

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE
JATROPHA ISABELLEI MÜLL ARG.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janaina Kieling Fröhlich

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE
JATROPHA ISABELLEI MÜLL ARG.**

por

Janaina Kieling Fröhlich

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *JATROPHA*
ISABELLEI MÜLL ARG.**

elaborada por
Janaina Kieling Fröhlich

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Paula Rossini Augusti, Dr^a. (UNIPAMPA)

Ionara Irion Dalcol, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 26 de março de 2012.

Àqueles que estão sempre ao meu lado,
pai, mãe, mano e Guilherme.
Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Medianeira pela serenidade, força e proteção.

A Universidade Federal de Santa Maria pelo acolhimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas oportunidades e por fornecer subsídios para os trabalhos apresentados e para o desenvolvimento dos experimentos.

A CAPES pela bolsa concedida.

A professora Dr. Margareth Linde Athayde pelas oportunidades de estágio e monitoria, pela orientação, pela amizade e pelo apoio fundamental ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pela amizade, atenção e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Ao professor Dr. Juliano Ferreira e aos alunos do Labneuro que tornaram possível a comprovação científica do uso popular da planta em estudo.

Aos professores João Batista Teixeira da Rocha, Sydney Hartz Alves e aos alunos Tarciéli e Romaiana que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Renato Záchia pela sugestão e pela identificação da planta.

Aos meus colegas de laboratório, Amandinha, Aline, Vanessa, Andriéli, Rose, Ritiel, Thiele, Amanda, Mariana, Marina, Jéssica e Bianca, pelo convívio, amizade, troca de conhecimentos e colaboração.

A Susi por me ajudar com os espectros de RMN.

Aos meus pais Paulo e Marta, meus alicerces e exemplos de vida, pelo amor, pelo apoio e pela torcida constante. Amo vocês!

Ao meu irmão Gabriel, pelas conversas, pela companhia e por segurar as pontas comigo por estarmos longe de casa.

Ao meu namorado Guilherme, pela força, incentivo e pelos pensamentos de que tudo vai dar certo.

A Carol e sua família por se tornarem a minha família nas horas em que precisei.

A todos os meus verdadeiros amigos que sempre torceram pelas minhas conquistas.

A todos aqueles que, pelo convívio diário, pelos encontros nos corredores, pela troca de favores e pelos sorrisos, contribuíram de alguma forma no meu trabalho.

Mas é claro que o sol, vai voltar amanhã
mais uma vez, eu sei
nunca deixe que lhe digam
que não vale a pena
acreditar nos sonhos que se tem
ou que seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém
Quem acredita sempre alcança!
Quem acredita sempre alcança!

(Renato Russo e Flávio Venturini)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *JATROPHA ISABELLEI* MÜLL ARG.

AUTORA: JANAINA KIELING FRÖHLICH
ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de março de 2012.

A espécie *Jatropha isabellei* Müll Arg pertence à família Euphorbiaceae e é conhecida popularmente como yaguá-rova, turubiti e mamoneiro do campo. A decocção das partes subterrâneas da planta é utilizada popularmente para tratar artrite, gota, dores nas costas e induzir o aborto. Este trabalho tem como objetivo determinar a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana de *J. isabellei*, bem como, isolar constituintes químicos e avaliar o uso popular para atrite gotosa em modelo animal. As partes subterrâneas de *J. isabellei* foram coletadas em maio de 2008 em Cacequi, RS. O material testemunho está depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob número de registro 11.816. O material vegetal foi seco, moído e macerado com solvente etanol:água (70:30, v/v). As frações foram obtidas por fracionamento do extrato bruto com solventes orgânicos de polaridades crescentes (diclorometano, acetato de etila, n-butanol). A fração acetato de etila apresentou a melhor atividade antioxidante frente ao radical DPPH, com IC₅₀ de 14,78 ± 1,10 µg/mL e perfil de inibição semelhante ao ácido ascórbico. Esta fração também apresentou os melhores valores no doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos condensados. O extrato bruto e a fração butanólica apresentaram atividade antioxidante proporcional ao doseamento dos ativos fenólicos. A fração diclorometano não apresentou boa capacidade antioxidante, mas proporcionou o isolamento de uma mistura de triterpenos relatados pela primeira vez na literatura para esta espécie, o sitosterol 3-O-β-D glicosídeo e estigmasterol. A indução da peroxidação lipídica por Fe(II) mostrou que todas as frações nas concentrações de 50 e 100 µg/mL foram capazes de inibir significativamente a produção de TBARS alcançando os níveis basais, quando comparadas ao controle. Na atividade antimicrobiana, a fração diclorometano apresentou os melhores resultados frente aos fungos *S. schenckii* e *F. proliferatum* e frente a bactérias do gênero *Micrococcus*. O extrato bruto de *J. isabellei* e sua fração rica em alcalóides apresentaram efeitos antinociceptivos e anti-edematogênicos em modelo animal de artrite gotosa, comprovando cientificamente o uso popular desta planta.

Palavras-chave: *Jatropha isabellei*. Capacidade antioxidante. Triterpenos. Atividade antimicrobiana. Atividade antinociceptiva e anti-edematogênica.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL STUDY OF *JATROPHA ISABELLEI* MÜLL ARG.

AUTHOR: JANAINA KIELING FRÖHLICH
ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Place and Date of the Defense: Santa Maria, March 26, 2012.

Jatropha isabellei Müll Arg. belongs to the Euphorbiaceae family and is popularly known as yaguá-rova, turubiti and mamoneiro do campo. The decoction from the underground parts of this plant is popularly used to treat arthritis, gout, back pain and induce abortion. This work aims to determine the antioxidant capacity and antimicrobial activity of *J. isabellei* as well as to isolate the chemical constituents and to evaluate the popular use for gouty arthritis in an animal model. The underground parts of *J. isabellei* were collected in May 2008, in Cacequi, RS. The material is deposited in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria under register number SMDB 11.816. The plant material was dried, milled and macerated with the solvent ethanol:water (70:30, v/v). The fractions were obtained by fractionation of the crude extract with organic solvents of increase polarity (dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol). The ethyl acetate fraction showed the best antioxidant activity against the DPPH free radical with IC₅₀ de 14.78 ± 1.10 µg/mL and inhibition profile similar to ascorbic acid. This fraction also showed the best values in the determination of phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins. The crude extract and butanolic fractions showed antioxidant activity proportional to the dosage of phenolics. The dichloromethane fraction did not showed good antioxidant capacity, but allowed the isolation of a mixture of triterpenes in first time reported for this species, sitosterol 3-O-β-D glucoside and stigmasterol. The lipid peroxidation induced by Fe (II) showed that all the fractions at concentrations of 50 and 100 µg/mL were able to inhibit significantly the production of TBARS, reaching the baseline levels when compared to control. In the antimicrobial activity the dichloromethane fraction showed the best results against the fungi *S. schenckii* e *F. proliferatum* and against bacteria of the *Micrococcus* genus. The crude extract of *J. isabellei* and its alkaloid purified fraction showed antinociceptive and antiedematogenic effects in an animal gouty arthritis model, scientifically proving the popular use of this plant.

Keywords: *Jatropha isabellei*. Antioxidant capacity. Triterpenes. Antimicrobial activity. Antinociceptive and antiedematogenic activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *Jatropha isabellei* Müll Arg – aspecto das partes aéreas da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta20

Figura 2 – *Jatropha isabellei* Müll Arg – aspecto geral da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta20

Artigo de revisão bibliográfica: “Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (Müell Arg.) com atividade gastroprotetora”

Figura 1 – Estrutura dos terpenos isolados de *Jatropha isabelli* Müell Arg.24

Figura 2 – Estrutura dos compostos 1-8 derivados do ácido ciperenóico26

Figura 3 – Estrutura da jatrolona A (1), jatrolona B (8) e seus derivados semisintéticos27

MANUSCRITOS

Capítulo 1 - Antioxidant capacity, inhibition of lipoperoxidation, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Figure 1. Antioxidant activities of the ethyl acetate and butanolic fractions and crude extract from the underground parts of *J. isabellei*.....46

Figure 2. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, butanolic fractions from *J. isabellei* on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates.46

Figure 3: Acetil aleuritolic acid; sitosterol 3-O-β-D glucoside and stigmasterol.....47

Capítulo 2 - Antinociceptive and anti-edematogenic effect of *Jatropha isabellei* crude extract in arthritic gout-type pain in rats

- Figure 1. Effect of *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) on the nociception induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). Time course and dose-effect of anti-allodinic effect; time course and dose-effect of anti-hyperalgesic effect of crude extract of *J. isabellei* orally.80
- Figure 2. Effect of *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) on the ankle edema induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). Time course and dose-effect of anti-edematogenic effect of crude extract of *J. isabellei* orally.81
- Figure 3. Effect of *J. isabellei* crude extract on the neutrophil infiltration induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site), analyzed 6 hours after MSU injections.82
- Figure 4. Biochemical changes induced by potassium oxonate administration (250 mg/kg, i.p.). Effect of allopurinol and *J. isabellei* crude extract in the seric level of uric acid 2 hour after PO treatment.83
- Figure 5. *In vitro* Xanthine oxidase activity. Effect of allopurinol and different concentrations of *J. isabellei* over xanthine oxidase *in vitro* activity.....84
- Figure 6. Effect of a fraction rich in alkaloids extracted from *J. isabellei* in the nociception and inflammation induced by intra-articular MSU injections (1.25 mg/site). Anti-allodinic, anti-hiperalgesic and anti-edematogenic effects of the fraction rich in alkaloids orally administrated.85

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITOS

Capítulo 1 - Antioxidant capacity, inhibition of lipoperoxidation, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Table 1. Total phenolic, flavonoids and condensed tannins content from the underground parts of *J. isabellei*.....48

Table 2. Antimicrobial activity of the underground parts of *J. isabellei*.....48

Capítulo 2 - Antinociceptive and anti-edematogenic effect of *Jatropha isabellei* crude extract in arthritic gout-type pain in rats

Table 1: Substances characterized by TLC technique.....61

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs: Absorvância

AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais

¹³C -RMN: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

CCD: Cromatografia em camada delgada

CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2 difenil- 1picrilhidrazila

¹H -RMN: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio deuterado

i.a.: Intra-articular

IC₅₀: Concentração inibitória para 50 por cento

i.p.: Intraperitoneal

MIC: Minimal inhibitory concentration, concentração inibitória mínima

MSU crystals: Monosodic urate crystals, cristais de urato monossódico

p.o.: Via oral

PMN: Leucócitos polimorfonucleares

PO: Potassium oxonate, oxonato de potássio

PWL: Paw withdrawal latency, latência de retirada de pata

PWT: Paw withdrawal threshold, limiar de retirada de pata

TBARS: Thiobabituric acid reactive substances, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

XO: Xantina oxidase

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 01:** Espectro de ^{13}C -RMN (100MHz, DMSO): Sitosterol 3-O- β -D glicosídeo e estigmasterol.....106
- Anexo 02:** Espectro de ^1H -RMN (400MHz, DMSO): Sitosterol 3-O- β -D glicosídeo e estigmasterol.....107
- Anexo 03:** Espectro de ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3): Ácido acetil aleuritólico.....108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 A família Euphorbiaceae.....	18
3.2 O gênero <i>Jatropha</i>	19
3.3 A espécie <i>J. isabellei</i>	19
Artigo de revisão bibliográfica: “Compostos isolados de <i>Jatropha isabelli</i> (Müell Arg.) com atividade gastroprotetora”.....	21
3.4 Capacidade antioxidante de <i>J. isabellei</i>	30
3.5 A planta <i>J. isabellei</i> e o tratamento da gota.....	32
4 MANUSCRITOS.....	35
Capítulo 1 - Antioxidant capacity, inhibition of lipoperoxidation, antimicrobial activity and triterpenes isolated from <i>Jatropha isabellei</i> Müll Arg.....	35
Capítulo 2 - Antinociceptive and anti-edematogenic effect of <i>Jatropha isabellei</i> crude extract in arthritic gout-type pain in rats.....	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade das plantas constitui-se na principal fonte de compostos naturais ativos. O uso de produtos naturais é antigo e por muito tempo, minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas (RATES, 2001).

A fitoterapia se caracteriza pelo tratamento com o uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas sem a utilização de princípios ativos isolados e representa parte importante da cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações (ARAÚJO et al., 2007). Nas últimas décadas, o interesse pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e encontra-se em expansão o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos. As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas, sendo que o Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. Além de seu uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas também são utilizadas em práticas populares e tradicionais como medicamentos caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina popular. O Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006). Informações de grupos indígenas tem desempenhado um papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas e os remédios indígenas estão ganhando popularidade entre as pessoas das áreas urbanas e rurais (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de fármacos não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos (fitoterápicos), mas também como matérias-primas isoladas (fitofármacos), para a síntese, ou como modelo para compostos farmacologicamente ativos. A importância das substâncias naturais derivadas de plantas quanto à sua função biológica e sua ampla diversidade molecular é

reconhecida no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997; GUERRA, NODARI, 2007). O avanço da química orgânica permitiu a obtenção de compostos puros e ainda possibilitou as modificações estruturais, visando produzir fármacos potencialmente mais ativos, seguros e com menos efeitos colaterais. Alguns exemplos de drogas importantes obtidas de plantas são a digoxina da *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, atropina de *Atropa belladonna*, a morfina e a codeína de *Papaver somniferum* e o paclitaxel de *Taxus brevifolia*. (GUERRA, NODARI, 2007; RATES, 2001).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO et al, 2001). Dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são originários de plantas e um número significativo destes são sintetizados a partir de precursores naturais (RATES, 2001). No Brasil, de 1999 para 2000, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos aumentou 15%, enquanto o crescimento do mercado de medicamentos sintéticos foi de apenas 3 a 4% (ABIFITO, 2001).

A 8ª Conferência Nacional de Saúde, realizada no ano de 1986, trouxe, entre suas recomendações, a “introdução de práticas alternativas de assistência à saúde no âmbito dos serviços de saúde, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida”. Por sua vez, a então Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos no ano de 1995. Em 1996, a 10ª Conferência Nacional de Saúde recomendou a incorporação, no SUS, das práticas de saúde como fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares. Todavia, a inserção das plantas no SUS foi concretizada somente em 2006 através da aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo decreto 5.813 de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006).

A utilização de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde pode se constituir numa alternativa terapêutica muito útil devido a sua eficácia aliada a um baixo custo operacional, a relativa facilidade para aquisição das plantas e a compatibilidade cultural do programa com a população atendida (MATOS, 1994).

A OMS descreve o perfil da maioria dos usuários de plantas medicinais como sendo a maioria da população mundial que vive principalmente em países em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna e aos medicamentos sintéticos e fitoterápicos, recorrendo então à medicina popular (FARNSWORTH et al., 1985) que se apresenta disponível, entre outras formas, como produtos comercializados por raizeiros e ervanários em feiras livres ou extraídos de fontes próximas aos locais de residência (MACIEL et al., 2002). Estima-se que nestes países, 65-80% da população dependa exclusivamente das plantas medicinais para a saúde básica. Contudo, mesmo nos países desenvolvidos grande parte da população faz uso de remédios populares e apesar do fácil acesso à medicina moderna, o uso das ervas medicinais manteve a sua popularidade por razões históricas e culturais (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal desta dissertação foi estudar fitoquímica e farmacologicamente as partes subterrâneas da espécie *Jatropha isabellei* Müll Arg (Euphorbiaceae).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade antioxidante de *J.isabellei* pelo método do DPPH e TBARS no extrato bruto e nas frações diclorometano, acetato de etila e butanólica.
- Quantificar, por métodos espectrofotométricos, taninos condensados, flavonóides, polifenóis totais e alcalóides no extrato bruto e nas frações.
- Isolar e elucidar, através de ressonância magnética nuclear, alguns metabólitos secundários a partir da fração diclorometano.
- Verificar a atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações através do método de microdiluição em caldo.
- Avaliar o extrato bruto em modelo experimental de gota em ratos, visando comprovar o seu uso popular.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A família Euphorbiaceae

Os vegetais pertencentes à família Euphorbiaceae são de hábitos diferentes: existem ervas, arbustos, árvores e plantas volúveis (trepadeiras). Em geral o caule e as folhas contêm látex branco, o que é uma característica dessa família (SCHULTZ, 1985). Em muitas espécies este látex contém uma elevada concentração de borracha, como por exemplo, em *Hevea brasiliensis*, principal e mais rendoso produtor de borracha (WEBERLING, SCHWANTES, 1986)

Segundo Weberling e Schwantes (1986) e Joly (1998), esta família compreende 290 gêneros e 7500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais, sendo essa família muito bem representada na flora brasileira. Os maiores centros de dispersão encontram-se na América e na África.

