



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA**

JACIELE DE AMORIM SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FITOEXTRAÇÃO DE ESPÉCIES
COLETADAS NA MINA DO SOSSEGO – CANAÃ DOS CARAJÁS E ESTUDO
FITOQUÍMICO DA *Jatropha curcas* L.**

Marabá

2015

JACIELE DE AMORIM SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FITOEXTRAÇÃO DE ESPÉCIES
COLETADAS NA MINA DO SOSSEGO – CANAÃ DOS CARAJÁS E ESTUDO
FITOQUÍMICO DA *Jatropha curcas* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial do título de
Licenciada Plena em Química, Faculdade de
Química, Universidade Federal do Sul e
Sudeste do Pará, orientado pela Prof^a Dr^a
Simone Yasue Simote Silva

Marabá

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca II da UNIFESSPA. CAMAR, Marabá, PA

Silva, Jaciele de Amorim

Avaliação do potencial de fitoextração de espécies coletadas na Mina do Sossego – Canaã dos Carajás e estudo fitoquímico da *Jatropha curcas* L. / Jaciele de Amorim Silva ; orientadora, Simone Yasue Simote Silva. — 2015.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura em Química, Marabá, 2015.

1. Química vegetal - Canaã dos Carajás (PA). 2. Fitoquímicos. 3. Biotecnologia farmacêutica. 4. Pinhão-manso. 5. *Escherichia coli*. I. Silva, Simone Yasue Simote, orient. II. Título.

CDD: 19. ed.: 581.19098115

JACIELE DE AMORIM SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FITOEXTRAÇÃO DE ESPÉCIES
COLETADAS NA MINA DO SOSSEGO – CANAÃ DOS CARAJÁS E ESTUDO
FITOQUÍMICO DA *Jatropha curcas* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial do título
de Licenciatura Plena em Química,
Faculdade de Química, Universidade
Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Data da Apresentação: 03 de fevereiro de 2015

Conceito:

Banca examinadora

Prof^a Dr^a. Simone Yasue Simote Silva
Faculdade de Química/Unifesspa – Orientadora

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva
Faculdade de Química/Unifesspa – Membro

Prof.Dr.Alcy Favacho Ribeiro
Faculdade de Química/Unifesspa - Membro

À minha família, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida, em especial aos meus pais João Pereira da Silva e Semari Silva do Nascimento. Aos meus irmãos Janiele de Amorim Silva, Joicyelle de Amorim Silva, Jaomara Nascimento da Silva e João Pereira da Silva Júnior, pelo amor, amizade e por todas as renúncias que fizeram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida! Por guiar meus passos e por sempre estar presente.

À Nossa Senhora, por ser minha intercessora junto ao Pai!

A todos os meus familiares em especial meus pais e irmãos.

As minhas amigas e irmãs de coração que encontrei em Marabá: Chiscaulen Ribeiro Ramos, Leudiane da Paz Monteiro, Marisa Andrade da Silva, Jessica Neves da Silva e Thaianne Alves Lopes. Por termos caminhado juntas por esses quatro anos de graduação e por todas as vezes que precisei de vocês e sempre fui atendida, por me fazerem entender o real significado da palavra amizade.

Ao meu namorado/amigo João Paulo Cunha que é mais um anjo que conheci em Marabá que foi de grande importância nessa reta final da minha graduação e pelo incentivo de continuar me apoiando para as próximas etapas dos meus objetivos e por sua dedicação, cuidado, ajuda e carinho para comigo.

A pesquisadora e orientadora Prof^a Dr^a Simone Yasue Simote Silva, pela atenção e serenidade, bem como pela orientação neste trabalho.

Ao professor Dr. Sebastião da Cruz Silva sempre disponível e atencioso para a orientação experimental, pelos ensinamentos adquiridos no decorrer da graduação quando tive dificuldade.

A todos os professores da graduação em Licenciatura Plena em Química pelos ensinamentos transmitidos, em especial ao professor Dr Alcy Favacho Ribeiro, pela contribuição dada a este trabalho.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Química Orgânica/Unifesspa.

Aos professores Dr Andrey Moacir do Rosário Marinho e Dr^a Patrícia Santana Barbosa Marinho e aos alunos de pós-graduação de Belém por colaborarem para a realização deste.

A Faculdade de Engenharia de Materiais, por conceder o Laboratório.

Ao Francisco Carlos Lima Silva pela ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos de Capanema, que apesar da distância sempre se lembravam de mim, me deram força e muito apoio para que eu não me sentisse tão sozinha.

A CAPES, PAPIM e FAPESPA pelas bolsas concedidas no decorrer da minha graduação.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
FIGURA 1 – Estruturas de alguns antibióticos produzidos pelas plantas -----	20
FIGURA 2 – A planta <i>Jatropha curcas</i> L.(pinhão manso)-----	22
FIGURA 3 – Bacteria <i>Escherichia coli</i> -----	25
FIGURA 4 – Bactéria <i>Bacillus subtilis</i> -----	26
FIGURA 5 – Procedimento de maceração dos vegetais -----	31
FIGURA 6 – Resultado positivo para taninos em todas as partes das plantas -----	43
FIGURA 7 – Resultado positivo para catequinas na raiz-----	44
FIGURA 8 – Resultado positivo para flavonoides na raiz-----	44
FIGURA 9 – Resultado positivo para esteroides e triterpenoides em todas as partes das plantas.-----	45
FIGURA 10 – Resultado positivo para depsídeos -----	45
FIGURA 11 – Resultado positivo para cumarina -----	46
FIGURA 12 – Resultado positivo para saponinas-----	46
FIGURA 13 – Espectro de RMN ¹ H mistura dos esteróidessitosterol e estigmasterol-----	47
FIGURA 14 – Estruturas química da mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol-----	48
FIGURA 15 – Espectro de RMN ¹³ C extrato Pi.E.R.4 -----	49
FIGURA 16 – Esqueletos de triterpenos do tipo lupano (a), ursano (b) e oleanona (c).-----	50
FIGURA 17 – Espectro de RMN ¹ H Pi.E.R.4-----	51
FIGURA 18 – Espectro RMN ¹ H expandido Pi.E.R.4-----	52
FIGURA 19 – Estrutura da α - amirina -----	53

LISTA DE FLUXOGRAMA

	p.
FLUXOGRAMA 1 – <i>Screnning</i> fitoquímico	34
FLUXOGRAMA 2 – Fracionamento do extrato Pi.E.R	35
FLUXOGRAMA 3 – Fracionamento da Pi.E.R.5	36

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	p.
TABELA1 – Identificação dos pontos de GPS-----	28
TABELA 2 – Dados das espécies coletadas-----	29
TABELA 3 – Faixa crítica do metal cobre na biomassa das plantas-----	39
TABELA 4 – Resultado fitoquímico para as respectivas espécies-----	42
TABELA 5 – Dados de RMN1H e RMN13C da substância Pi.E.R.4, CDCl3-----	54
QUADRO 1 - Extratos submetidos ao ensaio biológico frente à bactéria <i>B.subtilis</i>	55
QUADRO 2 - Extratos submetidos ao ensaio biológico frente à bactéria <i>E. coli</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

AcOEt	Acetato de Etila
B.	<i>Bacillus</i>
BHI	Infuso Cérebro Coração
CCD	Cromatografia em camada delgada
E.	<i>Escherichia</i>
Hex	Hexano
IV	Infravermelho
MeOH	Metanol
p.	Página
PA	Pará
Pi.E.R	Extrato etanólico do pinhão raíz
Pi.E.R.4	Extrato etanólico do pinhão fração 4
Pi.E.R.5	Extrato etanólico do pinhão fração 5
Pi..E.R.5.7	Extrato etanólico do pinhão raíz isolada da fração5
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniletrozólico
UFC	Unidade Formadora de colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
Unifesspa	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
UV	Ultravioleta
°C	Grau Celsius
Cm	Centímetro
Ø	Diâmetro
%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
G	Gramma
H	Altura

Kg	Quilograma
mL	Militros
nm	Nanômetro
Δ	Descolamento químico
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
ppm	Parte por milhão

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	16
2 – OBJETIVOS	18
2.1 – OBJETIVO GERAL	18
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 – PRODUTOS NATURAIS	19
3.2 – <i>Jatropha Curcas</i> L.	21
3.3 – BACTERIAS	23
3.3.1 – <i>Escherichia coli</i>	25
3.3.2 – <i>Bacillus subtilis</i>	26
4 – PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1 – MATERIAIS	27
4.2 – EQUIPAMENTOS	27
4.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
4.3.1 – Coleta do material botânico	28
4.3.2 – Moagem dos vegetais	28
4.3.3 – Dados das plantas	28
4.3.4 – Análise química das plantas	30
4.3.5 – <i>Screnning</i> fitoquímico	30
4.3.5.1 – Obtenção do extrato para realização do <i>screnning</i> fitoquímico	30
4.3.5.2 – Utilizando água destilada como solvente	31
4.3.5.2.1 – Polissacárideos	31
4.3.5.2.2 – Taninos	32
4.3.5.3 – Utilizando metanol como solvente	32
4.3.5.3.1 – Catequinas	32
4.3.5.3.2 – Flavonoides	32
4.3.5.3.3 – Sesquiterpelactonas e outras Lactonas	32
4.3.5.4 – Utilizando clorofórmio como solvente	32
4.3.5.4.1 – Esteroides	33
4.3.5.4.2 – Carotenoides	33
4.3.5.5 – Utilizando éter etílico como solvente	33
4.3.5.5.1 – Depsídeos e Depsidonas	33
4.3.5.5.2 – Derivados de Cumarina	33

4.3.5.5.3 – Saponina Espumídica	33
4.3.6 – Estudo Fitoquímico	34
4.3.6.1 – Fracionamento do extrato Pi.E.R	34
4.3.6.2 – Fracionamento da Pi.E.R.5	36
4.3.7– Ensaio Antimicrobianos	36
4.3.7.1– Ativação das bactérias	37
4.3.7.2– Padronização das culturas	37
4.3.7.3– Preparo da amostra.....	37
4.3.7.4 – Ensaio para medir a concentração mínima inibitória (MIC)	37
4.3.7.5 – Tipos de atividades.....	38
5 – RESULTADO E DISCUSSÃO	39
5.1 – ANÁLISE QUÍMICA DAS PLANTAS	39
5.2 – SCREENING FITOQUÍMICO	41
5.3 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	47
5.3.1 – IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA Pi.R.5.7	47
5.4 – ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	55
5.3.1 – Ensaio antimicrobianos frente às bactérias.....	55
6 – CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

RESUMO

Jatropha curcas L. é constituído por 175 espécies tropicais e está inserido na família Euphorbiaceae, onde muitas espécies apresentam grande potencial químico e biológico por serem ricas em estruturas químicas e com atividades biológicas e farmacêuticas. Por meio da biotecnologia o homem vem há muito tempo explorando a produção de novas formas de utilização direta ou indireta dos vegetais. Vem sendo utilizada principalmente na área da saúde e há uma elevada descoberta de matérias-primas empregadas pela indústria farmacêutica que compõem espécies vegetais de todo tipo. Embora os princípios ativos que constituem os medicamentos sejam às vezes de processos químicos, há vários metabólitos secundários e antibióticos utilizados no controle de infecções bacterianas proveniente de espécies vegetais. As plantas também têm a capacidade de ajudar na despoluição de novos e antigos contaminantes que comprometem a saúde e a sustentabilidade do meio ambiente através da fitoextração. Sendo assim, este trabalho propôs-se avaliar o potencial de fitoextração de nove espécies coletadas na Minado Sossego/Canaã dos Carajás, através das análises da porcentagem de cobre presentes na biomassa destas. Em conjunto com a análise do *screening* fitoquímico dessas espécies, selecionou-se a *Jatropha curca* L., pois a mesma, além de apresentar potencial fitoextratora de cobre, também mostrou resultados positivos para diversas classes de substâncias. O extrato etanólico das raízes provenientes de *Jatropha curca* L. apresentou atividade bacteriostática frente à bactéria *Escherichia coli*. O estudo fitoquímico deste extrato permitiu a identificação de três substâncias: os esteroides sitosterol, estigmasterol e o triterpeno α -amirina.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L., fitoextratora e estudo fitoquímico

1 – INTRODUÇÃO

A parte dos avanços, a aplicada tem evoluído desde a antiguidade para achar novas respostas às crescentes necessidades humanas, tanto na alimentação como nas aplicações médicas, têxteis, industriais e como fonte de energia renovável. O papel das plantas na medicina expandiu-se para além de seu uso tradicional e contínuo na farmácia, para tratar de converter a várias espécies de plantas em fábricas de anticorpos monoclonais e outros compostos biofarmacêuticos. (NOGUEIRA, 2000 apud FARIA 2010).

