor, mas também pode ser altamente tóxica ao organismo.^{66,127}

1.9 ESPÉCIE *J. ribifolia* (Pohl) Baill

A *J. ribifolia* (Pohl) Baill é uma espécie nativa do Brasil, arbustiva, pequena, atinge 2m de altura, com folhas 3-lobadas (Figura 23). É uma planta perene, adaptada a todos os tipos de solos, ⁸⁵ encontra-se distribuída nas regiões secas tropicais das Américas ¹²⁰ e nas regiões áridas da África e Ásia. ³³ No Brasil é encontrada em regiões semi-áridas do nordeste e do cerrado do Centro-Oeste, onde é conhecida como pinhão-rasteiro. ^{25,88} No nordeste suas folhas são muito utilizadas para xaropes e extratos, antídoto para veneno de cobra, feridas e impingem, ⁵⁶ no centro-oeste suas raízes são usadas na forma de extratos para gastrites, úlceras e ferimentos. Experimentos com caprinos resultaram em até 40% de mortalidade dos animais alimentados com as folhas da planta, demonstrando alta toxicidade. ⁸⁸



Figura 23 - Planta *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill

O estudo foi motivado pela ausência de publicações de estudos com o óleo desta espécie, além de comprovar as evidências de atividades medicinais pelo uso popular. Foi realizada uma investigação fitoquímica e bioativa do óleo essencial das raízes, no intuito de descobrir novos princípios ativos e bioatividades.

1.10. OBJETIVOS

1.10.1 Objetivo geral

Conhecer, isolar e caracterizar a composição química do óleo essencial, verificar possíveis atividades biológicas e avaliar o perfil de ácidos graxos de sementes da *Jatropha ribifolia*.

1.10.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar os constituintes químicos presentes no óleo desta espécie através de GC-FID, GC-MS e IV.
- Avaliar a composição de voláteis do óleo através da técnica de HS-SPME-GC-MS.
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo através de ensaios microbiológicos.
- Avaliar o potencial antitumoral e citotóxico do óleo e das frações isolados.
- Determinar o perfil de ácidos graxos das sementes por GC-FID e GC-MS.

1.11. REFERÊNCIAS

1. AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FRANÇA PF, BARBOSA-FILHO JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia. UFPB: João Pessoa, v. 18, 472-508, 2008.
2. ALAM, M.; ALANDIS M. N. Microwave Assisted Synthesis of Urethane Modified Polyesteramide Coatings from *Jatropha* seed oil, Journal Polym Environ, King Saud University: Kingdom of Saudi Arabia. v. 19, 784–792, 2011.
3. ALMASSY JÚNIOR A; LOPES RC; ARMOND C; DA SILVA, F; CASALI, WD. Folhas de Chá – plantas medicinais na Terapêutica Humana. Ed. UFV: Viçosa, 2005, 233p.
4. ALVES AM, GONÇALVES JC, CRUZ JS, ARAÚJO DA. Evaluation of the sesquiterpene (–)-*alpha*-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. Neuroscience Letters. v. 472 (1):11–15, 2010.
5. ALVES JMA, SOUSA AA, SILVA SRG, LOPES GN, SMIDERLE OJ, UCHOA SCP, Pinhão-Manso: Uma Alternativa para Produção de Biodiesel na Agricultura Familiar da Amazônia Brasileira, Agro@mbiente On-line, Boa Vista, v.2:1, jan/jun- 2008.
6. ARAGÃO GF, CARNEIRO LMV, JUNIOR APF, VIEIRA LC, BANDEIRA PN, LEMOS TL, VIANA GS. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-

- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 85: 4, 827–34, 2006.
7. ARAÚJO JCLV, LIMA EO, CEBALLOS BSO, FREIRE KRL, SOUZA EL, SANTOS FILHO L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*. v. 33: 1, 55-64, 2004.
 8. ARAÚJO JMA. *Química de Alimentos – Teoria e Prática - óleos Essenciais*; Ed. UFV: Viçosa, 1995.
 9. BARREIRO LJ, Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32:3, 679-688, 2009.
 10. BARREIRO EJ. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. *Química Nova*, v. 13:1, p. 29 – 37, 1990.
 11. BARREIROS ALBS, BARREIROS ML, DAVID JM, DAVID JP, QUEIROZ LP, Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum numulária*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13:12, 08-11, 2003.
 12. BIZZO HR, Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v. 32:3, 588-594, 2009.
 13. BOGUCKA-KOCKA A, SMOLARZ HD, KOCKI J. Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines. *Fitoterapia*, v.79, 487-497, 2008.
 14. BORGES WS, BORGES KB, BONATO PS, PUPO MT. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry*. v.13, 1137-1163, 2009.
 15. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Scheffer MC, Corrêa C Jr, Júnior; Coordenação, Maria Consolacion Udry, Nivaldo Estrela Marques e Rosa Maria Peres Kornijezuk. *Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares*. Ed. Preliminar, Brasília: MAPA/SDC, 2006. 48 p.
 16. BRITO JO, Óleo Essencial do Eucalipto, *Documentos Florestais, USP*, v.17, 1-26, ago-2003.
 17. BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Espanha: Ed. Acribia S.A., 1991, p.594.
 18. CARVALHO JCT, CASCON V, POSSEBON LS, MORIMOTO MSS, CARDOSO LGV, KAPLAN MAC, GILBERT B, Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaífera duckei* dwyer. *Phytotherapy Research*, v.19, 946-950, 2005.
 19. CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários*. Visconde do Rio Branco-MG: Editora Suprema, 2001, 104p.

20. CHOPRA RN, NAYAR SL, CHOPRA IC, Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1986.
21. CLAYDEN J, Atropisomerism. *Tetrahedron*, v.60, 4335, 2004.
22. COLBY SM, CROCK J, DOWDLE-RIZZO B, LEMAUX PG, CROTEAU R, Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase, *Biochemistry, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, v. 95, 2216–2221, 1998.
23. COLLINS HC, BRAGA LG, BONATO SP. *Fundamentos de Cromatografia*. 6. ed, Campinas: Ed. Unicamp, 2006, p.17-275.
24. CONTRAN N, CHESSA L, LUBINO M, BELLAVITE D, ROGGERO PP, ENNE G. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: from sowing to biodiesel and by-products. *Industrial Crops and Products*, v. 42, 202-215, 2012.
25. CORDEIRO I, SECCO R. *Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB017584>) acessado em nov. de 2012.
26. COSMULESCU S, TRANDAFIR I. Seasonal variation of total phenols in leaves of walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5:19, 4938–4942, 2011.
27. CUNHA AO. O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente. in: Cunha AP, Ribeiro JA, Roque OR. *Plantas Aromáticas em Portugal: Caracterização e Utilizações*. Ed. Fun. Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2007, 1-13.
28. DA COSTA FB, TERFLOTH L, GASTEIGER J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry*, v. 66:345–353, 2005.
29. DASH S, KANTA NL, BHISE S, BHUYANL N. Antioxidant and antimicrobial activities of *Heracleum nepalense* D Don root. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.4:1, 341–347, 2005.
30. DAVIDSON PM, NAIDU AS. Phytophenols. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*. A. S. Naidu, ed. CRC Press, Boca Raton-FL, 2000, 265–293.
31. DE LAS HERAS B, HORTELANO S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation and Allergy-Drug Targets*. v. 8, 28-39, 2009.
32. DEGENHARDT J, KÖLLNER TG, GERSHENZON J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, v.70, 1621-1637, 2009.

33. DEHGAN B, WEBSTER GL. University of California Publicações em Botânica. v. 74: 1-73, 33 figs., 1979.
34. DEROGIS PB, MARTINS FT, SOUZA TC, MOREIRA ME, SOUZA FJD, DORIGUETTO AC, SOUZA KR, VELOSO MP, SANTOS MH. Complete assignment of the ¹H and ¹³C-NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. Magnetic resonance in chemistry, v. 46, 278–282, 2008.
35. DEWICK PM, Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester: A John Wiley & Sons. 2009, 327p.
36. DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. var. *tropeana* (red onion) seeds. Food Chemistry, v. 107, p. 613-621, 2008.
37. FARHAT A, GINIES C, ROMDHANE M, CHEMAT F. Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy. Experimental and theoretical study. J. Chromatogr. A., v.1216: 5077-5085, 2009.
38. FERNANDES RM., PEREIRA NA, PAULO LG, Antinflamatoy activity of copaiba balsam. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.73, 53, 1992.
39. FERRAZ JBS, BARATA LES, SAMPAIO PB, GIMARÃES GP. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. Ciência e Cultura, v. 61: 3, 45-53, 2009.
40. FRANCO LL. As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo. Curitiba: Ed. Santa Mônica. 1996. 241 p.
41. FROSCHE, F. Bioactive substances from Basf for cosmetics. Pollena: Tluszce, Srodki Piorace. Kosmet, v.31: 144-147, 1987.
42. GOMES HHS, DANTAS IC, CATÃO MHCV, Plantas medicinais: sua utilização nos terreiros de umbanda e candomblé na zona leste de cidade de Campina Grande-Pb. BioFar, v. 3:1, 110-129, 2008.
43. GRIFFITH S G, TRUEMAN L, CROWTHER T, THOMAS B, SMITH B. Onions a global benefits to health. Phytotherapy Research, v.16, 603-615, 2002.
44. GUIMARÃES J, MEDEIROS JC, VIEIRA LA. Programa fitoterápico farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais. Divulgação em Saúde Pública para Debate, v. 36, 41-47, 2006.
45. HAMADA H, FUCHIKAMI Y, JANSINO RL, KAMINSKY LS, Regioselective hydroxylation of warfarin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry, v.33:3, 599-600, 1993.
46. HENRIQUES MGMO, ROSAS EC, CARVALHO MV, VEIGA JR, VF, PINTO AC, XV Simpósio de Plantas Medicinais, Águas de Lindóia, Brasil, 1998.

47. HOHMANN J, MOLNÁR J, RÉDEI D, EVANICS F, FORGO P, KÁLMÁN A, ARGAY G, SZABÓ P. Discovery and biological evaluation of a new family of potent modulators of multidrug resistance: Reversal of multidrug resistance of mouse lymphoma cells by new natural jatrophone diterpenoids isolated from *Euphorbia* species. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, 2425-2431, 2002.
48. ITOH A, NOZAKI H, YAMAMOTO H, Stanism of sesquiterpene biosynthesis humulene germacrene rearrangement. *Studies on the mech. Tetrahedron Letters*, v. 19, 32, 2903-2906, 1978.
49. JAKIEMIU EAR, SCHEER AP, OLIVEIRA JS, CÔCCO LC, YAMAMOTO CI, DESCHAMPS C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31:3, 683-688, 2010.
50. JIE H, TAO S, JUN H, SHUANGYANG C, XIAOQIANG C, GUOLIN Z, Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*, *Food Chemistry*. v. 103,355-358, 2007.
51. KAMATOU GPP, Viljoen AM. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 87:1, 1-7, 2010.
52. KAUR M, ALI A. Lithium ion impregnated calcium oxide as nano catalyst for the biodiesel production from karanja and *jatropha* oils. *Renewable Energy*, v.36, 2866-2871, 2011.
53. 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, 1-10, 2008.
54. KUPCHAN SM, EAKIN MA, THOMAS AM, Tumor inhibitors: structure–cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.14, 1147–1152, 1971.
55. LAMARE V, FURTOSS R. Bioconversion of sesquiterpenes. *Tetrahedron*, v.12, 4109-4132, 1990.
56. LEAL CKA, AGRA MF. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 24:1, 5-13, 2005.
57. LEONARDO M, Produção de óleo essencial associado à deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L. cv. GENOVESE. 2007. 134p. Tese (Doutorado em Agronomia-Concentração em Irrigação e Drenagem). UNESP: Botucatu, 2007
58. LEWINSONHN TM, PRADO PI. Biodiversidade Brasileira - Síntese do Estado Atual do Conhecimento, Ed. Pinsky: São Paulo, 2002, 17-25p.

59. LIMA SRM, FERNANDES PD, VEIGA JR VF, PINTO AC. III Reunião da Sociedade Latino-Americana de Fitoquímica, Gramado, Brasil, 1999.
60. LIMA SR, VEIGA JR, VF, CHRISTO HB, PINTO AC, FERNANDES PD. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research*, v.17, 1048-1053, 2003.
61. LORENZI H, MATOS FJA. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
62. LUZYANIN K, ABRANTES M. Ressonância magnética nuclear – ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. *Química*, v. 117, 25-30, 2010.
63. MACHADO TF, NOGUEIRA NAP, ALVES RICP, SILVA MG, SOUSA CT, Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes espécies de *Ocimum*, Embrapa Agroindústria Tropical, UFG, Brasil, 2009.
64. MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JUNIOR VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25:3, 429-438, 2002.
65. MAGGIO AM, BARONE G, BRUNO, M, DUCA D, ROSSELLI SJ. Conformational analysis and DFT calculations of 8a-hydroxy-germacradiene-6,12-olide derivatives. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v.18, 1116, 2005.
66. MARIZ SR, BORGES ACR, MELO-DINIZ MFF, MEDEIROS IA. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão narrativa. *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, Botucatu, v.12:3, 346-357, 2010.
67. MARTÍNEZ AL, GONZÁLEZ-TRUJANO ME, PELLICER F, LÓPEZ-MUÑOZ FJ, NAVARRETE A. Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Medica*. v.75, 508-511, 2009.
68. MARTÍNEZ, ALEJANDRO. Sesquiterpenolactonas. Universidade de Antioquia, 2002, 19p. Disponível em: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>. Acesso em: 20/10/12.
69. MARUSSELLA JC, SICURELLA NA. Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. v. 49, 692-694, 1960.
70. MATOS FJA. *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: Ed. UFC, 2004. 448p.
71. MCHUGH MA, KRUKONIS VJ. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworth Stoncham: Boston, MA, 3 ed., 1994.
72. MINNARD AJ, WIJNBERG, JBPA, de GROOT, A, The synthesis of germacrene sesquiterpenes and related compounds. *Tetrahedron*, v.55, 2115-2146, 1999.

73. MORAES FILHO MO. Segurança e eficácia de Plantas Medicinais: Evidência Científica e Tradicional. In: V Jornada catarinense e I jornada internacional de plantas medicinais, Joinville. 2006, 58-59
74. MORAES TM, KUSHIMA H, MOLEIRO FC, SANTOS RC, MACHADO ROCHA LR, MARQUES MO, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA CA. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*. v:180, 499-505, 2009.
75. NAGEGOWDA DA. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation, *FEBS Letters*, v.584, 2965-2973, 2010.
76. NEGI KS, KANWAL KS, Plants used as fish toxins in Garhwal region of Uttarakhand Himalaya. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, v.8:4, 535–538, 2009.
77. NEVES A, ROSA S, GONÇALVES J, RUFINO A, JUDAS F, SALGUEIRO L, LOPES MC, CAVALEIRO C, MENDES AF. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced NFκB activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of α -pinene. *Planta Medica*. v.76, 303-308, 2010.
78. NUNES FMN, PEREIRA PAP, ANDRADE JB, Reações de Ozonólise de Olefinas em Fase Gasosa, *Química Nova*, v.23:6, 2000.
79. OLIVEIRA ER. O que é Medicina Popular. Coleção primeiros passos. São Paulo: Ed. Brasiliense, 1985, 91p.
80. OLIVEIRA F, AKISUE G, AKISUE MK, *Farmacognosia*, São Paulo: Ed. Atheneu, v.1, 9-20, 1998, 433p.
81. OLOWOKUDEJO JD. Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of Linnean Society*, v.111, 54-139, 1993.
82. OMIDREZA FIRUZI, MOJTABA ASADOLLAHI, MARYAM GHOLAMI, KATAYOUN JAVIDNIA, Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, v.122, 117-122, 2010.
83. PAIVA LA, RAO VS, GRAMOSIA NV, SILVEIRA ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorfii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. *Journal Ethnopharmacol*, v.62, 73-78, 1998.
84. PANDLEY RC. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural source. *Medicinal Research Reviews*, v.18: 5, 333-346, 1998.
85. PATIL V, SINGH K. Oil gloom to oil boom - *Jatropha curcas* a promising agro-forestry crop. Shree Offset Press, Nashik, 1991.

86. PFAU M, REVIAL G, GUINGANT A, D'ANGELO J. Enantioselective synthesis of quaternary carbon centers through Michael-type alkylation of chiral imines. *Journal of the American Chemistry Society*, v.107:1, 273-274, 1985.
87. PHAN MG, TRAN TTN, PHAN TS, OTSUKA H, MATSUNAMI K. Two new sesquiterpene lactones and other chemical constituents of *Artemisia roxbughiana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 45, 115–119, 2012.
88. PIMENTEL LA, RIET-CORREA B, DANTAS AF, MEDEIROS RMT, RIET-CORREA F. Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. *Toxicon*, v.59, 587–591, 2012.
89. POLOVINKA MP, KORCHAGINA DV, GATILOV YV, BAGRIANSKAYA IY, BARKHASH VA, PERUTSKII VB, UNGUR ND, VLAD PF, SHCHERBUKHIN VV, ZEFIROV NS. Cyclization and Rearrangements of Farnesol and Nerolidol Stereoisomers in Supercritical Fluids. *Journal Organic Chemistry*, v.59:6, 1509–1517, 1994.
90. PRANCE GT, *Out of the Amazon*. HMSO: London, p.83, 1992.
91. RAM SG, PARTHIBAN KT, KUMAR RS, THIRUVENGADAM V, PARAMATHMA M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.55: 803-809, 2008.
92. RAYNIE DE, *Modern extraction techniques*. *Analytical Chemistry*. v.76: 4659-4664, 2004.
93. ROBBERS JE, SPEEDIE MK, TYLER VE. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 1997. 327p.
94. ROCHA BA, PUPO MT, ANTONUCCI GA, SAMPAIO SV, PAIVA RMA, SAID S, GOBBO-NETO L, DA COSTA FB. Microbial transformation of the sesquiterpene lactone tagitinin C by the fungus *Aspergillus terreus*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.39, 1719–1724, 2012.
95. SACCHETTI G, MAIETTI S, MUZZOLI M, SCAGLIANTI M, MANFREDINI S, RADICE M, BRUNI R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v.91, 621-632, 2005.
96. SACCHETTI G, MEDICI A, MAIETTI S, RADICE M, MUZZOLI M, MANFREDINI S, BRACCIOLI E, BRUNI R. Composition and functional properties of the essential oil of *Amazonian basil*, *Ocimum mictanthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.52: 3486-3491, 2004.
97. SAHRAOUI N, VIAN M, BORNARD I, BOUTEKEDJIRET C, CHEMAT F. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, v.1210: 229-233, 2008.
98. SANTOS AO, UEDA-NAKAMURA T, DIAS FILHO BP, VEIGA JUNIOR, VF, PINTO AC, NAKAMURA CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from

- different species of the *Copaifera* genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.103:3, 227-281, 2008.
99. SANTOS AR, PINHEIRO AC, SODERO ACR, CUNHA AS, PADILHA MC, SOUSA P M, FONTES SP, VELOSO MP, FRAGA CAM, Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. Química Nova, v.30, 125, 2007.
 100. SANTOS FA, RAO VSN, SILVEIRA ER, Atividade antinociceptiva resistente ao naxolone do óleo essencial de *Psidium pholianum* Berg (araçá-doce). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 1996. Florianópolis. Anais... Florianópolis, 1996. F-050.
 101. SANTOS FA, RAO VSN, SILVEIRA ER. Investigation on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. Phytotherapy Research, v.12, 24-27, 1998.
 102. SANTOS NP. Theodoro Peckolt: a produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil. História, Ciências, Saúde - Manguinhos, v. 12: 2, 515-33, maio-ago. 2005.
 103. SATURNINO HM, PACHECO DD, KAKIDA J, TOMINAGA N, GONÇALVES NP. Produção de oleaginosas para o biodiesel. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.26:229, 44-74, 2005.
 104. SAYYAH M, MOAIED S, KAMALINEJAD M. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed. Journal of Ethnopharmacology, v.98:1-2, 209-211, 2005.
 105. SCHMIDT TJ. Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. Current Organic Chemistry, v.3, 577-608, 1999.
 106. SIANI AC, SAMPAIO ALF, SOUZA MC, HENRIQUES MGMO, RAMOS MFS, Óleos Essenciais, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Rio de Janeiro, ano 3:16, 38-43, 2000.
 107. SIANI AC, RAMOS MFS, LIMA OM, SANTOS RR, FERREIRA EF, SOARES ROA, ROSAS EC, SUSUNAGA GS, GUIMARÃES AC, ZOGHBI MGB, HENRIQUE MGMO. Evaluation of anti-inflammatory related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium* J. Ethnopharmacol. v.66, 57, 1999.
 108. SILVA AR. Tudo sobre aromaterapia. São Paulo: Roca, 1998. 624 p.
 109. SILVA LL, HELDWEIN CG, REETZ LGB, HÖRNER R, MALLMANN CA, HEINZMANN BM. Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 20:5, 2010.
 110. SILVA RM, BANDEL G, FARALDO MIF, MARTINS OS. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. Scientia Agricola, Piracicaba, v.58: 1, 101-107, 2001.