As plantas da família Euphorbiaceae são muito úteis ao homem. Dentre estas, destacam-se a mamona (*Ricinus* spp), originária da região norte-africana e com sementes ricas em óleo (óleo de rícino); o tungue e a noqueira de Iguape ou noqueira brasileira, ambos do gênero *Aleurites*, com sementes que produzem óleo industrial de baixo ponto de congelamento (o que é essencial para certos tipos de lubrificação); a seringueira da Amazônia (*Hevea* spp), que é a maior produtora de borracha e a mandioca (*Manihot* spp), que, com suas raízes tuberosas, fornece amido e farinha. Outras euforbiáceas são utilizadas como plantas medicinais, dentre estas, a mais conhecida é a quebra-pedras (*Phyllanthus* spp), utilizada para o tratamento de cálculos renais (JOLY, 1998; LAWRENCE, 1977).

Dentre os gêneros nativos no Brasil destacam-se, pelo número de espécies e pela sua utilidade, os seguintes: *Croton* (sangue-de-dragão), *Phyllanthus*, *Euphorbia* e *Jatropha*, com várias espécies ornamentais, seja pelas folhas palmíticas exóticas, pelo caule intumescido ou pelas flores e inflorescências vermelhas (JOLY, 1998).

3.2 O gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* contém aproximadamente 170 espécies conhecidas e está entre os quinze mais numerosos da família Euphorbiaceae. Linnaeus (1753) foi o primeiro a nomear o gênero *Jatropha*. O nome do gênero deriva da palavra grega *jatrós* que significa médico, e *trophé* que quer dizer alimento. *Jatropha* é um gênero com plantas do tipo arbusto e árvores resistentes à seca e que crescem em países tropicais e subtropicais. São amplamente distribuídas em áreas selvagens ou semicultivadas na América do Sul e Central, África, Índia e sudoeste da Ásia (KUMAR, SHARMA, 2008).

Um grande número de substâncias naturais bioativas, principalmente diterpenos e triterpenos, têm sido isolados de extratos das espécies do gênero *Jatropha*. Outros compostos já isolados incluem lignanas, cumarinas, flavonóides, alcalóides, peptídeos cíclicos e fitoesteróis (ZHANG et al., 2009).

3.3 A espécie *J. isabellei*

Uma revisão bibliográfica sobre a espécie *J. isabellei* (Figuras 1 e 2) foi realizada e os dados encontram-se no artigo intitulado “Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (Müell Arg.) com atividade gastroprotetora”, publicado na Revista Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, volume 36, número 2, julho/dezembro 2010.

Todas as publicações que compreendem o artigo de revisão sobre a espécie em questão, utilizam o nome da planta escrito da forma *Jatropha isabelli* Müell Arg.; entretanto, por questões de padronização do latim, atualmente o nome correto da planta de acordo com o site “The Plant List: a working list of all plant species” (preconizado por muitos periódicos para a verificação da nomenclatura correta das plantas), é: *Jatropha isabellei* Müll Arg. Devido este fato, em todos os trabalhos produzidos pelo nosso grupo de pesquisa optou-se por utilizar a nomenclatura mais atual.



Figura 1 – *Jatropha isabellei* Müll Arg – aspecto das partes aéreas da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta (Cacequi, RS).



Figura 2 – *Jatropha isabellei* Müll Arg – aspecto geral da planta. Imagem obtida da planta em seu local de coleta (Cacequi, RS).

3.4 Capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana de *J. isabellae*

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo e os radicais livres são produzidos naturalmente nos processos fisiológicos ou por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

O excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet$), hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) causam a oxidação de biomoléculas como o DNA, lipídios e proteínas levando eventualmente às doenças crônicas decorrentes do estresse oxidativo, como câncer, arterosclerose, doenças cardiovasculares e pulmonares, catarata, doenças degenerativas, diabetes, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. (CAI et al, 2004; FERREIRA, MATSUBARA, 1997; SILVA et al., 2006; SOUSA et al, 2007).

O ser humano possui vários mecanismos antioxidantes que controlam os radicais livres e evitam os danos produzidos por EROs, que são compostos potencialmente agressivos às células, principalmente aos neurônios. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (superóxido dismutase (SOD) e glutathione reduzida (GSH), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px)) ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Em estudos recentes ficou evidente que alimentos ricos em substâncias antioxidantes desempenham papel importante na prevenção de doenças, incluindo as neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Mal de Alzheimer (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). O consumo de antioxidantes naturais também está associado com a redução dos riscos de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças associadas com o envelhecimento e o estresse oxidativo (HERTOG et al, 1993).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em baixas concentrações, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir da neutralização por antioxidantes não são

reativos para propagar a reação em cadeia e formam produtos estáveis (SOUSA et al, 2007).

As plantas contêm uma ampla variedade de metabólitos secundários com estrutura química favorável à captação e neutralização de radicais livres. São exemplos disso os polifenóis, flavonóides, taninos, carotenóides, quinonas, cumarinas, terpenóides, antocianinas e as vitaminas, que possuem grande capacidade antioxidante (CHOI et al, 2002; REEDY, ODHAV, BHOOLA, 2003).

Estudos têm demonstrado que muitas destas substâncias antioxidantes também possuem atividades antiinflamatória, contra arterosclerose, antitumoral, na inibição da peroxidação lipídica, antimicrobiana e antiviral (CARLUCCIO et al, 2003; HARBONE, WILLIAMS, 2000; MIDDLETON JR., CHITHAN, THEOHARIDES, 2000; SHAHAT, 2002).

Nos países em desenvolvimento, muitas doenças estão associadas à falta de saneamento básico e água potável, o que torna as pessoas mais susceptíveis às infecções virais, fúngicas e bacterianas, fazendo com que o uso de agentes antimicrobianos aumente. Apesar da evolução das pesquisas farmacêuticas para a produção de novos antibióticos, a resistência microbiana a estes fármacos aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos (COHEN, 1992). O mesmo ocorre com os fungos e os vírus.

O uso de plantas reconhecidas na medicina popular pela sua atividade antimicrobiana adquiriu significado importante no tratamento de infecções, pois se dá com fins profiláticos e paliativos. Devido a este fato, ultimamente muitos trabalhos tem sido realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana. Sabe-se que esta atividade tem sido atribuída a diferentes compostos bioativos, como flavonóides, terpenos e taninos.

Estas observações levam à busca de novos ativos antioxidantes e antimicrobianos derivados de plantas, que surgem como uma promissora alternativa terapêutica para várias doenças. Adicionalmente, não existem estudos avaliando a capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana de *J. isabellei*.

3.5 J. *isabellei* e o tratamento da gota

A gota é uma doença metabólica que se caracteriza por altos níveis de ácido úrico no sangue como resultado de uma produção excessiva ou excreção diminuída. A hiperuricemia resulta na deposição de cristais de urato sódico (que é o produto final do metabolismo das purinas - guanina e adenina), nos tecidos, especialmente nos rins e articulações, causando episódios recorrentes de artrite aguda e levando progressivamente à artrite gotosa crônica, com o desenvolvimento da gota tofácea (BIEBER, TERKELTAUB, 2004; CHAMPE, HARVEY, FERRIER, 2006). Os tofos são depósitos de cristais de urato que ocorrem nos tecidos subcutâneos, sendo o cotovelo, a região aquiliana, mãos e pavilhão auricular os locais mais freqüentes e costumam aparecer cerca de dez anos após recorrentes crises de gota (EMMERSON, 1996; NOVAES, 2008).

Fatores que contribuem para o aumento da produção de ácido úrico e o desenvolvimento de gota incluem uma dieta rica em proteínas, hipertensão, doenças renais, envelhecimento, o consumo de álcool e a obesidade (BIEBER, TERKELTAUB, 2004; EMMERSON, 1996).

A deposição de cristais de urato monossódico nas articulações desencadeia um processo inflamatório devido à infiltração de neutrófilos polimorfonucleares que fagocitam os cristais, ocorrendo assim a liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , enzimas lisossomais e interleucinas) os quais amplificam a resposta inflamatória. Além disso, o aumento da produção de lactato nos tecidos sinoviais devido as lesões, promove a diminuição do pH, o que aumenta a deposição dos cristais de urato (CHAMPE, HARVEY, FERRIER, 2006; RANG, DALE, RITTER, 2001; SILVA, 2006)

O diagnóstico de gota baseia-se na associação de crises de artrite, presença de tofos e hiperuricemia. É aceito que o diagnóstico certo da gota seja feito pela identificação de cristais de urato no líquido sinovial ou nos tofos (EMMERSON, 1996; NOVAES, 2008).

O tratamento da gota visa o alívio da dor do ataque agudo e a prevenção das complicações associadas com a deposição crônica de cristais de urato nos tecidos. Os AINEs e a colchicina são utilizados para o tratamento da gota aguda. No

tratamento preventivo, utilizam-se drogas capazes de inibir a síntese de ácido úrico, como o alopurinol, ou que aumentem a sua excreção renal, os denominados agentes uricosúricos, como a probenecida, sulfimpirazona e a benzobromarona (SILVA, 2006). Entretanto, a terapia medicamentosa da gota apresenta efeitos colaterais e muitas vezes os fármacos não são tolerados pelo organismo dificultando a adesão ao tratamento. Novas alternativas para tratar as crises de gota estão sendo estudadas e muitas delas provêm de plantas que se mostram eficazes nesta patologia. A planta *J. isabellei* é utilizada com esta finalidade na medicina popular, o decocto das partes subterrâneas da planta é indicado para tratar reumatismo e gota (PERTINO et al, 2007). Contudo, nenhuma evidência científica existe acerca da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva desta espécie.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta seus resultados na forma de manuscritos, os quais constituem os capítulos 1 e 2. Cada capítulo é constituído de introdução, metodologias, resultados e discussões e conclusão. Os manuscritos encontram-se formatados de acordo com os periódicos para onde serão submetidos.

Além disso, esta dissertação contempla um item das considerações finais, no qual os resultados são interpretados em conjunto, das conclusões e das referências bibliográficas, as quais são relativas às seções introdução, revisão bibliográfica e considerações finais.

Na seção dos anexos são apresentados os espectros de ressonância magnética nuclear dos compostos isolados.

4 RESULTADOS

Capítulo 1 – FRÖHLICH, J.K.; FROEDER, A.L.F.; JANOVİK, V.; VENTURINI, T.P.; PEREIRA, R.P.; BOLIGON, A.A.; BRUM, T.F.; ALVES, S.H.; ROCHA, J.B.T.; ATHAYDE, M.L. Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Manuscrito a ser submetido ao periódico **Natural Product Research**

RESEARCH ARTICLE

Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Janaina Kieling Fröhlich^{a*}; Amanda Luana Forbrig Froeder^a; Vanessa Janovik^a; Tarcieli Pozzebon Venturini^b; Romaiana Picada Pereira^c; Aline Augusti Boligon^a; Thiele Faccim de Brum^a; Sydney Hartz Alves^b; João Batista Teixeira da Rocha^c; Margareth Linde Athayde^a.

^a *Phytochemical Research Laboratory at Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

^b *LAPEMI Research Laboratory at Department of Parasitology and Microbiology, Federal University of Santa Maria, build 20, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

^c *Biochemical Laboratory at Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, build 18, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

* Corresponding author. E-mail: janafröhlich@yahoo.com.br

Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Jatropha isabellei Müll Arg. belongs to the family Euphorbiaceae. The antioxidant capacity of this plant was evaluated by the DPPH method and inhibition of TBARS. Ethyl acetate fraction demonstrated the best antioxidant activity against DPPH free radical and its profile was similar to ascorbic acid. This fraction also presented the best results of phenolics, flavonoids and condensed tannins showing a positive relation between phenolic content and antioxidant activity. All fractions and the crude extract were able to inhibit significantly the TBARS production induced by Fe (II) at two concentrations tested reaching the basal levels. In this test ethyl acetate and dichloromethane fraction showed good values for IC₅₀. The dichloromethane fraction showed the best results against the fungi *S. schenckii* and *F. proliferatum* and the bacterium of *Micrococcus* genus. This fraction allowed the isolation of acetyl aleuritic acid and a mixture of sitosterol 3-*O*- β -D glucoside and stigmasterol, described for the first time to this species.

Keywords: *Jatropha isabellei*; antioxidant capacity; antimicrobial activity; triterpenes

1. Introduction

In recent years, there is a great interest in the study of antioxidants derived from plants because even in small quantities they are able to prevent diseases caused by free radicals (Noguchi & Niki, 2000). The consumption of natural antioxidants has been associated with a lower incidence of diseases related to oxidative stress. The protective effect of plants is due to the presence of several components which have distinct mechanisms of action like vitamins, carotenoids, flavonoids and other phenolic compounds (Halliwell, 1996; Le Marchand, 2002).

Compounds with antimicrobial activity also has been investigated and the searches for new anti-infections agents showed that plant extracts, essential oils or isolated compounds such as alkaloids, flavonoids, diterpenes, triterpenes and sesquiterpene lactones are potential sources of bioactive compounds (Ríos & Recio, 2005).

Jatropha isabellei Müll Arg. belongs to the family Euphorbiaceae and is popularly known as “yagua rova”, “turubiti” and “mamoneiro-do-campo” (Fröhlich et al, 2010). In the Paraguayan traditional medicine the decoction of the rhizome slices is used as a digestive, to treat rheumatism, human gout and to induce abortion (Basualdo & Ortiz, 1995). In spite of the popular use, little is known about the secondary metabolites from this species. Only terpenes were isolated from rhizomes of *J. isabellei* and their structures were modified to assess their gastroprotective activity (Pertino, Rodriguez, Theoduloz, Razmilic, & Schmeda-Hirschmann, 2006; Pertino, Schmeda-Hirschmann, Rodriguez & Theoduloz, 2007a; Pertino, Schmeda-Hirschmann, Rodriguez & Theoduloz, 2007b). Some of these compounds were analyzed regarding the antiproliferative and antiprotozoal activity (Theoduloz, Rodriguez, Pertino & Schmeda-Hirschmann, 2009; Schmeda-Hirschmann & Razmilic, 1996).

In addition to the terpenes, other compounds are known for the genus *Jatropha*, such as lignans, coumarins, flavonoids, alkaloids, cyclic peptides and phytosterols (Zhang et al, 2009).

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity and the antioxidant capacity from this species, to determine which classes of compounds are involved in these activities and isolate and identify novel actives for this plant.

2. Results and discussion

2.1. Free radical-scavenging activity (DPPH)

Antioxidant profiles from the fractions of *J. isabellei* are shown in Figure 1.

DPPH is a stable free radical that is used for analyzing the antioxidant activity from extracts and pure substances and its results can indicate the presence of phenolic and flavonoid compounds (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996). The method is based on the reduction of alcoholic DPPH solutions in the presence of a hydrogen donating antioxidant. This solution has an intense violet color and in the presence of an active radical scavenger occurs the degree of decoloration which indicates the free radical-scavenging efficiency of the fractions (Kusilic, Radonic, Katalinic & Milos, 2004).

Ethyl acetate fraction demonstrated the best antioxidant activity and its profile (Figure 1) was similar to that found for ascorbic acid in all concentrations tested. This can be seen by the similar values of IC₅₀ (14.78±1.10 µg/mL for ethyl acetate fraction and 12.66±1.40 µg/mL for ascorbic acid. This value is not present significant difference at p<0.05).

The concentration of 250 µg/mL from crude extract and butanolic fraction also showed a good antioxidant activity, with 80.4 and 74.83% of inhibition respectively; however, with decreasing concentration it is clear the distance between this activity and that provided by ascorbic acid a fact which leads to increased concentrations of IC₅₀ (124.60±1.04 and 121.05±1.90 µg/mL, respectively). This values not present significant difference at p<0.05; but are statistically different of IC₅₀ values of the ascorbic acid and ethyl acetate fraction. In contrast, dichloromethane fraction showed a reduced ability to sequester free radicals and this way, was not presented in Figure 1. This fact can be explained by the different composition between each fraction; there are compounds that react quickly with the DPPH and others that have a slower reaction mechanism. It is important to remark that as free radicals in the organism are short-lived species it implies that the impact of a substance as an antioxidant depends on its fast reactivity towards free radicals (Villaño, Fernández-Pachón, Moyá, Troncoso & García-Parrilla, 2007).