Um dos mais importantes campos de aplicação da pesquisa é o da saúde. Uma elevada porcentagem das matérias-primas empregadas pela indústria farmacêutica se compõe de espécies vegetais de todo tipo, embora os princípios ativos que constituem os medicamentos sejam às vezes produto de processos químicos. (NOGUEIRA, 2000 apud FARIA2010).

Alcaloides, antibióticos, óleos essenciais, vitaminas e uma infinidade de outras substâncias de fundamental interesse terapêutico têm como fonte espécies plantas dos mais variados tipos. A importância econômica dos recursos obtidos do reino vegetal é inegável. O homem depende para a sua sobrevivência e bem estar de recursos naturais, os quais em grande parte provêm delas (NOGUEIRA, 2000 apud FARIA 2010).

A investigação preliminar de constituintes químicos representa, muitas vezes, um estímulo motivador da curiosidade, já que possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica a natureza das substâncias presentes, facilitando a escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico. (MATOS, 1971).

A população brasileira, de um modo geral, guarda um saber significativo a respeito de métodos alternativos de cura das doenças mais frequentes as comunidades tradicionais possuem uma bagagem maior sobre o assunto. (AMOROSO,1996).

Algumas plantas têm a capacidade de acumular em seus tecidos os contaminantes extraídos do solo, da água ou do ar, sem, no entanto, degrada-los. Esse processo de remediação é chamado de fitoextração (ANDRADE et al, 2007).

A fitoextração busca identificar os genes responsáveis e maximizar processos que ajudem na despoluição de novos e antigos contaminantes que comprometem a saúde e a sustentabilidade do meio ambiente. As tecnologias baseadas em uso de vegetais para remediação de solos contaminados são cada vez mais utilizadas em países desenvolvidos (ANDRADE et al, 2007).

O aquecimento global e suas consequências nos lembram de que providências urgentes precisam ser tomadas, a eliminação da vegetação e o aumento da poluição tem correlação inversa e tem ocorrido de forma concomitante, mas sem receber a devida atenção. A vegetação funciona como um filtro natural e sua eliminação provoca consequência desastrosa, seja diretamente na capacidade de remover/imobilizar/metabolizar rejeitos ou, indiretamente, na diminuição da diversidade da biota do solo (ANDRADE et al, 2007).

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de fitoextração de nove espécies coletadas na Mina do Sossego\Canaã dos Carajás, assim como realizar o *screening* fitoquímico dessas, para posterior estudo fitoquímico de uma delas.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o teor de cobre (Cu) de 16 espécies coletada Canaã dos Carajás-PA;
- ✓ Realizar *screening* fitoquímicos dessas espécies;
- ✓ Preparar extrato bruto da espécie selecionada;
- ✓ Realizar o estudo fitoquímico do extrato;
- ✓ Isolar e identificar os compostos;
- ✓ Realizar ensaios antimicrobianos dos extratos e das substâncias isoladas.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – PRODUTOS NATURAIS

Até meados do século XX, as plantas e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (MACHAD et al., 2007 apud FERNANDES 2012).

Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, oriundos de nada mais do que 90 espécies, na utilização na terapia moderna (SAXENA, 1983; TAVARES, 2002 apud FERNANDES 2012).

No advento do terceiro milênio, cerca de $\frac{3}{4}$ da população mundial dependem ainda dos poderes curativos das plantas, pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica (MEDEIROS, 1990; LANCHER, 2000 apud FERNANDES 2012).

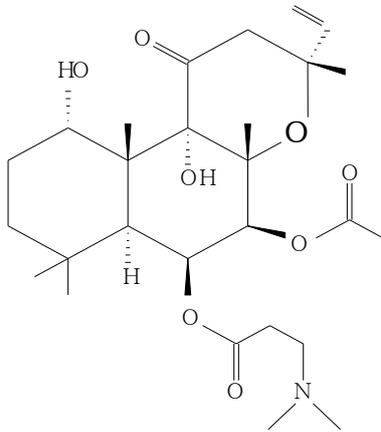
As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese (LANCHER, 2000 apud FERNANDES 2012).

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até os microrganismos patogênicos (MACHAD et al., 2007 apud FERNANDES 2012).

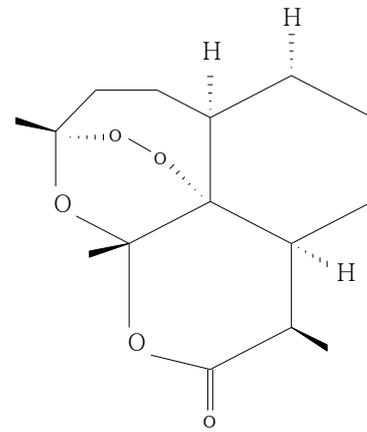
As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina. A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forscolina, o taxol e a

artemisinina, a representação estrutural, FIGURA 1. (MEDEIROS, 1990; LANCHER, 2000 apud FERNANDES 2012).

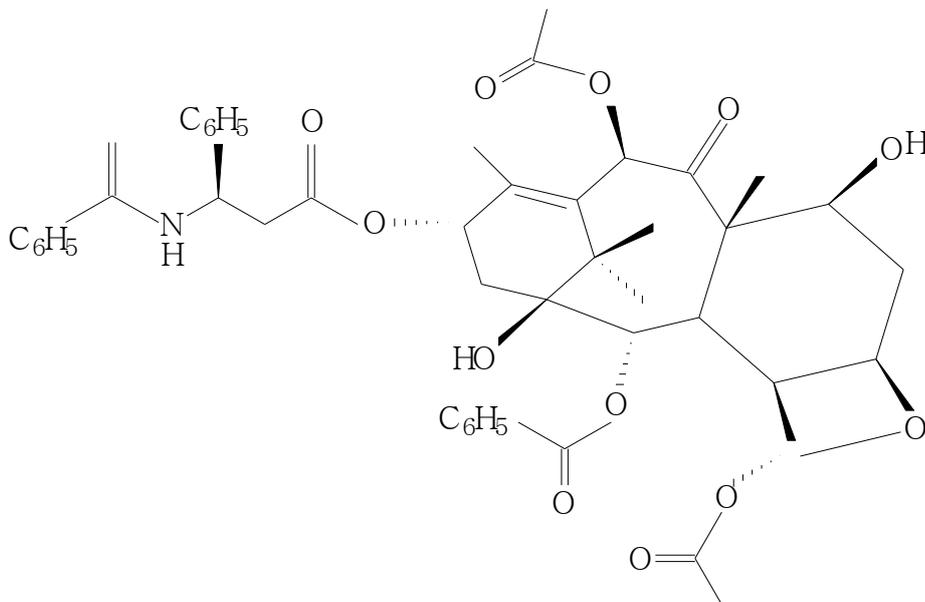
FIGURA 1 – Estruturas de alguns antibióticos produzidos pelas plantas



Forscolina



Artemisinina



Taxol

Fonte: MORIKAWA, 2007

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (LANCHER, 2000 apud FERNANDES 2012).

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo: botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MEDEIROS, 1990; LANCHER, 2000 apud FERNANDES 2012).

3.2 – *Jatropha Curcas* L.

Jatropha curcas L. popularmente conhecido como pinhão-mansão pertencem à família Euforbiácea, a mesma da mamona e mandioca. A família Euphorbiaceae compreende, aproximadamente, 8000 espécies, com cerca de 320 gêneros. O gênero *Jatropha* contempla, aproximadamente, 160 espécies de plantas herbáceas e arbustivas, variáveis quanto ao valor medicinal, valor ornamental e produção de óleo (WEBSTER, 1994 apud FERNANDES 2012).

O nome *Jatropha* deriva do grego iatrós (doutor) e trophé (comida), implicando as suas propriedades medicinais. *Curcas* é o nome comum para o pinhão-mansão em Malabar, Índia (NUNES, 2007 apud PEREIRA 2012).

O pinhão-mansão é também conhecido como pinhão do Paraguai, purgueira, pinha de purga, grão-de-maluco, pinhão-de-cerca, turba, tartago, medicineira, tapete, siclité, pinhão-do-inferno, pinhão bravo, figo-do-inferno, pião, pinhão-das-barbadas, sassi, dentre outros (Globo Rural, 2012).

É provável que o pinhão-mansão tenha a América Central como centro de origem e, foram os portugueses que o introduziram no Brasil. A espécie ocorre, atualmente, em vários continentes, nas zonas tropicais e subtropicais, tendo sido levado também pelos portugueses do Caribe às ilhas do Cabo Verde, de onde ocorreu sua distribuição pela África e Ásia (HELLER, 1996).

A espécie possui vasta distribuição geográfica devido a sua rusticidade e resistência à seca e às longas estiagens, adaptável às adversidades de solo e de clima, sendo seu desenvolvimento favorecido por altas temperaturas e umidade, como também por solos mais férteis. Sobrevive em condições adversas, mas com significativa redução da produção (RESENDE et al., 2009).

É um arbusto grande, decrescimento rápido, cuja altura normal é de dois a três metros, podendo alcançar até cinco metros em condições especiais. O diâmetro do tronco atinge aproximadamente 20 cm; possui caule liso de lenho mole; floema com longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex; possuem raízes curtas e pouco ramificadas, o tronco é dividido desde a base, em compridos ramos, com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca, as quais ressurgem logo após as primeiras chuvas, FIGURA 2, (Globo Rural, 2012).

FIGURA 2 – A planta *Jatropha curcas* L(pinhão manso)



Fonte: Embrapa Meio-Norte – PI

As plantas de pinhão-manso são tradicionalmente plantadas visando o controle de erosão, a recuperação de áreas degradadas, a contenção de encostas e de dunas, e ao longo de canais, rodovias, ferrovias, e como cerca viva em divisões internas ou nos limites de propriedades rurais (SARTUNINO et al, 2000).

Na medicina doméstica, o látex da planta é aplicado como cicatrizante, hemostático e também como purgante. As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele. São eficazes também contra o reumatismo e possui poder anti-sifilítico. As sementes, bem como o óleo retirado destas, são frequentemente usadas como purgativo, no tratamento de afecções da pele, hidropisia, gota, paralisia e reumatismo, principalmente nos países tropicais (Globo Rural, 2006).

O pinhão-manso é considerado uma espécie produtora de óleo e, também, usada na fabricação caseira de sabão. Seu maior atributo, entretanto, é o alto teor de óleo produzido pelas sementes, com 27 a 35%, podendo frutificar por mais de 40 anos (SARTUNINO et al, 2006).

Além disso, a torta que resta é um fertilizante rico em nitrogênio, potássio, fósforo e matéria orgânica. Desintoxicada, a torta pode também ser transformada em ração, como tem sido feito com a torta de mamona. A casca dos pinhões pode ser usada como carvão vegetal e matéria-prima na fabricação de papel (HELLER, 1996).

O gênero *Jatropha* L. é constituído por 175 espécies tropicais e subtropicais (WEBSTER, 1994), onde muitas espécies apresentam grande potencial químico e biológico por serem ricas em estruturas químicas e com atividades biológicas e farmacêuticas. Estudos anteriores já indicaram a presença de metabolitos secundários tais como: Taninos, Alcaloides e Saponinas, compostos de defesa química cujo efeito é dependente da dosagem, sendo caracterizados principalmente por sua função anti-herbívora, precipitando proteínas no trato intestinal dos herbívoros, ou mesmo apresentando função hemolítica, atividade exclusiva das saponinas (SARTUNINO et al, 2000).

Nas espécies deste gênero constatou-se ainda a presença de ricina, uma toxalbumina que causa vômitos, diarreia, desidratação, choque e danos nos rins e fígado, responsável por casos de intoxicação relatados (WEBSTER, 1994 apud FERNANDES 2012).

Lameira & Pinto (2009) abordam o uso popular de várias espécies desse gênero. Atualmente, muitas dessas espécies são objetos de estudos multidisciplinares envolvendo pesquisas sobre suas características químicas, propriedades biológicas, importância etnobotânica e taxonômica, o que tem contribuído para o melhor conhecimento desse grupo (SECCO, 2005).