111. SILVA TS, FREIRE EMX. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.12:4, 427-435, 2010.
112. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Tradução de Paula Fernandes de Aguiar e Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 508p.
113. SIMÕES CMO, SPITZER V. Óleos voláteis. In: SIMÕES CMO, SCHENCKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004, 467-495.
114. SINGH BN, SINGH BR, SINGH RL, PRAKASH D, SINGH DP, SARMA BK, UPADHYAY G, SINGH HB. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, 450–452, 2009.
115. SINHA NK, GUYER DE, GAGE DA, LIRA CT. Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, 842-845, 1992.
116. SOUZA GHB, MELLO JCP, LOPES NP, Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos. *Plantas Mediciniais*, Ouro Preto: UFOP, 2012, 312p.
117. SOUZA GHB, MELLO JCP, LOPES NP. *Farmacognosia: coletânea científica*. Ouro Preto: UFOP, 2012, 372p.
118. SOUZA SAM, MEIRA MR, FIGUEIREDO LS, MARTINS ER. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer: Goiânia, 6:10, 1, 2010.
119. STASHENKO EE, JARAMILLO BE, MARTÍNEZ JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025: 93-103, 2004.
120. SUJATHA M, PRABAKARAN AJ. Characterization and utilization of Indian *Jatropha*. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, v.10:1, 123–128, 1997.
121. TAIZ L, ZEIGER E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
122. TAKAYAMA C, DE-FARIA FM, DE ALMEIDA AC, VALIM-ARAÚJO DDE A, REHEN CS, DUNDER RJ, SOCCA EA, MANZO LP, ROZZA AL, SALVADOR MJ, PELLIZZON CH, HIRUMA-LIMA CA, LUIZ-FERREIRA A, SOUZA-BRITO AR. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal Ethnopharmacol*, v.135:1, 147-55, 2011.

123. TENORE GC, CIAMPAGLIA R, ARNOLD NA, PIOZZI F, NAPOLITANO F, RIGANO D, SENATORE F, Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. Food and Chemical Toxicology, v.49, 238–243, 2011.
124. TRESE GE, EVANS WC. Farmacognosia. 13. ed. Mexico: Interamericana. McGrawHill, 1989, 901p.
125. TRIPATHI P, KUMAR, DUBEY NK. Evaluation of some essential oils for their fungitoxicity against *Penicillium expansum* (Link).In Recent Advances in Mycological Research. I K International Publishing House, New Delhi, 119-128, 2006.
126. UGAZ OL. Investigacion Fitoquimica: métodos el estudio de produtos naturales. 2. ed. Peru: Pontifícia Universidade Católica Del Peru, Fondo Editorial, 1994, 300p.
127. VALE JR, CZECZKO, NG, AQUINO, JU, RIBAS-FILHO JM, BETTEGA L, VASCONCELOS PRL, CORREA NETO MA, NASSIF PAN, MAZZA M, HENRIQUES GS. Estudo comparativo da cicatrização de 357 gastrorrafias com e sem o uso do extrato de *Jatropha gossypifolia* L. (pião roxo) em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21: 3, 40-8, 2006.
128. VASCONCELOS KRF, VEIGA JUNIOR, VF, ROCHA WC, BANDEIRA MFCL, Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne, Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18: 733-738, 2008.
129. VEIGA JR VF, PINTO AC, O gênero *Copaifera* L. Química Nova, v.25, 273-286, 2002.
130. VERMAA RS, PADALIAA RC, CHAUHANA A, THULB ST, Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.). Industrial Crops and Products, v.42, 195– 201, 2013.
131. WAGNER H, BLADT S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer, 1996.
132. WAGNER H. Pharmazeutische Biologie 2, Drogen und ihre Inhaltsstoffe. 5 ed. New York: G. Fisher, 1993, 522p.
133. WANG Z, DING L, LI T, ZHOU X, WANG L, ZHANG H, LIU L, LI Y, LIU Z, WANG H, HE H, Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Journal of Chromatography A, v.1102, 11-17, 2006.
134. WEBSTER D, TASCHEREAU P, LEE TD, JURGENS T. Immunostimulant properties of *Heracleum maximum* Bartr. Journal of Ethnopharmacology, v.106:3, 360–363, 2006.
135. WEBSTER GL. Classification of the Euphorbiaceae. Anais do Jardim Botânico de Missouri. v.81, 3–143, 1994.

136. WEI A, SHIBAMOTO T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.5, 7218-7225, 2010.
137. Ye CL, Dai DH, Hu WL, Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.), *Food Control*, v.30, 48-53, 2013.
138. ZAGOTO JN, BRA CHT A, PAGADIGORRIA CLS, ISHII-IWAMOTO EL, CORTEZ DAG, YAMAMOTO NS. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat live. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105:1-2, 47-54, 2006.

CAPÍTULO II
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO
ESSENCIAL E DE FRAÇÕES ISOLADAS DE RAIZ DA *Jatropha ribifolia*
(Phol) Baill

2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL E DE FRAÇÕES ISOLADAS DA RAIZ DA *Jatropha ribifolia* (Phol) Baill

¹Celia Eliane de Lara da Silva, ²Willian Ferreira da Costa, ³Maria de Fátima Cepa Matos, Adriana Araújo, ¹Sandro Minguzzi, ¹Rogério César de Lara da Silva, ¹*Euclésio Simionatto

¹Centro de Pesquisas Tecnológicas do Estado de Mato Grosso do Sul (CPTREM), Pós-graduação em Recursos Naturais (PGRN), Departamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, rua Emílio Masculli, 275, 79950-000, Naviraí – MS.

²Complexos e Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP), Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, 87020-900, Maringá - PR.

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Laboratório de biologia molecular e culturas celulares, *The author correspondence: euclésio@uems.br

RESUMO: O óleo essencial de raiz da *Jatropha ribifolia* (Phol) Baill, Euphorbiaceae, foi obtido por destilador tipo Clevenger e sua composição foi analisada por CCD, GC-FID, GC-MS, IK, RMN e IV. O rendimento médio do óleo colhido em três épocas diferentes foi de 0,21 %. Foram identificados 61 compostos, o que representa 82,19% do óleo, sendo o β -pineno (9,16%), isoeugenol metil éter (8,54%) e β -vatireno (8,34%) os majoritários. Foram avaliados o potencial antibacteriano e antifúngico do óleo, apresentando potencial bacteriostático frente à duas linhagens de bactérias, *S. aureus* (CIM 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *P. aeruginosa* (CIM 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as cepas foram sensíveis à ação fungistática do óleo, sendo mais significativo contra a *C. albicans*, com uma CIM de 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo foi avaliado frente a nove linhagens de células tumorais, expressando resultado significativo contra células cancerígenas de pulmão-NCI-H460 (6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e de ovário-OVCAR-3 (8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Três compostos foram isolados e identificados, dehidro-aromadendreno (3,53%), 7-tetraciclo [4,4,11,11-tetrametil (6.2.1.0(3.8)0(3.9)) undecanol], (6,64%) e (8*S*-*cis*)-5(1H)-azulenone,2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilideno) (3,33%).

PALAVRAS-CHAVE: *Jatropha ribifolia*; óleo essencial; composição química; bioatividade.

ABSTRACT: The essential oil from the of *Jatropha ribifolia* (Phol) Baill root, the Euphorbiaceae, was obtained by distiller type Clevenger and its composition was analyzed by TLC, GC-FID, GC-MS, RMN and IR. The average yield of oil collected in three different periods was 0.21 %. Fifty three compounds were identified, representing 82.19% of the oil, being β -pinene (9.16%), isoeugenol methyl ether (8.54%) and vatirenene (8.34%), the majority compounds. Were evaluated the potential antibacterial and antifungal oil, with potential bacteriostatic against the two lineages of bacteria, *S. Aureos* (CIM 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and *P. aeruginosa* (CIM 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$). All strains were sensitive to the gungal inhibition oil, being more significant against *C. albicans*, with a MIC of 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The oil was evaluated against the nine tumor cell lines expressing significant result against lung NCI-H460 (6.2 mg mL^{-1}), and ovarian OVCAR-3 (8.0 mg mL^{-1}) cancer cells. Three compounds were isolated and identified, dehydro-aromadendrene (3,53%), [4,4,11,11-tetramethyl- 7-tetracyclo (6.2.1.0 (3.8) 0 (3.9)) undecanol] (6,64%) and (8*S-cis*) -5 (1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8 a-hexahydro-3 ,8-dimethyl-4-(1-methylethylidene) (3,33%).

KEY-WORDS: *Jatropha ribifolia*; essential oil, chemical composition; bioactivity

2.1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre fez uso empírico das plantas para curar o corpo, mas no Brasil a partir do século XV esse conhecimento passou a ser mais explorado cientificamente, pois além do rico uso tradicional, é um dos países mais ricos em biodiversidade, o segundo maior detentor de espécies endêmicas, abrigando de 15 à 20% da flora mundial com cerca de 55mil espécies.^{1,2} Todo esse patrimônio genético vem correndo risco de desaparecer, devido à antiga e extensa exploração consumptiva humana, e uma forma de preservá-lo é através da pesquisa e divulgação da sua relevância ao homem, nos diversos aspectos, como saúde, econômico, ecológico e outros.³ As descobertas científicas tem demonstrado que o bioma brasileiro é uma fonte inesgotável de bioativos e protótipos de fármacos, despertando assim o interesse pelos seus constituintes.⁴ Através de pesquisas bioprospectivas, houve o desenvolvimento de uma gama de

quimioterápicos, e cerca de 50% dos fármacos existentes originaram-se de moléculas naturais.^{4,5} A morfina, isolada da espécie *Papaver somniferum* em 1804, é um exemplo clássico de um princípio biologicamente ativo e precursor para vários quimiosintéticos. Na terapia anticâncer há um predomínio dos produtos naturais, sendo que 60% dos fármacos desenvolvidos nas últimas décadas tiveram sua origem relacionada a eles, como a vincristina e a vimblastina. Dos onze antineoplásicos extraídos da flora, dois são alcalóides isolados da espécie *Catharanthus roseus* e o antineoplásico de escolha para tratamento de vários tipos de câncer, como no linfoma de Hodgkin e leucemia, corroborando a importância das pesquisas com os recursos naturais.^{4,10,12,20} No intuito de ampliar o conhecimento sobre as plantas medicinais e investigar novos ativos terapêuticos, foi feito um estudo investigativo com a espécie *Jatropha ribifolia* (Phol) Baill, da família Euphorbiaceae, do gênero *Jatropha*, o qual possui mais de 200 espécies.²⁴ Esta espécie encontra-se distribuída disformemente nas regiões tropicais da América¹⁶ e áridas da África e da Ásia.¹² Algumas espécies deste gênero, por serem oleaginosas, vem sendo estudadas para produção de biocombustível.^{14,18,21} A *J. ribifolia* é uma espécie pouco relatada cientificamente, conhecida popularmente como pinhão rasteiro, encontrada no Brasil em solos semi-áridos do nordeste e do cerrado.^{33,15,24} É uma planta perene, resistente à várias condições edafoclimáticas, seu arbusto de 2m de altura e herbácea, com folhas 3-lobadas, o que a diferencia de outras espécies.²² É utilizada na medicina popular na forma de xarope, para tratar mordeduras de cobra, impingem, feridas, gastrite e enfermidades em animais.²⁶ As folhas desta planta apresentou toxicidade em estudos com caprinos, causando uma mortalidade de até 40% dos animais.²³ De forma inédita foi realizado uma investigação fitoquímica, em que se trabalhou com o óleo essencial da raiz desta espécie, primeiramente com a caracterização dos compostos e após com ensaios biológicos *in vitro* na busca de atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimento experimental para obtenção do óleo essencial

A espécie utilizada foi identificada no Instituto de Botânica de São Paulo, pela professora Dra. Inês Cordeiro, sendo sua exsicata registrada sob nº CGMS 31.481.¹² As raízes

(Figura 24) da planta foram coletadas na região rural da cidade de Naviraí-MS, em de 2011, fevereiro e setembro de 2012. O material foi levado ao laboratório da UEMS, onde foi triturado, pesado e o óleo extraído por hidrodestilação a vapor, com aparelho de Clevenger, por um período de 12 h, até completa extração. O óleo foi dessecado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e acondicionado em frasco âmbar em dessecador protegido da luz (Figura 25).⁶



Figura 24 - Raízes da *J. ribifolia*

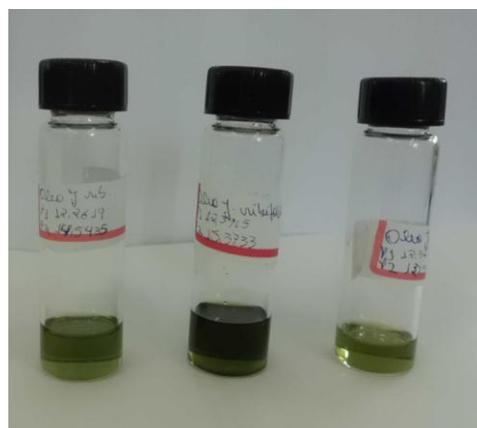


Figura 25 – Óleo da raiz da *J. ribifolia*

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi utilizada para análise preliminar, fracionamento e isolamento dos compostos químicos. Primeiramente foram utilizadas cromatofolhas da Merck G60-F₂₅₄, cortadas em tamanho 7x3cm, como fase estacionária, sendo esta pontilhada com o óleo essencial através de um capilar. Em seguida foram feitas sucessivas eluições com diferentes combinações de solventes orgânicos para obter uma fase móvel mais eficiente. Foi eleita a fase composta por hexano-cetato de tila (85:15) e hexano-acetato de etila-ácido Acético (86:10:4). Foram usados um revelador químico, preparado com 1 g de vanilina, 1 mL de ácido sulfúrico e etanol q.s.p 100 mL, e um revelador físico, a câmera com lâmpada UV 254 nm. Para separação e isolamento de compostos foram utilizadas placas de vidro (19x19 cm) de largura por 0,5 mm de espessura, para confecção de cromatoplas, com sílica gel G60-Merck (15 g) para 38 mL de

água destilada, sendo ativada, após seca, em estufa à 100 °C por 24h. Uma alíquota de 200 µL do óleo foi eluída na referida cromatoplaça e revelada em seguida. ^{6,9}

Para verificação da atividade antioxidante do óleo da *J. ribifolia*, a borda (1 cm) da cromatoplaça previamente eluída com o óleo, foi borrifada com solução 0,4 mmol L⁻¹ do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrasil) em metanol, e aquecida com aquecedor elétrico por 10 segundos. ^{6,9,30}

Cromatografia à gás com detector de ionização de chama (GC-FID) e cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A avaliação do perfil cromatográfico do óleo e pureza das frações isoladas foi realizada em GC-FID-HP5890, com coluna ZB5 40m (0,25 mm x 0,25 µm), fase estacionária 5 % fenil e 95% dimetilpolisiloxano. Condições de análise: razão de divisão do injetor em *split* 1:80, gás de arraste: N₂ (1,2 mL min⁻¹); forno cromatográfico 40 °C, elevação de 4°C até 260°C, injetor 250°C e detector 250°C. A análise qualitativa foi feita em GC-MS-Focus GC Triplus (Thermo Finigan), equipado com uma coluna HP5MS e com biblioteca NIST 32, sob as mesmas condições do GC-FID. Para a identificação dos compostos foi comparado à fragmentação do íon molecular dos espectros da amostra obtido com os espectros da biblioteca NIST do equipamento, calculado o Índice de Kovats (IK) dos compostos e confirmados através do IK tabelado da literatura. ^{1,9}

Infravermelho (IV)

Para conhecimento dos grupos funcionais do composto isolado foi obtido espectro de IV pelo equipamento FT-IR-4100 (Jasco), na janela espectral de 400 até 40000 cm⁻¹, utilizando amostra KBr. Esta análise espectroscópica foi realizada em parceria com o laboratório de Química Inorgânica da UFGD.

Ensaio Biológicos

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do óleo essencial foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, com base nas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documentos CLSI-M7-A9 e CLSI-M27-A3, ^{7,8} e realizados no laboratório de microbiologia da UFGD. Os microorganismos testados foram: *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Candida albicans* ATCC® 90028, *Candida tropicalis* ATCC® 750, *Candida krusei* ATCC® 6258, *Candida glabrata* ATCC® 2001.

As atividades antibacteriana e antifúngica foram comparadas com a ação *in vitro* de ampicilina e fluconazol, respectivamente.

As bactérias foram previamente cultivadas em ágar Triptona de soja (Himedia) a 37 °C por 24 horas. Suspensões foram preparadas em solução salina estéril (0,85%) com concentração aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O meio de cultura utilizado foi o caldo Müeller-Hinton (Himedia).

As leveduras do gênero *Candida* foram previamente cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Difco) a 35°C por 24 horas. Suspensões foram preparadas em solução salina estéril (0,85%) com concentração ajustada para 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS-Sigma-Aldrich) pH 7, suplementado com 2 % de glicose.

Para o ensaio antibacteriano, o óleo foi, primeiramente, diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido) e em seguida passou por uma segunda diluição em caldo Muller-Hilton (1:100). Após o óleo diluído foi adicionado às microplacas de 96 poços para as demais diluições em série, obtendo-se as concentrações de 16 a 8192 µg ml⁻¹. As suspensões bacterianas foram diluídas em 1:100 em caldo Mueller-Hilton. As microplacas foram preenchidas com 100 µl de caldo Mueller-Hinton nas colunas de 2 à 11 e 200 µl na coluna 12, 100 µl do óleo diluído nos poços das colunas 1 e 2, e realizado diluição seriada até a coluna 10. E adicionado 100 µl do inóculo nas colunas de 1 à 11. A coluna 11 foi utilizada como controle positivo (meio de cultura e inóculo) e a coluna 12 para controle negativo (meio de cultura) (Figura 26). As microplacas foram incubadas à 37° C por 24 h em câmara úmida. A CIM

foi obtida através da menor diluição capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado, pela visualização da ausência de turbidez nos poços. O teste foi realizado em duplicata.

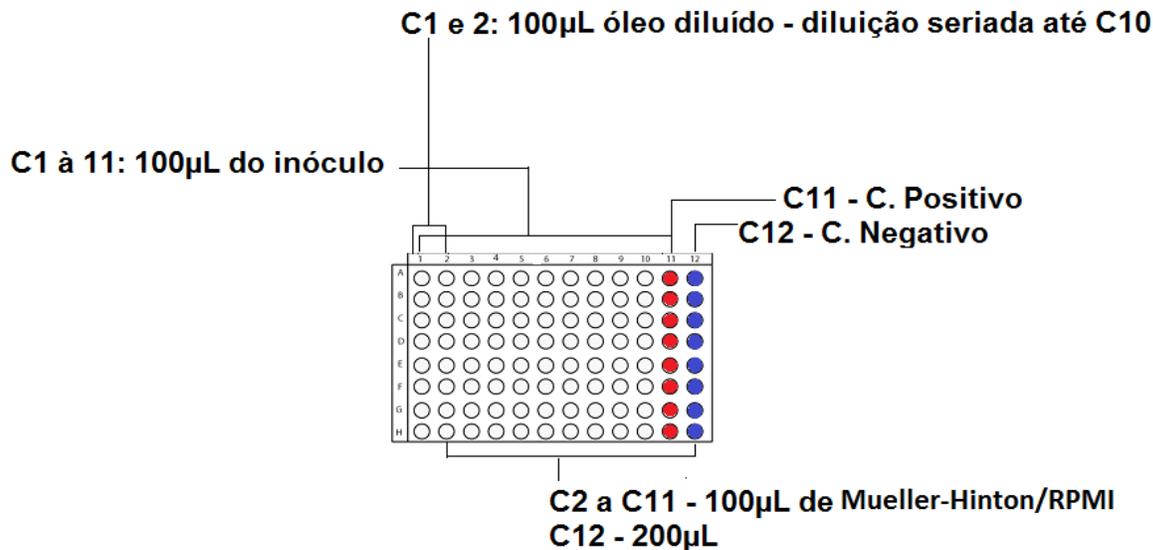


Figura 26- Montagem das microplacas para os ensaios biológicos

Para o ensaio antifúngico, o óleo passou por uma primeira diluição com DMSO e após em RPMI-1640 (1:100) e adicionado às microplacas para as demais diluições em série, obtendo-se as concentrações de 16 a 8192 µg/ml. As suspensões fúngicas foram diluídas em 1:50 em solução salina estéril (0,85%) e depois em 1:20 em caldo RPMI-1640. Para montagem da microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µl de RPMI 1640 nas colunas 2 à 11 e 200 µl na coluna 12, 100 µl do óleo diluído nas colunas 1 e 2, seguida de diluição seriada da coluna 2 à 10 e 100 µl do inóculo nas colunas de 1 à 11. A coluna 11 foi utilizada o controle positivo (meio de cultura e inóculo) e a coluna 12 para controle negativo (meio de cultura) (Figura 26). As microplacas foram incubadas em câmara úmida à 35° C por 48h. A CIM foi obtida através da menor diluição capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado, pela visualização da ausência de turbidez nos poços. O teste foi realizado em duplicata.