2.3 In vitro Fe (II)-induced lipid peroxidation in rat brain

The antioxidant capacity of the crude extract and fractions from underground parts were tested against Fe (II), a known pro-oxidant. After the oxidation, the TBA (thiobarbituric acid) reacts with lipoperoxidation aldehydes, such as malondialdehyde (MDA), producing a red color detected at 532nm. The encephalic tissue obtained from rats is used since the brain is vulnerable to free radical damage due the fact of its consumption of oxygen and low concentration of antioxidant enzymes and free radical scavengers. The two highest concentration tested (50 and 100 µg/mL) for all fractions and the crude extract were able to inhibit significantly the TBARS induced by Fe (II) when compared to the control (p<0.001), reaching baseline levels (Figure 2).

Considering the concentration able to inhibit the TBARS production in 50 percent (IC₅₀ - µg/ml ± SEM), the ethyl acetate fraction showed the smaller value (34.5 ± 8.5), following by the dichloromethane and butanolic fractions (37.8 ± 9.7 and 49.04 ± 2.9, respectively) and by the crude extract (51.19 ± 4.25). This values do not present significant difference at p<0.05.

2.3. Phenolic and flavonoid contents and condensed tannins

The phenolic, flavonoids and condensed tannins content from the underground parts of *J. isabellei* are shown in Table 1.

Plant phenolics include simple phenols, phenolic acids (both benzoic and cinnamic acid derivatives), coumarins, flavonoids, stilbenes, hydrolysable and condensed tannins, lignans, and lignins (Naczka & Shahidi, 2004); these have received more attention because of their biological activities.

Comparing the values of phenolics, flavonoids and condensed tannins it can be seen that the ethyl acetate is the fraction that presents the best results and these values shown a positive relation between phenolic content and its antioxidant activity (Table 2 and Figure 1). Crude extract and butanolic fraction also had shown a positive and proportional relation with the antioxidant activity. Several authors have described this correlation in plants as *Cassia fistula*, *Terminalia brasiliensis*, *Cenostigma macrophyllum* and *Copernicia cerifera* (Luximon-Ramma, Bahorun, Soobrattee & Aruoma, 2002; Souza et al, 2007). The same occur with the underground parts of *J. isabellei*.

Many other studies have demonstrated that the more polar fractions are good sources of antioxidant compounds and exhibited stronger activity than non-polar extracts and these effects can be explicate mainly due to its contents of phenols. The free radical scavenging activity from extracts of opposite polarity of *Salvia tomentosa* demonstrated that the methanolic extract showed IC₅₀ 18.7 µg/mL, a value seven times lower than that showed by the dichloromethane fraction (Tepe, Daferera, Sokmen, Sokmen & Polissiou, 2005). These conditions were found in a similar manner to the crude extract and fractions of *J. isabellei*.

The dichloromethane fraction demonstrated the lowest quantification of phenolic compounds and a lower antioxidant activity. This fact can be explain due the polarity of this solvent which did not extract more polar compounds such as phenols; the terpenes often extracted by this solvent react weakly with DPPH.

The inhibition of lipid peroxidation by the underground parts of *J. isabellei* was related with the phenolic content. Phenolic compounds, mainly presents in the ethyl acetate fraction, are known to inhibit lipid peroxidation and lipooxygenase *in vitro* (Sousa et al, 2007). Dichloromethane fraction also showed very good IC₅₀ value; this fact can be explained in part due to the presence of triterpenes. Isolated compounds sitosterol and stigmasterol were tested for their antioxidant activity by evaluating of the capacity to inhibit peroxide formation in linoleic acid (by the thiocyanate method) and demonstrated 21 and 9% of inhibition respectively (Hung & Yen, 2001).

2.4 Identification of isolated compound acetyl aleuritolic acid and the mixture of sitosterol 3-O-β-D-glucoside and stigmasterol

Column chromatography of the dichloromethane fraction led to the isolation of the acetyl aleuritolic acid (1) and the binary mixture of sitosterol-3-O-β-D-glucoside (2) and stigmasterol (3). Acetyl aleuritolic acid has been isolated from this species (Pertino et al, 2007a) and it was isolated by our group again. The structure was identified based on the ¹³C NMR data and by comparison with literature data (Mc Lean, Perpich-Dumont, Reynolds, Jacobs & Lachmansing, 1987; San Gil et al, 2008). The ¹³C NMR assignments (400MHz/ppm) of compound acetyl aleuritolic acid in deuterated CHCl₃ solvent are: δ C 37.33 (C1); 23.49 (C2); 80.70 (C3); 37.67 (C4); 55.70 (C5); 18.71 (C6); 40.81 (C7); 39.09 (C8); 49.20 (C9); 38.00 (C10); 17.29 (C11); 33.37 (C12); 37.33 (C13); 160.41 (C14); 116.71 (C15); 31.38 (C16); 51.57 (C17); 41.48 (C18); 35.43 (C19); 29.29 (C20); 33.77 (C21); 30.83 (C22); 27.93 (C23); 16.59 (C24); 15.59 (C25); 26.18 (C26); 22.43 (C27); 183.83 (C28); 31.95 (C29); 28.63 (C30); 171.04 (C=O); 21.22 (CH₃, acetate gr.).

The mixture of sitosterol-3-O-β-D-glucoside (2) and stigmasterol (3) is first reported for this species. The structures were identified based on the ¹H NMR and ¹³C NMR data and by comparison with literature data (Agrawal, 1992; De-Eknankul & Potduang, 2003; Iribarren & Pomillio, 1983; Janovick et al, 2012; Boligon et al, 2010). The sp² signals at δ 140.69, 138.25, 129.05 and 121.37 ppm indicate the presence of four olefin carbons. The signals at δ 140.69 and 121.37 ppm are characteristic of steroids with a double bond at carbons 5 and 6 (Forgo & Kövér, 2004; De-Eknankul & Potduang, 2003) whereas the signals 138.25 and 129.05 ppm are typical of triterpenes with a double bond at C22 and C23 (Forgo & Kövér, 2004; Zanon, Pereira, Boschetti, Santos & Athayde, 2008). β-Sitosterol and stigmasterol have a double bond at the same position (Δ⁵), therefore the signals at the ¹³C NMR spectra will coincide and this way C-5 and C-6 will be more intense when compared with the other two sp² signals (Δ²²) that belong only to stigmasterol (De-Eknankul & Potduang, 2003). In the ¹H NMR spectrum, stand out the large singlet signal at 5.32 ppm that is characteristic of H-6 of both compounds and the doublet at δ 5.17 and 5.04 ppm (H-23 and H-22, respectively) that characterize the olefinic hydrogens of stigmasterol (De-Eknankul & Potduang, 2003; Forgo & Kövér, 2004).

The ¹³C NMR allowed identify one anomeric carbon signal at δ 100.89 ppm. The appearance of anomeric resonances in chemical shifts range 90-112 ppm helps greatly in determining the number of O-glycosides, since none of the carbons of the aglycone absorb in

this region and anomeric resonances are usually non-equivalents and do not superimpose on one another (Agrawal, 1992). The presence of glucosyl residue at C-3 of the aglycone of sitosterol was attributed to the carbon with chemical shift at δ 79.25 ppm. The glucosyl residue at C-3 of aglycone increases the shift of this carbon in 6-7 ppm to low-field region compared with the shift of this carbon without glucosyl residue (Chaurasia & Wichtl, 1987). The C-3 of the stigmasterol does not appear linked to glycoside because its chemical shifts (δ 73.59 ppm) is in a more protected region of the spectrum. The glucosyl residue was identified as β -D-glucose by comparison of the ^{13}C NMR spectrum with the literature (Agrawal, 1992).

The ^{13}C NMR assignments (400MHz/ppm) of compounds sitosterol 3-O- β -D glucoside (2) and stigmasterol (3) in solvent deuterated DMSO are: δ C 38.42 (C-1, 2+3); 31.37 (C-2, 2+3); 79.25 (C-3, 2); 73.59 (C-3, 3); 41.69 (C-4, 2); 41.94 (C-4, 3); 140.69 (C-5, 2+3); 121.37 (C-6, 2+3); 31.51 (C-7, 2+3); 31.41 (C-8, 2+3); 49.72 (C-9, 2+3); 36.96 (C-10, 2+3); 22.16 (C-11, 2+3); 39.93 (C-12, 2); 39.71 (C-12, 3); 41.94 (C-13, 2+3); 56.33 (C-14, 2+3); 24.95 (C-15, 2+3); 28.82 (C-16, 2); 29.06 (C-16, 3); 55.52 (C-17, 2+3); 14.02 (C-18, 2); 11.94 (C-18, 3); 20.69 (C-19, 2+3); 36.30 (C-20, 2); 40.12 (C-20, 3); 18.73 (C-21, 2); 22.16 (C-21, 3); 33.45 (C-22, 2); 138.25 (C-22, 3); 27.88 (C-23, 2); 129.05 (C-23, 3); 45.27 (C-24, 2); 50.74 (C-24, 3); 29.36 (C-25, 2); 31.47 (C-25, 3); 21.03 (C-26, 2); 22.73 (C-26, 3); 19.81 (C-27, 2); 18.94 (C-27, 3); 23.97 (C-28, 2); 25.56 (C-28, 3); 14.02 (C-29, 2); 12.19 (C-29, 3); 100.89 (C-1'); 76.82(C-2'); 76.86 (C-3'); 70.25 (C-4'); 77.05 (C-5'); 61.23 (C-6').

The approximate percentage of each constituent of the mixture was determined according Goulart et al, 1993, using the ^1H NMR spectrum and the relative intensities corresponding to H-6 (sitosterol 3-O- β -D glucoside and stigmasterol) and H-22 e H-23 (stigmasterol). This method allowed deduct that the mixture has 80% of sitosterol 3-O- β -D glucoside and 20% of stigmasterol. Several authors found the higher values in the quantification of β -sitosterol when isolated in a mixture with stigmasterol (Galotta & Boaventura, 2005; Boligon, 2010). The progressive increase in the proportion of stigmasterol compared to β -sitosterol from the root into the stem can be attributed to the rate of incidence of light that determine the bioconversion of β -sitosterol in stigmasterol (Galotta & Boaventura, 2005).

2.5 Antimicrobial activity

The data of the antimicrobial activity from the crude extract and fractions of *J. isabellei* are shown in Table 2. The crude extract and fractions were not active against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* and *P. zopfii* (MIC \geq 2000 $\mu\text{g/mL}$).

Dichloromethane was the fraction that show the best results against the microorganisms tested. Good results were obtained against the fungi *S. schenckii* and *F. proliferatum* and the bacterium of *Micrococcus* genus. The antimicrobial activity of the dichloromethane fraction can be attributed to the terpenes known for this species. This fact is reported in many studies about the antifungal and antibacterial of diterpenes and triterpenes (Urzua et al., 1998; Tabopda et al., 2009; Chen, Fei, Chen & Gao, 2008; Singh & Dubey, 2001). Some compounds presents in various plants and already identify into *J. isabellei* were tested against different microorganisms and their antimicrobial capacity was related. The acetyl aleuritolic acid isolated from *Croton urucurana*, showed MIC of 0.1 mg/mL against *S. aureus* and *S. typhimurium* (Peres, Monache, Cruz, Pizzolatti & Yunes, 1997). The β -sitosterol and stigmasterol isolated from *Heliotropium ellipticum* also showed notable antifungal and antibacterial activity against the microorganisms tested. All isolated terpenes in this study showed better antimicrobial activity than its corresponding fraction (Jain, Singh & Jain, 2001).

This assay shows a low susceptibility of the microorganisms tested against the ethyl acetate and butanolic fraction and crude extract. This fact can be explain, in part, due the low content of flavonoids (Table 2) in this samples, since this class of secondary metabolites have antifungal and antibacterial activity recognized (Harborne & Williams, 2000).

3. Conclusions

The ethyl acetate fraction from the underground parts of *J. isabellei* showed a good antioxidant activity by the inhibition of the free radical DPPH and this can be explain due the content of phenolics, flavonoids and condensed tannins. All the fractions and the crude extract were effective in inhibit TBARS production; the best IC₅₀ values were obtained with ethyl acetate and dichloromethane fractions and this can be attributed, at least in part, to the presence of phenolics and terpenes. Sitosterol 3-*O*- β -D-glucoside and stigmasterol were isolated from the dichloromethane fraction and were described for the first time for *J. isabellei*. The good antimicrobial activity presented by the dichloromethane fraction, is probably due to the abundance of terpenes in this fraction.

References

- Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31 (10), 3307-3330.
- Basualdo, E.M.Z. & Ortiz, M. (1995). *Medicinal plants of Paraguay: underground organs, II: Economy Botany*, 49, 387-394
- Boligon, A.A., Janovick, V., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Fröhlich, J.K. & Athayde, M.L. (2010). Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29 (3), 450-453.
- Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovick, V., Rocha, J.B.T. & Athayde, M.L. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, 100, 6592-6498.
- Chaurasia, N. & Wichtl, M. (1987). Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural Products*, 50(5), 881-885.
- Chen, J.J., Fei D.Q., Chen, S.G. & Gao, K. (2008). Antimicrobial triterpenoids from *Vladimiria muliensis*. *Journal of Natural Products*, 71, 547-550.
- De-Eknamkul, W & Potduang, B. (2003). Biosynthesis of b-sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62, 389-398.
- Forgo, P., & Kövér, K. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the 1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, 69, 43-50.
- Fröhlich, J.K., Boligon, A.A., Feltrin, A.C., Janovick, V., Froeder, A.L.F. & Athayde, M.L. (2010). Revisão: Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (Müell Arg) com atividade gastroprotetora. *Saúde*, 36(2), 17-25.
- Galotta, A.L.Q.A. & Boaventura, M.A.D. (2005). Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). *Química Nova*, 28 (2), 610-613.
- Goulart, M.O.F., Sant'Ana, A.E.G., Lima, R.A., Cavalcante, S.H., Carvalho, M.G. & Braz Filho, R. (1993). Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolonas A e B. *Química Nova*, 16 (2), 95-100.
- Halliwell, B. (1996). Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Alternative Medicine Review* 3, 174-186.
- Harborne, J.B., & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Hung, C.Y. & Yen, G.C. (2001) Extraction and identification of antioxidative components of Hsiantso (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 34, 306-311.
- Iribarren, A.M. & Pomilio, A.B. (1983). Components of *Bauhinia candicans*. *Journal of Natural Products*, 46(5), 752-753.
- Jain, S.C., Singh, B., & Jain, R. (2001). Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*, 72, 666-668.
- Janovick, V., Boligon, A.A., Frohlich, J.K., Schwanz, T.G., Pozzebon, T.V., Alvez, S.H. & Athayde, M.L. (2012). Isolation and chromatographic analysis of bioactive triterpenoids from the bark extract of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Natural Product Research*, 26(1), 66-71.
- Kusilic, T., Radonic, A., Katalinic, V. & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633-640.
- Le Marchand, Loic. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 296-301.
- Luximon-Ramma, A., Baborun, T., Soobrattee, M. & Aruoma, O. (2002). Antioxidant activities of phenolic, protoanthocyanidin, and flavonoids components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5042-5047.
- Mc Lean, S., Perpick-Dumont, M., Reynolds, W.F., Jacobs, H. & Lachmansing, S.S. (1987). Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of two

- triterpenoids of *Maprounea guianensis* by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, 65, 2519-2525.
- Noguchi, N. & Niki, E. (2000). Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1538-1546.
- Peres, M.T.L.P., Monache, F.D., Cruz, A.B., Pizzolatti, M.G. & Yunes, R. (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 223-226.
- Pertino, M., Rodriguez, J.A., Theoduloz, C., Razmilic, I. & Schmeda-Hirschmann, G. (2006). Gastroprotective activity and citotoxic effect of cyperenoic acid derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 1507-1513.
- Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A. & Theoduloz, C. (2007a). Gastroprotective effect and citotoxicity of terpenes from Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 553-559.
- Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A. & Theoduloz, C. (2007b). Gastroprotective effect and citotoxicity of semisynthetic Jatrophone derivatives. *Planta Medica*, 73, 1095-1100.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radicals*. Biol. Med. 20, 933- 956.
- Rio, J.L. & Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), 80-84.
- San Gil, R.A.S., Albuquerque, M.G., Alencastro, R.B., Pinto, A.C., Gomes, F.E.S., Dantas, T.N.C. & Maciel, M.A.M. (2008). Solid-state ¹³C NMR and molecular modeling studies of acetyl aleuritic acid obtained from *Croton cajucara* Benth. *Journal of Molecular Structure*, 885, 82-88.
- Schmeda-Hirschmann, G. & Razmilic, I. (1996). Antiprotozoal activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research*, 10, 375-378.
- Singh, B. & Dubey, M.M. (2001). Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *in vivo* and *in vitro*. I. Antimicrobial Screening. *Phytotherapy Research*, 15, 231-234.
- Souza, C.M.M., Silva, H.R., Vieira Jr., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*, 30, 351-355.
- Tabopda, T.K., Nagoupayo, J., Tanoli, S.A.K., Offer, A.C.M., Ngadjui, B.T., Ali, M. S., Luu, B. & Dubois, M. A. L. (2009). Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Medica*, 75, 522-527.
- Tepe, B.; Daferera, D; Sokmen, A; Sokmen, M. & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Theoduloz, C., Rodriguez, J.A.,ertino, M. & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Antiproliferative activity of the diterpenes jatrophone and jatrophone and their derivatives. *Planta Medica*, 75(14), 1520-1522.
- Urzua, A., Caroli, M., Vasquez, A., Mendoza, L., Wilkens, M. & Tojo, E. (1998). Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 251-254.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- Zanon, R.B., Pereira, D.F., Boschetti, T.K., Santos, M., & Athayde, M.L. (2008). Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 226-229.
- Zhang, X.P., Zhang, M.L., Su, X.H., Huo, C.H., Gu, Y.C. & Shi, Q.W. (2009). Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. *Chemistry & Biodiversity*, 6, 2166-2183.