3.3 – BACTERIAS

As células bacterianas são caracterizadas morfológicamente por seu tamanho, forma, arranjo e estruturas que apresentam. São sempre de dimensões microscópicas, o diâmetro da maioria delas varia de 0,2 a 1,5 μm e o comprimento de 1 a 6 μm . Algumas espécies bacterianas possuem células maiores. Quanto a sua

forma, as bactérias podem ser divididas em três grupos básicos: cocos (células esféricas), bacilos (células cilíndricas em forma de bastonetes) e espirilos (células espiraladas). Muitas bactérias podem ainda ser classificadas quanto ao arranjo que apresentam cocos, diplococos, estreptococos, bacilos e espirilos. Além do DNA principal, encontramos os plasmídios, que podem ser transferidos por conjugação para outras bactérias. Há bactérias heterotróficas, autotróficas fotossintéticas e autotróficas quimiossintéticas. Quanto à respiração, podem ser aeróbias ou anaeróbias. A reprodução é assexuada, ocorrendo também conjugação (GOMES & TOLEDO, 1991; SILVA; TRABULSI, 1991; TRABULSI; TOLEDO, 1991).

Dentre várias estruturas presentes nas células, bacterianas temos a parede celular de acordo com a constituição da parede celular, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: gram-positivos e gram-negativos. A parede das bactérias gram-positivas é praticamente formada de uma só camada enquanto a das gram-negativas é formada por duas camadas. Entretanto, os dois tipos de paredes apresentam uma camada em comum, situada externamente à membrana citoplasmática, que é denominada camada basal, mureína ou peptidoglicano (SILVA & TRABULSI, 1991).

Muitas bactérias são patogênicas; outras são importantes na reciclagem da matéria orgânica e outras são utilizadas pelo homem na produção de alimentos ou como objetos de pesquisas em estudos científicos. Existem também espécies de bactérias que são encontradas em associação com o corpo humano (SCHAECHTER, 2009).

Quanto às bactérias patogênicas, apesar do surgimento e da disponibilização de vacinas e antibióticos eficazes, os germes continuam ganhando a batalha nas doenças infecciosas em países em desenvolvimento. Uma das causas de tal situação consiste no surgimento e na disseminação de resistência microbiana, que tende a aumentar mediante uso indiscriminado de antimicrobianos. Este sério problema afeta a saúde individual e coletiva, sendo real preocupação nos que lidam com a saúde pública (WANNMACHER, 2004).

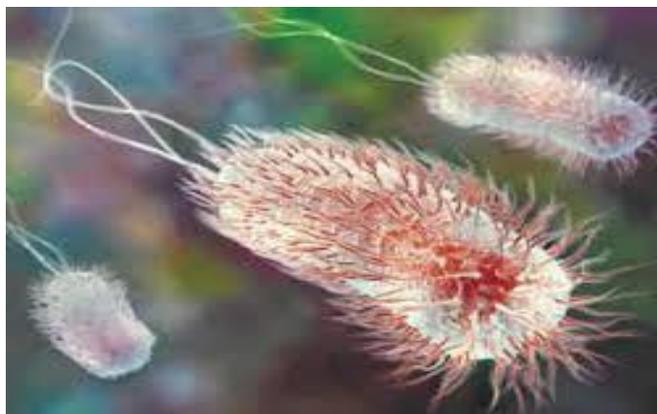
3.3.1 – *Escherichia coli*

Escherichia coli (E. coli), é uma espécie da família Enterobacteriaceae extremamente heterogênea e complexa, embora um dos seus membros seja considerado os seres vivos mais conhecidos na face da terra (*Escherichia coli* K12). Do ponto de vista de suas relações com o homem, podem-se distinguir três grandes grupos de *Escherichia coli*: o grupo das cepas comensais que habita os nossos intestinos desde o nascimento até a morte, o grupo das cepas enteropatogênicas constituído de vários patótipos, ou seja, de conjuntos de amostras que causam infecções por mecanismos diversos e o grupo das cepas patogênicas extra-intestinais capazes de causar diferentes tipos de infecção (SILVA & CAMPOS, 2008).

São classificadas como bastonetes retos, gram-negativos, não são formadores de esporos, possuem mobilidade através dos flagelos ou são imóveis. Algumas bactérias podem causar infecções se as defesas dos hospedeiros estão comprometidas (SILVA; TRABULSI, 1991).

A *Escherichia Coli*, FIGURA 3, é um grupo de bactérias que habitam normalmente no intestino humano e de alguns animais, e por isso a presença desta bactéria na água ou nos alimentos se deve à contaminação com fezes. As bactérias *E.Coli* presentes no intestino humano não causam problemas de saúde, mas quando outros tipos desta bactéria entram no organismo, elas podem causar doenças como a gastroenterite e infecção urinária, apendicite entre outros (SILVA; CAMPOS, 2008).

FIGURA 3 – Bacteria *Escherichia coli*



Fonte: Artwork Photograph

3.3.2 – *Bacillus subtilis*

A bactéria *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), é uma espécie de bactéria gram-positiva que possui características ublúqua comumente encontrada na água, solo, ar e decomposição de resíduos vegetais. A bactéria produz endósporos que lhe permite suportar condições extremas de calor e ressecamento do ambiente, além disso, umas das grandes variedades de proteases e outras enzimas que permitem degradar variedade de substratos naturais. No entanto, na maioria das condições do organismo não e biologicamente ativo, mas existe sobre a forma de esporos (PINHEIRO, 2012).

O *B. subtilis*, FIGURA 4, é considerada um organismo benigno já que não possuem características que causam doenças, isto é, não é considerado patogênico ou tóxico para seres humanos, animais ou plantas. Os riscos potenciais associados com o uso dessa bactéria em instalações de fermentação são baixos. E pode se esperar que também habitem temporariamente a pele e o trato gastrointestinal dos seres humanos (PINHEIRO, 2012).

FIGURA 4 – Bactéria *Bacillus subtilis*



Fonte: Artwork Photograph

4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 – MATERIAIS

Suportes para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica do tipo “fash” (230-400 Mesh) – Merckerey- Nagel.
- Sephadex LH-20.

Cromatografia em coluna:

- Colunas de tamanhos variados, dependendo das quantidades a serem cromatografadas.

Cromatografia em camada delgada:

- Folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, Ø= 0,2 mm – Merckerey- Nagel.

Solventes:

- Álcool etílico (PROQUIMIS).
- Acetato de etila, etanol, hexano e metanol (PROQUIMIS).

Revelador:

- Vanilina
- Lampada de UV (256 e 360 nm)
- Solução de sulfato cérico.

4.2 – EQUIPAMENTOS

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 300MHZ e 400 MHZ (UFSCar).
- Rota evaporador- Q-344B2- QUIMISI ISSO 9002 (Unifesspa).
- Câmara UV- BOITTON (254 e 360 nm) (Unifesspa).

4.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 – Coleta do material botânico

Foram coletadas em Canãa dos Carajás-PA, diferentes espécies encontradas no local, no total de 9 plantas. As plantas foram identificadas com o seus nomes conhecidas no cotidiano preliminarmente pelo professor de engenharia de matérias da Unifesspa, Kildemar, a data e seus pontos de coordenadas do GPS.

Todos os vegetais foram lavados em água corrente sobre uma peneira, para a retirada de solo, pedras e outros materiais indesejáveis. Em seguida foram levadas a estufas para a secagem à temperatura de 100°C por 72 horas.

4.3.2 – Moagem dos vegetais

O material foi moído em moinho facas, em seguida os materiais eram colocados em sacos de papel devidamente identificados.

A TABELA 1 relata os dados dos pontos de coletas e respectivos pontos de coordenadas no GPS das espécies coletadas. Na TABELA 2, p. 29 estão os dados de algumas das espécies que foram analisadas.

4.3.3 – Dados das plantas

TABELA1 – Identificação dos pontos de GPS

PONTO GPS		
	SUL	NORTE
107	06° 27' 05,5''	50° 04' 49,6''
109	06° 27' 15,0''	50° 04' 48,5''
111	06° 27' 21,9''	50° 04' 59,6''
112	06° 27' 41,6''	50° 04' 27,6''
113	06° 27' 39,1''	50° 04' 30,3''
115	06° 27' 29,5''	50° 04' 08,3''
116	06° 27' 29,5''	50° 04' 10,4''

TABELA 2 – Dados das espécies coletadas

ESPÉCIES	PONTO GPS	DATA COLETA	PESO (m)
Planta 1	116	21/11/2012	
Parte Aérea			20,381
Flor			17,959
Raíz			14,069
Planta 2	111	21/11/2012	
Folhas			21,556
Caule			20,6618
Raíz			20,711
Planta 3	111	21/11/2012	
Folhas			27,858
Ramos			20,274
Raíz			20,507
Caule			20,363
Planta 4	109	22/11/2012	
Flor			20,307
Folhas			22,884
Caule			20,884
Raíz			23,667
Planta 5	107	22/11/2012	
Folhas			20,329
Raíz			20,811
Embaúba	115	21/11/2012	
Folhas			20,122
Tronco			20,009

Continuação da TABELA 2 – Dados das espécies coletados

Pinhão	111	21/11/2012	
Folhas			20,410
Tronco			26,496
Raíz			22,497
Branquearão	111	21/11/2012	
Parte Aéria			25,110
Raíz	112		26,305
Melão S.Caetano	113	21/11/2012	
Parte Aéria			27,105

4.3.4 – Análise química das plantas

As espécies coletadas TABELA 2 foram submetidas a análise de metais em suas biomassas, realizada pelo laboratório FULLIN no Espírito Santos- ES.

O metal analisado para a realização dos estudos desse trabalho foi o cobre (Cu), observando uma faixa crítica do metal pesados por biomassa das espécies, sendo que a faixa crítica de cobre em vegetais é 20-100 mg/Kg de matéria seca.

4.3.5 – *Screnning* fitoquímico

O *screnning* fitoquímico permite conhecer as possíveis classes de metabólitos secundários presentes nas plantas, o teste foi realizado nas 9 espécies coletadas na Mina do Sossego - Canaã dos Carajás-PA.

4.3.5.1 – Obtenção do extrato para realização do *screnning* fitoquímico

Utilizou-se 10g das partes vegetais de cada espécie, com suas respectivas partes (raiz, folhas e tronco) para a extração com etanol 100 mL. Após 7 dias realizou-se a filtração do material e em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Esse procedimento foi realizado por 4 vezes, FIGURA 5,p.31.

FIGURA 5 – Procedimento de maceração dos vegetais



Fonte: Própria autora.

Os extratos foram submetidos à investigação qualitativa dos constituintes químicos por classes dos metabólitos, tais como: polissacarídeos, taninos, catequinas, flavonoides, sesquiterpelactonas e lactonas, carotenoides, esteroides e tripernoides, depsídeos e depsídonas, derivados de cumarina. Utilizando metodologia proposta por Barbosa 2004, Matos 1997 e Costa 2004.

Para a realização de cada um dos testes foram utilizados vários solventes extratores, de acordo com a polaridade de cada classes a ser analisada.

4.3.5.2 – Utilizando água destilada como solvente

Foi preparada a soluções mães, de cada extrato bruto dos 9 vegetais e suas respectivas partes, foram diluídas algumas miligramas deste em água destilada. A solubilização dos extratos foi realizada com auxílio de bastão de vidro e banho de ultrassom. Após esse procedimento foi realizado uma filtração simples. Uma alíquota das soluções referentes a cada planta foi utilizada para identificar:

4.3.5.2.1 – Polissacárideos

Em um tubo de ensaio, foi adicionado 5,0mL da solução-mãe e duas gotas lugol.

4.3.5.2.2 – Taninos

Em um tubo de ensaio, foi transferido 10,0 mL da solução- mãe e uma gota de solução de cloreto férrico 1% (m/v).

4.3.5.3 – Utilizando metanol como solvente

4.3.5.3.1 – Catequinas

Adicionou-se 3,0ml da solução-mãe em tubo de ensaio mais 1,0mL da solução de vanilina 1% e 1mL de ácido clorídrico concentrado.

4.3.5.3.2 – Flavonoides

Em 100ml de solução-mãe no tubo de ensaio foi adicionado cinco gotas de ácido clorídrico concentrado Em seguida acrescentou um pedaço de fita de magnésio de 1,0 cm ao tubo.