Foi realizado o ensaio para concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM), através de subcultura para placas de Petri com ágar Sabouraud para leveduras e ágar Triptona de soja para bactérias. As placas foram demarcadas conforme as posições das cepas nas placas dos ensaios de CIM. Em seguida, com palitos esterilizados em

autoclave, foram adicionadas alíquotas de cada poço nas respectivas demarcações. Essas placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h para as bactérias e a 35 °C por 48 h para as leveduras. A menor concentração do óleo que não apresentou crescimento visível na subcultura foi considerada como CBM e CFM. ³

Atividade Citotóxica

A capacidade antiproliferativa do óleo puro foi avaliada frente a oito linhagens de células neoplásicas, U251 (glioma SNC), M - MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0(rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), Ht-29 (colón), K562 (leucemia), e para as frações além das células acima foi incluída a PC-3 (próstata). Células normais HaCat (queratinócito humano) foram utilizadas como controle. Primeiramente as células, em diferentes densidades, foram cultivadas em meio RPMI-1640, com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida e 5% de CO₂, realizado de acordo com a técnica descrita por Skehan et al. (1990). ²⁹

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, que foram preenchidas com 100 µL de suspensão de células e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após foi adicionado 100 µL da amostra teste, previamente diluída com DMSO, nas concentrações de 0,25 a 250 µg mL⁻¹, exceto no controle negativo (células/meio de cultura) contendo DMSO 0,25 %, e incubadas nas mesmas condições.

Após 48 h as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 40%, e deixadas por 1 h à 4 °C em geladeira. Em seguida foram lavadas e adicionou-se 50 µL de SRB (Sulforrodamina B) 0,1% por 30min em temperatura ambiente. A SRB foi removida, as placas foram lavadas com ácido acético 1 %, e adicionado Tris Base 10 mM (Sigma). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância em leitor de microplacas com base na coloração de proteínas pela SFB, que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células viáveis (vivas), então quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrodestilação a vapor com aparelho de Clevenger foi eficiente para extração do óleo essencial das raízes da *J. ribifolia* com rendimento médio de 0,21 % m/m ($\pm 0,11$). O óleo essencial mostrou-se com coloração verde-azulada, com fragrância forte, canforado e agradável, com uma densidade relativa calculada em $0,915 \text{ g mL}^{-1}$. A composição completa para o óleo extraído foi realizada por cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) conforme perfil ilustrado na Figura 27.

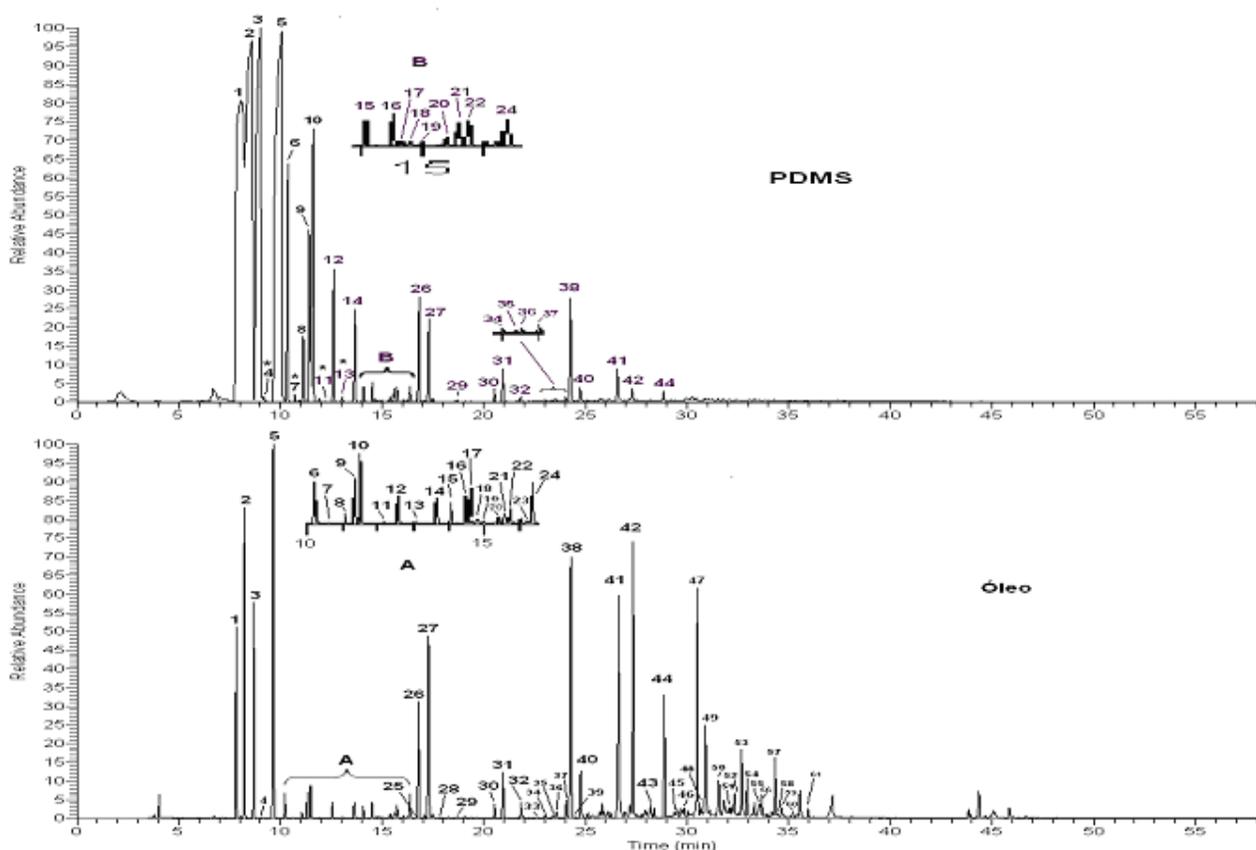


Figura 27 - Perfil cromatográfico do óleo da *J. ribifolia* obtido por GC-MS.

A composição química obtida por injeção direta em GC-MS mostra que o óleo é rico em compostos terpênicos. Os resultados da análise do perfil cromatográfico são mostrados na Tabela 1, contendo o índice de Kovats (IK) calculado e tabelado,¹ o percentual (área de pico por área total), obtido para todos os compostos. Os terpenos em maior concentração para o

óleo analisado foram: β -pineno (9,16%), β -vatireno (8,34%), α -gurjuneno (6,98%), α -pineno (6,35%), canfeno (4,34%), triciclano (3,79%) e dehidro aromadendreno (3,52%). Álcoois e aldeídos representam a segunda maior classe de compostos sendo o isoeugenol metil éter (8,54%), 6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol (6,64%), p-ment-1-en-8-ol (5,24%) e (R)-(-)-p-ment-1-en-4-ol (2,91%), como mostra a Figura 28. A Tabela 1 mostra a composição química para estes percentuais. O IK determinado para a maioria de cada um dos compostos identificados foi equivalente ou próximo ao índice tabelado, com determinação baseada na comparação da fragmentação do íon molecular do espectro de massas obtidos com os dados espectrais da biblioteca NIST do equipamento e também pelos espectros da biblioteca de Adams. ¹

Tabela 1. Composição química do óleo essencial da *J. ribifolia* (Pohl) Baill analisado por GC-MS
KI* - índice de Kovats tabelado, KI - índice calculado. ND - não determinado; TR- tempo de retenção.

n.	TR	Compostos	IK	IK*	%	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5	FR6
1	7.83	triciclano	919	921	3,79						
2	8.24	α -pineno	931	932	6,35						
3	8.70	canfeno	945	946	4,34						
4	9.13	3,3,4-trimetil-2-ciclopente-1-one	958	ND	traço						
5	9.67	β -pineno	974	974	9,16						
6	10.21	β -mirceno	990	988	0,51						
7	10.81	α -felandreno	994	1002	traço						
8	11.06	α -terpineno	1014	1014	0,12						
9	11.35	p-cimeno	1022	1022	0,12						
10	11.47	d-limoneno	1026	1024	1,55						
11	12.32	3-careno	1057	1054	traço						
12	12.57	τ -terpineno	1057	1054	0,34						
13	13.05	trans-p-menta-2,8-dienol	1070	ND	0,05						
14	13.63	terpinoleno	1088	1086	0,41						
15	14.12	β -linalool	1100	1095	0,33						
16	14.54	exo-fencol	1112	1116	0,42						
17	14.68	tujone	1116	1114	0,05						
18	14.83	cis- β -terpineol	1120	1130	0,05		0,81				
19	14.99	< α >canfolenal	1125	1126	0,03						
20	15.41	trans-pinocarveol	1137	1135	0,03	1,42					
21	15.62	(-)-alcanfor	1142	1141	0,03						
22	15.76	2,3,3-trimetil 2-norbomanol	1147	1140	0,05						
23	16.2	pinocanfeno	1159	1158	traço						
24	16.36	borneol	1164	1165	0,76	7,79	0,25				
25	16.69	3-pinanone	1173	1172	traço						
26	16.8	(R)-(-)-p-ment-1-en-4-ol	1176	1174	2,91						
27	17.29	p-ment-1-en-8-ol	1185	1179	5,24	7,03					
28	17.96	D-verbenone	1209	1204	0,04						
29	18.79	1,3,3-trimetil-2-(2-metil-ciclopropil)-ciclohexeno	1190	1186	0,05						
30	20.55	2,6-acido octadienoico, 3,7-dimetil-, etil ester	1195	1194	0,36						
31	20.94	2-metil-1-(trimetilciclopropilideno)	1285	ND	1,23						

		propeno									
32	21.83	metil geranato	1296	1322	0,46						2,14
33	22.75	2,4diisocianato-1-metilbenzeno	1301	ND	traço						
34	23.04	9,10-dehidro-isolongifoleno,	1361	ND	0,12						
35	23.43	β-vatireno	1312	ND	8,34						
36	23.59	β -patcouleno	1324	1322	0,26						
37	24.05	(-)- β -elemeno,	1361	1391	0,01						
38	24.3	cipereno	1373	1398	0,01						1,75
39	24.46	(6-hidroximetil-2,3-dimetilfenil) metanol	1378	1379	0,01						
40	24.77	isoleveno	1393	1389	1,35						
41	26.6	α-gurjuneno	1400	1409	6,98						
42	27.36	isoeugenol metil eter	1494	ND	8,54	0,78	21,19	0,39			
43	28.23	espatulenol	1514	1490	0,74						9,25
44	28.87	dehidro-aromadendreno	1519	ND	3,52						
45	28.38	corimbolone	1533	ND	traço	1,26	3,27				
46	29.72	isolongifolene-5-ol	1534	ND	0,65	1,41	1,36				
47	30.52	[4,4,11,11-tetrametil -7- tetraciclo (6.2.1.0(3.8)0(3.9)) undecanol]	1608	ND	6,64			38,63	31,60		21,28
48	30.83	cedrol	1619	ND	traço				4,80		
49	30.91	8S-cis-5(1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilideno)	1622	ND	3,33			11,16		23,03	73,54
50	31.55	<3->tujopsanone	1645	1650	1,25						
51	32.0	4a,8,8- trimetiloctahidrociclopropa (d)naftalen-2(3H)-one	1661	ND	traço			9,12	19,05		
52	32.34	(-)-espatulenol	1673	ND	1,25	5,49					
53	32.69	6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	1696	ND	1,15	3,69		12,20			12,89
54	32.90	β -guaieno	1697	ND	traço	12,8					
55	33.41	2,2,7,7-tetrametiltriciclo [6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one	1713	ND	0,46	1,59	0,57		7,25		4,55
56	33.92	2(1H)naftalenone, 3,5,6,7,8,8a-hexahidro-4,8a-dimetil-6-(1-metiletenil)	1732	ND	1,15	7,82		3,80			
57	34.12	ácido acético, 7-isopropenil-1,4a-dimetil-3-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidronaftalen-2-il ester	1740	ND	0,09	1,36		9,88	4,47		1,22
58	34.16	oxido-[2] aromandendreno	1762	ND	traço	2,74					
59	34.78	8-oxo-9H-cicloisolongifolene	1765	ND	2,09	1,91		3,27	21,43		
60	35.08	valeral	1776	ND	0,41	2,49					
61	35.94	metil hinokiate	1827	ND	1,20	7,86					3,57
Total (%)					82,19	65,4	75,61	70,26	80,03	73,54	73,73
Terpenos					48,51						
Álcoois / Aldeídos					19,66						
Cetonas					4,66						
Outros					9,36						

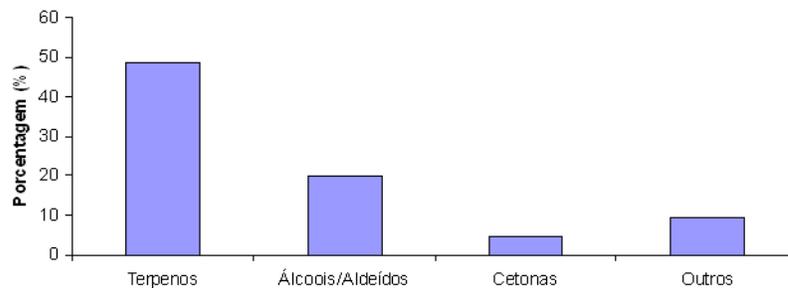


Figura 28 - Percentual dos compostos de óleo volátil da *J. ribifolia*.

Por meio de sucessivas etapas de fracionamentos em CCD preparativa do óleo essencial, foi possível a obtenção de seis frações semi-puras denominadas FR1, FR2, FR3, FR4, FR5 e FR6, e o isolamento dos compostos A, B e C (Figura 32), sendo suas estruturas elucidadas através do método analítico GC-FID e GC-MS, KI, baseando-se em comparações do KI calculado para o composto com os IK tabelado e por espectros de massas dos mesmos e dados da biblioteca NIST e Adams.^{1,27} O Monitoramento do processo de isolamento foi realizado através de cromatografia gasosa (GC-MS), conforme Figuras 29, 30 e 31 abaixo e 36, 37, 38, 39, 40 e 41 no apêndice.

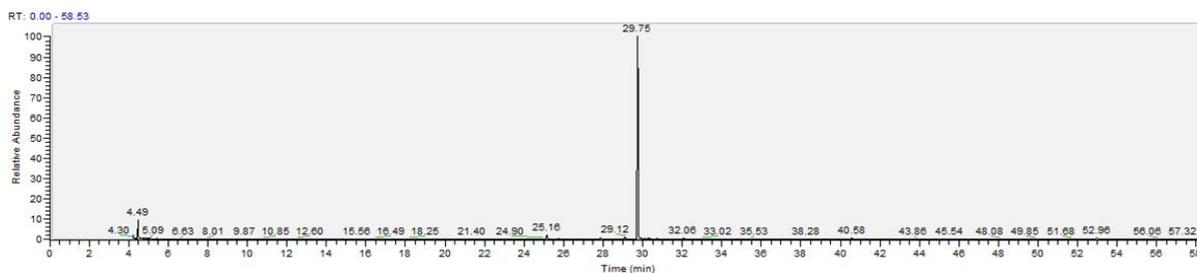


Figura 29-Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS do constituinte A isolado.

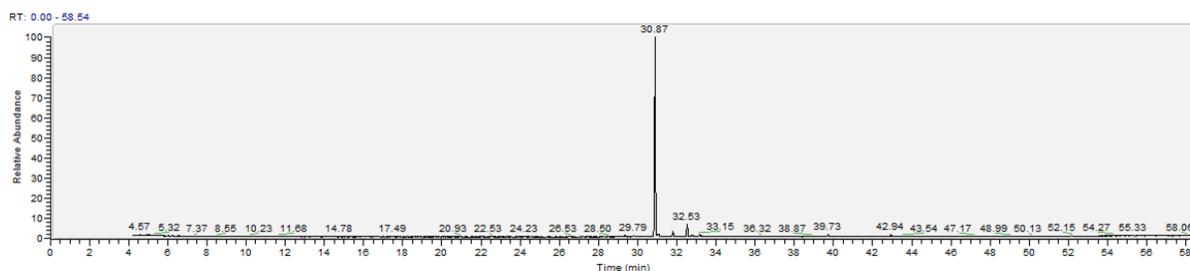


Figura 30 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtidos por GC-MS do constituinte B isolado.

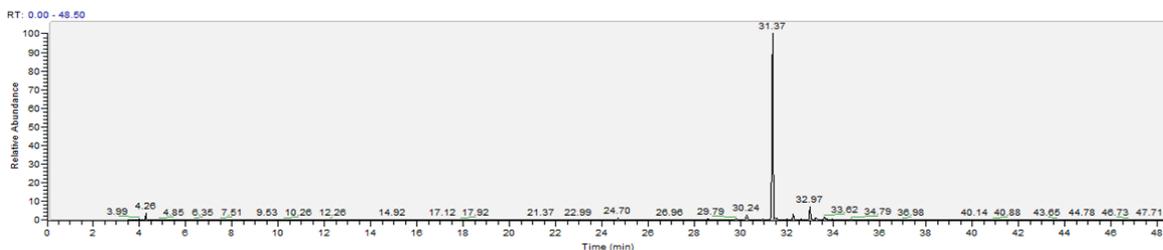


Figura 31 - Cromatograma de íons totais (TIC) obtidos por GC-MS do constituinte C isolado.

Através dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT pode-se comprovar a estrutura química do composto C (Figura 32), tratando-se de uma cetona sesquiterpênica com a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$. Foram confirmadas 4 metilas nos deslocamentos de 15.467, 18.104, 19.174 e 26.604 ppm, 4 CH_2 nos desvios químicos 26,121 e 26.414, 34.804, 43.670 ppm, uma carbonila ($\text{O}=\text{CR}_2$) em 207 ppm, 4 sinais de carbonos insaturados entre 129-148 ppm e 2 carbonos terciários (R_3CH) na região de 35 e 63 ppm.

O espectro de IV forneceu dados qualitativos do composto C, onde foram identificadas bandas de absorção características de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em 1715 cm^{-1} , para alcanos (CH) em $2921,35\text{ cm}^{-1}$ e alcanos (CH_3) em $1398,88\text{ cm}^{-1}$, bandas de ligação $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático em $1486,11\text{ cm}^{-1}$ e um CH_2 em $804,68\text{ cm}^{-1}$ (Figura 48) no apêndice.

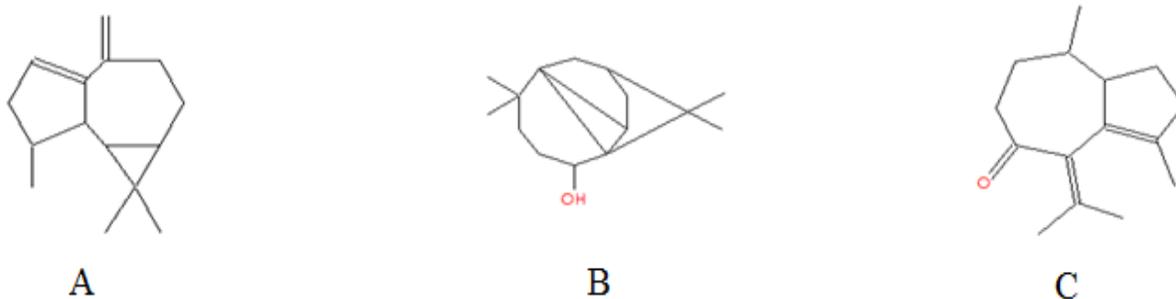


Figura 32 - Estrutura química do dehidro-aromadendreno (A), 4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol (B) e (8S-cis)-5(1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimethyl-4-(1-metiletilideno) (C)

A ação antioxidante do óleo da *J. ribifolia* foi avaliada pela sua reação com o DPPH, um radical livre estável, cromóforo, que é reduzido a difenil-picril-hidrazina, revelando mancha violeta de fundo amarelo. O ensaio para ação antioxidante foi negativo, pois não

ocorreu o aparecimento das manchas, o DPPH não foi estabilizado, indicando a ausência de ativos antioxidantes no óleo volátil.