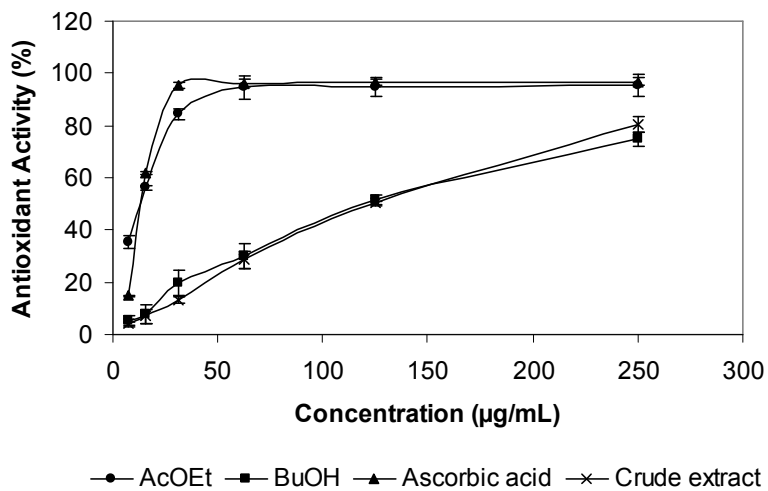


Figure 1. Antioxidant activities of the ethyl acetate and butanolic fractions and crude extract from the underground parts of *J. isabellei* against DPPH free radical. The results are the means±S.D. (standard deviation) values from the triplicate.

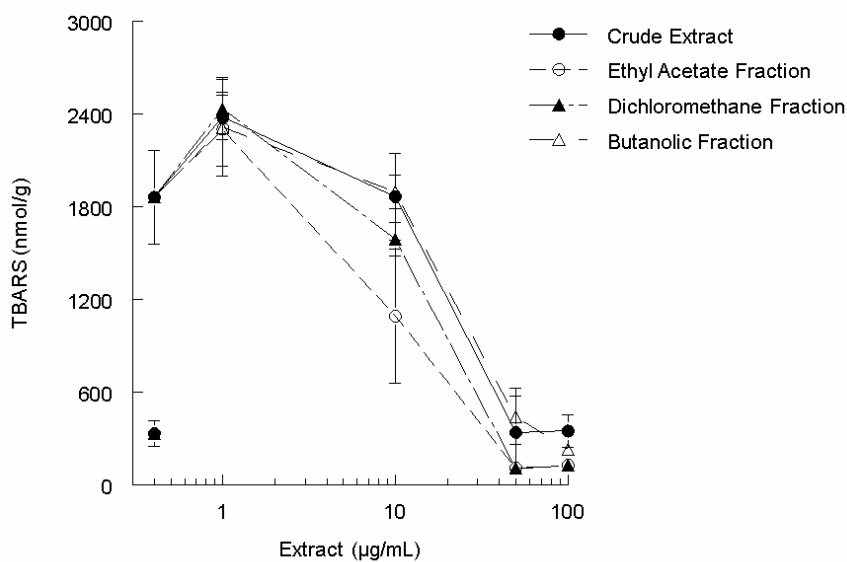
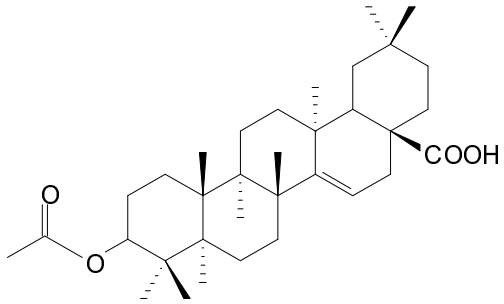
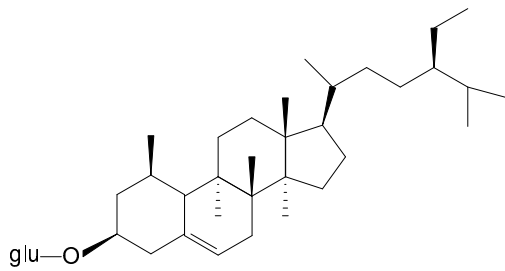


Figure 2. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, butanolic fractions from *J. isabellei* on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates. The samples were incubated for 1 h with Fe(II) and the plant extracts or without (basal). Data show means ± SEM (standard error of mean) values average from 3 to 6 independent experiments performed in duplicate.

1



2



3

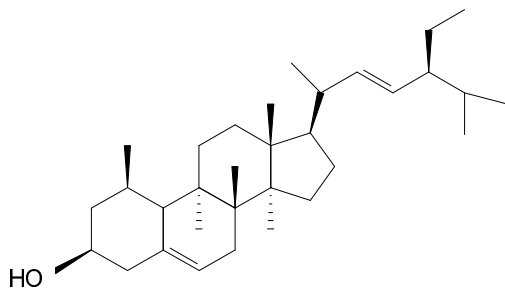


Figure 3: Acetyl aleuritolic acid (1); sitosterol 3-O-β-D glucoside (2) and stigmasterol (3).

Table 1. Total phenolic (TP), flavonoids (FC) and condensed tannins content (TC) from the underground parts of *J. isabellei*.

<i>Fractions</i>	<i>TP±S.D.</i>	<i>FC± S.D.</i>	<i>TC± S.D.</i>
Dichlorometane	113.35±1.89 ^{b,c,d}	9.60±1.04 ^{b,c,d}	2.70±1.32 ^{b,c,d}
Ethyl acetate	635.80±0.13 ^{a,c,d}	25.90±0.79 ^{a,c,d}	15.63±0.46 ^{a,c,d}
Butanolic	321.20±0.69 ^{a,b,d}	17.70±1.29 ^{a,b}	8.00±0.56 ^{a,b,d}
Crude extract	396.10±0.55 ^{a,b,c}	18.24±1.23 ^{a,b}	8.90±0.51 ^{a,b,c}

S.D.: standard deviation; TP: expressed as gallic acid equivalents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fraction \pm S.D.); FC: expressed as quercetin equivalents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fraction \pm S.D.); TC: expressed as catechin equivalents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fraction \pm S.D.). Dichlorometane (a); ethyl acetate (b); butanolic (c) and crude extract (d). a, b, c and d indicate statistical difference ($p<0.05$) in each column.

Table 2. Antimicrobial activity of the underground parts of *J. isabellei*.

<i>Microorganisms/Fractions</i>	Minimal inhibit concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	AcOEt	CH₂Cl₂	BUOH	Crude Extract
<i>S. pullorum</i>	1000	500	>2000	>2000
<i>Micrococcus sp.</i>	1000	250	>2000	>2000
<i>C. neoformans</i>	2000	1000	>2000	2000
<i>S. cerevisiae</i>	2000	500	2000	2000
<i>S. schenkii</i>	1000	250	>2000	>2000
<i>F. proliferatum</i>	1000	250	>2000	1000

The minimal inhibit concentration determined by the absence of turbidity.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Janaina Kieling Fröhlich^{a*}; Amanda Luana Forbrig Froeder^a; Vanessa Janovik^a; Tarcieli Pozzebon Venturini^b; Romaiana Picada Pereira^c; Aline Augusti Boligon^a; Thiele Faccim de Brum^a; Sydney Hartz Alves^b; João Batista Teixeira da Rocha^c; Margareth Linde Athayde^a.

^a *Phytochemical Research Laboratory at Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Build 26, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

^b *LAPEMI Research Laboratory at Department of Parasitology and Microbiology, Federal University of Santa Maria, build 20, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

^c *Biochemical Laboratory at Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, build 18, Santa Maria, CEP 97105-900, Brazil.*

* Corresponding author. E-mail: janafrhlich@yahoo.com.br

Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg.

Jatropha isabellei Müll Arg. belongs to the family Euphorbiaceae. The antioxidant capacity of this plant was evaluated by the DPPH method and inhibition of TBARS. Ethyl acetate fraction demonstrated the best antioxidant activity against DPPH free radical and its profile was similar to ascorbic acid. This fraction also presented the best results of phenolics, flavonoids and condensed tannins showed a positive relation between phenolic content and antioxidant activity. All fractions and the crude extract were able to inhibit significantly the TBARS production induced by Fe (II) at two concentrations tested reaching the basal levels. In this test ethyl acetate and dichloromethane fraction shows very good values for IC₅₀. The dichloromethane fraction showed the best results against the fungi *S. schenckii* and *F. proliferatum* and the bacterium of *Micrococcus* genus. This fraction allowed the isolation of acetyl aleuritic acid and a mixture of sitosterol 3-O-β-D glucoside and stigmaterol, described for the first time to this species.

Keywords: *Jatropha isabellei*; antioxidant capacity; antimicrobial activity; triterpenes

Materials and methods

Chemicals, apparatus and general procedures

All chemicals were of analytical grade. Silica Gel 60, Silica Gel 60 F254 coated plates, iron sulfate II (FeSO₄), DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), aluminum chloride (AlCl₃), ascorbic acid and gallic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany and Rio de Janeiro, Brazil). The solvents for the extractions and analytical procedures as dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, methanol, n-butanol and chloride acid were obtained from Vetec and Proquimios. Folin–Ciocalteu phenol reagent 2 N, tris-HCl, quercetin and catechin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

The absorbances were measured in a Shimadzu-UV-1201 (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer. NMR spectra were carried out on a Bruker AMX 400 spectrometer

equipped with a broadband 5-mm probe, using a spectral width of 10 ppm (parts per million). Chemical shifts were expressed as ppm relative to the TMS. Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO) and chloroform were used as solvent for the samples.

Plant collection and extraction

The underground parts of *J. isabellei* Müll Arg. were collected in Cacequi (Rio Grande do Sul, Brazil, coordinates: latitude 29 ° 53'01" south and longitude 54 ° 49'30" west), in May of 2008. A exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMDB 11816. The underground parts were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol 70%. After filtration, the ethanol was evaporated under reduced pressure, causing the aqueous extract. This extract was partitioned successively with solvents of increase polarity: dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. At the end of all extraction procedures, each extract was taken to dryness, resulting in the dried fractions.

Radical-scavenging activity – DPPH assay

The antioxidant activity of the fractions and the crude extracts was determined according to a slightly modified method described by Choi et al. (2002). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical-scavenging capacity (RSC) and to determine the inhibitory concentration (IC₅₀). Ascorbic acid was used as a reference substance.

Determination of total phenolics

The determination of total phenolic content was performed by the Folin–Ciocalteu method described by Chandra & Mejia, 2004. The test was performed in triplicate and the total phenolic content was expressed in micrograms equivalents of gallic acid per milligrams of each fraction.

Determination of flavonoid content

The flavonoid content was determined by the ability of these in complex with AlCl₃, according to a slightly modified colorimetric method described by Woisky & Salatino (1998). Quercetin was used to make the calibration curve and the test was performed in triplicate. The flavonoid content was expressed in micrograms equivalents of quercetin per milligram of each fraction.

Determination of condensed tannins

The condensed tannins were determined by the vanillin method according Morrison, Asiedu, Stuchbury, & Powell (1995). The crude extract and the fractions were prepared at concentration of 25.0 mg/mL diluted in methanol. The test was carried out in triplicate and the condensed tannins content was expressed in micrograms equivalents of catechin per milligram of each fraction.

Isolation of triterpenes compounds

The dichloromethane fraction from the underground parts (2.70 g) was subjected to column chromatography on silica gel 60 (240 g) eluted with Hex/CH₂Cl₂ (9.5:0.5 - 0:1); CH₂Cl₂/EtOH (9.5:0.5 - 0:1). This procedure resulted in sub-fractions that were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and grouped based on similarity of their chromatographic profiles. The TLC plates were observed on UV light and the detection was realized with sulfuric anisaldehyde/100°C for ten minutes. The sub-fractions 81-101, after precipitation with hexane, resulted on the compound 1 (28mg). The sub-fractions 343-351, after precipitation with methanol, resulted in the mixture of compounds 2 and 3 (20mg) (figure 1).

In vitro Fe(II)-induced lipid peroxidation in rat brains

Male Wistar rats weighing 270–320 g and with age from 3 to 3.5 months from our own breeding colony were kept in cages of 3 or 4 animals each, with continuous access to food and water in a room with controlled temperature (22 ± 3 °C) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. Rats were decapitated under mild ether anesthesia, and the encephalic tissue was rapidly dissected and placed on ice. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris–HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4000g to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant was used for the TBARS assay. After centrifugation, an aliquot of 100 µL of the supernatant was incubated for 1 h at 37 °C with pro-oxidants agent (10 µM of Fe₂SO₄) in the presence or absence of plant extracts for the determination of lipid peroxidation. The levels of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) were measured at 532 nm using a standard curve of MDA as described by Ohkawa, Ohishi & Yagi, (1979) and the values are expressed in nmol MDA/g of tissue. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA.

Antimicrobial activity

The fractions dichloromethane, ethyl acetate and butanolic and the crude extract were individually evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella pullorum*, *Micrococcus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix schenckii*, *Fusarium proliferatum* ATCC and *Prototheca zopfii*. The minimal inhibit concentration (MIC) of each fraction against the test microorganisms were determined by the broth microdilution method as the protocols by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Eight different dilutions of each fraction (2000, 1000, 625, 500, 250, 125, 62.5 and 15.625 µg/mL) were tested. The MIC endpoint was considered as the lowest concentration of the extract or fraction inhibiting the total growth of microorganisms and was detected by lack of visual turbidity.

References

- Chandra, S. & Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583-3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. & Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163, 1161-1168.
- Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. & Powell, A.A. 1995. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Annals of Botany*, 76, 287-290.
- Ohkawa, H., Ohishi, Y.K. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Woisky, R. G.; Salatino, A. (1998). Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research*, 37 (2), 99-105.

Capítulo 2 - SILVA, C.R.; FRÖHLICH, J.K.; OLIVEIRA, S.M.; CABREIRA, T.N.; ROSSATO, M.F.; TREVISAN, G.; FROEDER, A.L.F.; BOCHI, G.V.; MORESCO, R.N.; ATHAYDE, M.L.; FERREIRA, J. Antinociceptive and anti-edematogenic effect of *Jatropha isabellei* crude extract in arthritic gout-type pain in rats

Manuscrito a ser submetido ao periódico **Journal of Ethnopharmacology**

Antinociceptive and anti-edematogenic effect of *Jatropha isabellei* crude extract in arthritic gout-type pain in rats

Cássia R. Silva^{1a}, Janaina K. Fröhlich^{2a}, Sara M. Oliveira¹, Thaíssa N. Cabreira¹, Mateus F. Rossato¹, Gabriela Trevisan¹, Amanda L. F. Froeder², Guilherme V. Bochi³, Rafael N. Moresco³, Margareth L. Athayde^{2*}, Juliano Ferreira^{1*}

¹Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Laboratório de Fitoquímica, ³Laboratório de Bioquímica Clínica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding authors:

*Juliano Ferreira, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 (55) 32208053; Fax: +55 (55) 32208031. e-mail: ferreira99@gmail.com

*Margareth Linde Athayde, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 (55) 32208950, Fax: +55 (55) 32208248. e-mail:

margareth@smail.ufsm.br

^aThese authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Jatropha isabellei* is a medicinal plant which has been used in traditional medicine for the treatment of arthritic diseases, in especial gout disorders.