4.3.5.3.3 – Sesquiterpelactonas e outras Lactonas

Em 3,0 mL da solução-mãe no tubo de ensaio foi adicionado 2 gotas de solução de cloridrato de hidroxilamina 10% e 2 gotas de hidróxido de potássio 10%, aquecendo-a em banho maria por dois minutos.

Após resfriar, acidificará com a solução de ácido clorídrico 1N e adicionou 1 gota de cloreto férrico 1%.

4.3.5.4 – Utilizando clorofórmio como solvente

Foi preparada uma solução-mãe com alguns miligramas dos extratos brutos, solubilizando alguns miligramas do extrato em clorofórmio.

4.3.5.4.1 – Esteroides

3,0 mL foram transferidos para tubos de ensaio. Adicionou-se 2,0 mL de anidrido acético seguido de agitação. Foi adicionando 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, pelas paredes do tubo.

4.3.5.4.2 – Carotenoides

Foi transferida para o tubo de ensaio 3,0 mL da solução-mãe e 3 gotas de ácido trifluoracético concentrado.

4.3.5.5 – Utilizando éter etílico como solvente

Foi preparada uma solução-mãe com alguns miligramas dos extratos brutos concentrados em éter etílico para cada um dos testes a baixo.

4.3.5.5.1 – Depsídeos e Depsídonas

Transferiu-se para tubos de ensaios 5,0 mL da solução- mãe, e, seguida o éter foi evaporado em banho- maria e ao resíduos foram acrescentados 3,0 mL de metanol. Agitou-se e adicionaram-se três gotas de cloreto férrico 1% (m/v).

4.3.5.5.2 – Derivados de Cumarina

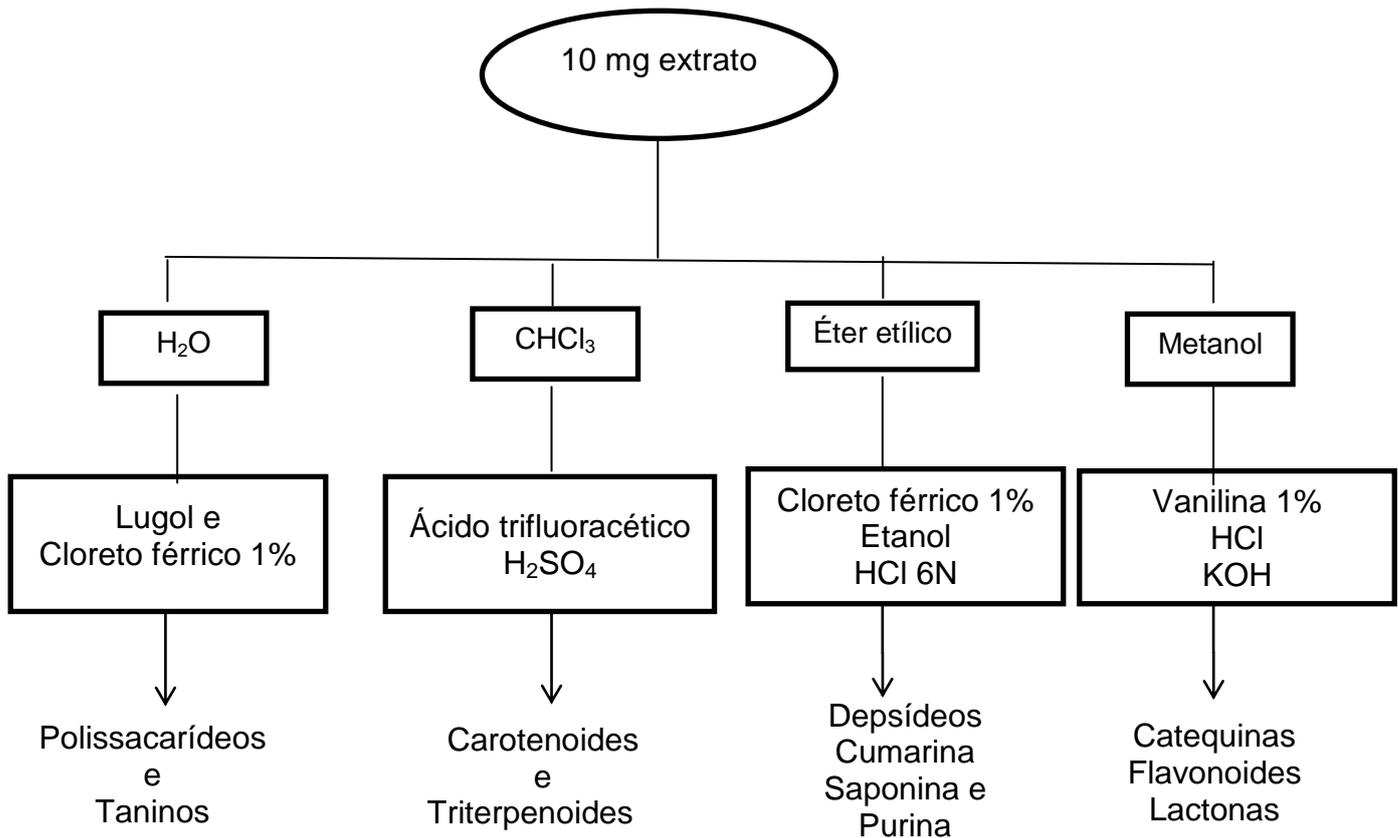
Foi realizado o teste de cromatografia em camada delgada, utilizou-se o sistema de solventes Hexano/Acetato 7:3, após a placa eluir, foi exposta a radiação UV com comprimento de onda de 365 nm.

4.3.5.5.3 – Saponina Espumídica

Foram dissolvidos alguns miligramas do extrato concentrado em 1,0 mL de etanol. Em seguida, foi adicionada água destilada até a obter-se no final 15,0 mL de solução. Esta solução foi filtrada e passada para um tubo de ensaio, este foi agitado vigorosamente por 2 minutos.

No FLUXOGRAMA1 esta ilustrando as etapas do procedimento realizado para o teste do *screnning* fitoquímico, para as respectivas classes de metabólitos analisadas.

FLUXOGRAMA 1 – *Screnning* fitoquímico



4.3.6 – Estudo Fitoquímico

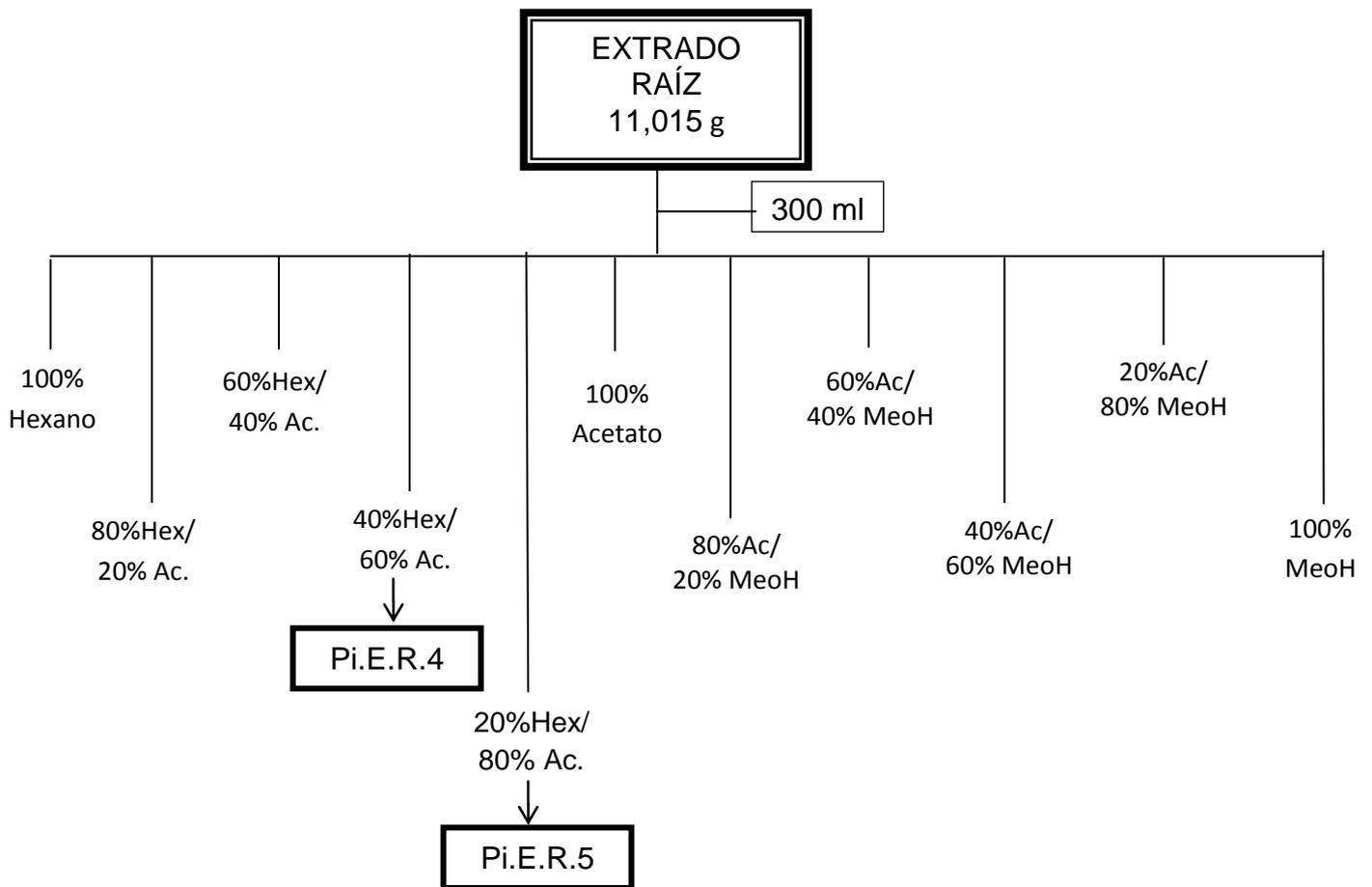
Após o *screnning* fitoquímico, selecionou a espécie *Jatropha curcas* L., parte da raiz, para realizar a extração em grande escala, ou, seja pesou-se 78,490g de raiz da espécie e realizou-se a extração com etanol.

4.3.6.1 – Fracionamento do extrato Pi.E.R

Aproximadamente 11,015g do extrato bruto foi submetido ao fracionamento em coluna de vidro (Ø x H= 3,5 x 15 cm) utilizando como fase estacionária sílica flash® (230-400 mesh), como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol 100%

com 300 ml no modo gradiente, aumentando polaridade em uma porcentagem de 20% até metanol 100%, FLUXOGRAMA 2.

FLUXOGRAMA 2 – Fracionamento do extrato Pi.E.R

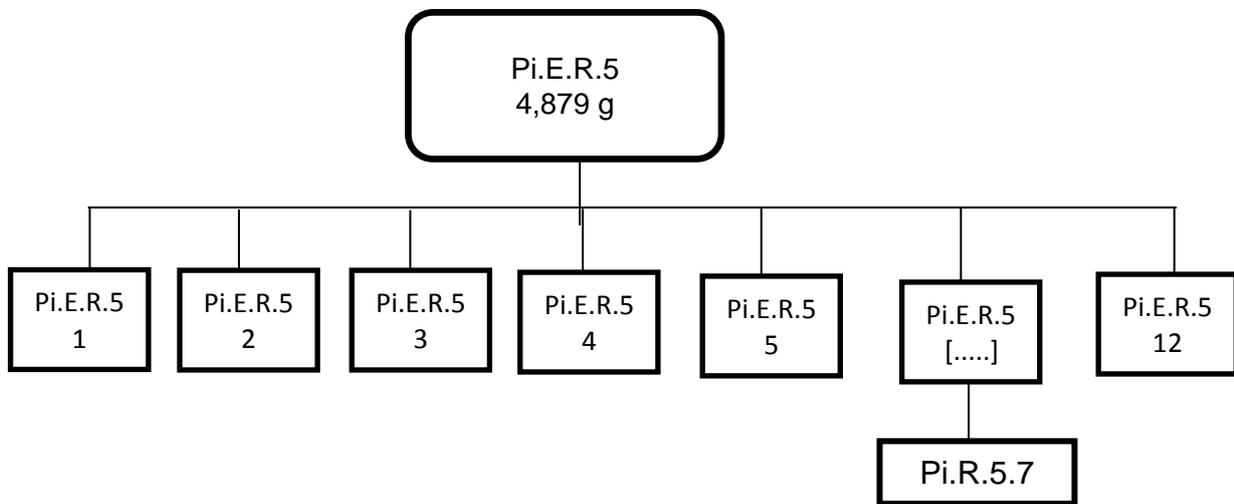


A fração Pi.E.R.4 por comparação de ccd apresentou aparentemente ser uma substância pura, onde foi realizada análise de ressonância magnética nuclear, na universidade de São Carlos-SP. Para a fração Pi.E.R.5 foi realizada um novo fracionamento.