A investigação da atividade biológica do óleo frente às cepas bacterianas e fúngicas foi através do método de microdiluição em caldo. A ação antibacteriana foi verificada a olho nu pela ausência de turvação dos poços. De acordo com os resultados da CIM expostos na Tabela 2, o óleo apresentou potencial bacteriostático frente a duas linhagens de bactérias, *S. aureus* (CIM 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *P. aeruginosa* (CIM 4096 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mostrando que a bactéria Gram + é mais susceptível à ação do óleo. Mesmo sendo maior que o CIM do antibacteriano padrão, o resultado foi significativo, pois foi eficaz frente às bactérias Gram - e Gram +. No entanto, o óleo não apresentou ação bactericida nas concentrações testadas.

Os resultados da Tabela 3 demonstram que todas as cepas foram sensíveis à ação fungistática do óleo, sendo mais significativo contra a *C. albicans*, com uma CIM de 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já contra as cepas *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* foram necessárias doses maiores. O óleo apresentou ação fungistática e fungicida frente a *C. tropicalis* e *C. glabrata* nas mesmas concentrações, sendo CIM e CFM iguais. Esse resultado merece atenção pelo fato desses fungos apresentarem resistência à antifúngicos padrões, como ambos para o Itraconazol e a *C. tropicalis* à Anfotericina B.^{5,17} Os resultados indicaram 100% de susceptibilidade das cepas, mas em diferentes concentrações da amostra testada. As leveduras mostraram-se mais susceptíveis ao óleo em relação às bactérias, sendo essa situação já relatada para outros óleos essenciais.²

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial da raiz da *Jatropha ribifolia* (Phol) Baill. frente à diferentes cepas bacterianas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Bactéria	Óleo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		MIC Ampicilina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	MIC	CBM	
<i>E. coli</i>	s/ inibição	s/ ação	8
<i>E. faecalis</i>	s/ inibição	s/ ação	1
<i>P. aeruginosa</i>	4096	s/ ação	1
<i>S. aureus</i>	2048	s/ ação	128

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial da raiz da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. ($\mu\text{g mL}^{-1}$) frente a diferentes cepas fúngicas.

Levedura	Óleo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Fluconazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	MIC	CFM	
<i>C. albicans</i>	246	2048	1
<i>C. tropicalis</i>	2048	2048	2
<i>C. krusei</i>	4096	8192	16
<i>C. glabrata</i>	2048	2048	32

Nos ensaios antiproliferativos (Tabela 4) para células tumorais com o óleo bruto, verificamos que o mesmo apresentou maior potencial citotóxico frente a duas linhagens, de pulmão e de ovário, com IG_{50} de 6,2 e 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Nos testes com as frações semi-puras, as células neoplásicas do SNC (U251) foram mais sensíveis à FR2, composta majoritariamente pelo monoterpene isoeugenol metil éter (21,19%) e o sesquiterpene [4,4,11,11 - tetrametil - 7 - tetraciclo (6.2.1.0(3.8) 0 (3.9)) undecanol] (38,63%), prováveis responsáveis pela ação, com GI_{50} de 4,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As células cancerígenas de mama (MCF-7) tiveram sua viabilidade reduzida significativamente pela maioria das frações, com menor GI_{50} de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FR2. As células tumorais de ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES) apresentaram maior sensibilidade às frações FR1, FR2, FR4 e FR6, com menor IG_{50} de 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FR1, sendo o valor igual ao do controle doxorrubicina. Já para as células de ovário (OVCAR-3) a FR1 apresentou resultado mais significativo de 0,51 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esta fração é composta na sua maioria por monoterpenos: transpinocarveol (1,42 %), borneol (7,79 %), α -terpineol (7,03 %) e isoeugenol metil éter (0,78 %) e sesquiterpenos: isolongifolene-5-ol (1,41 %) e metil-hinokiate com 7,86 %. Para as linhagens celulares de câncer renal (786-0), as frações 1 e 2 exerceram maior potencial antiproliferativo. As células neoplásicas pulmonares foram susceptíveis à todas as frações, mesmo que em doses maiores que o controle positivo. Frente às células da próstata (PC-3), todas as frações foram eficientes quando comparada à doxorubicina, destacando-se FR1 e FR2 com $\text{GI}_{50} < 0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, com valores de GI_{50} iguais ao do controle positivo.

Tabela 4. Atividade antiproliferativa do óleo da *J. ribifolia* (Pohl) Baill frente à células neoplásicas

	GI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
	2	m	a	7	4	o	h	k	q	p
O	25	25	25	25	6,2	8,0	25	18,3	20,4	–
FR1	25,0	2,5	0,19	3,1	4,5	0,51	3,3	2,7	1,2	<0,25
FR2	4,2	1,0	0,45	3,6	6,5	10,3	6,1	1,0	1,2	<0,25
FR3	25,0	3,9	25,0	25,0	25,0	2,1	25,0	11,3	3,6	0,88
FR4	25,0	7,8	3,8	25,0	25,0	4,7	25,0	7,9	10,3	0,25
FR6	25,0	25,0	3,0	25,0	25,0	5,6	25,0	5,8	25,0	0,57
D	0,025	<0,25	0,19	0,025	<0,25	<0,25	0,031	0,37	0,068	<0,25

GI_{50} - concentração necessária para que ocorra 50% de inibição do crescimento; O - óleo essencial da *J. ribifolia*, D - doxorubicina; 2-U251-(glioma, SNC); m - MCF-7 (mama); a - NCI-ADR/RES (ovários com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 - 786-0(rim); 4 - NCI-H460 (pulmão - tipo não pequenas células); o - OVCAR-3 (ovário); h - HT-29 (colón); k - K562 (leucemia); q - HaCat (queratinócito humano, célula não tumoral) e p - PC3 (próstata)

Também vale ressaltar que as frações FR3 e FR6 apresentaram menores GI_{50} para estas células, com 0,88 e 0,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo os compostos majoritários da FR3: [4,4,11,11-tetrametil -7-tetraciclo (6.2.1.0(3.8) 0 (3.9)) undecanol] (31,6%) e o 6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol (12,2%) e FR6: 4,4,11,11-tetrametil- 7-tetraciclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol(21,28%) e 8S-cis-5(1H)-azulenone,2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilideno) (17,08%). Os resultados foram expressivos também para células leucêmicas (K562) com menor GI_{50} da FR2 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As células de cólon retal (HT29) foram mais suscetíveis à FR1 e FR2, com GI_{50} de 3,3 e 6,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Ressalta-se que a FR2 foi a que apresentou os melhores resultados frente à todas as células testadas.

2.4 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro trabalho com o óleo essencial de raízes da *J. ribifolia*, no qual foram investigadas a composição química e as atividades biológicas. Relativo à composição química da planta, o óleo da raiz é principalmente representado por terpenos, a maioria sesquiterpenos, seguido de álcoois e aldeídos. Os ensaios biológicos demonstraram potencial antibacteriano, antifúngico, fungicida e citotóxico do óleo essencial, apontando a presença de princípios ativos agindo sozinhos ou em sinergismo. Esses resultados embasam

futuros estudos com o óleo da *J. ribifolia* para identificação dos compostos que exercem essas bioatividades, bem como elucidação dos mecanismos de ação.

2.5 REFERÊNCIAS:

1. ADAMS RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Illinois EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804p.
2. ARAUJO JCLV, LIMA EO, CEBALLOS BSO, FREIRE KRL, SOUZA EL, SANTOS FILHO L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical, v.33:1, 55-64, 2004.
3. BAGIU RV, VLAICU B, BUTNARIU M. Chemical Composition and in Vitro Antifungal Activity Screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). International Journal Molecular Sciences, v.13, 1426-1436; 2012.
4. BARREIRO EJ, MANSSOUR CAM. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Arte Médica Editora Ltda: Porto Alegre, 2008, p.161-178.
5. BLANCO MT, CAÑADAS J, GARCÍA-MARTOS P, MARÍN P, GARCÍA-TAPIA A, RODRÍGUEZ MJ. Actividad in vitro de posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*. Revista Española de Quimioterapia, v. 22:3, 139-143, 2009.
6. BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5. ed. Brasília: Anvisa, v.2, 2010, 545p.
7. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
8. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically: CLSI M7-A9. 9. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
9. COLLINS HC, BRAGA LG, BONATO SP. Fundamentos de Cromatografia. 6. ed, Campinas: Ed. Unicamp, 2006, 17-275p.
10. CONNORS JM. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. Journal of Clinical Oncology, v.3: 6400- 6408, 2005.
11. DEHGAN B, Webster GL. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). University of California Press, Berkeley. Botany, v.74, 1997, 73p.

12. FERNANDES ES, RODRIGUES FA, TÓFOLI D, IMAMURA PM, CARVALHO JE, RUIZ ALTG, FOGLIO MA, MINGUZZI S, SILVA RCL. Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophone terpenes from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill roots. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy*, 2012 (in press).
13. HARVEY AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.13:19-20, 894-901, 2008.
14. 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, 1-10, 2008.
15. LEAL CKA, AGRA MF. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.24, 5-13, 2005.
16. LEWINSONHN TM, PRADO PI, Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento, Ed. Pinsky: São Paulo, 2002, p. 17-25.
17. LUMBRERAS C, LIZASOAIN M, AGUADO JM. Antifúngicos de uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 21:7, 366-380, 2003.
18. MANDEEP KAUR, AMJAD ALI. Lithium ion impregnated calcium oxide as nano catalyst for the biodiesel production from karanja and *jatropha* oils. *Renewable Energy*, v.36, 2866-2871, 2011.
19. MITTERMEIER RA, ROBLES GIL P, MITTERMEIER CG. Megadiversity: earth's biologically wealthiest nations. Cidade do México: CEMEX, Conservation International e Agrupación Sierra Madre, 1997.
20. NEWMAN DJ, CRAGG GM, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, 461-77, 2007.
21. NIZA NM, TAN KT, AHMAD Z, LEE KT. Comparison and optimisation of biodiesel production from oil using supercritical methyl acetate and methanol. *Chemical Papers*, v.65:5, 721-729, 2011.
22. PATIL V, SINGH K. Oil gloom to oil boom – *Jatropha curcas* a promising agro-forestry crop. Shree Offset Press, Nashik, 1991.
23. PIMENTEL LA, RIET-CORREA B, DANTAS AF, MEDEIROS RMT, RIET-CORREA F. Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. *Toxicon*, v.59, 587-591, 2012.

24. RAM SG, PARTHIBAN KT, KUMAR RS, THIRUVENGADAM V, PARAMATHMA M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.55, 803-809, 2008.
25. SACCARO JR NL, A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. *Ambiente & Sociedade*, São Paulo, v.14:1, 2011.
26. SILVA TS, FREIRE EMX, Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.12:4, 427-435, 2010.
27. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. São Paulo: LTC, 2000, 460p.
28. SIMÕES CMO, SPITZER V. Óleos voláteis. In: SIMÕES CMO, SCHENCKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed.UFRGS/ UFSC, 2004, 467-495p.
29. SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v.82, 1107-1118, 1990.
30. SOLER-RIVAS C, ESPÍN JC, WICHERS HJ, *Phytochem Analysis*, v.11, 1, 2000.
31. SUJATHA M, PRABAKARAN AJ. Characterization and utilization of Indian *Jatropha*. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, v.10:1, 123–128, 1997.
32. UNU-IAS. United Nations University - Institute of Advanced Studies: Report. *Bioprospecting of Genetic Resources in the Deep Seabed: Scientific, Legal and Policy Aspects*, 2005. Disponível em: <http://www.ias.unu.edu/binaries2/antarctic_bioprospecting.pdf>, Acessado em: 16 dez. 2012.
33. WEBSTER GL. Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*, v.81, 3–143, 1994.

CAPÍTULO III
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DA
***Jatropha ribifolia* (POHL) BAILL POR SPME-GC-MS.**

3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill POR SPME-GC-MS.

¹Celia Eliane de Lara da Silva, ²Willian Ferreira da Costa, ¹Sandro Minguzzi, ¹Rogério César de Lara da Silva, ¹*Euclésio Simionatto

¹Centro de Pesquisas Tecnológicas do Estado de Mato Grosso do Sul (CPTREM), Pós-graduação em Recursos Naturais (PGRN), Departamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, rua Emílio Mascoll, 275, 79950-000, Naviraí – MS.

²Complexos e Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP), Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, 87020-900, Maringá - PR.

*The author correspondence: euclésio@uems.br

RESUMO: A composição química do óleo essencial e seus voláteis obtidos de raízes da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill foram analisados neste trabalho. A extração tipo Clevenger foi utilizada para hidrodestilação do óleo e a composição química determinada por cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). A identificação dos compostos foi confirmada pelo Índice de Kovats, obtido por uma série de alcanos de cadeia longa (C7-C30) e comparado com os dados da biblioteca NIST 32 e ADAMS (2007). Um total de 61 compostos foi identificado no óleo essencial por GC-MS. A extração dos voláteis foi realizada através da microextração em fase sólida (SPME) com quatro diferentes fibras. A extração dos voláteis do óleo essencial foi extremamente rápida (15 s) para evitar saturação do revestimento da fibra e do detector do equipamento. Na composição do óleo essencial têm-se terpenos β -pineno (9,16%); β -vatireno (8,34%); α -gurjuneno (6,98%); α -pineno (6,35%); canfeno (4,34%); triciclono (3,79%) e dehidro-aromadendreno (3,52%) e aldeídos e álcoois. Através da SPME foi possível a determinação de dez compostos voláteis não identificados no óleo, sendo estes 3,3,4-trimetil-2-ciclopenteno-1-one (3,2%); α -felandreno (0,67%); 3-careno (0,02%); trans-*p*-menta-2,8-dienol (0,17%); pinocanfeno (0,02%); 3-pinanone (0,77%); D-verbenone (0,04%); 1,3,3-trimetil-2-(2-

metil-ciclopropil)-ciclohexano (0,09%); 2,4diisocianato-1-metilbenzeno (0,38%) e (6-hidroxi-metil-2,3-dimetilfenil) metanol (0,01%).

PALAVRAS-CHAVE: Euphorbiaceae, headspace, terpenos.

ABSTRACT: The chemical composition of essential oil and volatile obtained from the roots of *Jatropha ribifolia* L. were performed in this work. The extraction by Clevenger was utilized for hydrodistillation of oil and chemical composition determined by gas chromatography coupled mass spectrometry detector (GC-MS). The identification of compounds was confirmed by retention index (Kovats index) obtained from a series of straight chain alkanes (C₇-C₃₀) and comparison with NIST 32 and Adams library. A total of 61 compounds were identified in essential oil by GC-MS. The extraction of volatile was performed also with the use of solid phase microextraction (SPME) with four different fibers. The essential oil extraction was extremely rapid (15 s) to avoid saturation of the fiber and the MS detector. The majority of the composition of essential oil are the terpenes β -pinene (major compound 9.16%); β -vaterone (8.34%); α -gurjunene (6.98%); α -pinene (6.35%); camphene (4.34%); tricyclene (3.79%) and dehydro aromadendrene (3.52%) and aldehydes and alcohols. Through SPME it was possible to determine ten volatile compounds not identified in oil, these being 2,3,4-trimethyl-2-cyclopenten-1-one (3.2%); α -phellandrene (0.67%); 3-carene (0.02%); *trans-p*-mentha-2,8-dienol (0.17%); pinocamphone (0.02%); 3-pinanone (0.77%); verbenone (0.04%); 1,3,3-trimethyl-2-(2-methyl-cyclopropyl)-cyclohexene (0.09%); 2,4 diisocyanato-1-methylbenzene (0.38%) and (6-hydroxymethyl-2,3-dimethylphenyl) methanol (0.01%).

KEY-WORDS: Euphorbiaceae, headspace, terpenes.

3.1 INTRODUÇÃO

A *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill., é uma Euphorbiaceae encontrada na região do semi-árido do nordeste do Brasil²² e mais recentemente no centro-oeste.¹² O gênero *Jatropha* é constituído de mais de 200 espécies sendo mais comum na região semi-árida a *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill., *J. mutabilis* (Pohl) Baill. e *J. ribifolia* (Pohl) Baill.²⁴ Outras espécies

tais como a *J. gossypifolia* L. e *J. curcas* L. são encontradas em território brasileiro e tem importância sócio-econômica, medicinal e ornamental.²²

A *J. curcas* L. pode ser utilizada na produção de biodiesel para motores a diesel⁹ e tem sido alvo de muitas pesquisas com vários catalisadores.^{30,8} A *J. gossypifolia* L. é uma planta que pode apresentar toxicidade, mas tem sido usada na medicina popular e para o tratamento de várias doenças,¹⁷ entretanto, alguns compostos exibem toxicidade hepática.^{17,16}

Muitos compostos terpênicos foram isolados de espécies da *Jatropha* com respeito a novas estruturas químicas e valores medicinais. Estes terpenos podem exibir atividade citotóxica, antitumoral e antimicrobiana *in vitro*, tais como a jatrofona, spruceanol e jatrofatrione que mostraram atividade contra células tumorais.¹⁰ Os compostos isolados são obtidos de extrato orgânico a partir de cascas, galhos e raízes. Alguns terpenos são isolados da composição obtido do óleo do fruto. Entretanto, a composição do óleo essencial para terpenos voláteis de espécies da *Jatropha* ainda não é conhecida.

A *J. ribifolia* é uma espécie aromática encontrada na região centro-oeste, também conhecida como “minâncora do campo”, Fernandes et al. (2013),¹² recentemente estudando as raízes desta espécie, isolou os compostos jatrofona e ácido ciperenóico do extrato hexânico e caracterizou-os por técnicas espectroscópicas (RMN de ¹H e ¹³C). A atividade antiproliferativa *in vitro* da jatrofona mostrou seletividade em uma concentração-dependente na inibição do crescimento total (TGI) para células neoplásicas de glioma (0,57 µg mL⁻¹), mama (9,2 µg mL⁻¹), ovário 0,96 µg mL⁻¹), rim (4,2 µg mL⁻¹), próstata (8,4 µg mL⁻¹), cólon (16,1 µg mL⁻¹) e leucemia (0,21 µg mL⁻¹).

A extração de compostos voláteis do óleo pode ser realizada por purge-trap,⁸ extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE),¹⁹ extração líquido-líquido (*Liquid-liquid Extraction* - LLE),^{21,25} hidrodestilação assistida por micro-ondas (*Microwave-assisted Hydrodistillation* - MAHD),^{13,11} extração por fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction* - SFE),²³ microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* - SPME),^{5,14} por extrator de Clevenger,¹ entre outros.

SPME é uma técnica aplicada para extração e concentração de grande variedade de compostos orgânicos,^{29,4} de vários tipos de matrizes tais como água,^{28,27} ar,³ solo,⁶ componentes voláteis em alimentos,^{2,26} óleo essencial⁵ e matrizes biológicas.¹⁵ A determinação direta de analitos através do acoplamento com outras técnicas também tem sido desenvolvida.

^{18,27,28} A SPME é feita por materiais sorventes e adsorventes tais como polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno (DVB), Carbowax (CW) e carboxens (CAR) dispersos sobre uma fibra de sílica. Na extração de compostos voláteis não é necessário o uso de solventes no preparo e análise de amostras. ⁴

Este trabalho mostra a composição de voláteis extraídos do óleo essencial obtido de raízes da *J. ribifolia* (Pohl) Baill., por uso de amostragem em *headspace* estático com diferentes fibras de SPME com análises por GC-MS. O perfil cromatográfico obtido pelas fibras foi comparado ao perfil cromatográfico do óleo por injeção direta nas mesmas condições.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Uma quantidade de raízes da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Bail. foi coletada na região de pastagem perto da cidade de Naviraí-MS e transportadas para o laboratório de química orgânica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS-Naviraí). A *Jatropha ribifolia* foi identificada no Instituto de Botânica de São Paulo, pela professora Dra. Inês Cordeiro, sendo sua exsicata registrada sob nº CGMS 31.481. ¹² As raízes foram limpas e lavadas com água corrente para remoção de partículas e secas por 3 horas à temperatura ambiente. Depois foram trituradas mecanicamente e colocadas em balão de 5L e o óleo essencial extraído com equipamento extrator de Clevenger até extração exaustiva. O óleo essencial coletado foi colocado em frascos de vidro próprios, selados e estocados em ambiente escuro para análises posteriores.

Instrumentação

A análise cromatográfica foi realizada usando um cromatografo a gás (Thermo-Finigan - USA), equipado com detector de espectrometria de massas e injetor *split/splitless*. Coluna cromatográfica capilar de 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm (HP5-MS) foi usada para separação dos componentes do óleo essencial. Um *holder* para fibra de uso manual foi obtido da Supelco (Bellefont). Fibras de SPME da Supelco e revestidas com quatros tipos de diferentes filmes: 100 µm de polidimetilsiloxano (PDMS), 85 µm de poliacrilato (PA), 65 µm de

polidimetilsiloxano / divinilbenzeno (PDMS/DVB e a 85 μm de Carbowax/DVB (CW/DVB) foram utilizadas. Todas as fibras foram condicionadas em injetor do cromatógrafo de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante.