Aim of the study: Confirm the use of *J. isabellei* by the South American folk medicine.

Materials and methods: Rats were orally administered with crude extract (100-300 mg/kg) or a fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) of *J. isabellei*. Intra-articular injection of 50 μ l of monosodium urate crystals (MSU) (1.25 mg/site) was used as a gout model and for the assessment of treatment effects on nociception (thermal hyperalgesia and mechanical allodynia) and inflammation (edema and neutrophil infiltration). The effect of *J. isabellei* on uric acid, creatinine and urea levels were evaluated in the model of hyperuricemia induced by the intra-peritoneal injection of potassium oxonate (250 mg/kg) in vivo. Xanthine oxidase activity was measured in vitro. Colchicine (30 mg/kg) or allopurinol (10 mg/kg) were used as positive controls.

Results: Our study demonstrated that *J. isabellei* crude extract or the fraction rich in alkaloids was able to prevent thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, edema and neutrophil infiltration induced by MSU injection in the gout model in rats. On the other hand, the treatment with *J. isabellei* did not alter uric acid, urea or creatinine levels in the hyperuricemia model in vivo and the xanthine oxidase activity in vitro.

Conclusion: Confirming its use by folk medicine, *J. isabellei* crude extract and its alkaloids fraction exhibited antinociceptive and anti-inflammatory effects in a model of gout without exerting hypouricemic effect.

Key words: *Jatropha isabellei*; Euphorbiaceae; nociception; edema; uric acid; MSU.

1. INTRODUCTION

Gout is a metabolic disorder associated with an excess of circulating uric acid resulting in the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in tissues. The hyperuricemia occur via uric acid under-excretion or overproduction, and can be readily determined in most patients. Reversible factors contribute to increased urate production including a high-purine diet, obesity and regular alcohol consumption (Bieber and Terkeltaub, 2004; Choi et al. 2004). After formed, MSU crystals may be deposited in joints, usually in the big toe or ankle, causing neutrophil infiltration and consequent swelling and excruciating pain (Desaulniers et al. 2001). Estimations from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) indicate that 0.5% of total population suffered from a gout attack. In addition gout is currently considered the most common inflammatory arthritis in men over 40 years old, exceeding rheumatoid arthritis (Lawrence et al. 1998; Weaver, 2008).

Options for treatment of chronic gout are allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase enzyme; probenecide, an uricosuric drug that stimulate the renal excretion of uric acid and non steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs), as indomethacin, that inhibited the COX enzyme activity (Cronstein and Terkeutaub, 2006; Terkeltaub, 2010). Another drug that has been used is colchicine, an alkaloid derived from the autumn crocus *Colchicum autumnale* witch has been used to gout attacks treatment (Roberge et al. 1993). However, approximately 50% of patients are noncompliant with the medication, especially if they are having recurrent gout flares (Gaffo and Saag, 2010). Moreover, each of these agents is associated with risks potentially severe adverse effects and drug-drug interactions and many gout patients end up opting for treatments based on folk medicine (Terkeltaub, 2010).

In the Paraguayan and Brazilian traditional medicine dry slice rhizome of *Jatropha isabellei* (Euphorbiaceae) is used as infusion or decoction to treat different types of arthritis, mainly gout (Basualdo et al. 1995; Pertino et al. 2007). However, until now any activity related with gout disease has been scientifically reported for this plant. Thus, the aim of this work is confirm the popular use by analyze the antinociceptive and anti-edematogenic effect of the crude extract and of a fraction rich in alkaloids obtained from *J. isabellei* in animal models of gout.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

The present study was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care and all procedures were approved by our Institutional Ethics Committee (process number 94/2010). The number of animals and nociceptive stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drugs treatments. Behavioral evaluation was performed blindly with respect to drug administration. All experiments were performed using adult male Wistar rats weighing 250–300 g. Animals were housed under controlled temperature (22 ± 1 °C), on a 12 hour light/12 hour dark cycle and with standard lab chow and water *ad libitum*. The animals were acclimated to the experimental room for at least 1 hour before the experiments.

2.2. Drugs and reagents

Synthetic monosodium urate (MSU) crystals were prepared as described previously by Rassol and Varalakshmi (2006) and Hoffmeister et al. (2011). Briefly, 4 g of uric acid (Vetec, Brazil) was dissolved and heated in 800 mL of H₂O, adjusted to

pH 8.9 with NaOH (9 mL, 0.5 N) at 60 °C, cooled overnight in a cold room, and then washed and dried. Needle-like crystals were recovered and suspended in phosphate-buffered (PBS) solution (PBS, 10.71 mM K₂HPO₄, 6.78 mM NaH₂PO₄, 120.4 mM NaCl; pH 7.4). Polarized light microscopic examination confirmed that the crystals were rod-shaped and varied in length (12 ± 2 µm) The preparation was endotoxin-free as determined by an amebocyte cell lysate assay (Sigma, St Louis, MO, USA).

The crude extract and the fraction rich in alkaloids from *J. isabellei* were prepared in dimethylsulphoxide (DMSO, 5%), Poliethilenglicol (PEG, 20%) and phosphate buffer (PBS, 75%) for oral (p.o.) administration. Allopurinol and colchicine were obtained from the drugstore. Potassium oxonate were purchased from Sigma (USA), dissolved in PBS and administrated by intraperitoneal (i.p.) rout. In addition, 5-(N,N-diethylamino)-pentyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), xanthine oxidase (XO) and ptherine were purchased from Sigma (USA).

The Draggendorff's reagent was prepared by dissolution of 8 g of bismuth subnitrate in 20 mL of nitric acid 30% (v/v). This solution was shed about 22.8 g of potassium iodide and solubilized in small amount distilled water. The volume was completed to 100 mL and the content was filtered.

Ethyl alcohol, acetone, chloroform, ammonium hydroxide and ethyl ether were purchased from Vetec (Brazil). Silica Gel 60 F254 coated plates for thin layer chromatography (TLC) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.3. Plant collection and extraction

To prepare the plant material for animal treatment, the underground parts of *J. isabellei* Müll Arg. were collected in Cacequi (Rio Grande do Sul, Brazil, coordinates:

latitude 29°53'01" south and longitude 54 ° 49'30" west), in May of 2008. A exsiccate was archived as voucher specimen in the herbarium of Department of Biology at UFES (SMDDB 11816). The underground parts were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder was macerated with ethanol 70% during ten days, at room temperature. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the solvent, using a rotary evaporator, causing the crude extract. This procedure was repeated seven times and the extracts were combined.

2.4. Alkaloids extraction

The crude extract of *J. isabellei* was resuspended in hydrochloric acid 2 N and washed with ethyl ether three times. The aqueous fraction resulting from the partition was alkalized with ammonium hydroxide and again washed with ethyl ether three times. The ethereal fraction was dried resulting in a purified fraction of alkaloids.

The residue from the extraction of alkaloids was dissolved in ethanol and investigated by TLC technique. A quantity of 2 µL was applied in plates and eluted with acetone: ammonium hydroxide (97:3) and chloroform: ethanol: ammonium hydroxide (93:6.5:0.5). The plates were observed under UV light (254 and 365 nm) and sprayed with Dragendorff's reagent. The purified fraction of alkaloids showed positive results to alkaloids according to Wagner, Bladt, Zgainski (2006) and the thin layer chromatography showed the presence of at least three types of alkaloids classes (Table 1).

Table 1: Substances characterized by TLC technique.

Mobile phase	Characteristic	Rf
acetone: ammonium hydroxide (97:3)	254nm: orange stain	0.82
	365nm: blue fluorescent stain	0.18
	365nm: yellow fluorescent stain	0.12
chloroform: ethanol: ammonium hydroxide (93:6,5:0,5)	254nm: orange stain	0.59
	365nm: blue fluorescent stain	0.17
	365nm: yellow fluorescent stain	0.14

According Wagner, Bladt, Zgainski, 2006.

2.5. Estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent

To evaluate the amount of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent we used a spectrophotometric method described for Sreevidya and Mehrotra (2003). This method is based on the formation of yellow bismuth complex in nitric acid medium with thiourea that corresponds to the amounts of alkaloids present in plant. Briefly, 2 g of the crude extract were solubilized in ethanol and hydrochloric acid 1% until concentration of 60 mg/mL and pH was maintained at 2–2.5. The 5 mL of the extract solution were added 2 mL Dragendorff's reagent and the precipitate formed was centrifuged (2.400 rpm/ 30 minutes). The precipitate was washed with ethanol then treated with 2 mL disodium sulfide solution. The brownish black precipitate formed was then centrifuged and dissolved in 2 mL concentrated nitric acid. This solution was diluted to 10 mL in a standard flask with distilled water. To 1 mL of this solution was added 5 mL thiourea solution 3%. The absorbance was measured at 435 nm against the blank containing nitric acid and thiourea. The quantification procedure showed a percentage of alkaloids to 0.048%. The amount of alkaloids present was calculated by absorbance of sample and the calibration curve ($y=$

2.2783x + 0.0361, r= 0.9996). The crude extract of the underground parts of *J. isabellei* showed 0.048 % of alkaloids content.

2.6. MSU crystals-induced arthritic gout

To investigate the possible antinociceptive effect of *J. isabellei*, we performed the arthritic gout model induced by intra-articular injections of MSU, according to the method described by Coderre and Wall (1987), with some modifications. Briefly, we injected 50 μ L of vehicle (PBS) or MSU suspension (1.25 mg/site) intra-articularly (i.a.) to the tibio-tarsal joint (ankle) on isoflurane anesthetized animals. Separate groups of animals received orally vehicle (PBS), colchicine (30 mg/kg, used as positive control), *J. isabellei* crude extract (100-300 mg/kg) or a fraction rich in alkaloids (0.15 mg/Kg, p.o., a dose equivalent at alkaloid content in the crude extract of *J. isabellei*) 1 hour before the crystals injections. The nociceptive and edematogenic parameters were observed in 1, 2, 4, 6 and 24 hours after the MSU injections, except for the fraction rich in alkaloids that was test only at 2 hours after MSU injections.

2.7. Nociceptive parameters

2.7.1. Mechanical allodynia

The measurement of mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was carried out using the Up-and-Down paradigm as described previously by Chaplan et al. (1994). Briefly, rats were first acclimatized (1–2 hours) in individual clear Plexiglas boxes (9 X 7 X 11 cm) on elevated wire mesh platform to allow the access to the plantar surface of the hind paws. Von Frey filaments of increasing stiffness (6 - 100 g) were applied to the rat hind paw plantar surface with a pressure causing the filament

to bend. Absence of a paw lifting after 3 seconds led to the use of the next filament with increasing weight, and paw lifting indicated a positive response and led to the use of next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements or until four consecutive positive or four consecutive negative responses had occurred. The 50% mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon (1980). The PWT was expressed in grams (g) and was evaluated before and several times after i.a. injection of MSU. A significant decrease in PWT compared to baseline values was considered as mechanical allodynia.

2.7.2. Thermal hyperalgesia

To measure paw withdrawal latency (PWL) to radiant heat, rats were placed on a glass plate surrounded by a clear plastic chamber (Hargreaves et al. 1988). A radiant heat stimulus was applied underneath the glass floor with a high-intensity projector lamp bulb (60 W) and the withdrawal latency was measured using an electronic timer. The heat stimulus was focused on the plantar surface of each hind paw. The intensity of the heat stimulus was adjusted to drive average baseline paw-withdrawal latency (PWL) of approximately 9-12 seconds in naive rats. A 20 seconds cut-off was used to prevent tissue damage. This parameter allows the observation of the development of thermal hyperalgesia that are the increased pain sensitivity. Only quick hind paw movements close from the heat stimulus were counted to be the withdrawal response. When rats showed locomotion or rearing, measurements were stopped and waited until they completely settled down.

2.8. Edema measurement

The edema formation was assessed as an increase in articular thickness, in millimeter (mm), measured before and after MSU injection by a digital capiler (Hoffmeister et al. 2011). Results were expressed as the difference between the basal value and the test value at each time observed.

2.9. Myeloperoxidase (MPO) assay

To assess the neutrophil infiltration in articular tissue 6 hours after MSU induced gout, we evaluated the MPO activity, according to the method of Suzuki et al. (1983), with some modifications. Vehicle (PBS), colchicine (30 mg/kg), *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) or fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) was administrated 1 hour before MSU injections. Briefly, 6 hours after MSU injection, the animals were sacrificed by CO₂, reperused to avoid blood interference, and the articular tissue samples were collected and frosted until analysis. Samples were homogenized with 20 volumes of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) plus 0.5% HTAB, centrifuged (11,200 x g at 4°C for 20 minutes) and the supernatants were collected.

For MPO activity evaluation, 10 µL of supernatant was incubated with 200 µL acetate buffer (8 mM, pH 5.4) and 40 µL of TMB (18.4 mM) at 37 °C for 3 minutes. The reaction was stopped with 30 µL of acetic acid in cold bath, and the enzyme activity value was assessed colorimetrically at 630 nm, using a Micro plate reader. The results were expressed as optical density (OD) for g of tissue.

2.10. Potassium Oxonate-induced hyperuricemia in rats

To evaluate the existence of anti-hyperuricemic effect of the *J. isabellei* crude extract we used an animal model of hyperuricemia induced by the uricase inhibitor,

Potassium Oxonate (PO). In rodents, uric acid is further metabolized into allantoin by uricase, thus the crude extract was analyzed in animals treated with an uricase inhibitor, PO, for evaluate possible effects of the plant on uric acid levels. Briefly, rats were treated with PO (250 mg/kg; i.p.) 1 hour before oral administration of vehicle; *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol (10 mg/kg, used as positive control), as described previously by Nguyen et al. (2005). Blood samples were taken 2 hours after the drugs administrations by capillarity in the right eye in anesthetized (90 mg/Kg of ketamine plus 3 mg/Kg of xylazine hydrochloride, i.p.) rats. Serum was obtained centrifuging blood sample for 10 minutes at 1000 x g. The serum uric acid, urea, and creatinine levels were measured as renal injury and excretion, by commercial kit analyzes. The results were expressed in mg/dL and the allopurinol was used as positive control of hypouricemic effect.

2.11. Xanthine oxidase assay

This method was realized according Angel et al. (1986) e Liu et al. (2008), with same modifications. Xanthine oxidase (0.5 U/ml) was incubated with pterine (20 μ M) in the presence and absence of Allopurinol (10 μ g/mL) or *J. isabellei* crude extract (10-30- 300 μ g/mL) at 37 °C for 30 min. After, samples were boiled in a water bath at 100° during 3 min and centrifuged at 10.000 x g for 10min. The supernatant was diluted in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.5) and the xanthine oxidase activity was determined by fluorescence at 347 nm of excitation and 405 nm of emission using a spectrofluorimeter.

2.12. Side effects assessment

2.12.1. Open-Field test

The effect of the *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) on spontaneous locomotor activity and exploratory behaviour was assessed by the open-field test, as previously reported by Milano et al. (2008). The apparatus was a round arena (57 cm in diameter) with the floor divided into 21 equal areas. The number of areas crossed with all paws and the number of rearing responses were recorded for 5 minutes, 3 hours after the treatment.

2.12.2 Gastric lesion assessment

To evaluate the gastric tolerability of animals after oral administration of *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg), the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) or sodium diclofenac (50 mg/kg, used as positive control) rats were fasted for 18 hours prior to drug exposure (Berenguer et al. 2007). The animals were euthanized 6 hours after the administration of the treatments. Stomachs were opened by cutting along the greater curvature, washed with saline at 4° and immediately the lesion index was assessed with support of a magnifying glass. The quantification of gastric mucosal lesions was carried out by assigning a score according to the number and size of lesions on a scale from 0 up to 6 points (Oliveira et al. 2009).

2.12.3. ALT and AST measurement

Vehicle (PBS), *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) or the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg) was administrated 1 hour before MSU injections. Briefly, 6 hours after MSU injection, the animals were euthanized by CO₂ and the serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were

assayed spectrophotometrically according to the standard procedures using commercially available diagnostic kits (BioClin diagnostics (I) Quibasa Química Básica Ltd., Belo Horizonte, Brazil).

2.13. Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm S.E.M. The percentages of prevention are reported as the mean \pm S.E.M. and calculated for the maximal developed responses obtained after injection of MSU in comparison with vehicle-treated animals. The statistical significance between groups was assessed by the Student “t” test, one- or two-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Pos-hoc tests (Student-Newman-Keuls’-SNK for one-way or Bonferroni for two-way ANOVA) were also carried out when appropriate. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered to be indicative of significance.