4.3.6.2 – Fracionamento da Pi.E.R.5

A fração Pi.E.R.5(4,879 g) foi refracionada em uma coluna de vidro (\varnothing x h = 2,0 x 9,0 cm), tendo-se como fase estacionaria a sílica flash® F60 40-63 μ m (230-400 mesh), e fase móvel com hexano, acetato de etila e metanol com gradiente de polaridade crescente. Obtendo no final 57 frações, que após comparação em CCD foram reunidas e 12 frações, como mostra o FLUXOGRAMA 3.

FLUXOGRAMA 3 – Fracionamento da Pi.E.R.5



A fração Pi.R.5.7 por comparação de ccd apresentou aparentemente ser uma substância pura, onde foi realizada análise de ressonância magnética nuclear, na universidade de São Carlos-SP.

4.3.7– Ensaio Antimicrobianos

O ensaio antimicrobiano foi realizado no laboratório de química da UFPA, campus de Belém nestes ensaios utilizado cepas certificados das bactérias *E. coli*, *B. subtilis*.

O meio de cultura utilizado foi o caldo BHI (Infuso Cérebro Coração), que segundo recomendação do fabricante, para cada 1 L de caldo, foram utilizadas 37 g de meio do cultivo. Para o preparo do ágar BHI, foram utilizados 4,5 g de bacteriológico onde foi utilizado nas placas de petri. Após essas dissoluções o meio BHI foi autoclavado a 121°C por 15 minutos para garantir total esterilidade.

4.3.7.1– Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo agar BHI, por um período de 24 h. Após esse tempo foram transferidas, com auxílios de um palito, aproximadamente três colônias de cada bactérias para tubos de ensaio contendo 3 (três) mL de caldo BHI e incubadas por mais um período de 24h. Suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximada $1,0 \times 10^8$ UFC (unidades formadas de colônias).

4.3.7.2– Padronização das culturas

A solução padrão foi obtida por meio de uma mistura das soluções de H_2SO_4 a 1% (9,95 ml) e $BaCl_2$ também a 1% (0,05 ml), numa solução de $BaSO_4$ numa concentração referente a $1,0 \times 10^8$ UFC/ML. Após este processo, comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a bactéria com o tubo de ensaio que continha $BaSO_4$.

4.3.7.3– Preparo da amostra

Foram utilizados 5 mg do extrato a ser testada e 1,0 mg de cada substâncias para serem dissolvidas em 100 μ L de DMSO, contidos em tubos de eppendorf. Em seguida foram adicionados 900 μ L de caldo BHI esterilizado. Sendo que no intervalo de cada adição de solução ao extrato, a mesma era agitada para uma melhor homogenização.

4.3.7.4 – Ensaio para medir a concentração mínima inibitória (MIC)

Em cada placa de elisa de 96 furos adicionou-se 100 μ L de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 μ L da solução contendo as amostras a serem testadas e homogeneizou-se. Após, foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100 μ L da primeira cavidade transferido esse volume para a próxima, homogeneizando, esse procedimento foi repedido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, onde foram retirados 100 μ L e

descartados. A última linha da placa foi utilizada como um controle do meio usado, em cada cavidade foi adicionado 5 µL da suspensão bacteriana e incubaram-se as placas a 37°C por 24h. A leitura dos resultados foi feita adicionando-se 10 µL do corante TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico) em cada cavidade da placa de Elisa.

Para o preparo do corante usou-se 10 ml de água destilada estéril, em seguida foi adicionado ao mesmo, uma massa de 0,2g de TTC e agitou-se para uma homogeneização mais efetiva. Após pronto, a solução-corante não apresenta cor, sendo a mesma translúcida. Mas, ao entrar em contato com os meios onde há micro-organismos, a mesma apresentará uma coloração vermelha.

4.3.7.5 – Tipos de atividades

Após verificar a MIC dos extratos foi necessário saber o tipo de atividade apresentada em cada concentração (bacteriostática ou bactericida). Nas cavidades onde não apresentou coloração vermelha, os extratos foram (re)inoculados em placa de petri contendo meio de cultura Ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 h.

5 – RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 – ANÁLISE QUÍMICA DAS PLANTAS

De acordo com o intervalo de 20-100 de Cu mg/Kg, citador por ANDRADE 2007 pode-se observar que planta 1 nas partes aérea e raíz, planta 4 nas folhas e branquearão parte aérea apresentaram valores bem acima da faixa crítica do metal pesado na biomassa das espécies. Já as espécies planta 3, planta 5, embaúba, pinhão-manso e melão de são caetano apresentaram valores correspondentes aos intervalo críticos de metais em todas as partes analisadas.

Somente no caule da planta 3 que apresentou valor abaixo da faixa crítica de metal.

Em todas as espécies analisadas as partes das plantas que apresentou os valores acima da faixa crítica foi na parte aérea e folhas, como foi encontrado cobre também na raíz, pode-se inferir que todas as espécies apresentaram potencial fitoextratora.

Os dados em relação aos valores de cobre na biomassa das plantas estão na TABELA 3.

TABELA 3 – Faixa crítica do metal cobre na biomassa das plantas

ESPÉCIES	PARAMETRO ANALISADO
	Cu mg/Kg
Planta 1	
Parte Aérea	120 mg/kg
Flor	54 mg/kg
Raíz	144 mg/kg
Planta 2	
Folhas	140 mg/kg
Caule	31 mg/kg
Raíz	34 mg/kg

Continuação TABELA 3 – Faixa crítica do metal cobre na biomassa das plantas

Planta 3	
Folhas	78 mg/kg
Ramos	31 mg/kg
Raíz	28 mg/kg
Caule	16 mg/kg
Planta 4	
Flor	68 mg/kg
Folhas	216 mg/kg
Caule	70 mg/kg
Raíz	50 mg/kg
Planta 5	
Folhas	90 mg/kg
Raiz	96 mg/kg
Embaúba	
Folha	68 mg/kg
Tronco	38 mg/kg
Pinhão	
Folhas	76 mg/kg
Tronco	26 mg/kg
Raíz	96 mg/kg
Branquearão	
Parte Aéria	140 mg/kg
Raíz	36 mg/kg
Melão S.Caetano	
Parte Aéria	30 mg/kg

5.2 – SCRENNING FITOQUÍMICO

Através do *screnning* fitoquímico das 9 espécies estudadas, pode-se observar que com exceção do tronco da embaúba e o tronco do pinhão, todas as demais partes das espécies coletadas apresentaram resultados positivos para taninos.

Para as classes de catequinas, flavonoides, somente as folhas e raiz do pinhão-manso apresentou resultados positivos.

Os depsídeos e esteroides apresentou resultados positivos em 7 espécies, nas plantas 1,2,3,4,5, embaúba e pinhão-manso, mas não em todas partes das plantas.

A classe de cumarina foi verificada somente nas plantas 1 e pinhão-manso nas partes área e raiz respectivamente apresentou resultado positivo.

Nenhuma das espécies apresentou resultados positivos para polissacarídeos, carotenoides, lactonas e purinas. Esses resultados estão contidos resumidamente na TABELA 4, p. 42.

TABELA 4 – Resultado fitoquímico para as respectivas espécies

Amostra	Polissacarídeos	Taninos	Catequinas	Flavonoides	Lactonas	Carotenoides	Esteroides	Depsídeos	Cumarina	Saponina	Purinas
Planta 1											
Parte Aérea	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flor	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Raíz	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Planta 2											
Folhas	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Caule	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Raíz	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Planta 3											
Folhas	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Ramos	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Raíz	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Caule	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Planta 4											
Flor	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Folhas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Caule	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Raíz	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Planta 5											
Folhas	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Raíz	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Embaúba											
Folhas	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Tronco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinhão											
Folhas	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Tronco	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Raíz	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Branquearão											
Parte Aérea	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Raíz	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Continuação da TABELA 4 – Resultado fitoquímico para as respectivas espécies.

Melão S.Caetano											
Parte Aéria	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-

(+) Presença(-) Ausência

A *Jatropha curcas* L. foi à espécie selecionada para o estudo fitoquímico e testes antimicrobianos, pois apresentou resultados positivos para um maior número de classes de substâncias e também por apresenta um bom potencial fitoextrator para o cobre.

A FIGURA 6 mostra resultados obtidos para todas as partes da planta (raíz, tronco, folhas). Na Figura 6a, pode-se observar as soluções mães das respectivas partes, após adição de cloreto férrico 1% observou-se a mudança de coloração para verde, confirmando a presença de taninos em todos os extratos, Figura 6b

FIGURA 6 – Resultado positivo para taninos em todas as partes das plantas



Fonte: Própria autora

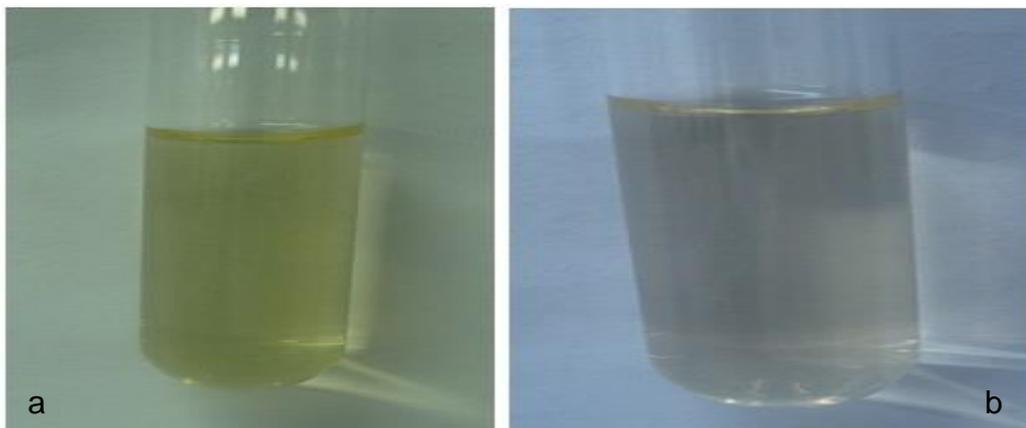
Para a solução-mãe, Figuras 7a e 8a, quando foi utilizado metanol, somente o extrato das raízes apresentou resultado positivo para as catequinas e flavanoides, sendo que, para as catequinas apresentou uma coloração vermelho não muito intensa indicando resultado satisfatório para essa classe, Figura 7b. Já para a classe de flavonoides o surgimento de coloração rosa, confirmou a presença do mesmo, neste extrato, Figura 8b.

FIGURA 7 – Resultado positivo para catequinas na raíz



Fonte: Própria autora

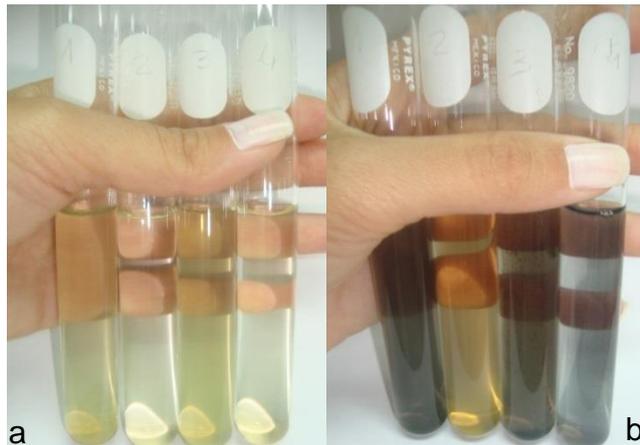
FIGURA 8 – Resultado positivo para flavonoides na raíz



Fonte: Própria autora

Com o uso do clorofórmio como solvente, obteve-se resultado positivo para os esteroides e triterpenoides em todas as partes da espécie, onde pode-se observar que a solução mãe antes esverdeada, Figura 9a, mudança de coloração para verde persistente indicou a presença desta classe, Figura 9b.