Condições cromatográficas

Os parâmetros de análises cromatográficas usados neste trabalho foram: temperatura do injetor 230 °C, temperatura do detector 250 °C, temperatura do forno 40 °C (1 min), aumento de 4 °C min^{-1} a 260 °C. O Hélio (1.2 mL min^{-1}) foi usado como gás de arraste. O modo de injeção foi realizado em *splitless* por 5 min e após a válvula *split/splitless* aberta. Foi obtido um cromatograma de íons totais em modo scan de 40 m/z a 400 m/z , com espectrômetro de massas quadrupolo operando em ionização de impacto de elétron de 70 eV, com temperatura da fonte de 250 °C.

Procedimentos de extração por HS-SPME

A extração foi realizada em modo *headspace* estático (HS) com todas as diferentes fibras de SPME. Em adição, para minimizar os sinais de fundo (background), as fibras foram aquecidas em injetor do GC-MS por 5 min depois de cada amostragem por HS-SPME. Em seguida 50 μL do óleo essencial foram coletados e adicionados em frascos (10 mL) fechados com septo lacrado, para extração por SPME em laboratório à 25° C. As fibras foram expostas por 15 s em *headspace* para extração dos voláteis para evitar saturação do revestimento da fibra. A dessorção foi realizada por 5 min em injetor do GC-MS. Nenhum *carryover* foi determinado para as fibras. Os dados foram coletados com software Xcalibur® e analisados contra biblioteca NIST MS Search 2.0 e Adams (2007). Os compostos foram preliminarmente identificados por pesquisa na biblioteca do equipamento, e muitos identificados por comparação do espectro de massas, de índice retenção de Kovats (IK) da literatura e índice de Kovats calculado obtido por uma série homóloga de alcanos de cadeia longa (C7 - C30), que foram usados para calcular o KI para todos os compostos identificados. Para análise do óleo

puro 50 μ L foram solubilizados em 5 mL do solvente orgânico e injetados em modo *split* (1/100).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes da *J. ribifolia* foram sujeitas à hidrodestilação por 12h usando extrator de Clevenger modificado, obtendo-se um rendimento médio de 0.16%. O óleo apresentou uma coloração verde-azulada com odor intenso, agradável e refrescante. A composição de voláteis do óleo da raiz não tem sido mostrada para *J. ribifolia* em literatura. As composições químicas do óleo e voláteis foram analisadas através do GC-MS e HS-SPME-GC-MS. A composição química realizada por injeção direta do óleo em GC-MS mostrou que este é rico em terpenos. Na Tabela 5 é mostrada a composição química, o KI calculado e tabelado para todas as análises e a porcentagem para todos os compostos. Os terpenos são compostos em sua maioria por β -pineno (composto majoritário com 9,16%), β -vatireno (8,34%), α -gurjuneno (6,98%), α -pineno (6,35%), canfeno (4,34%), triciclano (3,79%) e dehidro-aromadendreno (3,52%). Álcoois e aldeídos representam a segunda maior classe de compostos majoritários, sendo o *p*-menth-1-en-8-ol o componente majoritário para álcoois com 5,24%, e cetonas a terceira maior classe com 8-oxo-9H-cicloisolongifoleno o composto majoritário com 3,33%.

Tabela 5: Composição química e fração de voláteis do óleo da *J. ribifolia* L. identificados por GC/MS e HS-SPME-GC-MS.

	RT	Compostos	IK	IK*	óleo	PA	PDMS/DVB	PDMS	CW/DVB
1	7.83	triciclano	919	921	3.79	7.52	32.39	21.01	12.26
2	8.24	α-pineno	931	932	6.35	13.19	ND	21.32	15.22
3	8.70	canfeno	945	946	4.34	8.65	11.98	15.15	23.65
4	9.13	3,3,4-trimetil-2-ciclopenten-1-one	958	ND	traço	0.01	ND	ND	3.20
5	9.67	β-pineno	974	974	9.16	18.26	19.48	22.3	4.45
6	10.21	β -mirceno	990	988	0.51	1.37	3.71	2.63	0.5
7	10.81	α -felandreno	994	1002	traço	ND	0.13	0.67	0.01
8	11.06	α -terpineno	1014	1014	0.12	0.15	1.25	0.01	1.01
9	11.35	<i>p</i> -cimeno	1022	1022	0.12	0.32	3.06	0.02	0.02
10	11.47	<i>d</i> -limoneno	1026	1024	1.55	4.19	6.00	6.33	10.4
11	12.32	3-careno	1057	1054	traço	ND	0.02	0.01	ND
12	12.57	<i>t</i> -terpineno	1057	1054	0.34	0.87	2.2	1.16	2.4
13	13.05	trans- <i>p</i> -menta-2,8-dienol	1070	ND	traço	0.10	0.17	0.07	0.17

14	13.63	terpinolene	1088	1086	0.41	1.23	2.27	1.00	2.56
15	14.12	linalool	1100	1095	0.33	0.82	0.44	0.17	0.59
16	14.54	exo-fenchol	1112	1116	0.42	0.9	0.6	0.25	0.91
17	14.68	tujone	1116	1114	0.05	ND	0.01	0.01	0.01
18	14.83	cis- β -terpineol	1120	1130	0.05	0.18	0.01	0.01	ND
19	14.99	< α ->canfolenal	1125	1126	0.03	ND	0.01	0.02	0.03
20	15.41	trans-pinocarveol	1137	1135	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02
21	15.62	(-)-alcanfor	1142	1141	0.03	0.01	0.4	0.24	0.01
22	15.76	2,3,3-trimetil 2-norbornanol	1147	1140	0.05	1.27	ND	0.36	1.2
23	16.20	pinocanfene	1159	1158	traço	ND	ND	ND	0.02
24	16.36	borneol	1164	1165	0.76	1.19	0.59	0.024	0.5
25	16.69	3-pinanone	1173	1172	0.06	ND	0.05	ND	0.77
26	16.80	(R)-(-)-p-ment-1-en-4-ol,	1176	1174	2.91	6.17	2.8	1.14	3.83
27	17.29	p-ment-1-en-8-ol	1185	1179	5.24	7.95	2.39	0.92	3.43
28	17.96	D-verbenone	1209	1204	traço	0.04	ND	ND	0.03
29	18.79	1,3,3-trimetil-2-(2-metil-ciclopropil)-ciclohexeno)	1190	1186	traço	ND	0.09	0.03	0.02
30	20.55	2,6-octadienoic acid, 3,7-dimetil-, etil ester	1195	1194	0.36	0.61	0.32	0.12	0.01
31	20.94	2-metil-1-(trimetilciclopropilideno propeno)	1285	ND	1.23	2.06	0.82	0.3	1.05
32	21.83	metil geranato	1296	1322	0.46	0.60	0.18	0.07	0.22
33	22.75	2,4-diisocianato-1-metilbenzeno	1301	ND	traço	0.38	ND	ND	ND
34	23.04	9,10-dehidro-isolongifolene	1361	ND	0.12	ND	0.07	0.03	0.05
35	23.43	β-vatireno	1312	ND	8.34	ND	0.13	0.02	0.02
36	23.59	β -patcouleno	1324	1322	0.26	0.27	0.02	0.01	0.15
37	24.05	(-)- β -elemeno	1361	1391	0.01	0.13	0.05	0.02	0.05
38	24.30	cipereno	1373	1398	0.01	6.45	2.72	1.19	3.35
39	24.46	(6-hidroximetil-2,3-dimetilfenil) metanol	1378	1379	traço	0.01	ND	ND	ND
40	24.77	isoleveno	1393	1389	1.35	0.89	0.36	0.14	0.44
41	26.6	α-gurjuneno	1400	1409	6.98	3.05	0.93	0.34	1.18
42	27.36	isoeugenol metileter	1494	ND	8.54	2.41	0.4	0.22	ND
43	28.23	espatulenol	1514	1490	0.74	ND	ND	ND	0.09
44	28.87	dehidro-aromadendreno	1519	ND	3.52	0.93	0.22	0.11	0.32
45	28.38	corimbolone	1533	ND	traço	ND	ND	ND	ND
46	29.72	Isolongifolene-5-ol	1534	ND	0,65	ND	ND	ND	ND
47	30.52	[4,4,11,11-tetrametil -7- tetraciclo [6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol]	1608	ND	6.64	0.39	0.15	0.14	ND
48	30.83	cedrol	1619	ND	traço	ND	ND	ND	ND
49	30.91	8S-cis-5(1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilideno)	1622	ND	3.33	ND	ND	ND	ND
50	31.55	tujopsanone <3->	1645	1650	1.25	ND	ND	ND	ND
51	32.0	4a,8,8-trimetil octahidro ciclopropa(d)naftalen-2(3H)-one	1661	ND	traço	ND	ND	ND	ND
52	32.34	(-)-espatulenol	1673	ND	1.25	ND	ND	ND	ND
53	32.69	6-isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	1696	ND	1.15	ND	ND	ND	ND

54	32.90	β -guaïeno	1697	ND	traço	ND	ND	ND	ND
55	33.41	2,2,7,7-tetrametiltriciclo [6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one	1713	ND	0.46	ND	ND	ND	ND
56	33,92	2(1H)naftalenone, 3,5,6,7,8,8a-hexahidro-4,8a-dimetil-6-(1-metiletenil)	1732	ND	1,15	ND	ND	ND	ND
57	34.12	ácido acético, 7-isopropenil-1,4a-dimetil-3-oxo-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidronaftalen-2-il ester	1740	ND	0,09	ND	ND	ND	ND
58	34.16	oxide-[2] aromandendrene	1762	ND	traço	ND	ND	ND	ND
59	34.78	8-oxo-9H-cicloisolongifolene	1765	ND	2.09	ND	ND	ND	ND
60	35.08	valeral	1776	ND	0,41	ND	ND	ND	ND
61	35.94	metil hinokiate	1827	ND	1,20	ND	ND	ND	ND
Total (%)					82.19	92.58	96.43	97.58	94.15
Terpenos					48.51	69.53	87.9	93.8	79.11
Álcoois / Aldeídos					19.66	18.99	7.22	3.124	11.54
Cetona					4.66	0.06	0.41	0.25	3.27
Outros					9.36	4.00	0.90	0.41	0.23

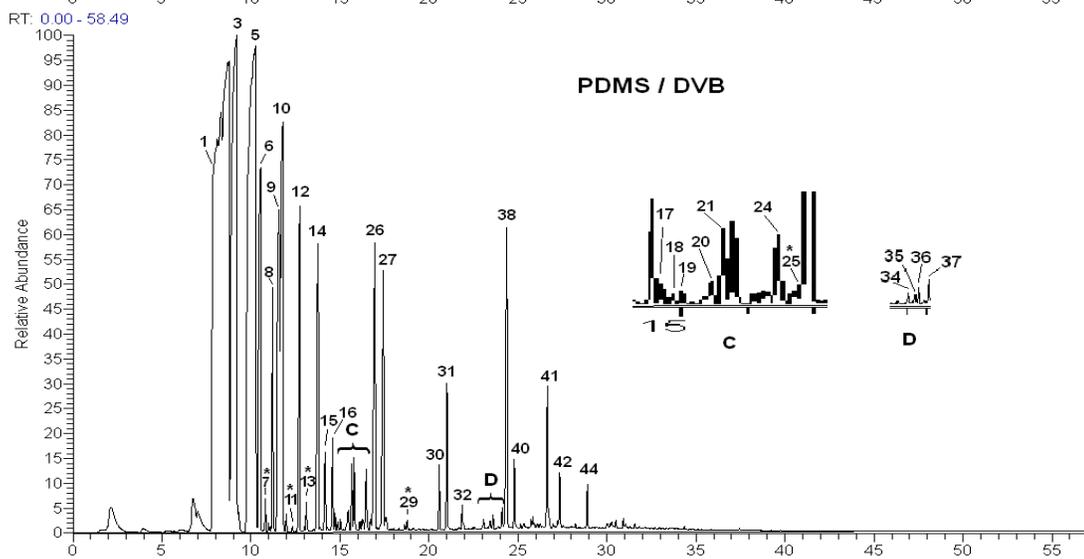
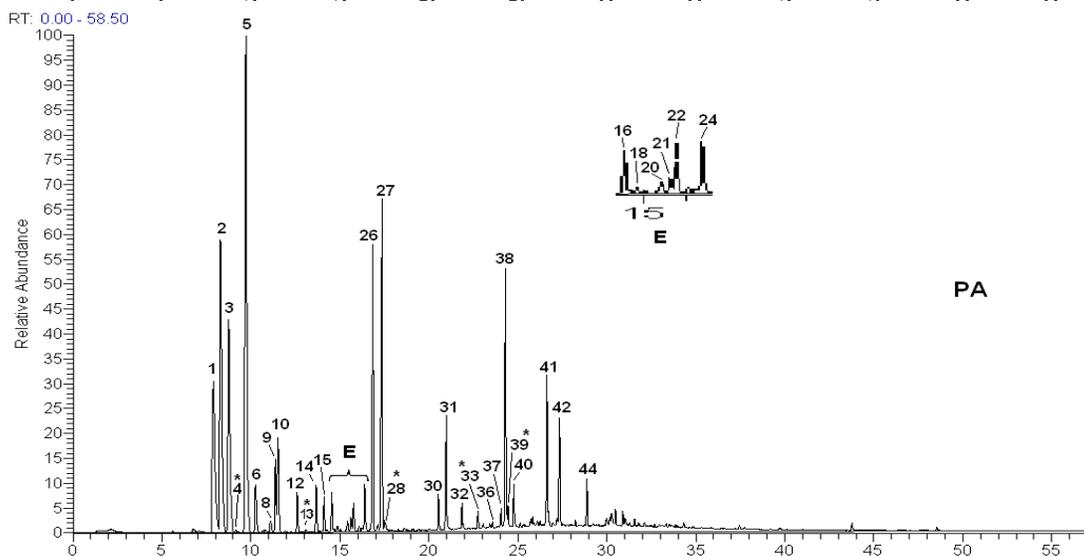
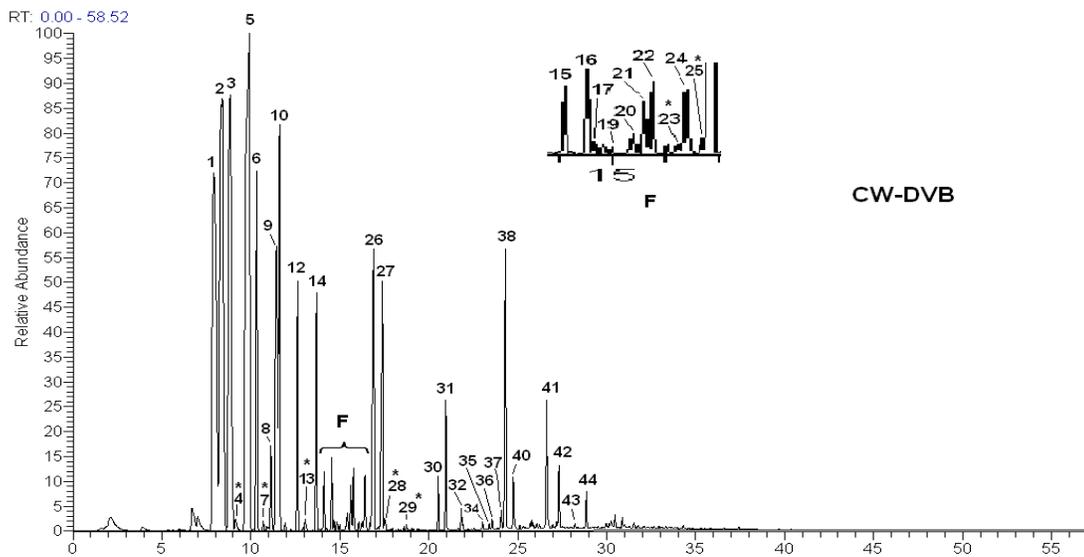
RT-tempo de retenção, IK- Índice de Kovats calculado, IK*-índice de Kovats tabelado, PA – fibra poliacrilato 85 μ m; PDMS/DVB – polidimetilsiloxano/divinilbenzeno 65 μ m; PDMS – polidimetilsiloxano 100 μ m; CW/DVB – carbowax/ divinilbenzeno 85 μ m. ND – não detectado.

SPME é uma técnica de extração não exaustiva,² na qual uma fibra óptica de sílica revestida por materiais sorventes / adsorventes é exposta ao *headspace* acima da amostra ou na qual a fibra é imersa na fase aquosa. A extração dos analitos pode ser atribuída às suas características associadas ao revestimento da fibra. Fibras de revestimento não polares, tais como PDMS, são mais adequadas para análises de compostos não polares, PDMS/DVB (fibra bi-polar) é aplicada para voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade e poliacrilato (PA) (fibra polar) para extração de compostos voláteis de média a alta polaridade.^{3,7} Para todas as fibras o tempo de extração foi curto para evitar saturação do revestimento devido à alta volatilidade dos compostos. Assim evitou-se a saturação do detector do espectrômetro de massas. Um total de 61 compostos foram identificados e comparados ao IK para óleo puro e composição de voláteis. A composição do óleo avaliada foi de 87,59 %, na qual para o perfil de voláteis realizado com as fibras de SPME foi acima de 92 %.

O perfil cromatográfico obtido para os voláteis do óleo com as fibras PDMS e PDMS/DVB são muito similares no início do cromatograma, onde para os compostos tricicleno e α -pineno existentes não houve boa separação. As fibras CW/DVB e PA em geral mostraram melhores resultados na extração para compostos de baixo peso molecular à

moderadamente alto. Compostos de alta massa molar do óleo compreendidos entre os tempos de 30 e 47min não foram extraídos pelas fibras devido ao curto tempo de extração ou por não serem voláteis (Figura 33).

Através do uso da SPME para extração dos voláteis foi possível a identificação de alguns compostos que não foram detectados no óleo por GC-MS. Estes foram o 2,3,4 – trimetil - 2 - ciclopenteno - 1 - one; α -felandreno; 3-careno; trans-*p*-menta - 2,8 -dienol; pinocanfone; 3-pinanone; verbenone; 1,3,3 - trimetil - 2 - (2 – metil - ciclopropil) -ciclohexeno; 2,4 diisocianato – 1 - metilbenzeno e (6 – hidroximetil - 2,3 -dimetilfenil) metanol. As fibras PA e CW/DVB foram seletivas para extração dos compostos pinocanfone, 2,4 diisocianato – 1 - metilbenzeno e (6 – hidroximetil - 2,3 -dimetilfenil) metanol, aparecendo somente nestes cromatogramas (Figura 33). Terpenos estão em maiores concentrações para todas as análises, seguidos de álcoois/aldeídos e cetonas. A Figura 34 expõe estes resultados.