3. RESULTS

3.1. Effects of *J. isabellei* crude extract on nociception and edema induced by MSU

Animals that received intra-articular injection of MSU crystals (1.25 mg/site) developed mechanical allodynia, characterized by a significant reduction in the PWT when Von Frey filaments were applied in injected paw from 1 up to 24 hours (PWT diminished from 22.6 ± 7.1 g in baseline to 6.8 ± 3.7 g two hours after MSU injection; $P < 0.001$, Figure 1B). It was observed that *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) was able to prevent the mechanical allodynia induced by MSU from 1 up to 6 hours after administration, with a complete reversal at 2 hours (Figure 1A). The lower doses

of crude extract (100 or 200 mg/kg) were not capable of altering MSU-induced allodynia.

Likewise, we also observed the development of thermal hyperalgesia after intra-articular injection of MSU crystals, indicated as the decrease in the PWL from 2 to 4 hours when the injected paw was exposed to a radiant heat (PWL diminished from 12.8 ± 3.4 s in baseline to 5.1 ± 2.3 s 2 hours after MSU injection; $P < 0.001$, Figure 1D). The treatment with the *J. isabellei* crude extract (200 or 300 mg/kg) partially reduced (68 ± 20 % of prevention with 300 mg/kg) the thermal hyperalgesia observed 2 hours after MSU injection (Figure 1C).

Similar to *J. isabellei* crude extract, the alkaloid colchicine (30 mg/kg, p.o., used as positive control), inhibited both mechanical allodynia and thermal hyperalgesia caused by MSU with 74 ± 21 % and 79 ± 14 % of prevention, respectively (Figure 1B and D).

Animals that received intra-articular injection of MSU crystals (1.25 mg/site) presented an increase in the articular thickness, indicating the development of edema that was sustained from 1 up to 24 hours after MSU injection (articular edema increased from 5.6 ± 0.9 mm in baseline to 7.7 ± 0.6 mm 2 hours after MSU injection; $P < 0.001$, Figure 2B). It was observed that *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) was able to prevent the articular edema at 2 and 4h after MSU injection, with 35 ± 8 % and 24 ± 3 % of prevention, respectively. The lower doses of crude extract (100 or 200 mg/kg) were not capable of altering MSU-induced edema. The treatment with Colchicine (30 mg/kg, p.o., used as positive control) prevented the edema formation in 44 ± 14 %, 2 hours after MSU injections.

Furthermore, *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) did not shown any alteration in PWT, PWL or articular edema when orally administered in animals that

received intra-articular injections of vehicle demonstrating no *per se* effect (data not shown). Since only the dose of 300 mg/kg (p.o.) was able to prevent nociceptive and edematogenic effects induced by MSU injection, it was chosen for the further experiments.

3.2. Effects of *J. isabellei* crude extract on neutrophil infiltration induced by MSU

To investigate if the treatment with *J. isabellei* alters neutrophil infiltration, we assess the neutrophil infiltration in articular tissue after MSU injection by analyzing the MPO activity (Figure 3). We observed that MSU crystals induced cellular infiltration in the ankle articulation, when compared with control group (54 ± 23 % of increase in MPO activity). The increase in the MPO activity was fully prevented by both *J. isabellei* crude extract and colchicine administration (51 ± 4 % and 60 ± 8 % of prevention, respectively).

3.3. Effects of *J. isabellei* crude extract on Potassium Oxanate (PO)-induced hyperuricemia in rats

To evaluate the existence of hypouricemic effect of the *J. isabellei* crude extract, we used a model of hyperuricemia in rats. As shown in Figure 4, injection of PO (250 mg/kg, i.p.) markedly increased the serum uric acid levels in three times compared with control group (Figure 4). The treatment with the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (10 mg/kg, p.o., used as positive control) significantly prevented the uric acid increase in PO-treated animals (89±10% of prevention) while *J. isabellei* crude extract treatment did not alter uric acid levels (Figure 4). In these same animals, we did not observe any alteration in the serum levels of urea and creatinine among the

groups (data not shown). Accordingly with not effect on uric acid levels, the *J. isabellei* crude extract (10, 30 e 100 µg/ml) did not was able to alter the xantine oxidase activity *in vitro* while allopurinol (10 µg/ml) inhibited it in 70 ± 12 % (Figure 5).

3.4. Effects of a fraction rich in alkaloids extracted from *J. isabellei* on the nociception and articular edema induced by MSU intra-articular injection

We consider the hypothesis that the antinociceptive and anti-inflammatory effects demonstrated by the *J. isabellei* crude extract could be in part by alkaloids occurrence in the plant. For assess it, we verified the antinociceptive and the anti-inflammatory effects of a fraction rich in alkaloids extracted from *J. isabellei*. It was observed that the fraction rich in alkaloids (0.15 mg/kg, p.o) was able to prevent mechanical allodynia (83 ± 12 % of prevention), thermal hyperalgesia (43 ± 6 % of prevention), articular edema (61 ± 11 % of prevention) and neutrophil infiltration (46 ± 5 % of prevention) induced by MSU at 2 hours after its administration (Figure 6), in a manner similar to the crude extract.

4. DISCUSSION

Gout is a hyperuricemic condition associated with the deposition of sodium urate crystals in the joints, causing neutrophil infiltration and consequent swelling and pain (Martinon, 2010). Management of gout has changed relatively little in the past 50 years, despite the fact that many gout patients have contraindications to one or more currently available gout therapies. In the South America traditional medicine, *J. isabellei* is often used in the treatment of arthritic diseases, especially gout (Pertino et al. 2007). Our study demonstrated that *J. isabellei* was able to prevent the nociception, edema and neutrophil infiltration produced by MSU crystals injection in

rats, confirming its traditional use. Moreover, we suggest that these effects are attributed, in part, to a presence of alkaloid constituents in the plant.

We first analyzed the antinociceptive and antiedematogenic effects of crude extract of *J. isabellei* in rats submitted to intra-articular injections of MSU, a model of pain and edema related with gout. It was observed that crude extract (300 mg/kg, p.o.) prevented mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by MSU injections and this efficacy was similar to that found for colchicine. These results clearly indicate the existence of an analgesic-like effect of *J. isabellei*. It is an interesting finding since pain is the more frequent and unpleasant signal of gouty attacks (Martinon, 2006; Terkeltaub, 2010).

Besides pain relief, the gout treatment also must reduce the inflammatory reaction induced by MSU to avoid the worsening of the disease over the time (Cronstein and Terkeltaub, 2006; Landis and Haskard, 2001; Sabina et al. 2010). MSU crystals may stimulate an innate immune response with the production and release of several pro-inflammatory mediators from plasma and from resident cells such as kinins, interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF α). Some of these mediators are chemotactic and amplify the inflammatory reaction by inducing leukocyte infiltration (Cronstein and Terkeltaub, 2006; Landis and Haskard, 2001; Sabina et al. 2010; Martinon, 2010). The interaction of neutrophils with MSU crystals results in the release of lysosomal enzymes into the synovial fluid as well as the aberrant production and secretion of pro-inflammatory chemokines and cytokines. These mediators amplify and perpetuate the inflammatory reaction, which can lead, if unchecked, to tissue damage (Desaulniers et al. 2001; Popa-Nita and Naccache, 2010). Of note, *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg, p.o.) treatment was able not only to reduce the edema, but also prevent the neutrophil infiltration induced by MSU

injection. It is an important finding since the reduction of leukocyte infiltration may prevent its further activation and consequent tissue injury.

Crystal's accumulation may be also an indirect result of hyperuricemia. Despite hyperuricemia was not a direct indicator of gout, this characteristic has long been considering the most important risk factor for the onset of gout. The development of hyperuricemia may be due to an excessive rate of uric acid production, that in man, is formed primarily by the xanthine oxidase catalyzing oxidation of hypoxanthine and xanthine (Osada et al. 1993; Mandell, 2008; Gaffo et al. 2009). The anti-gout drug allopurinol is metabolized to oxipurinol by xanthine oxidase suppressing the uric acid generation and is clinically used to prevent gout attacks (Burke et al. 2006). We demonstrate that in the hyperuricemic model the allopurinol fully prevented the uric acid increase if compared with the control group. However, *J. isabellei* did not present any effect on hyperuricemia as well as creatinine or urea serum levels. These results suggest that this plant did not present the ability to inhibit uric acid biosynthesis. In fact, we observed that *J. isabellei* crude extract was not capable of inhibit xanthine oxidase activity *in vitro*. Studies have demonstrated that XO inhibitors may produce analgesic effects by lowering urate levels preventing gouty attacks (Ernst and Fravel, 2009; Terkeltaub, 2010). However, the antinociceptive and antiedematogenic effects of *J. isabellei* did not occur by neither xanthine oxidase inhibition nor alterations in the uric acid levels. Thus, our pre-clinical study suggests that *J. isabellei* use by population could be useful to treat gout attacks, as do colchicine or NSAID, but not to prevent it, as do allopurinol.

Colchicine was the first anti-inflammatory drug identified for the treatment of gout historically and is still used in modern medicine to treat inflammatory diseases (Keith, 2007). Colchicine is an alkaloid isolated from the corn of the autumn crocus

Colchicum autumnale and its use was approved by Food and Drugs Administration (FDA) for treatment of acute attack, reducing pain and inflammation in patients with gout related pain (Ahern et al. 1987; Richette and Bardin, 2010). Our results suggest that the crude extract of *J. isabellei* is acting in a way similar to the alkaloid colchicine. This raises the proposal that alkaloids constituents in *J.isabellei* may contribute to the crude extract effects. Accordingly with this idea and similarly observed with crude extract, we demonstrated that the fraction rich in alkaloids extracted from this plant was able to prevent nociception, edema and neutrophil infiltration induced by MSU crystals injection in a dose equivalent to its yield in crude extract. This result indicates that alkaloids present in *J. isabellei* may be responsible, at least in part, by antinociceptive and anti-inflammatory effects of this plant.

Apart its beneficial effect in pain and inflammation, the use of NSAIDs in arthritic patients is limited by side effects, such as gastrointestinal lesions and renal failure (Janssens et al. 2008; Kobata et al., 2009). We observed that the oral treatment with *J. isabellei* did not induced gastric lesion as did the NSAID diclofenac. On the contrary, previous studies have demonstrated that *J. isabellei* crude extract is gastroprotective and has low toxicity in rats (Pertino et al. 2007). In accordance with these findings we did not detect any alteration in the activity of enzymes that indicated liver or renal injury (ALT and AST, respectively) or in locomotor activity of rats after *J. isabellei* crude extract or fraction rich in alkaloids administration (data no shown). Taken together, our and literature data indicates that *J. isabellei* crude extract has low toxicity. However, more studies investigating the toxicity of chronic treatment with this extract must be carried out to evaluate the safety of this plant.

5. CONCLUSIONS

The crude extract of *J. isabellei* presents antinociceptive and anti-inflammatory effect in a rat model of gouty arthritis without producing hypouricemic effect. These results further support the traditional use of this plant in gouty patients.

5. REFERENCES

- Ahern, M.J., Reid, C., Gordon, T.P., McCredie, M., Brooks, P.M., Jones, M., 1987. Does colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. Australian & New Zealand Journal of Medicine. 17, 301-304.
- Angel, M. F., Narayanan, K., Swartz, W.M., Ramasastry, S.S., Basford, R.E., Kuhns, D.B., Futrell, J.W., 1986. The etiological role of free radicals in human hematoma-induced flap necrosis. Plastic & Reconstructive Surgery. 77, 795–801.
- Basualdo, I., Zardini, E.M., Ortiz, M., 1995. Medicinal plants of Paraguay: underground organs. II: Economic Botany. 49, 387–394.
- Berenguer, B., Trabadela, C., Sánchez-Fidalgo, S., Quílez, A., Miño, P., De la Puerta, R., Martín-Calero, M.J., 2007. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. Journal of ethnopharmacology. 114: 153-160.
- Bieber, J.D., Terkeltaub, R.A., 2004. Gout: On the bring of novel therapeutic options for an ancient disease. Arthritis e Rheumatism. 50, 2400-2414.
- Burke, A., Smyth, E., FitzGerald, G.A., 2006. Analgesic–antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. In: Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), The

Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp. 706–710.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *The Journal of Neuroscience*. 53, 55-63.

Choi, H.K., Atkinson, K., Karlson, E.W., Willet, W., Curhan, G., 2004. Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. *New England Journal of Medicine*. 350, 1093-1103.

Coderre, T.J., Wall, P.D., 1987. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain*. 28, 379-393.

Cronstein, B.N., Terkeltaub, R., 2006. The inflammatory process of gout and its treatment. *Arthritis Research & Therapy*. 8 Suppl 1.

Desaulniers, P., Fernandes, M., Gilbert, C., Bourgoin, S.G., Naccache, P.H., 2001. Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals. *Journal of Leukocyte Biology*. 70, 659-68.

Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 20, 441-62.

Ernst, M.L., Fravel, M.A., 2009. Febuxostat: A Selective Xanthine-Oxidase/Xanthine-Dehydrogenase Inhibitor for the Management of Hyperuricemia in Adults With Gout. *Clinical Therapeutics*. 31, 2503-2518.

Gaffo, A.L., Edwards, N.L., Saag, K.G., 2009. Gout. Hyperuricemia and cardiovascular disease: how strong is the evidence for a causal link? *Arthritis Research & Therapy*. 11, 240-246.

- Gaffo, A.L., Saag, K.G., 2010. Febuxostat: the evidence for its use in the treatment of hyperuricemia and gout. *Core Evidence*. 15, 25-36.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32, 77-88.
- Hoffmeister, C., Trevisan, G., Rossato, M.F., de Oliveira, S.M., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2011. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain*. [Epub ahead of print]
- Janssens, H.J., Janssen, M., van de Lisdonk, E.H., van Riel, P.L., van Weel, C., 2008. Use of oral prednisolone or naproxen for the treatment of gout arthritis: a double-blind, randomised equivalence trial. *Lancet*. 371, 1854-1860.
- Keith, M.P., 2007. Updates in the Management of Gout. *American Journal of Medicine*. 120,221-224.
- Kobata, Y., Yajima, H., Yamao, J., Tanaka, Y., Fukui, H., Takakura, Y., 2009. Risk factors for the development of gastric mucosal lesions in rheumatoid arthritis patients receiving long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy and the efficacy of famotidine obtained from the FORCE study. *Modern rheumatology*. 19: 629-636.
- Landis, R.C., Haskard, D.O., 2001. Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current Rheumatology Reports*. 3, 36–41.
- Lawrence, R.C., Helmick, C.G., Arnett, F.C., Deyo, R.A., Felson, D.T., Giannini, E.H., Heyse, S.P., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., Liang, M.H., Pillemer, S.R., Steen, V.D., Wolfe, F., 1998. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis & Rheumatism*. 41, 778-799.

- Liu, X., Chen, R., Shang, Y., Jiao, B., Huang, C., 2008. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 176, 137-42.
- Mandell, B.F., 2008. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 75 Suppl 5:S5-8.
- Martinon, F., 2010. Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunological Reviews*. 233, 219-231.
- Milano, J., Rossato, M.F., Oliveira, S.M., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J., Bonacorso, H.G., 2008. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life sciences*. 83: 739-743.
- Nguyen, M.T., Suresh, A., Tezuka, Y., Shi, L., Zaidi, S.F.H., Ueda, J., Tran, Q.L., Murakami, Y., Matsumoto, K., Kadota, S., 2005. Hypouricemic effects of Acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28, 2231-2234.
- Oliveira, S.M., Gewehr, C., Dalmolin, G.D., Cechinel, C.A., Wentz, A., Lourega, R.V., Sehnem, R.C., Zanatta, N., Martins, M.A., Rubin, M.A., Bonacorso, H.G., Ferreira, J., 2009. Antinociceptive effect of a novel tosylpyrazole compound in mice. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. 104: 122-129.
- Osada, Y., Tsuchimoto, M., Fukushima, H., Takanashi, K., Kondo, S., Hasegawa, M., Komoriya, K., 1993. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*. 241, 183-188.