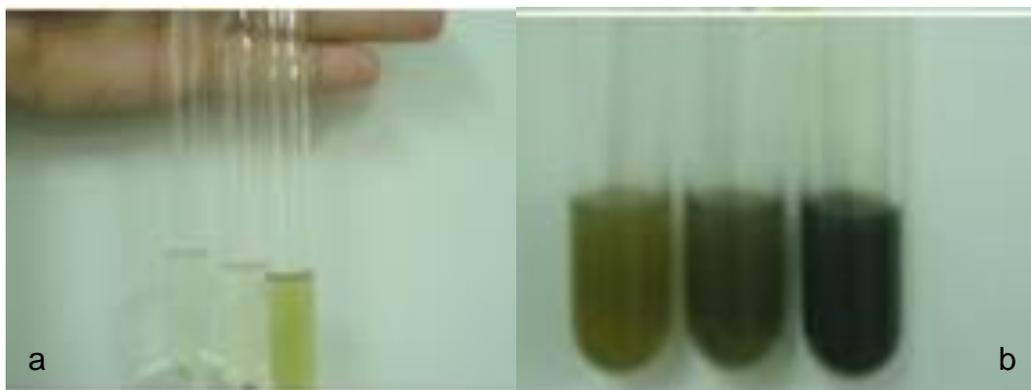
FIGURA 9 – Resultado positivo para esteroides e triterpenoides em todas as partes das plantas.



Fonte: Própria autora

Utilizado como solvente éter etílico apresentou resultado positivo para as classes de depsídeos, cumarina e saponinas. Para a classe dos depsídeos a solução mãe, Figura 10a, após adicionar gotas de cloreto férrico 1% foi observado aparecimento de coloração verde indicou resultados positivo para depsídeos na raiz e folhas, Figura 10b.

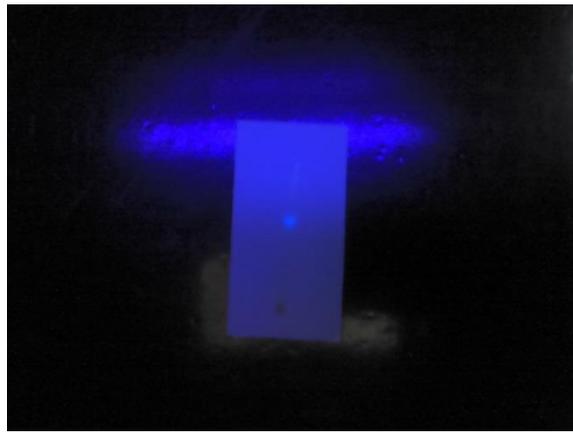
FIGURA 10 – Resultado positivo para depsídeos



Fonte: Própria autora

Para a classe de cumarinas, somente o extrato das raízes apresentou resultado positivo. Após a eluição da placa cromatográfica, contendo a amostra, a mesma foi exposta a radiação UV no comprimento de onda de 365 nm, onde o surgimento de fluorescência azul, na placa, indicou presença dessa classe de substância, Figura 11.

FIGURA 11 – Resultado positivo para cumarina



Fonte: Própria autora

Para as saponinas exibiu resultados positivos nos extratos das raiz, folhas e tronco. Onde as soluções mãe de cada extrato, Figura 12a, após a agitação e repouso, houve formação de espuma persistente informando resultado positivo, Figura 12b.

FIGURA 12 – Resultado positivo para saponinas



Fonte: Própria autora

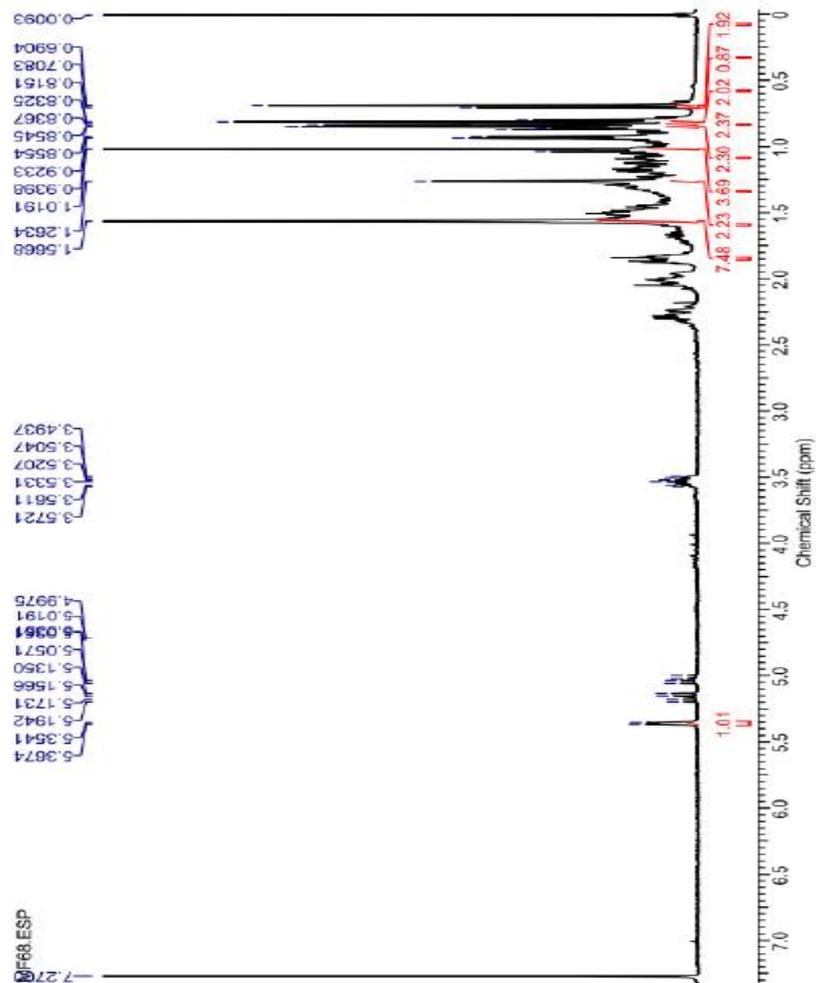
5.3 – IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.3.1 – IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA Pi.R.5.7

Os esteroides são substâncias de ampla ocorrência nos vegetais. A fração Pi.R.5.7, foi isolada do fracionamento do extrato Pi.E.R.5 apresentando-se como cristais brancos.

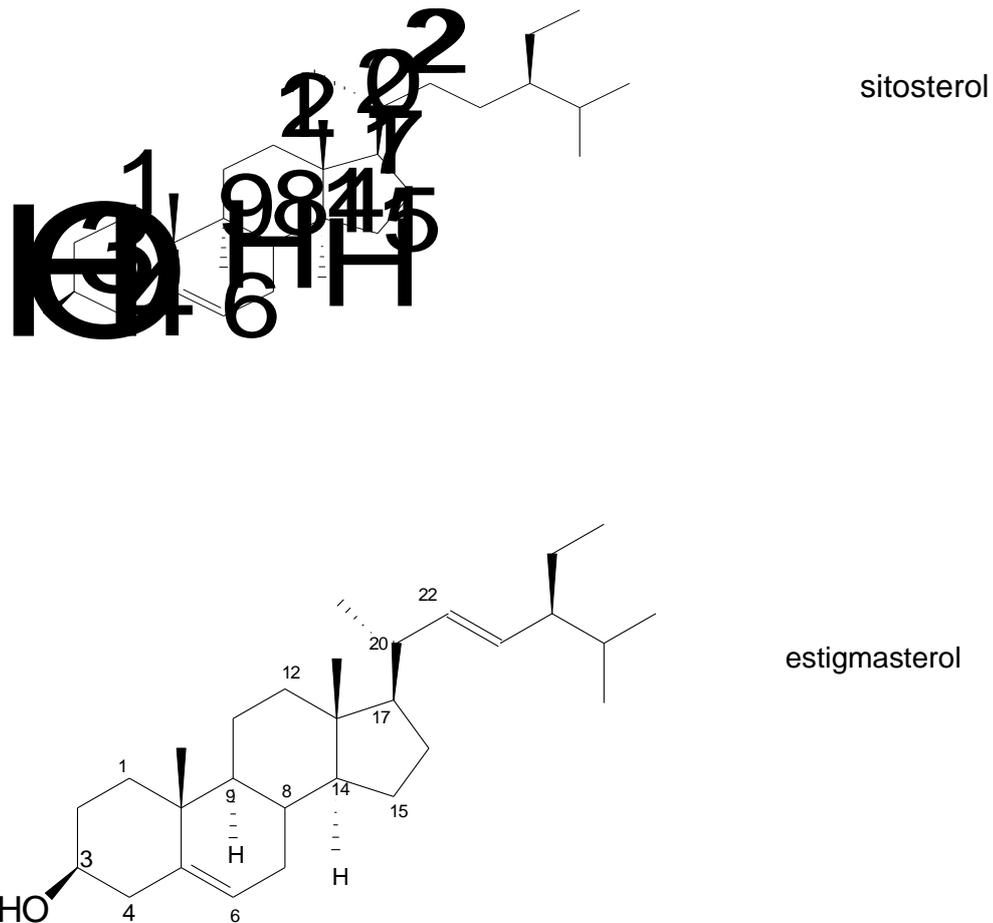
Aparentemente, através da análise do espectro de RMN¹H, Figura 13 mostrou-se tratar de uma mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol.

FIGURA 13 – Espectro de RMN¹H mistura dos esteróidessitosterol e estigmasterol



O espectro de RMN¹ H, apresentou um acúmulo de sinais relativos a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, na região compreendida entre δ 0,60 a δ 2,30, o que indicou a presença de esqueletos esteróidal. O duplete largo em δ 5,35 (H-6, J-50 Hz) e o multiplete centrado em δ 3,53 (H-3) caracterizam o β -sitosterol na mistura. Já a presença do esteroide estigmasterol foi deduzida pelos sinais em δ 5,02 (dd, J= 14,8 e 8,8 Hz) e δ 5,14 (dd, J=14,8 e 8,8 Hz), relatados aos hidrogênios vínlicos da cadeia, supondo, através destes dados, se tratar de uma mistura sitosterol mais estigmasterol, para a confirmação dessa mistura, seria necessário uma análise por CG-EM da amostra onde a presença dos íons molecular em m/z 414 e m/z 412, confirmaria a massa molecular do sitosterol e do estigmasterol, respectivamente, Figura 14.

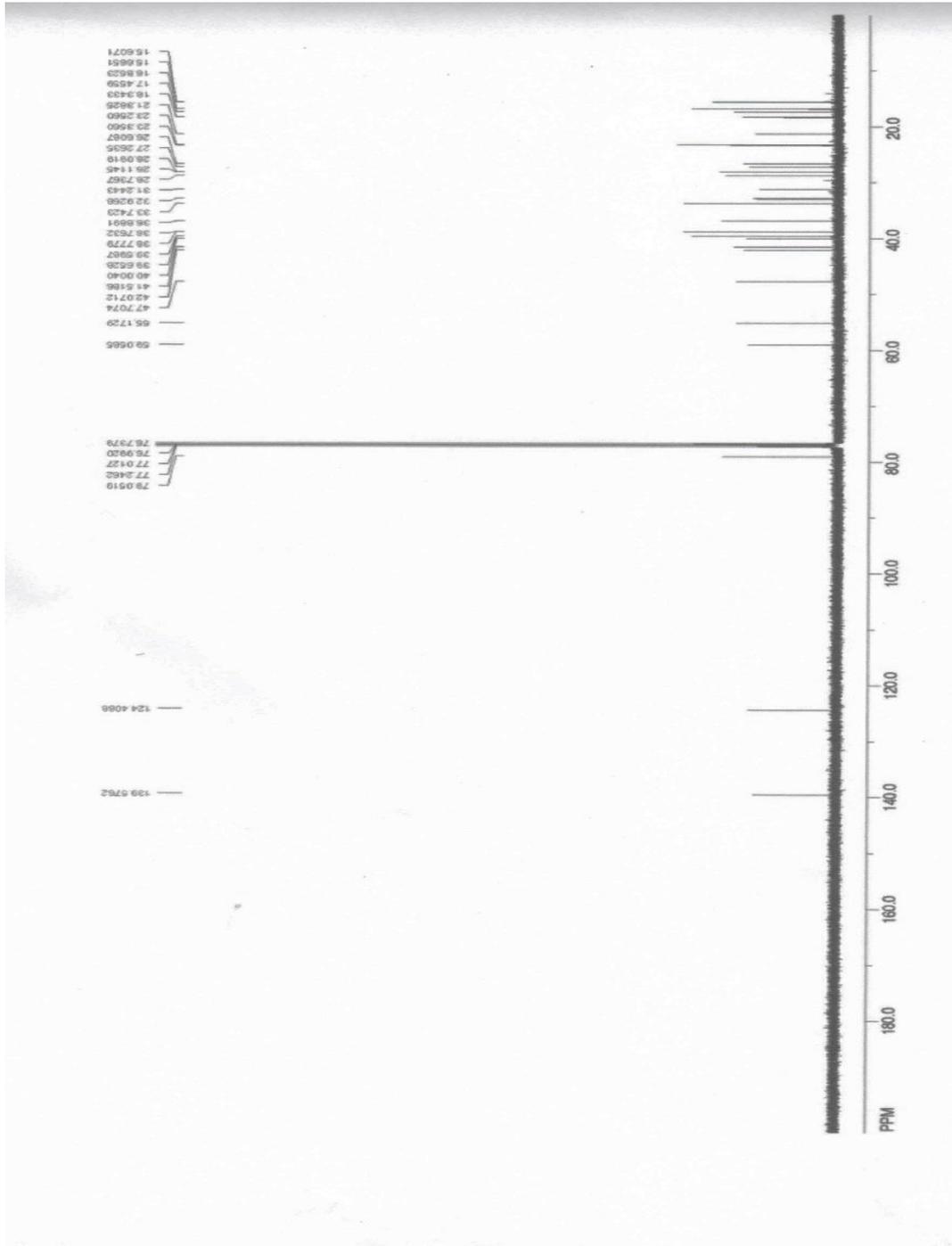
FIGURA 14 – Estruturas química da mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol