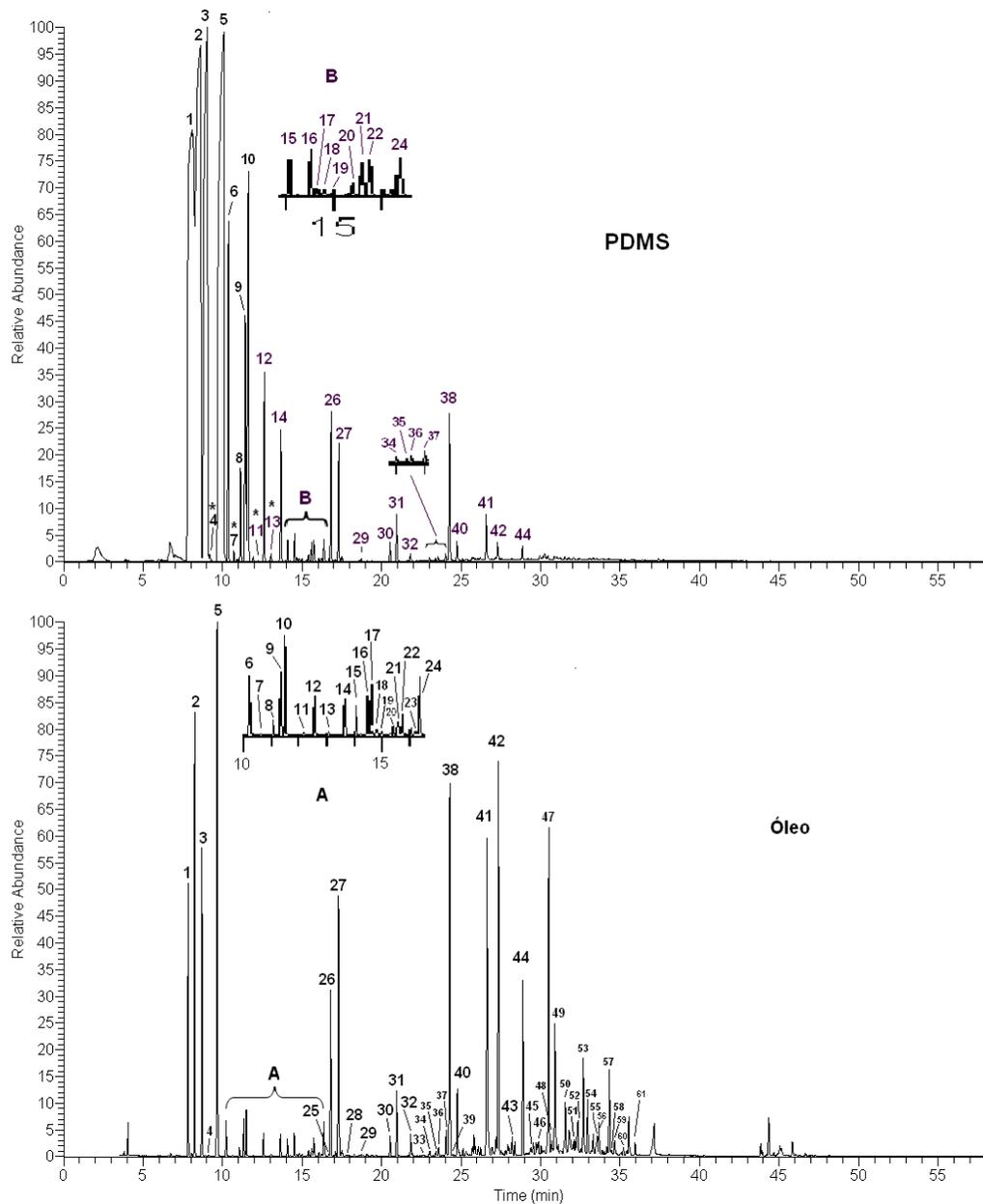


Figura 33: Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo obtido por GC-MS e voláteis determinados por HS-SPME-GC-MS da *J. ribifolia*. Nota: * compostos identificados somente na fração de voláteis do óleo: [4] 2,3,4-trimetil-2-ciclopenten-1-one; [7] α -felandreno; [11] 3-careno; [13] trans-*p*-menta-2,8-dienol; [23] pinocanfone; [25] 3-pinanone; [28] verbenon; [29] 1,3,3-trimetil-2-(2-metil-ciclopropil)-ciclohexeno; [33] 2,4 diisocianato-1-metilbenzeno e [39] (6-hidroximetil-2,3-dimetilfenil) metanol.

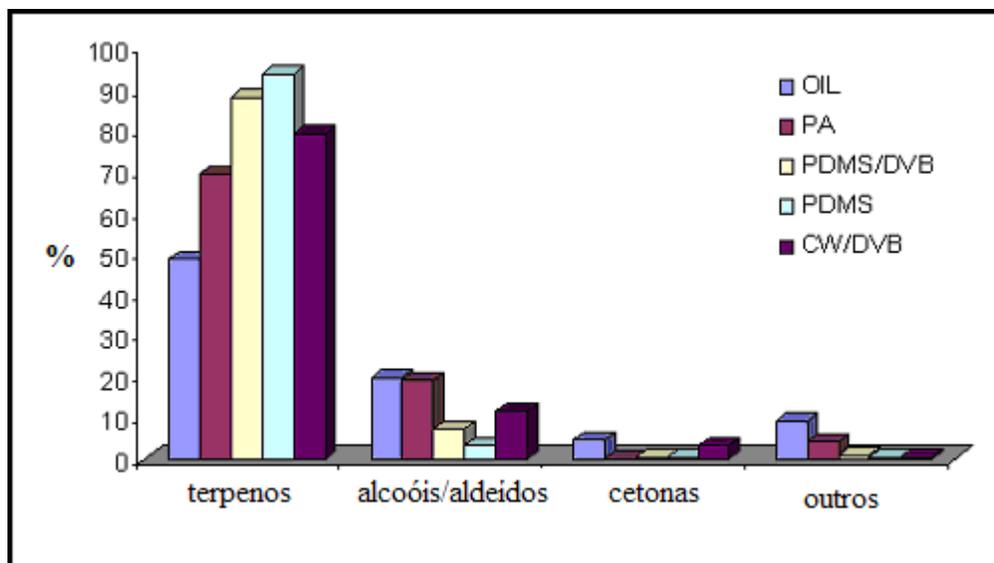


Figura 34: Porcentagem da composição das classes químicas majoritárias para óleo e fração de voláteis da *J. ribifolia* (Pohl) Baill.

3.4 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a descrever os compostos e os voláteis do óleo essencial das raízes da *J. ribifolia*, realizados por GC-MS e HS-SPME-GC-MS. Relativo à composição química da planta pode-se concluir que o óleo é principalmente representado por compostos terpênicos, álcoois e aldeídos. A técnica de SPME mostrou o perfil da composição química dos voláteis do óleo essencial. De acordo com os resultados obtidos, pode-se propor que estudos envolvendo SPME em óleos voláteis são mais eficientes e seguros quando são empregadas fibras com diferentes características, pois tais fibras podem fornecer perfis cromatográficos distintos do óleo bruto e também apresentar diferentes entre elas. Notou-se através do procedimento utilizado que as fibras foram mais eficientes na extração dos compostos monoterpênicos, ocorrendo significativa distinção do perfil obtido para o óleo do obtido para as fibras, evidenciados no caso de compostos como o triciclono, α -pineno, canfeno, β -pineno e β -mirceno, que apresentaram maior concentração no perfil cromatográfico para todas as fibras de SPME.

No caso dos sesquiterpenos o óleo bruto apresentou maior concentração destes compostos, revelando também discrepâncias entre o óleo e as fibras utilizadas para as análises.

Sesquiterpenos como β -vatireno, α -gurjuneno, espatulenol, dehidro-aromadendreno, [4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo (6.2.1.0(3.8)0(3.9))undecanol] e 8S-*cis*-5(1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilideno), foram significativamente mais abundantes no perfil cromatográfico do óleo bruto. Além destas verificações, alguns compostos presentes em nível de traços tiveram as identificações dificultadas em algumas fibras de SPME devido ao curto tempo de extração, como por exemplo, o sesquiterpeno 4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol, que apresentou um teor de 6.64 % no óleo, mas não foi detectado na extração com a fibra CW/DVB. O mesmo ocorre com o fenilpropanoide isoeugenol metil éter, com um teor de 8.54 %. Conclui-se que a fibra CW/DVB foi a que extraiu o maior número de compostos e apresentou melhor separação dos mesmos, fornecendo um perfil cromatográfico com melhor definição dos picos, sendo então a fibra mais eficiente para extração dos voláteis do óleo da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.

3.5 REFERÊNCIAS:

1. AHMADI F, SADEGHI S, MODARRESI M, ABIRI R, MIKAELI A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. Food and Chemical Toxicology, v.48, 1137-1144, 2010.
2. ARTUR CL, PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Analytical Chemistry. 62, 2145-2148, 1990.
3. AUGUSTO F, KOZIEL J, PAWLISZYN J. Design and validation of portable SPME devices for rapid field air sampling and diffusion based calibration. Analytical Chemistry. 73, 481-486, 2001.
4. AUGUSTO F, VALENTE ALP. Microextração por Fase Sólida. Química Nova, v.23, 4, 2000.
5. BENYELLES B, ALLALI H, DIB ME, DJABOU N, TABTI B, COSTA J. Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots: Comparative study using HS-SPME/GC/GC-MS and hydrodistillation techniques. Journal of Saudi Chemical Society, dez-2011.
6. CASTRO J, PÉREZ RA, SÁNCHEZ-BRUNETE C, TADEO JL. Analysis of pesticides volatilised from plants and soil by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. Chromatographia. 53, 361-365, 2001.

7. COELHO, E., FERREIRA, C., ALMEIDA, C. M. M. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 19:6, 1084-1097, 2008.
8. CORRO G, TELLEZ N, AYALA E, MARINEZ-AYALA A. Two-step biodiesel production from *Jatropha curcas* crude oil using SiO₂ HF solid catalyst for FFA esterification step. *Fuel*, v. 89:10, 2815-2821, 2010.
9. DEEBA F, KUMAR V, GAUTAM KSHIPRA, SAXENA RK, SHARMA DK. Bioprocessing of *Jatropha curcas* seed oil and deolid seed hulls for the production of biodiesel and biogas. *Biomass and bioenergy*, v.40, 13-18, 2012.
10. DEVAPPA RK, MAKKAR HP, BECKER K. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.90:12, 2090-2097, 2010.
11. FERHAT MA, MEKLATI BY, SMADJA J, CHEMAT F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*. v.1112, 121-126, 2006.
12. FERNANDES ES, RODRIGUES FA, TÓFOLI D, IMAMURA PM, CARVALHO JE, RUIZ ALTG, FOGGIO, MA, MINGUZZI S, SILVA RCL. Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophone terpenes from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill roots. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy*, 2012 (in press).
13. GOLMAKANI MT, REZAEI K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Analytical Methods*. v.109, 925-930, 2008.
14. HUANG B, LEI Y, TANG Y, ZHANG J, QIN L, LIU J. Comparison of HS-SPME with hydrodistillation and SFE for the analysis of the volatile compounds of *Zisu* and *Baisu*, two varietal species of *Perilla frutescens* of Chinese origin. *Food Chemistry*. v.125, 268-275, 2011.
15. KOSTER EHM, WEMES C, MORSINK JB, JONG GJ. Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography. *Journal Chromatography B*, v.739, 175-182, 2000.
16. KUMAR VP, CHAUHAN NS, PADH H, RAJANI M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacol*, v. 107, 182-188, 2006.
17. MARIZ SR, ARAÚJO MST, CERQUEIRA GS, ARAÚJO WC, DUARTE JC, DINIZ MFFM, MEDEIROS IA. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, 213-216, 2008.

18. MEURER EC, TOMAZELA DM, SILVA RC, AUGUSTO F, EBERLIN MN. Fiber introduction mass spectrometry: Fully direct coupling of solid-phase microextraction with mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 74, 21, 5688-5692, 2002.
19. MORET S, BARP L, GROB K, CONTE LS. Optimized off-line SPE–GC–FID method for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in vegetable oil *Food Chemistry*, v. 129:4-15, 1898-1903, 2001
20. NARAIN N, GALVÃO MS, MADRUGA MS. Volatile compounds captured through purge and trap technique in caju-umbu (*Spondias* sp.) fruits during maturation. *Food Chemistry*. v. 102: 3, 726-731, 2006.
21. PAOLINI J, LEANDRINI C, DESJOBERT JM, BARBONI T, COSTA J. Comparison of liquid–liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species. *Journal of Chromatography A*, v. 1193: 1-2, 37-49, 2008.
22. PIMENTEL LA, RIET-CORREA B, DANTAS AF, MEDEIROS RMT, Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. *Toxicon*, 59, 587-591, 2012.
23. POURMORTAZAVI SM, HAJIMIRSADEGHI SS. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography*, v.1163, 2-24, 2007.
24. RAM SG, PARTHIBAN KT, KUMAR RS, THIRUVENGADAM V, Paramathma M. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v.55:803-809, 2008.
25. SABANDAR CW, AHMAT NJ, SAHIDIN I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*, 2012 (in press).
26. SILVA RC, AGUIAR PMS, AUGUSTO F. Coupling of dynamic headspace sampling and solid phase microextraction. *Chromatographia*. v.60, 11-12, 687-691, 2004.
27. SILVA RC, EBERLIN MN. Faster and simpler determination of chlorophenols in water by fiber introduction mass spectrometry. *Analítica Chimica Acta*. 620, 97-102, 2008.
28. SILVA RC, MEURER EC, EBERLIN MN, AUGUSTO F. Determination of phthalates in water using fiber introduction mass spectrometry. *Analyst*. v.130: 2, 188-192, 2005.
29. WU J, LEE HK. Injection Port Derivatization Following Ion-Pair Hollow Fiber-Protected Liquid-Phase Microextraction for Determining Acidic Herbicides by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.78, 7292-7301, 2006.

30. YEE KF, LEE KT, CECCATO R, ABDULLAH AZ. Production of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil catalyzed by SO₄²⁻/ZrO₂ catalyst: Effect of interaction between process variables. *Bioresource Technology*, v. 102: 5, 4285-4289, 2011.

CAPÍTULO IV
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ALBÚMEN DA
SEMENTE DA *J. ribifolia* (Pohl) Baill

4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ALBÚMEN DA SEMENTE DA *J. RIBIFOLIA* (POHL) BAILL.

¹Celia Eliane de Lara da Silva, ²Willian Ferreira da Costa, ¹Sandro Minguzzi, ¹Rogério César de Lara da Silva, ¹*Euclésio Simionatto

¹Centro de Pesquisas Tecnológicas do Estado de Mato Grosso do Sul (CPTREM), Pós-graduação em Recursos Naturais (PGRN), Departamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, rua Emílio Masculli, 275, 79950-000, Naviraí – MS.

²Complexos e Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP), Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Av. Colombo, 5790, Jd Universitário, 87020-900, Maringá - PR.

*The author correspondence: euclésio@uems.br

RESUMO: A espécie *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill pertence à família Euphorbiaceae, sendo conhecida por ser altamente oleaginosa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos do albúmen da semente desta espécie. Os lipídios foram extraídos por Soxhlet e submetidos à esterificação com KOH/MeOH (2 mol L⁻¹), e analisados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID). Os principais ácidos determinados foram o mirístico (0,61 %), palmítico (4,81 %), esteárico (5,60 %), oléico (9,99 %) e o linoléico representando (72,82 %). Os resultados mostraram um predomínio de ácidos graxos insaturados no óleo do albúmen da *J. ribifolia*.

PALAVRAS-CHAVE: albúmen, pinhão-rasteiro, lipídios.

ABSTRACT: The *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill species belongs to the family Euphorbiaceae, are known to be highly oilseeds. The objective of this study was to evaluate the fatty acid profile of the albumen of the seed of this species. Lipids were extracted by sohxlet and submitted to esterification with KOH / MeOH (2 mol L⁻¹), and analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The main acids determines were myristic (0.61 %), palmitic (4.81 %), stearic (5,60 %), oleic (9.99%) and linoleic acids (72.82 %) representing the major

compound. The results showed a predominance of unsaturated fatty acids in the oil albumen *J. ribifolia*.

KEY-WORDS: albumen, creeping pinion, lipids.

4.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill., é uma planta nativa, encontrado no cerrado do Mato Grosso do Sul e também em regiões de clima seco do nordeste. Pertence à família Euphorbiaceae, gênero *Jatropha*, cujas espécies são resistentes e adaptáveis em diferentes tipos de solo, suas sementes são facilmente propagáveis, podendo ser usadas para recuperar áreas degradadas e erosadas. São importantes pelas propriedades medicinais e pelo alto teor de óleo, é o caso da *J. podagrica*, *J. molíssima*, *J. curcas* e *J. gossypipholia*.^{1,2,3,23} O óleo extraído das sementes dessas espécies são importantes comercialmente, tanto para produção de biodiesel como outros produtos. Os resíduos da semente da *J. curcas* podem ser usados como fertilizantes e gerador de energia através da combustão da casca da semente.^{5,6}

A *J. ribifolia*, espécie pouco conhecida, é uma planta aromática, com propriedades medicinais, usada na medicina tradicional, na forma de xarope feito com as folhas para problemas tópicos.¹⁸ As raízes possuem óleos essenciais, conhecida como “minâncora do campo” pelo odor forte e refrescante, é usada na forma de extrato para gastrites e ferimentos em geral. Estudos em animais mostraram alta toxicidade das folhas,¹⁴ e raízes contendo sesquiterpenos (jatrofona e ácido ciperenóico), com forte ação antitumoral.⁷

A busca por novas oleaginosas, como alternativas sustentáveis e menos poluentes para biocombustíveis, visto que a principal fonte de energia, o petróleo, é uma fonte esgotável e altamente nociva ao meio ambiente, é de extrema importância.⁸ Pesquisas têm mostrado resultados promissores com várias espécies não só da *Jatropha* como de outras plantas, para produção de biocombustíveis.^{10,11}

Outra finalidade para sementes oleaginosas está relacionada à composição química dos ácidos graxos existentes para nutrição humana.¹² Ácidos graxos possuem cadeias hidrocarbônicas lineares com quatro ou mais átomos de carbono, algumas ramificadas, com

um grupo carboxílico numa extremidade e um radical metil na outra. Os ácidos graxos podem ser saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), presença de uma dupla ligação e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), duas ou mais ligações duplas. Os AGPI são classificados de acordo com o número de carbonos, duplas ligações e suas posições, sendo os com 12 à 18 carbonos mais importantes. Os AGPI possuem três grupos importantes, o ômega-3, originado do ácido alfa-linolênico (ALA), ômega-6, derivado do ácido linoleico (LA) e o ômega-9 que tem sua origem no ácido oleico.²¹ São muitos os benefícios dos ácidos graxos insaturados ao organismo, como proteção do sistema cardiovascular, pela ação antitrombótica e anti-inflamatória, ação hipotensora, podendo está estar relacionada à regulação do tônus vascular, aumento da excreção de sódio e síntese de óxido nítrico.^{4,19} Age como dislipidêmico, reduzindo os triglicérides, diminuição dos moduladores do processo imune e inflamatório, inibindo a proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e citocinas, sendo eficazes em processos inflamatórios crônicos, como doenças reumáticas, e ainda podem agir como estimulantes da resposta imunológica.^{13,15,16,17} O ômega-3 contribui no desenvolvimento cerebral do feto durante a gestação e da visão.²⁰

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a composição química de ácidos graxos do albúmen da semente da *J. ribifolia*, através da extração, esterificação e identificação por GC-FID.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coletas da Planta

Os frutos da *Jatropha ribifolia* foram coletados na região de Naviraí-MS, em região de pastagem, localizado a 10 km da rodovia entre as cidades de Naviraí e Jutí – MS. Sua identificação foi comprovada por comparação a dados literários existentes, sendo sua excicata registrada no Instituto de Botânica de São Paulo sob número CGMS 31.481.^{7,21} Os frutos coletados foram levados ao laboratório de química orgânica da unidade de Naviraí - UEMS, e separados do fruto o albúmen (0,132 g) para extração do material graxo.

4.2.2 Extração do material graxo

A extração do material graxo foi realizada por aparelho de Soxhlet por um período de 4 horas com solvente hexano à quente sob refluxo. Após extração o solvente mais material graxo foi coletado e o hexano evaporado em evaporador rotatório sob vácuo e banho Maria a 60° C controlados. Após evaporação o material graxo foi coletado, pesado e acondicionados em frascos próprios para posterior esterificação e análise cromatográfica.²²

4.2.3 Transesterificação

A transesterificação dos ácidos graxos foi realizada conforme método 5509 ISO (1978).⁸ Aproximadamente 100 µL de óleo extraído do albúmen foi transferido para tubo de ensaio, adicionados 1,0 mL de hexano para solubilização do óleo com agitação. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de KOH 2 mol L⁻¹ em metanol, e a mistura submetida à agitação vigorosa em vortex até a obtenção de separação das fases.⁹ Após a separação de fases, a fase superior foi transferida para frascos próprios e 2 µL foram injetados no cromatógrafo a gás.

4.2.4 Cromatografia Gasosa (CG)

Para análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos, um cromatógrafo a gás HP-5890 SÉREI II, equipado com software “N2000”, com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida ZB-WAX (60 m, 0,25mm e 0,25 µm d. i. 100% etilenoglicol, Zebron, EUA) foi utilizado. A vazão dos gases foram de 1,2 mL min⁻¹ para o gás de arraste (N₂), e para formação da chama 30 mL min⁻¹ de gás H₂, e 300 mL min⁻¹ de ar sintético. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80. A programação da rampa foi de 140 °C por 5 min. seguidos com elevação de 5°C/min. até 200 °C e mantido por 12 minutos, e elevação de mais 5 °C/min. a 235 °C por mais 45 min.

Dois microlitros do óleo transesterificado foram injetados e a identificação dos ésteres metílicos realizada por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos de uma mistura padrão contendo 37 compostos (Sigma-Aldrich). O percentual dos principais ácidos graxos existentes foi avaliado.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo obtido do albúmen da *J. ribifolia* apresentou uma leve coloração amarelo claro. O rendimento da extração foi de 38,4% (50,3 mg) para extração do albúmen, utilizando o método proposto.