- Pertino, M., Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J.A., Theodoluz, C., 2007. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 553-559.
- Popa-Nita, O., Naccache, P.H., 2010. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunology & Cell Biology*. 88, 32-40.
- Rassol, M., Varalakshmi, P., 2006. Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on experimental gouty arthritis: An in vivo and in vitro study. *Chemico-Biological Interactions*. 164, 174-180.
- Richette, P., Bardin, T., 2010. Colchicine for the treatment of gout. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 11, 2933-2938.
- Roberge, C.H., Gaudry, M., Médicis, R., Lussier, A., Poubelle, P.E., Naccache, P.H., 1993. Crystal-induced neutrophil activation. IV. Specific inhibition of tyrosine phosphorylation by colchicine. *The Journal of Clinical Investigation*. 92, 1722-1729.
- Sabina, E.P., Rasool, M., Mathew, L., Ezilrani, P., Indu, H., 2009. 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation--an in vivo and in vitro study. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 229-235.
- Schmeda-Hirschmann, G. Razmilic, I., 1996. Antiprotozoal activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research*. 10, 375-378.
- Sreevidya, N. Mehrotra, S., 2003. Spectrophotometer method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*. 86, 1124-1127.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for

myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*. 132, 345–352.

Terkeltaub, R., 2010. Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nature Reviews Rheumatology*. 6, 30-38.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 2006. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlang. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 2006.

Weaver, A.L., 2008. Epidemiology of gout. 2008. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 75, 5:S9-12.

FIGURE AND LEGENDS

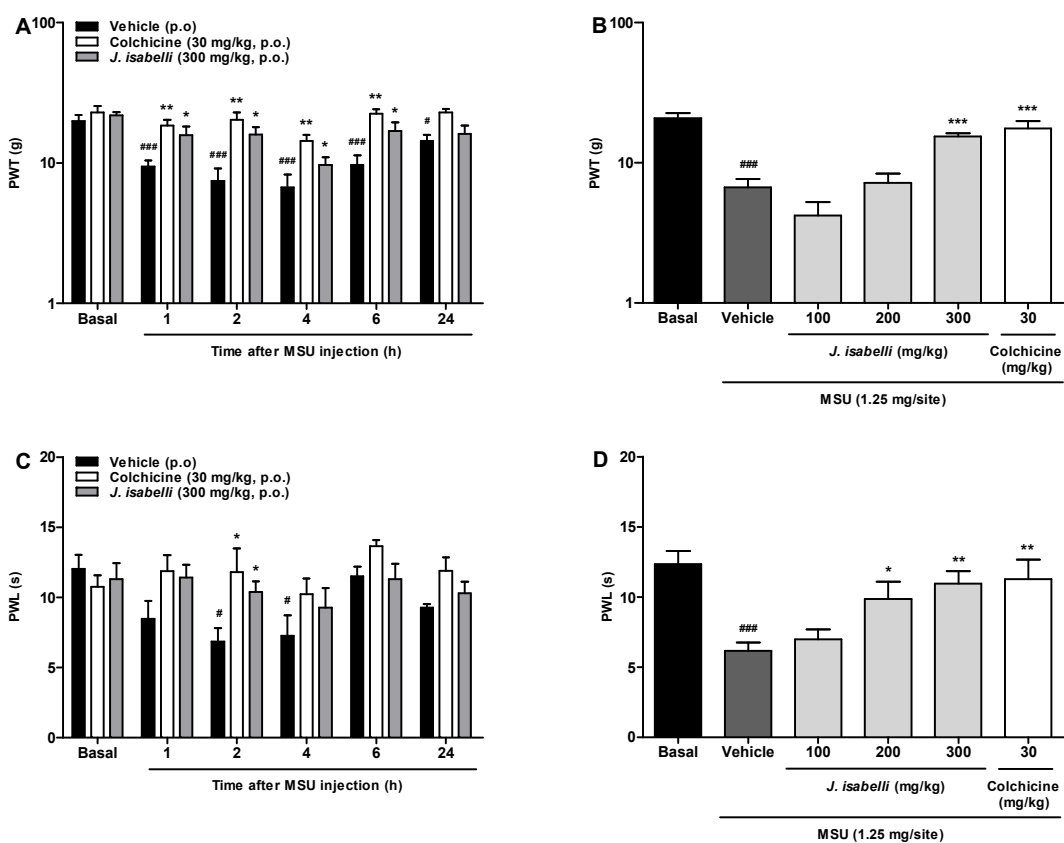


Figure 1: Effect of *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) on the nociception induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). Time course (A) and dose-effect (B) of anti-allodinic effect; time course (C) and dose-effect (D) of anti-hyperalgesic effect of crude extract of *J. isabellei* orally. Each column or point represents the mean of six to eight animals and vertical lines show the SEM. # $p < 0,05$ and ### $p < 0,001$ represents statistical difference to basal level and * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ represents statistical difference to vehicle - treated group. Statistical analysis was determined using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post test (B and D) or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (A and C).

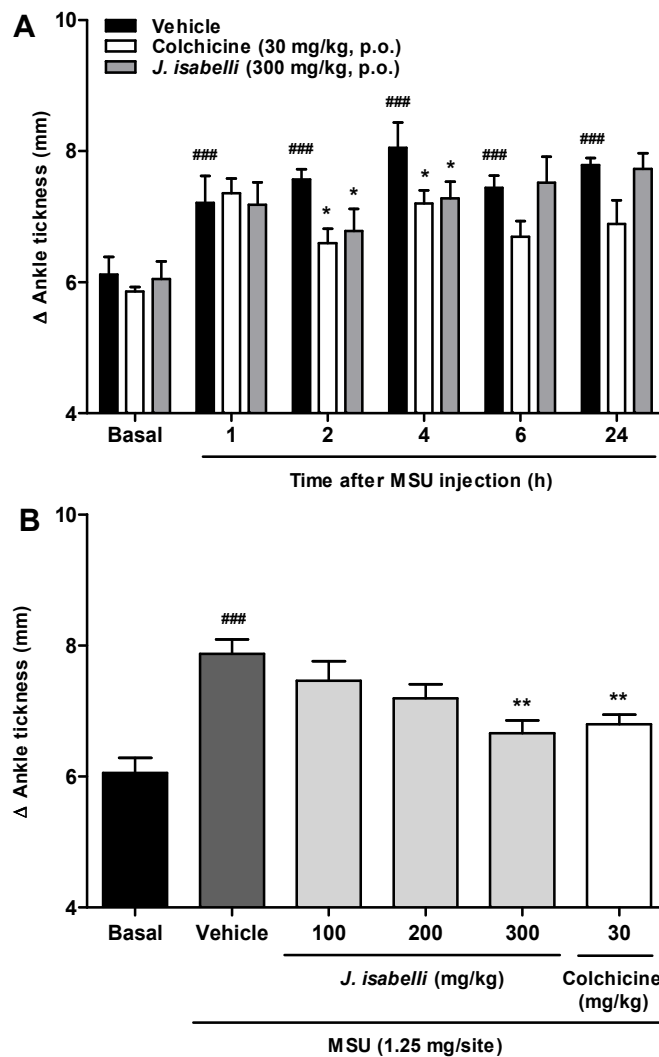


Figure 2: Effect of *J. isabellei* crude extract (300 mg/kg) on the ankle edema induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site). Time course (A) and dose-effect (B) of anti-edematogenic effect of crude extract of *J. isabellei* orally. Each column or point represents the mean of six to eight animals and vertical lines show the SEM. ### $p < 0,001$ represents statistical difference to basal level; * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ represents statistical difference to vehicle treated group. Statistical analysis was determined using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post test (B) or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (A).

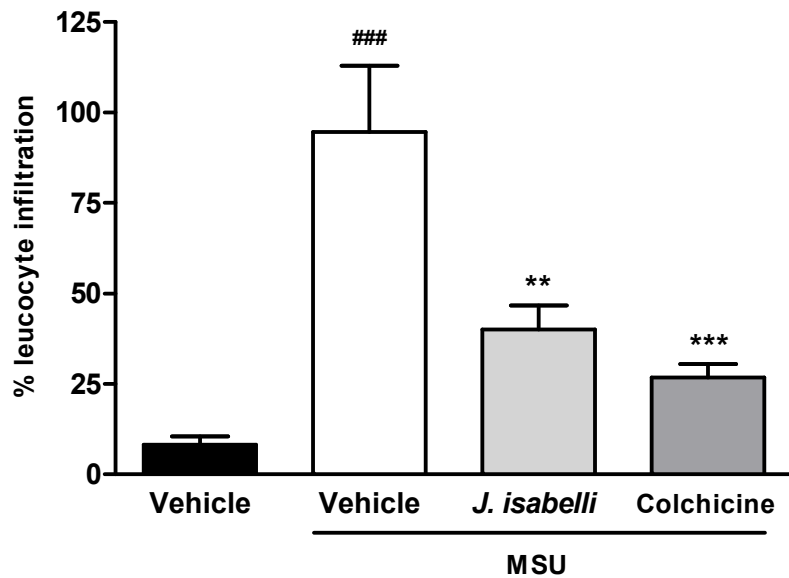


Figure 3: Effect of *J. isabellei* crude extract on the neutrophil infiltration induced by intra-articular MSU injection (1.25 mg/site), analyzed 6 hours after MSU injections. Each column or point represents the mean of four to six animals and vertical lines show the SEM. ### $p < 0,001$ represents statistical difference to vehicle intra-articularly injected group; * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ represents statistical difference to MSU injected group. Statistical analysis was determined using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post test.

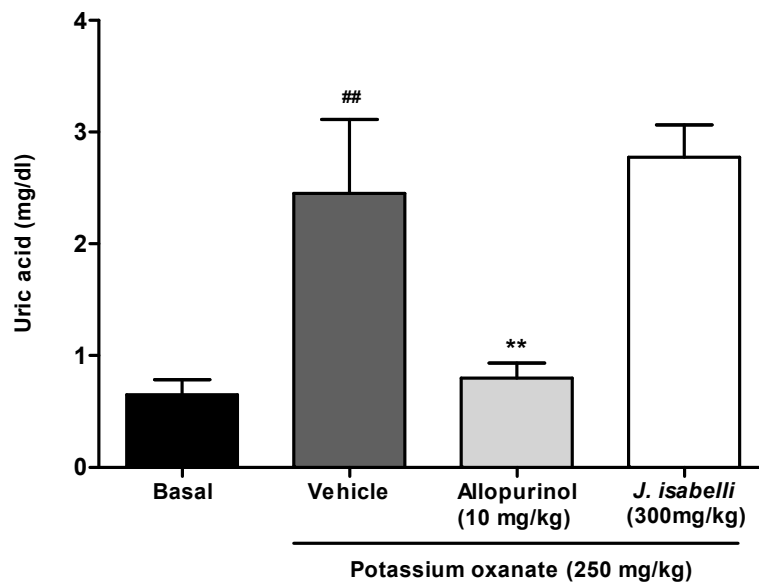


Figure 4: Biochemical changes induced by potassium oxonate administration (250 mg/kg, i.p.). Effect of allopurinol and *J. isabellei* crude extract in the seric level of uric acid 2 hour after PO treatment. Each column or point represents the mean of four to six animals and vertical lines show the SEM. ## $p < 0,01$ represents statistical difference to basal levels and ** $p < 0,01$ represents statistical difference to vehicle treated group. Statistical analysis was determined using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post test.

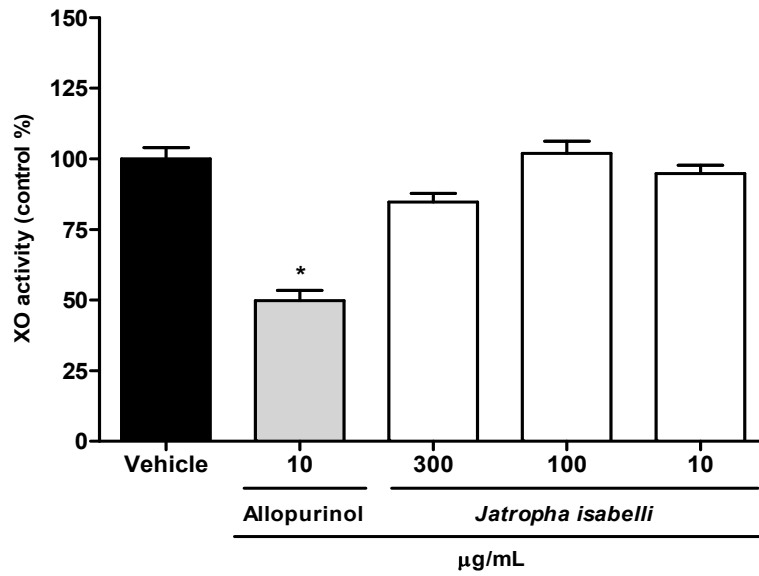


Figure 5: *In vitro* Xanthine oxidase (XO) activity. Effect of allopurinol and different concentrations of *J. isabellei* over xanthine oxidase *in vitro* activity. * $p < 0,05$ represents statistical difference to vehicle. Statistical analysis was determined using one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post test.

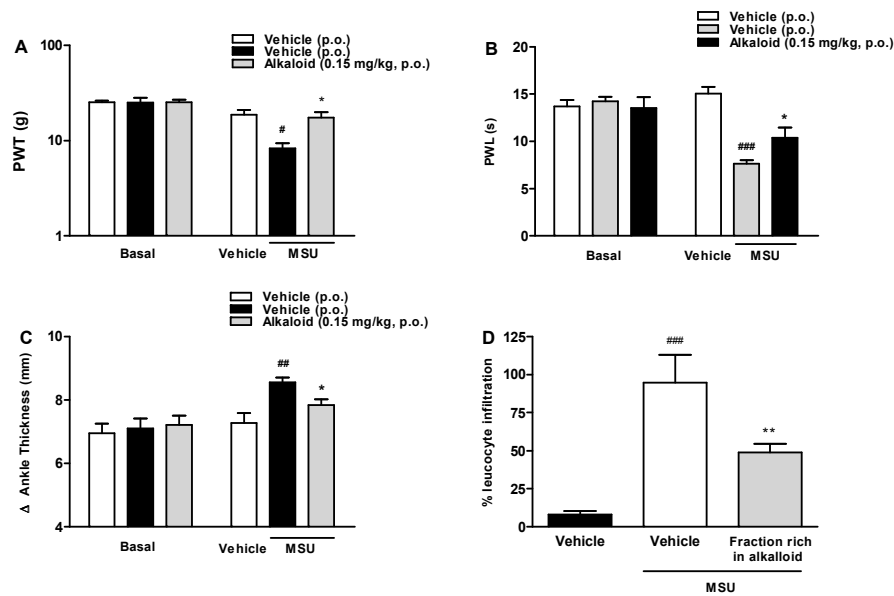


Figure 6: Effect of a fraction rich in alkaloids extracted from *J. isabellei* in the nociception and inflammation induced by intra-articular MSU injections (1.25 mg/site). Anti-allodinic (A), anti-hyperalgesic (B) and anti-edematogenic (C) effects of the fraction rich in alkaloids orally administrated. # $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ and ### $p < 0,001$ represents statistical difference to basal levels; * $p < 0,05$ represents statistical difference to MSU intra-articular injected and vehicle treated group. Effect of the fraction rich in alkaloids on the neutrophil infiltration, analyzed 6 hours after MSU injections (D). ### $p < 0,001$ represents statistical difference to vehicle intra-articularly injected group and ** $p < 0,01$ represents statistical difference to MSU injected group. Each column or point represents the mean of four to six animals and vertical lines show the SEM. Statistical analysis was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos antigos. A busca por alívio e pela cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

O uso popular das plantas medicinais contribui de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas destes vegetais. A cultura das práticas alternativas faz despertar o interesse de pesquisadores que buscam novas biomoléculas.

As plantas medicinais constituem uma fonte importante de pesquisa para a descoberta de novos agentes terapêuticos, uma vez que são produtoras de uma grande quantidade de metabólitos secundários com estruturas químicas diversificadas. Estes metabólitos estão sendo cada vez mais conhecidos através do isolamento, da elucidação estrutural e dos testes farmacológicos e de toxicidade, fato que tem impulsionado as indústrias farmacêuticas na busca por novos fármacos.

A revisão bibliográfica acerca de *J. isabellei* despertou o interesse em estudar esta espécie, pois demonstrou-se promissora em função das características dos terpenos isolados e devido aos seus usos populares. Os estudos já existentes sobre esta planta são apresentados no artigo de revisão que originou a publicação na Revista Saúde e remetem às atividades gastroprotetora e citotóxica, bem como antiprotozoária e antiproliferativa de *J. isabellei*.