5.3.2 – IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA Pi.E.R.4

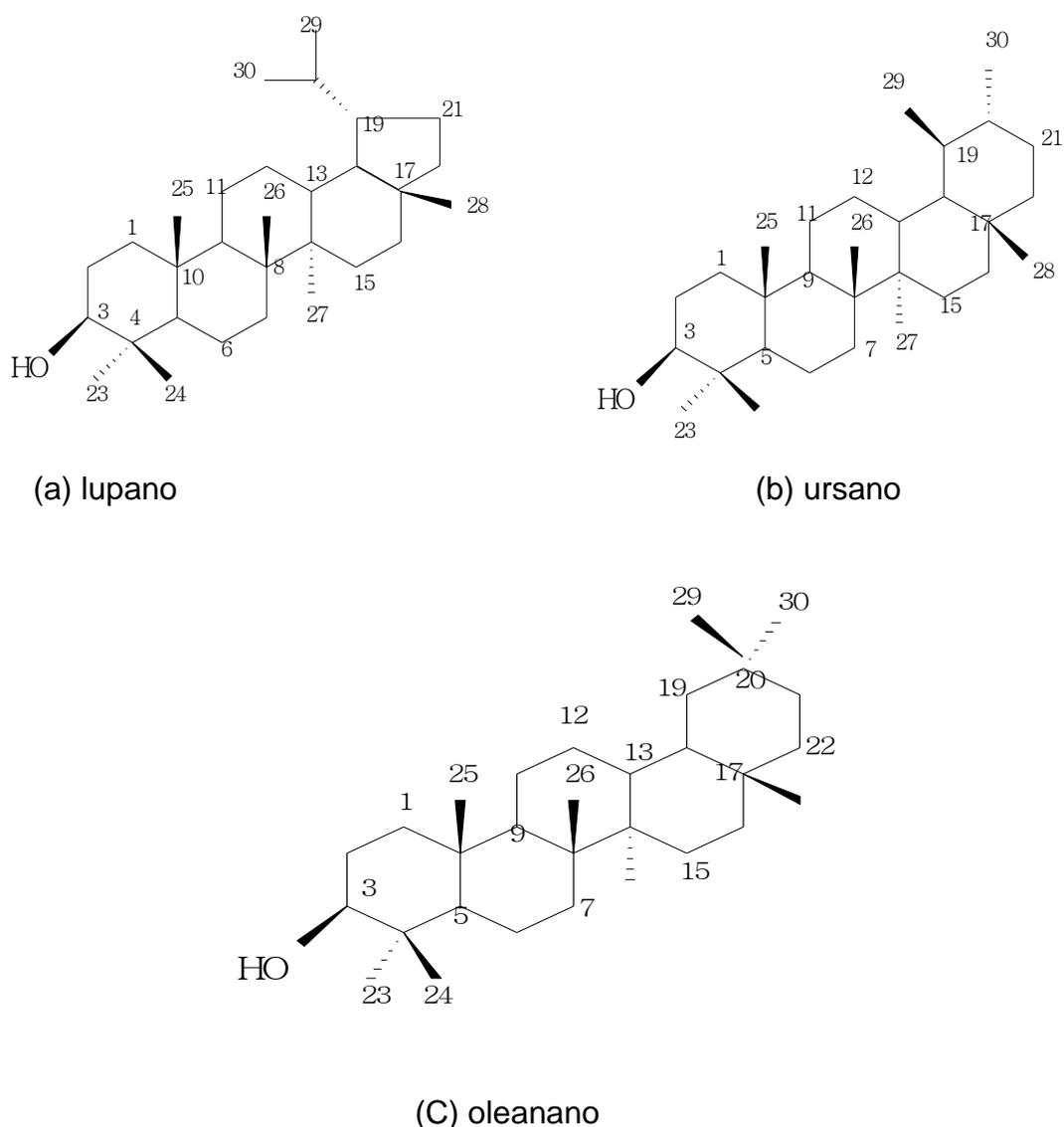
O espectro de RMN¹³C, Figura 15, da substância Pi.E.R.4, apresenta 30 sinais de carbonos, indicando se tratar de um triterpeno.

FIGURA 15 – Espectro de RMN¹³C extrato Pi.E.R.4



A ausência de sinais de hidrogênios de grupamento isoprenila no espectro de RMN¹H, já descarta a possibilidade de ser um triterpeno do tipo lupano Figura 16 a), para diferenciar os carbonos dos esqueletos, ursano Figura 16 b) e oleanona Figura 16 c), cujo os sinais são muito coincidentes, comparou-se os deslocamento químicos dos carbonos pertencentes ao anel E.

FIGURA 16 – Esqueletos de triterpenos do tipo lupano (a), ursano (b) e oleanona (c).

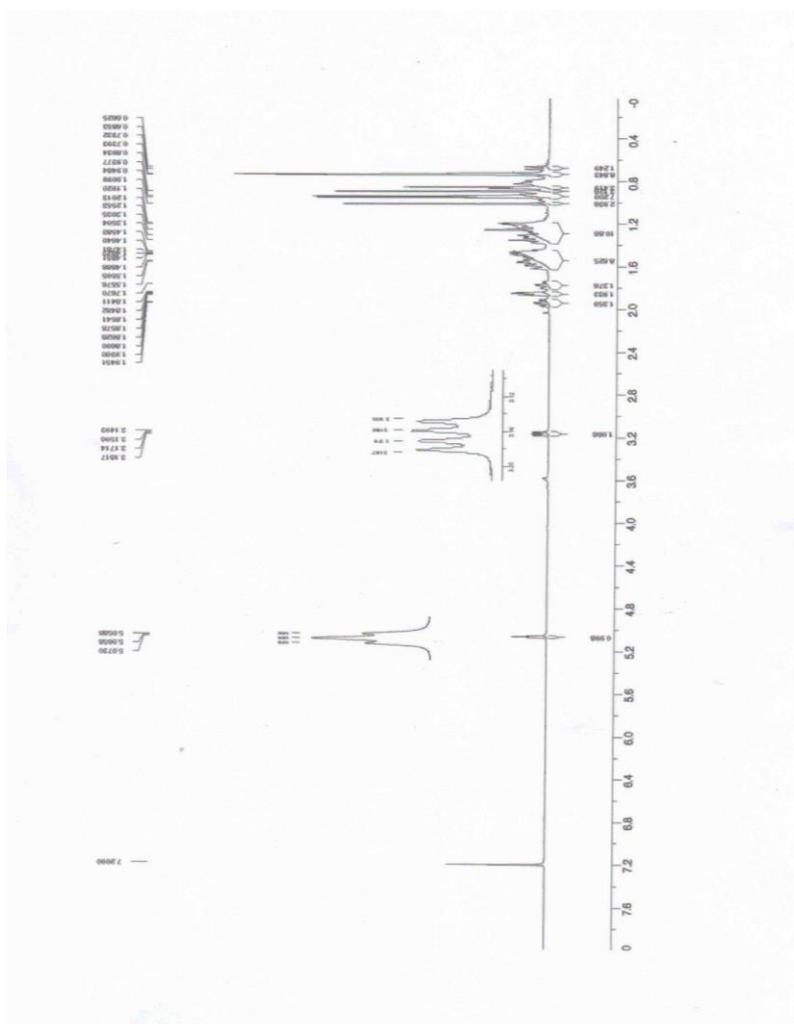


No esqueleto do tipo ursano, o anel irá assumir conformação torcida (tipo twist), para melhor “acomodar” o grupo metílico em C-19. Esta conformação torcida exercerá um efeito anisotrópico de proteção para os carbonos C-11, C-13, C-19, C-21 e C-27 e desproteção anisotrópica para os carbonos C-12, C-18, C-20 e C-22.

Quando ocorre dupla ligação entre os carbonos 12 e 13, eles passam a ser chamado lupeno, urseno e oleaneno.

Os dados de RMN¹H, Tabela 5, p.54, Figura 17, apresenta informações importantes para a identificação do triterpeno. O tripleto em δ 5,07 (J=3,6 Hz) é característico de hidrogênio olefínico e foi atribuído ao H-12. O duplo dubleto em δ 3,17 (J=5,2 e 1 Hz) é referente a H-3, segundo dados da literatura, CARVALHO et al, 1998, o descolamento químico de H-3 pode determinar sua conformação. Quando H-3 esta na posição β , seu descolamento ocorre em δ 3,40, como o deslocamento observado no espectro foi δ 3,2, sugere que H-3 esteja em α e portanto o grupo OH está na posição β .

FIGURA 17 – Espectro de RMN¹H Pi.E.R.4



Para distinguir a classe α ou β amirina, comparou-se os dados de C-12 e C-13 com os da literatura. Os valores de deslocamento da substância Pir. 1.47 em δ 124,4 e em δ 139,6, respectivamente, confirmam a presença de um esqueleto tipo ursano, pois se fosse do esqueleto tipo oleanano os C-12 e C-13 seriam mais blindados. Isso pode ser justificado devido a presença do grupo metila nos ursanos na posição 19, (equatorial), que está bem próximo a dupla ligação neste tipo de esqueleto, afetando estericamente o deslocamento do C-13.

O conjunto da análise dos dados de RMN, com a literatura, pode-se inferir que a substância Pi.E.R.4 trata-se da α - amirina, Figura 19.