A determinação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com o dos ésteres metílicos de mistura padrão contendo 37 compostos (Sigma-Aldrich). O percentual de cada ácido graxo foi calculado pela normalização total das áreas obtidas do cromatograma através da seguinte equação:

$$\%N = \frac{Ac_{tr}}{\sum Ac_{total}}$$

Onde: %N é a porcentagem obtida; Ac_{tr} = é área obtida do ácido graxo no tempo de retenção; Ac_{total} = área total do cromatograma obtido.

A reação de transesterificação realizada por uma base forte (KOH) em metanol converte os ácidos graxos livres e os ácidos ligados ao glicerol em ésteres metílicos. Estes podem ser analisados por cromatografia à gás, devido à diminuição de sua pressão de vapor proporcionando sua evaporação. A Figura 35 pode-se observar o cromatograma para o óleo obtido do albúmen da *J. ribifolia* obtido por GC-FID.

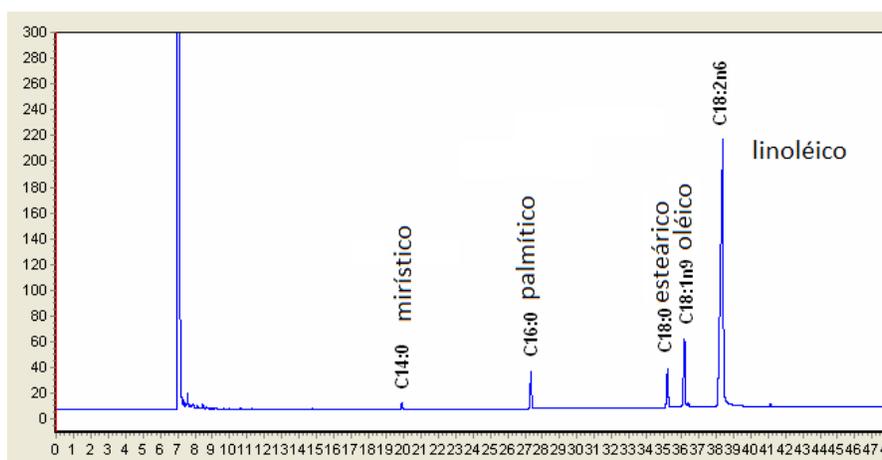


Figura 35- Perfil cromatográfico para ácidos graxos obtidos do óleo do albúmen da *J. ribifolia*, analisados por GC-FID.

A Tabela 6 mostra o percentual dos principais ácidos graxos para *J. ribifolia* comparados a outras duas espécies de *Jatropha*, a *curcas* e *gossypifolia*.

Tabela 6 - Percentual de ácidos graxos do óleo da *J. ribifolia* (Pohl) Baill.

Fórmula estrutural	Ácido graxo	Percentual <i>J. ribifolia</i>	Percentual^a <i>J. gossypifolia</i>	Percentual^b <i>J. curcas</i>
C14:0	Mirístico	0,61	0,05	0,05
C16:0	Palmítico	4,81	12,72	14,90
C18:0	Estearíco	5,60	7,83	5,73
C18:1n9	Oléico	9,99	19,96	45,98
C18:2n6	Linoléico	72,82	55,18	30,57
	Total	93,83	95,74	97,23
	Outros	6,17	4,26	2,77
Ácidos graxos saturados		11,02	20,6	20,68
Ácidos graxos insaturados		82,81	75,14	76,55

^a – Reis & Silva (2012)¹⁵, ^b – Xavier & Silva (2009)²⁴

O perfil de ácidos graxos da semente da *J. ribifolia* apresentou três ácidos graxos principais saturados e dois insaturados, sendo o linoléico com maior percentual (72,82%). Observa-se principalmente uma diferença para o palmítico, oléico e linoléico entre as três espécies estudadas, onde a *J. ribifolia* apresentou um alto teor de linoléico e um baixo teor de oléico.

4.4 CONCLUSÃO

O perfil de ácidos graxos para sementes da *J. ribifolia* não é encontrado em literatura. Este se mostrou com diferenças em sua composição quando comparado a outras duas espécies de *Jatropha*. O principal ácido graxo encontrado foi o linoléico com 72,82 %, sendo este percentual mais que o dobro quando comparado ao óleo da *J. curcas*.

Esta composição mostra-se muito interessante para estudos futuros visando seu melhor aproveitamento como alimento após desintoxicação, pois o mesmo é rico em ácidos graxos que desempenham importantes funções na fisiologia humana como o ácido linoléico, que não pode ser sintetizado pelo nosso organismo, portanto sendo necessária sua ingestão. A *J. ribifolia* também pode exibir potencial na produção de biodiesel, uma vez que se buscam fontes alternativas de biocombustível como fontes alternativas de energia.

4.5 REFERÊNCIAS:

1. ANDRADE PMM, CARMO MGT. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Revista Mn-Metabólica*, v.8:3, 135-43, 2006.
2. BORGES KA, BATISTA ACF, RODRIGUES HS, TERRONES MH, VIEIRA AT, OLIVEIRA MF. Production of methyl and ethyl biodiesel fuel from pequi oil (*Caryocar brasiliensis* Camb.). *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*, v.48:2, 83-89, 2012.
3. CALDER PC, ALBERS R, ANTOINE JM, BLUM S, BOURDET-SICARD R, FERNS GA, ET AL. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *O British Journal of Nutrition*, v.101:1, 1-45, 2009.
4. CICERO AFG, ERTEK S, BORGHI C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: their potential role in blood pressure prevention and management. *Current Vascular Phannacology*, v.7, 330-7, 2009.
5. CONTRAN N, CHESSA L, LUBINO M, BELLAVITE D, ROGGERO PP, ENNE G. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: from sowing to biodiesel and by-products. *Industrial Crops and Products*, v. 42, 202-215, 2012.
6. DIN JN, NEWBY DE, FLAPAN AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease - fisrung for a natural treatment. *BMJ*. v.328, 30-5, 2004.
7. FERNANDES ES, RODRIGUES FA, TÓFOLI D, IMAMURA PM, CARVALHO JE, RUIZ ALTG, FOGLIO MA, MINGUZZI S, SILVA RCL. Isolation, structural identification and cytotoxic activity of hexanic extract, cyperenoic acid, and jatrophone terpenes from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill roots. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy*, 2012 (in press).
8. ISO – International Organization for Standardization. Animal and vegetables fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids. Method ISO 5509, 1987.
9. IUPAC. Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. IUPAC Method 2.301. Report of IUPAC Working Group WG 2/87. Blackwell Scientific Publications, 7 ed., 1987.
10. JINDAL S, GOYAL K. Evaluation of performance and emissions of *Hibiscus cannabinus* (Ambadi) seed oil biodiesel. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v.14:4, 633-639, 2012.
11. KAFUKU G, LEE K T, MBARAWA M. The use of sulfated tin oxide as solid superacid catalyst for heterogenous transesterification of *Jatropha curcas* oil. *Chemical Papers*, v.64, 734–740, 2010.

12. KRATZEISTEISEN M, MULLER J. Suitability of *Jatropha* seed shells as fuel for small-scale combustion units. *Renewable Energy*. v. 51, 46-52, 2013.
13. OPENSHAW K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19, 1-15, 2000.
14. PIMENTEL LA, RIET-CORREA B, DANTAS AF, MEDEIROS RMT, RIET-CORREA F. Poisoning by *Jatropha ribifolia* in goats. *Toxicol*, v.59, 587-591, 2012.
15. REIS JM, SILVA RCL. Estudo da composição e citotoxicidade dos óleos essenciais e ácidos graxos da *J. gossypifolia* L. Trabalho de conclusão de curso. UEMS-Navirai, 2012.
16. SALEM N JR. Introduction to polyunsaturated fatty acids. *Background*, v.3:1, 1-8, 1999.
17. SHUCHRDT U, SERCHELI R, VARGAS M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal Brazilian Chemical Society*, v.9:1, 199-210, 1998.
18. SILVA TS, FREIRE EMX, Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu*, v.12:4, 427-435, 2010.
19. TEIXEIRA JPF, Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha Sp.*, *Bragantia: Campinas*, v.46:1, 151-157, 1987.
20. VALENZUELA AB, NIETO SK. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista Chilena de Pediatría*, v.74, 149-57, 2003.
21. VASCONCELOS GCL, MEDEIROS KAAL, MEDEIROS NI, DE LUCENA AMA, ARRIEL NHC. Caracterização morfológica comparativa de *Jatropha curcas* L., *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. e *Jatropha gossypifolia* L. II Congresso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão-manso. Brasília-DF, 2011.
22. VISAVADIYA NP, SONI B, DALWADI N. Free radical scavenging and antiatherogenic activities of *Sesamum indicum* seed extracts in chemical and biological model systems. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, 2507, 209.
23. WATT JM, Breyer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2. ed. E.& S. Livingstone, Edinburgh and London, 1962, 1457p.
24. XAVIER ME, SILVA RCL. Perfil de ácidos graxos do óleo de *Jatropha curcas* L. por cromatografia gasosa. Trabalho de conclusão de curso. UEMS-Navirai, 2009.

25. ZAMBOM MA, SANTOS GT, MODESTO EC. Importância das gorduras poliinsaturadas da saúde humana. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia. v.547, 553-7, 2004.
26. ZUCHI C, AMBROSIO G, LUSCHER TF, LANDMESSER U. Nutraceuticals in cardiovascular prevention: lessons from studies on endothelial function. Cardiovascular Therapeutics, v.28:4,187-201, 2010.