FIGURA 19 – Estrutura da α - amirina

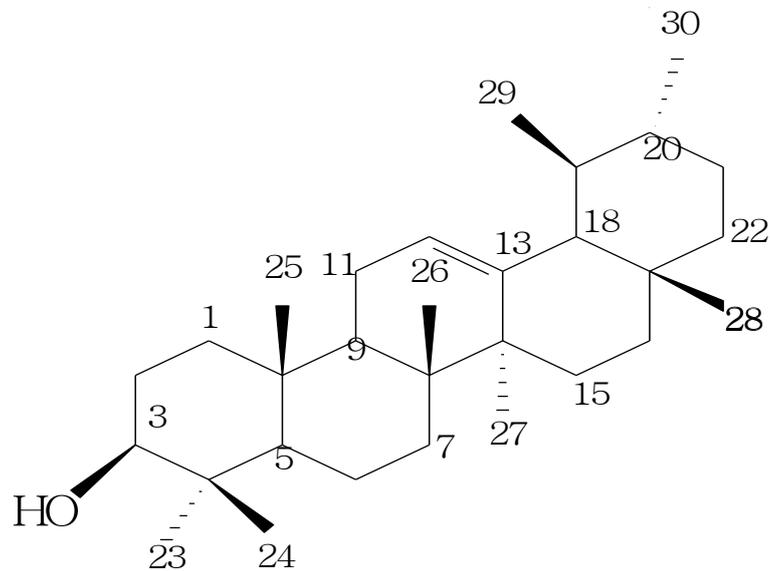


TABELA 5 – Dados de RMN1H e RMN13C da substância Pi.E.R.4, CDCl₃

Posição	δ HSubst.Pir.1.47 (<i>m</i> ; <i>J</i>)	δ HSouza et al, 2011 (<i>m</i> ; <i>J</i>)	¹³ C	
1			38,7	38,7
2			28,7	28,7
3	3,17(<i>dd</i> , <i>J</i> =5,2;11,1 Hz)	3,16(<i>dd</i> , <i>J</i> =5,1;11,2 Hz)	79,1	79,6
4			38,8	38,7
5	0,67(<i>d</i> , <i>J</i> =11,4 Hz)	0,67(<i>d</i> , <i>J</i> =11,6 Hz)	55,2	55,1
6			18,3	18,4
7			32	32,2
8			40,0	40,0
9			47,7	47,7
10			36,9	36,9
11			23,4	23,3
12	5,06(<i>t</i> , <i>J</i> =3,5 Hz)	5,06(<i>t</i> , <i>J</i> =3,2 Hz)	124,4	124,4
13			139,6	139,5
14			42,1	42,0
15	1,94(<i>td</i> , <i>J</i> =4,9;13,5 Hz)	1,94(<i>td</i> , <i>J</i> =4,5;13,5 Hz)	27,3	27,2
16	1,77(<i>td</i> , <i>J</i> =4,9;13,6 Hz)	1,76(<i>td</i> , <i>J</i> =5,0;13,5 Hz)	26,6	26,6
17			33,7	33,7
18			59,1	59,0
19			39,6	39,6
20			36,7	36,6
21			31,2	31,2
22	1,85(<i>dt</i> , <i>J</i> =2,6;7,0 Hz)	1,85(<i>dt</i> , <i>J</i> =3,0;7,0 Hz)	41,5	41,5
23	0,94 (<i>s</i>)	0,93 (<i>s</i>)	28,1	28,1
24	0,74 (<i>s</i>)	0,74 (<i>s</i>)	15,7	15,6
25	0,73(<i>s</i>)	0,73 (<i>s</i>)	15,6	15,6
26	0,89(<i>s</i>)	0,89 (<i>s</i>)	16,8	16,8
27	1,01(<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)	23,3	23,2
28	0,95(<i>s</i>)	0,94 (<i>s</i>)	28,1	28,1
29	0,85(<i>d</i> , <i>J</i> =5,6 Hz)	0,85(<i>d</i> , <i>J</i> =6,0 Hz)	17,5	17,4
30	0,73(<i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	0,73(<i>d</i> , <i>J</i> =7,0 Hz)	21,4	21,4

5.4 – ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

O extrato e as substâncias isoladas foram ensaiados frente das bactérias *Escherichiacolie* e *Bacillussubtilis*.

5.3.1 – Ensaios antimicrobianos frente às bactérias.

O extrato Pi.E.R., apresentou atividades bacteriostática até uma concentração de 625,0 µL/mL, uma alicota foi inoculadas em placas de petri para observar se apresentava atividades bactericida, nas demais concentração não apresentou atividade.

Para as duas substâncias Pi.E.R.4 e Pi.R.5.7 não apresentou atividades em nem umas das concentrações como esta no QUADRO 1.

QUADRO 1 - Extratos submetidos ao ensaio biológico frente à bactéria *B.subtilis*

		1	2	3	4	5	6
[]µL/mL		Pi.R.5.7	Pi.R.5.7	Pi.E.R.4	Pi.E.R.4	Pi.E.R	Pi.E.R
2500	A	+	+	+	+	-	-
1250	B	+	+	+	+	-	-
625,0	C	+	+	+	+	-	-
312,5	D	+	+	+	+	+	+
156,25	E	+	+	+	+	+	+
78,12	F	+	+	+	+	+	+
39,06	G	+	+	+	+	+	+
	H	+	+	+	+	+	+

Legenda: + Sem atividade; - Bacteriostático; = Bactericida

Frente à bactéria *E. coli* o extrato Pi.E.R e as duas substâncias Pi.E.R.4 e Pi.R.5.7 não apresentou atividades em nem umas das concentrações como esta no QUADRO 2, p.56.

QUADRO 2 - Extratos submetidos ao ensaio biológico frente à bactéria *E. coli*.

		1	2	3	4	5	6
[] μ L/mL		Pi.R.5.7	Pi.R.5.7	Pi.E.R.4	Pi.E.R.4	Pi.E.R	Pi.E.R
2500	A	+	+	+	+	+	+
1250	B	+	+	+	+	+	+
625,0	C	+	+	+	+	+	+
312,5	D	+	+	+	+	+	+
156,25	E	+	+	+	+	+	+
78,12	F	+	+	+	+	+	+
39,06	G	+	+	+	+	+	+
	H	+	+	+	+	+	+

Legenda: + Sem atividade; - Bacteriostático; = Bactericida

6 – CONCLUSÃO

O potencial de fitoextração verificado a partir da análise de cobre (Cu) nas biomassas das 9 espécies coletada na Mina do Sossego em Canaã dos Carajás/ PA foi possível verificar que todas as espécies em algumas das partes (raíz, folhas e troncos) estavam no intervalo ou acima de 20-100 de Cu mg/Kg, somente o caule da planta 3 apresentou valor abaixo deste intervalo. Podendo-se assim, inferir que, com exceção da planta 3, todas as demais espécies coletadas, possuem potencial fitoextratora de cobre.

O *screening* fitoquímico das espécies coletadas, permitiu conhecer o perfil químico das mesmas, onde várias delas apresentaram bons resultados, descartando-se as raízes do pinhão manso, onde foi observado resultado positivo para a maioria das classes de substâncias analisadas. Estes dados, juntamente com o potencial das suas raízes em acumular cobre, foi o que levou ao estudo fitoquímico de seu extrato, permitindo a identificação através de RMN¹H e RMN¹³C, da mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol e o triterpeno α -amirina.

No ensaio antimicrobiano frente a bactérias *E. coli* e *B. subtilis* todas as amostras testadas não apresentaram resultados satisfatórios frente as duas bactérias *E.coli* e *B. subtilis* em todas as concentrações.

Somente o extrato etanólico, Pi.E.R, apresentou resultado bacteriostático até uma concentração de 625,0 μ L/mL, frente a bactéria *E. coli*, nas demais concentrações não apresentou atividades, a mesma não apresentou atividade bactericida. Frente a bactéria *B. subtilis* o extrato não apresentou atividades.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Julio. Cesa; TAVARES, Roberto Lucena; MAHLER, Claudio Fernando. Fitorremediação. **O uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. 1 ed. São Paulo. 2007. cap. 1, p.50-52.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatografia de extratos vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.

CARVALHO, M. G., VELANDIA, J,R.; OLIVEIRA, L. F.& BEZERRA, F. B. “**Triterpenos isolados de Eschweilera longipes Miers (Lecythidaceal)**”. Quim. Nova, 21: 740, 1998.

CLARKE, S.C., HAIGH, R. D.; FREESTONE, P.P.E., WILLIAMS, P.H. Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen.**Clinical Microbiology Review**s, v. 16, n.3, 2003, p. 365-378.

FARIA, Maria Tezera.**A importância da disciplina Botânica: Evolução e perspectivas**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade Araguaia, Goiás.

FERNANDES, Théofilo Santos. **BIOATIVIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE PINHÃO ROXO *Jatropha gossypifolia* L. SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)**.Terezina. 2012, 69f. Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia de Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

GLOBO RURAL. Biodiesel o petróleo verde, São Paulo.2012.p.45.

GOMES, Tânia Aparecida Tardelli; TOLEDO, Maria Regina Fernandes; TRABULS, Luiz Rachid. Genética Bacteriana. In: TRABULSSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1991.386f, cap. 4, p.25-35.

HELLER, J. **Physic nut (*Jatropha curcas* L.) promoting the conservation and use of underrutilized and neglected crops.** Roma: InternationalPlantGeneticResourcesInstitute, 1996, p.66 .

LANCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: Rima, 2000, p.519.

MACHADO,L.A., SILVA,V.B., OLIVEIRA,M.M., **Uso de extratos vegetais no controle de pragas em Horticultura, Biológico,** São Paulo,v.69,n.2, 2007, p.103-106.

MATOS, F. J. A.; Sousa, M. P.; Souza, T. T.; **Rev. Bras. Farm,** 1971, p.50.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza Editora UFC 2ª edição. 2002, p. 141.

MEDEIROS, A. R. M. **Alelopatia: importância e suas aplicações.** Horti Sul,v.1, n.3. 1990, p.27-32.

MUNCH, E.; KIEFER, J. F. Purging nut (*Jatropha curcas* L) multiple use plant asa source of fuel in the future.**Schriftenreihe der Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit,** Stuttgart, v. 209, n. 1, 1989, p. 32.

NOGUEIRA, E. **Uma história brasileira da botânica.** Editora Marco Zero: São Paulo. 2000, p. 135.

NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras.

PINHEIRO, Eduardo Antônio de Abreu. **Estudo químico e ensaios antimicrobianos do fungo *Aspergillus* sp. EJC 08 isolado como endofítico de *Bauhinia guianensis*.** 2012, 187f. **Dessertação**(Graduação em Química dos Produtos Naturais)- Instituto de Ciências Exatas e Natural, Universidade Federal do Pará, Belém.

RESENDE, J. C. F. et al. Pinhão manso. In: MONTEIRO, J. E. B. A. (Org.). **Agrometeorologia dos cultivos**: o fator meteorológico na produção agrícola. Brasília, DF: Instituto Nacional de Meteorologia, 2009, p. 465-476.

SAXENA, R.C. **Naturally occurring pesticides and their potential**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMISTRY AND WORLD FOOD SUPPLIES, Manila, 1982. Chemistry and food world supplies: the new frontiers. Oxford: Pergamon (IUPAC), 1983, p.143-161.

SATURNINA, J.; BATRA, A.; ALI, D. J. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. Propagation and vitro culture. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 50, n. 3, 2000, p. 239-242.

SCHAECHTER, Moselio. Introdução às Bactérias Patogênicas. In: SCHAECHTER, Mosélio et al. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 115-119.

SECCO, R. S. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Euphorbiaceae-Parte-**IRodriguésia**, v. 56, 2005. p.86.

SILVA, Deyse Christina Vallimda; CAMPOS, Leila Carvalho. Escherichia coli que causa infecções Extra-intestinais (ExPEC – Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). In: TRABULSSI, Luiz Rachid; ALTHERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 41, p. 311-320.

SILVA, Neusa Pereira; TRABULSI, Luiz Raichid. Morfologia e Estrutura da Célula Bacteriana. In: TRABULSSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1991. Cap.1, p.3-11.

SOUZA, A.D.L.; ROCHA, A.F.I.; PINHEIRO, M.L.B; ANDRADE, C.H.S.; GALOTTA, A.L.A.Q. "Constituintes químicos de *gustaraug* L. (Leajthidacia)". *Quim. Nova*, 24; 239, 2011.

TAVARES, Márcio Aurélio Gracia Correia. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* (CHENOPODIACEAE), em relação a *Sitophilus zeamais* MOTS., 1855 (COL.: Curculionidae)**. Piracicaba, 2002. 44p. Dissertação (Mestrado) -Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

TRABULSI, Luiz Rachid; TOLEDO, Maria Regina Fernandes de. Escherichia. Taxionomia Bacteriana. In: TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 2 ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1991. Cap. 5, p. 37-41.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **O uso racional de medicamentos: temas selecionados**, n. 4. 2004.

WEBSTER, G.L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals** of the Missouri Botanical Garden. 1994.

ANEXOS: TRABALHOS DIVUGADOS EM EVENTOS

AMORIM, Jaciele Silva et al. Ensaios antimicrobianos da *Jatropha curcas* L. (pinhão manso). in: I ENCONTRO REGIONAL DA SBQ-PA/III ENCONTRO ACADÊMICO DA

FACULDADE DE QUÍMICA/ UFPA/IV SEMANA DE QUÍMICA/ UNIFESSPA, 2014, Belém.

AMORIM, Jaciele Silva.et al.*Screening*fitoquímico do Pinhão- manso (*Jatropha curcas* L.).in: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2012, Natal. **Química e Sociedade: Motores e Sustentabilidade.**