APÊNDICE

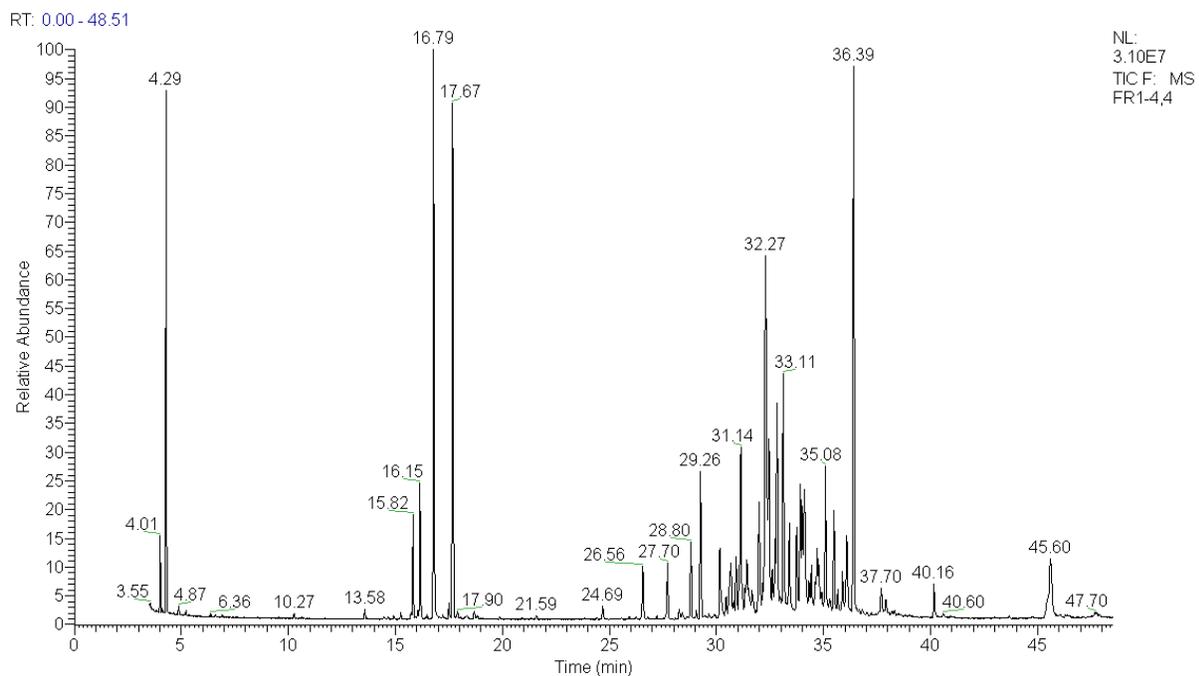


Figura 36 - Cromatograma de íons totais da fração 1 obtido por GC-MS

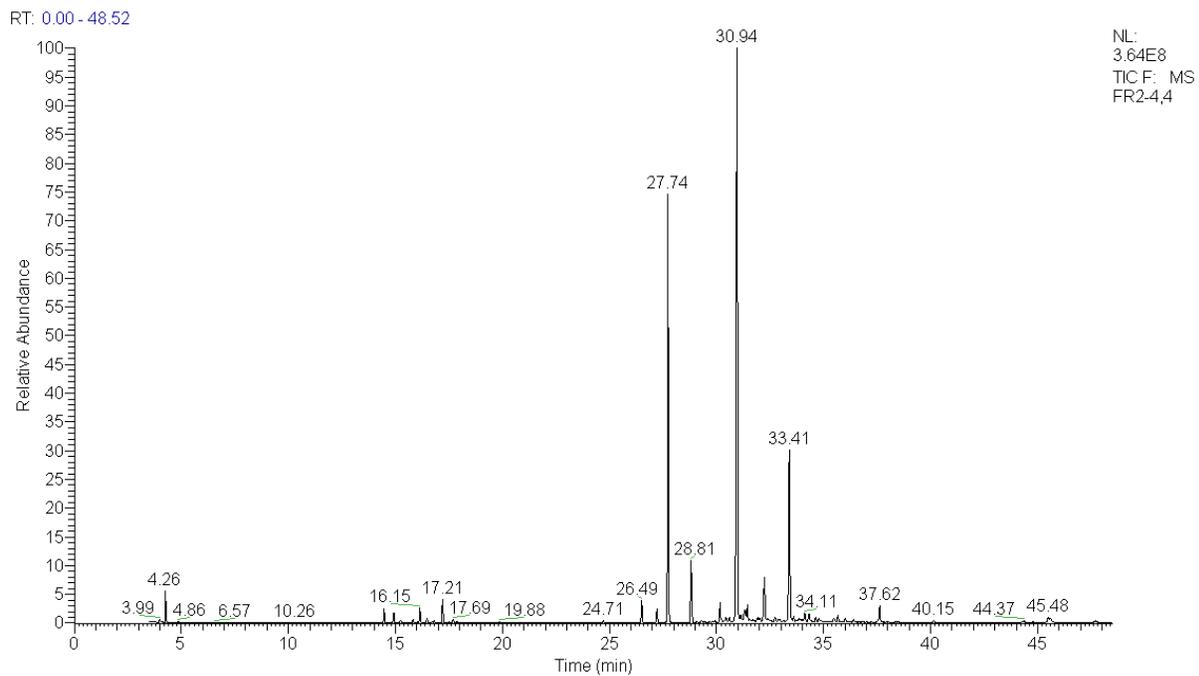


Figura 37 - Cromatograma de íons totais da fração 2 obtido por GC-MS

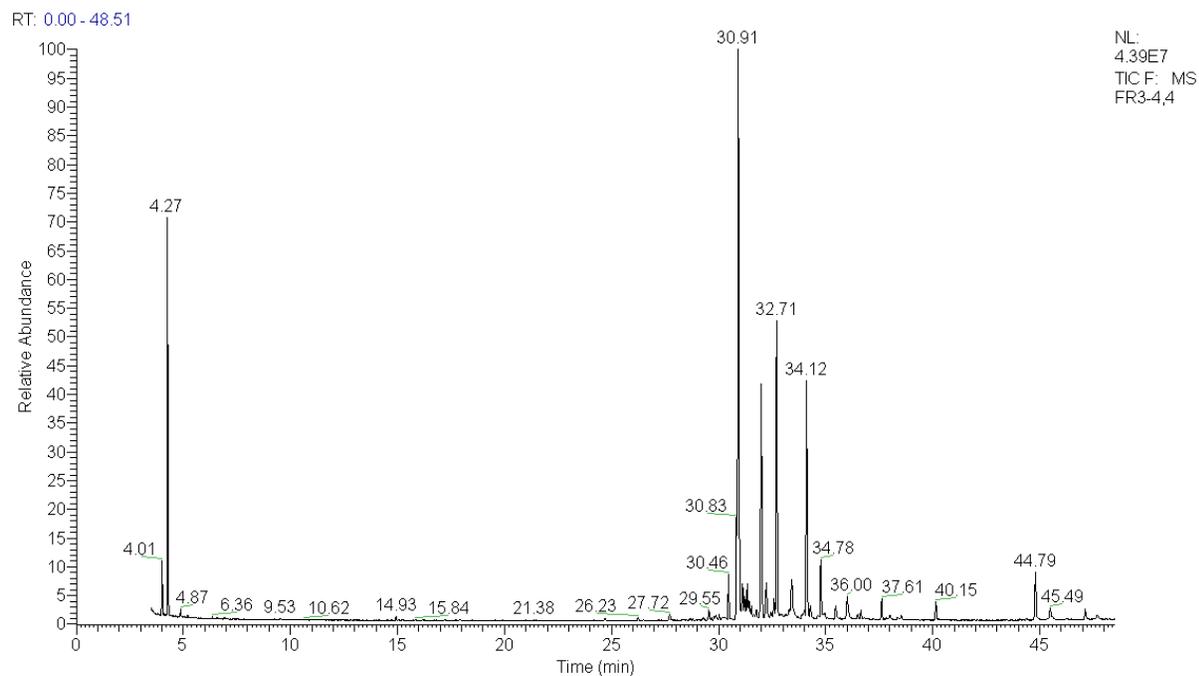


Figura 38 - Cromatograma de íons totais da fração 3 obtida por GC-MS

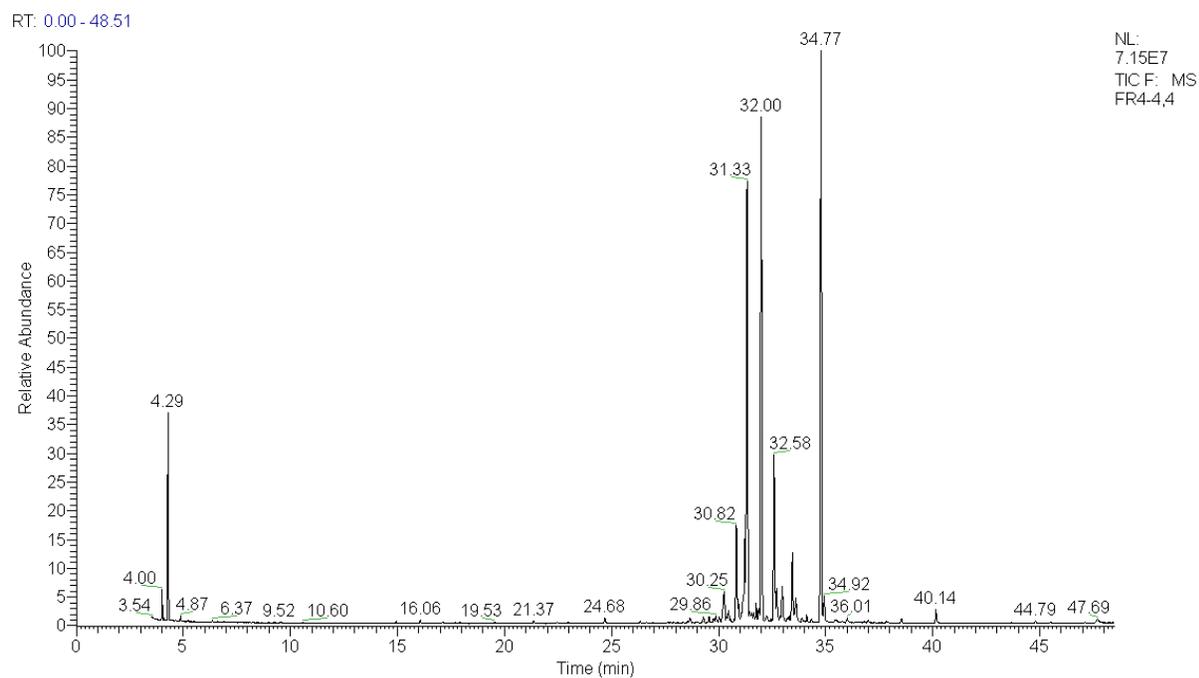


Figura 39 - Cromatograma de íons totais da fração 4 obtida por GC-MS

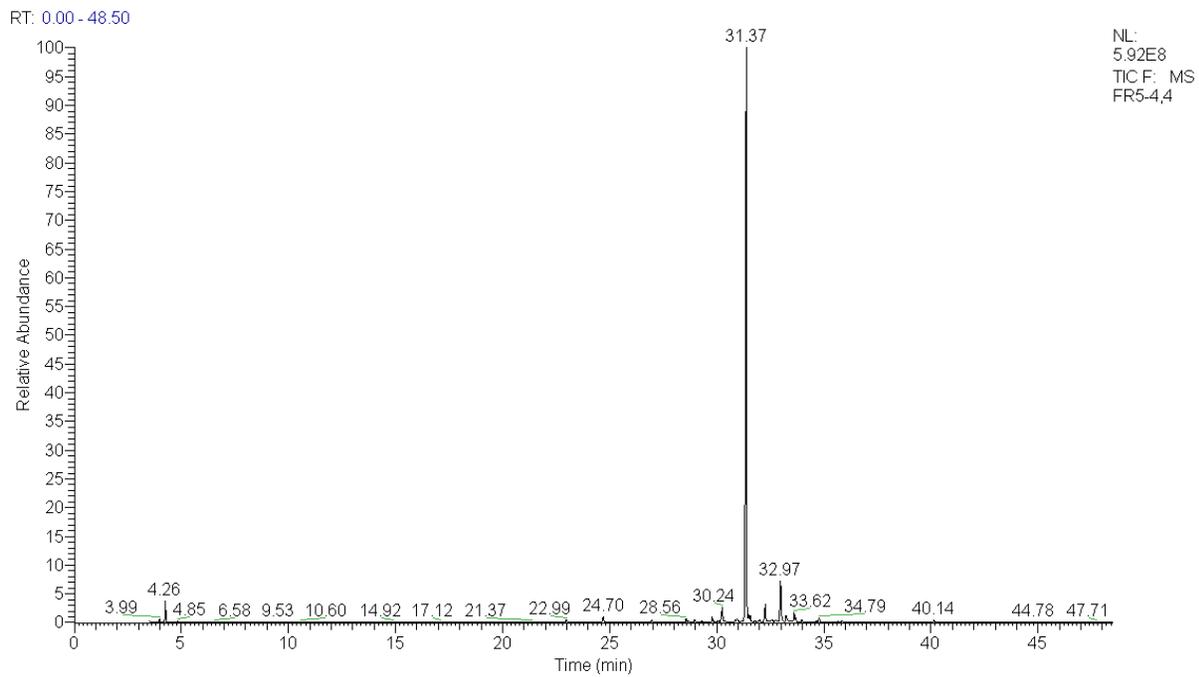


Figura 40 - Cromatograma de íons totais da fração 5 obtido por GC-MS

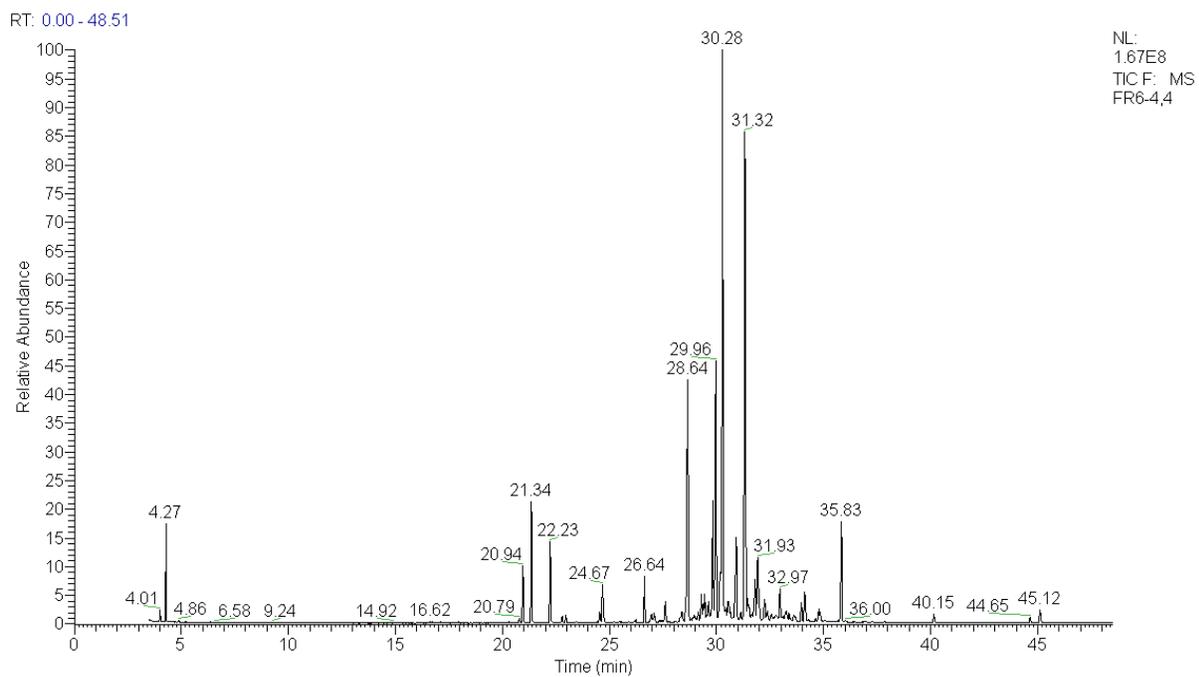


Figura 41 - Cromatograma de íons totais da fração 6 obtido por GC-MS

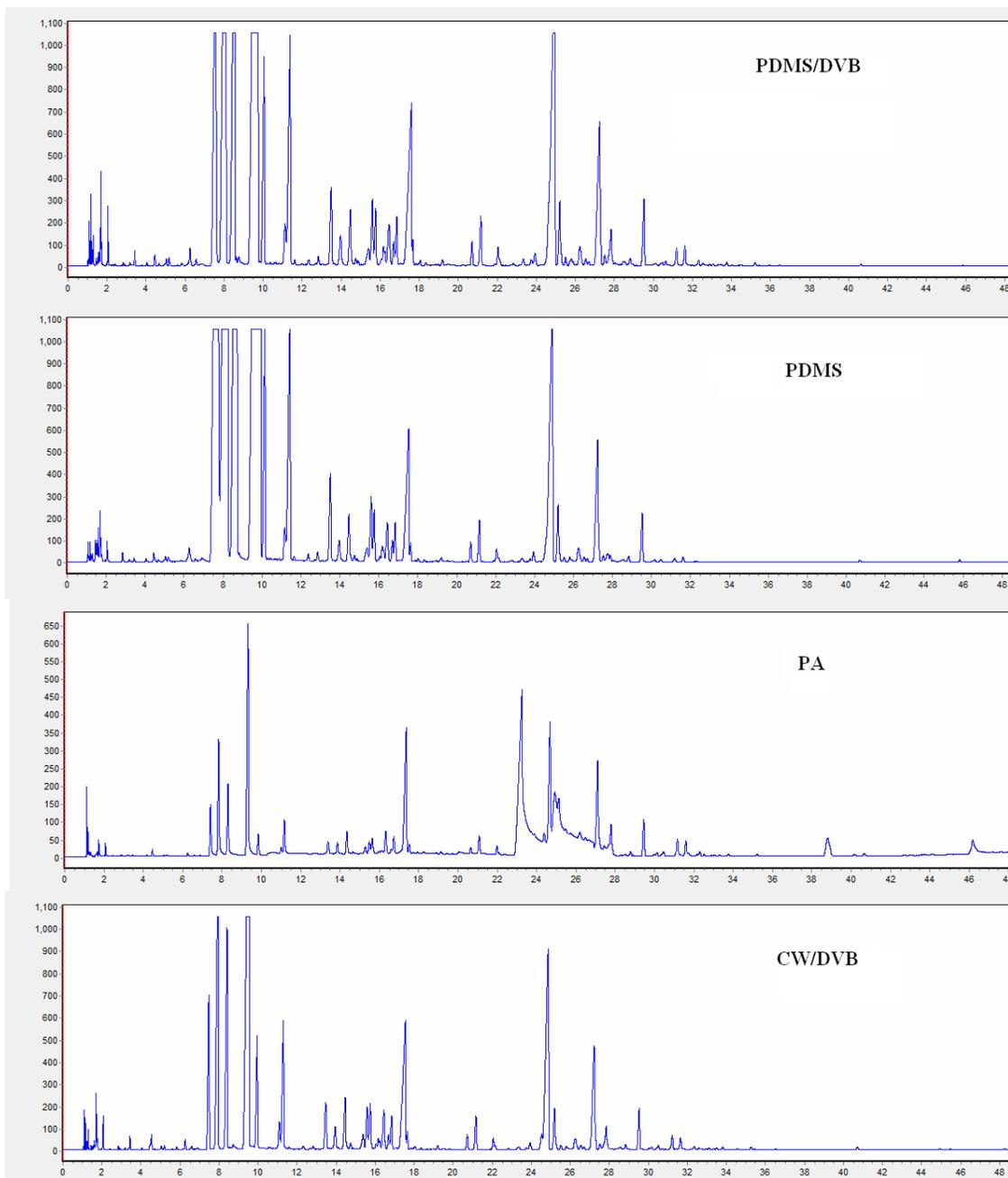


Figura: 42: Avaliação do perfil cromatográfico de voláteis do óleo essencial da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill obtido por HS-SPME-GC-MS. Fibras: polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm , poliacrilato (PA) 85 μm , polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 μm e Carbowax/DVB (CW/DVB) 85 μm .

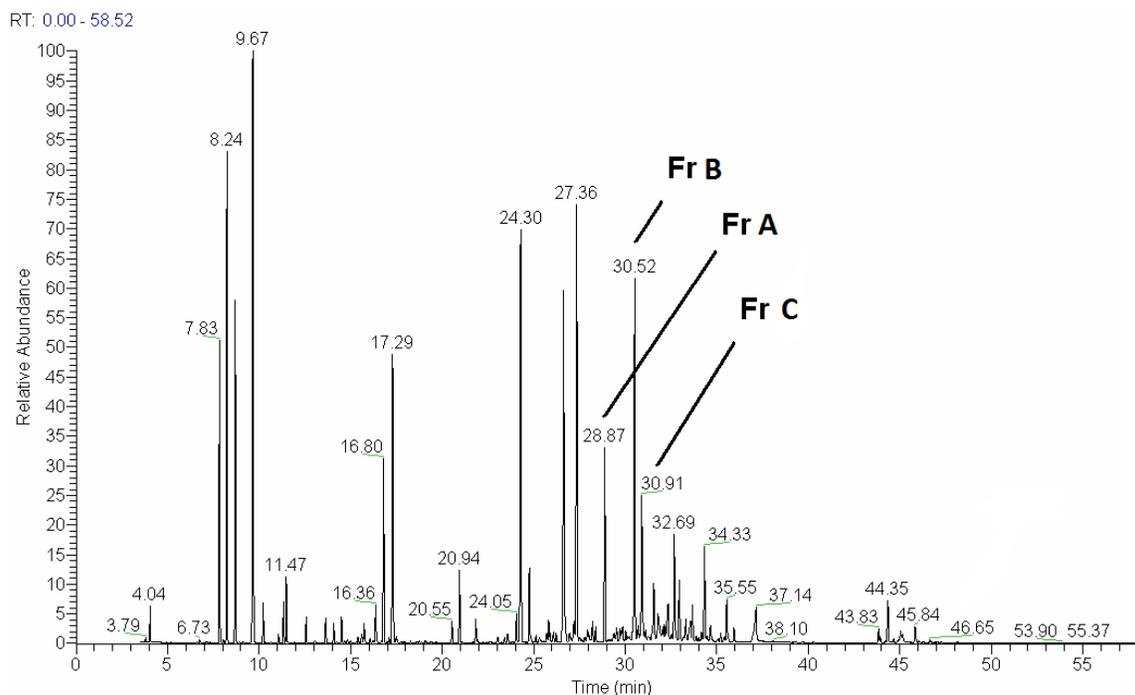


Figura 43: Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo essencial obtido por GC-MS e compostos isolados de frações obtidas por CCD. Fr A- dehidro-aromadendreno, Fr B- [4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo (6.2.1.0(3.8)0(3.9))undecanol], Fr C-(8S-cis)-5(1H)-azulenone,2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilidene).

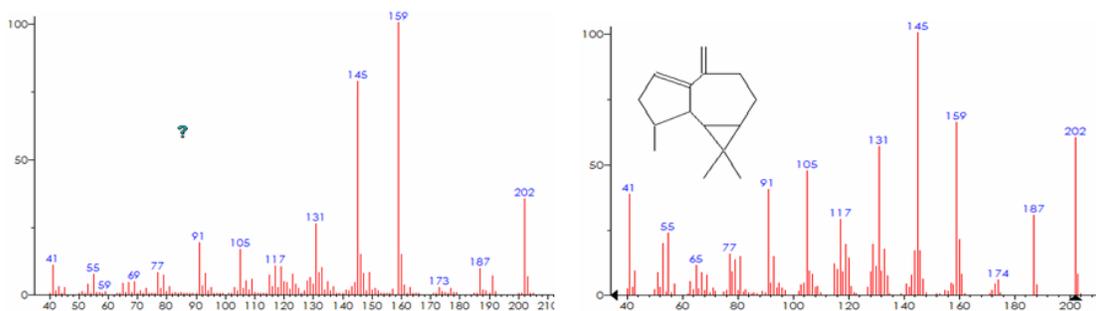
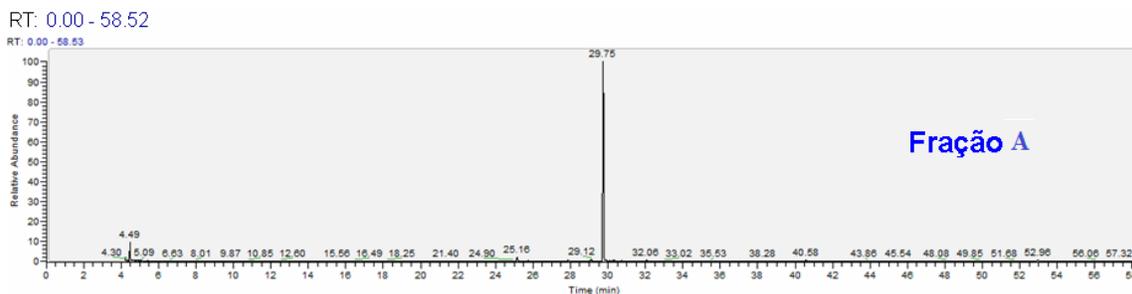


Figura 44: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração 1 isolada do óleo essencial por CCD. Compostos sugerido: Dehidro aromadendrene.

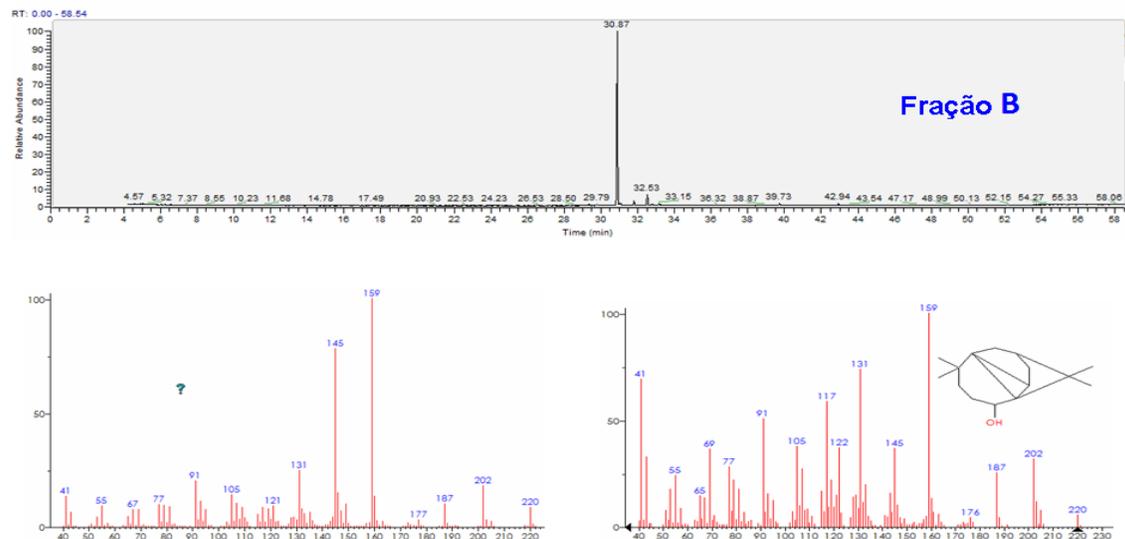


Figura 45- Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração C isolada do óleo essencial por CCD. Compostos sugerido: [4,4,11,11-tetrametil-7-tetraciclo(6.2.1.0(3.8)0(3.9))undecanol].

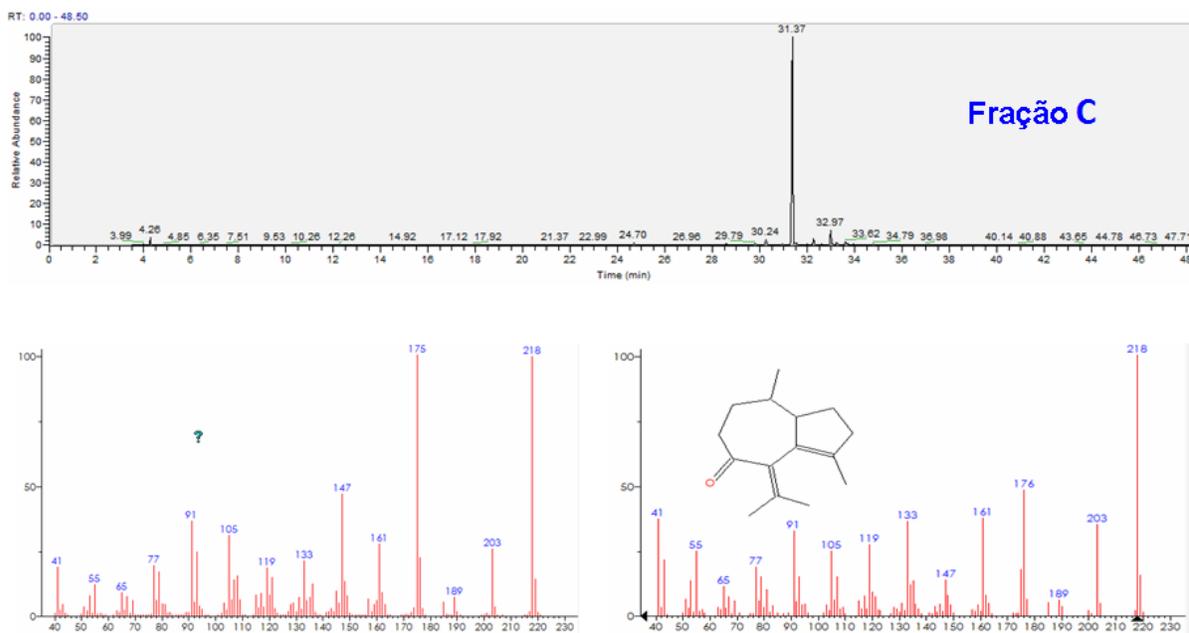


Figura 46: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS e comparação dos espectros de massas para o composto e biblioteca para fração 2 isolada do óleo essencial por CCD. Compostos sugerido:(8S-cis)- 5(1H)-azulenone, 2,4,6,7,8,8a-hexahidro-3,8-dimetil-4-(1-metiletilidene)

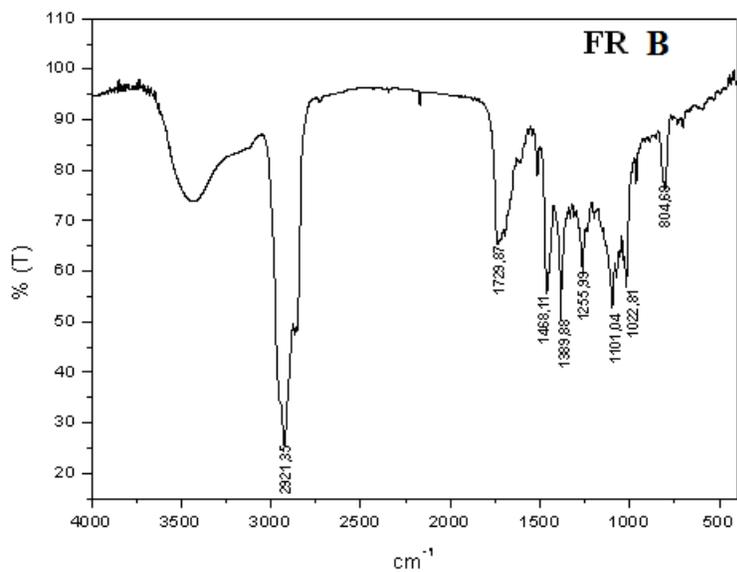


Figura 47: Espectro de infra-vermelho para Fração B isolada do óleo da *J. ribifolia* por CCD. Bandas características de carbonila (C=O) em 1715 cm⁻¹, para alcanos (CH) em 2921,35 e alcanos (CH₃) em 1398,88, bandas de ligação C=C do anel aromático em 1486,11 cm⁻¹ e um CH₂ alifático em 804,68.