Os vegetais produzem metabólitos secundários dotados de ação antioxidante que previnem os danos moleculares causados pelas espécies reativas de oxigênio. A grande diversidade destes compostos se deve ao fato de as plantas terem que se proteger dos radicais livres produzidos durante um período de estresse oxidativo, como por exemplo, a exposição demasiada à radiação ultravioleta (SCARTEZZINI, SPERONI, 2000).

Os polifenóis são amplamente distribuídos no reino vegetal e são definidos como substâncias que possuem estruturas químicas contendo um anel aromático e hidroxilas livres (MALACRIDA, MOTTA, 2005). Estes compostos são efetivos doadores de hidrogênios e seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição de grupamentos hidroxila, bem como, da sua habilidade em suportar a deslocalização dos elétrons no anel aromático (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996). Dentre os polifenóis mais importantes, podemos citar os flavonóides e taninos condensados, que se destacam pelas suas propriedades farmacológicas.

A ausência de estudos químicos sobre o potencial antioxidante de *J. isabellei* motivou a avaliação desta espécie, uma vez que a busca de plantas e compostos que previnam o envelhecimento, as doenças neurodegenerativas e o câncer têm sido procurados e estudados pelas indústrias farmacêuticas.

A atividade antioxidante de compostos vegetais pode ser atribuída a vários mecanismos, como a prevenção da peroxidação lipídica e capacidade sequestrante de radicais livres (KAUR, GEETHA, 2006). Estes mecanismos foram avaliados através da inibição do radical DPPH e da determinação do TBARS. O doseamento dos compostos que contribuem para a atividade antioxidante também foi realizado.

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e das frações de *J. isabellei* foi determinada frente ao radical DPPH (CHOI et al, 2002). Este ensaio determina a capacidade doadora de hidrogênios de determinadas substâncias, ocorrendo a redução do radical DPPH. Durante este processo a cor violeta intensa do radical passa a uma cor amarelo claro, indicando que houve a inibição do radical livre pelas substâncias antioxidantes contidas nas amostras da planta.

A fração acetato de etila foi a que apresentou a melhor atividade antioxidante, com perfil semelhante ao do padrão ácido ascórbico. Esta fração apresentou IC₅₀ de 14,78 ± 1,10 µg/mL e inibição de 95.35% do radical DPPH na maior concentração testada (250 µg/mL). Esta concentração também demonstrou bons resultados de inibição do radical livre para o extrato bruto e a fração butanólica, apresentando 80,40 e 74,83% de inibição, respectivamente. Entretanto, com a diminuição da concentração destas duas amostras, a inibição do radical DPPH diminuiu, tornando os valores de IC₅₀ mais elevados (124,60 e 121,05 µg/mL, respectivamente).

A fração diclorometano mostrou uma fraca capacidade antioxidante, apresentando inibição do radical DPPH apenas nas concentrações de 250 (34,04% inibição), 125 (19,84% inibição) e 62,5 µg/mL (2,26% de inibição).

Este ensaio evidencia que os solventes extraem compostos diferentes de acordo com a sua polaridade e assim, estas frações se comportam de maneira diferente frente ao radical DPPH. Muitos estudos demonstram que os compostos mais polares são extraídos mais facilmente pelos solventes polares e apresentam os melhores resultados para a atividade antioxidante devido à presença das hidroxilas. Entre os solventes da partição, os mais polares (acetato de etila e n-butanol) são os que geralmente apresentam a maior atividade antioxidante (MENSOR et al, 2001).

O doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos condensados do extrato bruto e das frações de *J. isabellei* revelou que a fração acetato de etila apresenta os melhores valores para estes metabólitos e que existe uma correlação positiva entre o conteúdo destas substâncias com a atividade antioxidante. O solvente acetato de etila foi encontrado como sendo o solvente mais efetivo na extração de flavonóides e desta forma apresentando uma notável atividade antioxidante para esta fração (MATTHAUS, 2002). Vários ensaios relatam a existência de uma correlação positiva entre compostos fenólicos e atividade antioxidante utilizando ensaios similares (CHANDRA, MEJIA, 2004; SOUSA et al, 2007).

O extrato bruto e a fração butanólica também apresentaram uma correlação positiva e proporcional com a atividade antioxidante. A fração diclorometano demonstrou pouco conteúdo de fenóis e uma fraca atividade antioxidante, fato que pode ser explicado em parte, devido à polaridade deste solvente que não extrai compostos polares, que por sua vez, apresentam melhor atividade antioxidante.

O solvente diclorometano foi o solvente mais apolar utilizado na partição do extrato aquoso e resultou uma fração rica em compostos mais apolares como os terpenos. Desta fração foram isolados os compostos ácido acetil aleuritólico (já descrito para esta planta por Pertino et al, 2007) e uma mistura de sitosterol 3-O-β-D glicosídeo e estigmasterol ainda não relatada para esta espécie.

A mistura de sitosterol glicosilado e estigmasterol caracterizou-se por um resíduo branco amorfo que, quando aplicado e eluído em CCD, apresentou-se como uma mancha roxa após revelação com anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100 °C. Através dos espectros de ¹³C-RMN e ¹H-RMN (ver em Anexos) os

deslocamentos químicos foram atribuídos e caracterizaram-se os átomos de carbono e hidrogênio que constituem os compostos. O solvente utilizado para a solubilização da mistura foi o DMSO deuterado.

Dentre os sinais verificados no espectro de ^{13}C -RMN, os deslocamentos na região de carbonos sp^2 (δ 140,69; 138,25; 129,05 e 121,37 ppm) indicam a presença de quatro carbonos oleofínicos, ou seja, duas duplas ligações. Os sinais em 140,69 e 121,37 ppm são característicos de esteróides com uma dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 (FORGO, KÖVER, 2004; DE-EKNAMKUL, POTDUANG, 2003) enquanto que os sinais em 138,25 129,05 ppm são típicos de triterpenos com uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 da cadeia lateral dos esteróides (DE-EKNAMKUL, POTDUANG, 2003; FORGO, KÖVER, 2004; ZANON et al, 2008). Esses deslocamentos químicos são muito importantes na elucidação estrutural de esteróides, pois caracterizam β -sitosterol e estigmasterol. Estes compostos possuem uma dupla ligação na mesma posição (Δ^5), assim, os sinais do espectro ^{13}C -RMN irão coincidir e os sinais do C5 e do C6 serão mais intensos quando comparado com os outros dois sinais referentes a insaturação (Δ^{22}) que pertencem somente ao estigmasterol (DE-EKNAMKUL, POTDUANG, 2003; AYRES et al, 2008). No espectro de H^1 -RMN destaca-se o sinal de um singleto largo em 5,32 ppm que é característico do H-6 de ambos compostos e o dubleto de dubletes em 5,17 ppm e 5,04 ppm que caracterizam os hidrogênios oleofínicos do estigmasterol (H-23 e H-22, respectivamente) (DE-EKNAMKUL, POTDUANG, 2003; FORGO, KÖVER, 2004).

O espectro do ^{13}C -RMN permitiu identificar um carbono anomérico de sinal em 100,89 ppm. A presença de ressonâncias anoméricas em deslocamentos químicos na faixa de 90-112 ppm ajuda muito na determinação do número de O-glicosídeos, uma vez que nenhum carbono de aglicona absorve nesta região e que ressonâncias anoméricas são geralmente não equivalentes e não se sobrepõe umas as outras (AGRAWAL, 1992). A presença de um resíduo glicosídico no C-3 da aglicona do sitosterol foi atribuído devido a este carbono apresentar deslocamento químico de 79,25 ppm. O resíduo glicosídico no C-3 da aglicona aumenta o deslocamento deste carbono em 6-7 ppm para a região de campo baixo quando comparado com o deslocamento deste carbono sem resíduo glicosídico (CHAURASIA, WICHTL, 1987). O C-3 do estigmasterol não aparece ligado a resíduo glicosídico porque seu deslocamento químico (δ 73,59 ppm) está em uma região mais protegida do

espectro. O resíduo glicosídico foi identificado como β -D-glicose por comparação do espectro de carbono com a literatura (AGRAWAL, 1992).

A porcentagem aproximada de cada constituinte da mistura foi determinada de acordo com Goulart et al (1993) utilizando o espectro de ^1H -RMN e as intensidades relativas à integração dos picos correspondentes ao H-6 (ambos compostos), de intensidade relativa 1,50 e os sinais de H-22 e H-23 (do estigmasterol) com intensidades relativas de 0,30 cada. Subtraindo-se este valor 0,30 de 1,50 (H-6 ambos compostos), obtém-se a intensidade de 1,20, que corresponde a um próton da molécula de β -sitosterol. As intensidades relativas 0,30 (1H do estigmasterol) e 1,20 (1H do sitosterol) permitiram deduzir que a mistura [1,50 (1+2) =100%] contém 80% de β -sitosterol e 20% de estigmasterol. Muitos autores encontraram valores mais altos na quantificação do β -sitosterol quando isolado em mistura com o estigmasterol (GALLOTA, BOAVENTURA, 2005; BOLIGON et al, 2010). Um aumento progressivo na proporção de estigmasterol, comparado ao β -sitosterol, das raízes em relação ao caule foi atribuído à diferença da incidência de luz, o que determina a bioconversão de β -sitosterol em estigmasterol (GALLOTA, BOAVENTURA, 2005).

A eficiência antioxidante do extrato bruto e das frações das partes subterrâneas de *J. isabellei* foi avaliada *ex vivo* frente ao Fe (II), um conhecido agente oxidante. O cérebro de ratos, que é um órgão particularmente suscetível aos danos causados por radicais livres (devido seu alto consumo de oxigênio e baixa concentração de enzimas antioxidantes) foi utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante dos ativos de *J. isabellei* frente à peroxidação lipídica induzida por Fe (II). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por um radical livre podendo formar radicais que propagam a reação peroxidativa e carbonilas tóxicas como o malondialdeído, que é citotóxico e pode lesar o DNA (ESTERBAUER, 1993). A peroxidação lipídica é a principal consequência do estresse oxidativo e resulta em dano às membranas celulares devido à oxidação, acarretando um aumento da fluidez da membrana, comprometimento da sua integridade e inativação da interação entre membrana/receptor e membrana/enzima (HALLIWELL, GUTTERRIDGE, 1986).

Todas as frações e o extrato bruto de *J. isabellei*, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foram capazes de inibir significativamente a produção de TBARS quando comparadas com o controle ($p < 0,001$), alcançando os níveis basais. Considerando a concentração capaz de inibir a produção do TBARS em 50% (IC_{50} - µg/mL \pm SEM), a fração acetato de etila apresentou o menor valor ($34,5 \pm 8,5$), seguida pelas frações diclorometano e butanólica ($37,8 \pm 9,7$ e $49,04 \pm 2,9$, respectivamente) e pelo extrato bruto ($51,19 \pm 4,25$). Estes valores não apresentam diferença significativa entre si com $p < 0,05$.

Os bons resultados encontrados para esta planta podem ser explicados, em parte, devido aos compostos fenólicos da fração acetato de etila e pela presença de triterpenos na fração diclorometano. Os flavonóides são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*, bem como os triterpenos sitosterol e estigmasterol que inibiram a peroxidação lipídica em 21 e 9% respectivamente (HUNG, YEN, 2001; SOUSA et al, 2007). Assim, esta planta pode ser um auxiliar na prevenção e no combate aos danos celulares e neurotóxicos causados pela peroxidação lipídica.

Visando avaliar a capacidade antimicrobiana da espécie *J. isabellei*, o extrato bruto e as frações diclorometano, acetato de etila e butanólica foram avaliadas frente a uma série de microorganismos que incluem bactérias, fungos e uma alga. A fração diclorometano apresentou os melhores resultados frente aos fungos *S. schenckii* e *F. proliferatum* e frente a bactérias do gênero *Micrococcus*, com concentração inibitória mínima de 250 µg/mL para cada microorganismo. A atividade antimicrobiana da fração diclorometano pode ser atribuída, em parte, aos terpenos presentes nesta fração. Muitos estudos anteriores relatam a atividade antimicrobiana dos terpenos e das frações mais apolares (AIYELAAGBE et al, 2000; CHEN et al, 2008; SINGH, DUBEY, 2001; SINGH, SAHU, SHARMA, 2002; SINGH, SINGH, 2003; STEFANELLO et al, 2006; TABOPDA et al, 2009; URZUA et al, 1998).

Os terpenos da espécie *J. isabellei*, como o β -sitosterol, o estigmasterol e o ácido acetil aleurítico, já foram avaliados anteriormente quanto à sua capacidade antimicrobiana e apresentaram bons resultados frente aos fungos e bactérias testadas (PERES et al, 1997; CORTEZ et al, 1998; JAIN, SINGH, JAIN, 2001; MATHABE et al, 2008).

A espécie *J. isabellei* é utilizada popularmente no tratamento de artrite, em especial a gota. A gota é um processo inflamatório que ocorre nas articulações devido a interação dos cristais de urato com os neutrófilos presentes na articulação. Este processo libera mediadores inflamatórios que atraem mais células de defesa para a articulação, ampliando a resposta imune. A defesa do organismo contra os cristais provoca uma grande reação inflamatória na articulação o que provoca dor, calor, edema e vermelhidão.

As plantas podem contribuir no tratamento da gota através de seus metabólitos secundários que possuem ação anti-inflamatória, como os terpenos e flavonóides e também através dos alcalóides, como a colchicina, responsável por inibir a quimiotaxia dos leucócitos para dentro da articulação, evitando assim, a ampliação da resposta imune (AHERN et al, 1987; SPILBERG et al, 1979).

Com a finalidade de comprovar o uso popular desta espécie para o tratamento de artrite, em especial gota, os efeitos antinociceptivo e anti-edematogênico do extrato bruto e de uma fração purificada de alcalóides, foram avaliados através de modelo experimental para gota utilizando animais. A fração purificada de alcalóides foi obtida a partir do extrato bruto através da extração de Stas-Otto, utilizando éter etílico. Esta fração foi previamente caracterizada por CCD e revelou a presença de pelo menos três classes de alcalóides segundo Wagner, Bladt, Zgainski (2006). A quantificação de alcalóides no extrato bruto deu-se através de doseamento espectrofotométrico segundo a metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003), revelando a presença de 0,048% de alcalóides.

A artrite gotosa deste modelo experimental foi induzida pela injeção de cristais de urato (MSU) na articulação do tornozelo dos ratos anestesiados, conforme metodologia descrita por Coderre e Wall (1987). Uma hora antes da injeção dos cristais, os animais foram divididos em quatro grupos e tratados com veículo, colchicina (30mg/kg), extrato bruto da planta (300mg/kg) ou com a fração rica em alcalóides (0,15mg/kg). A administração da colchicina e dos extratos da planta antes dos cristais, determina que este experimento avalie a prevenção da inflamação. Uma curva de doses e de tempos previamente determinada, demonstrou que o melhor efeito do extrato bruto na diminuição da dor e do edema ocorreu na dose de 300mg/kg e se deu 3 horas após a administração do extrato bruto, sendo 2 horas após a injeção dos cristais de MSU, assim, os parâmetros do ensaio foram

analisados neste tempo. A dose da fração purificada de alcalóides foi determinada com base na quantificação de alcalóides no extrato bruto (0.048%).

Para avaliar a nocicepção foram utilizados dois parâmetros: estímulo mecânico, através dos filamentos de Von Frey (determina se há ocorrência de alodínia mecânica) e estímulo térmico, através do feixe de luz de alta intensidade (determina se há ocorrência de hiperalgesia térmica) (CHAPLAN et al, 1994; HARGREAVES et al, 1988). A alodínia e a hiperalgesia são decorrentes da sensibilização do animais após a injeção dos cristais e o desenvolvimento da resposta imune, ou seja, os animais vão sentir com mais facilidade os estímulos mecânicos e térmicos. Como todo processo inflamatório produz edema na região afetada, a medição do edema foi outro parâmetro avaliado no modelo experimental de gota. Todos os animais tiveram seu limiar basal previamente determinado e no momento do experimento os animais que receberam a fração purificada de alcalóides e o extrato bruto, tiveram seus dados comparados com animais que receberam apenas o veículo e outros que receberam o controle positivo, a colchicina.

O extrato bruto de *J. isabellei* (300mg/kg) foi capaz de reverter completamente a alodínia mecânica e reduzir a hiperalgesia térmica ($68 \pm 20\%$) no tempo de 2 horas, ou seja, impediu que houvesse a redução do limiar da dor (pelos nociceptores de estímulos mecânicos e térmicos) devido reação inflamatória na articulação. A colchicina, utilizada como controle, também inibiu a alodínia mecânica ($74 \pm 21\%$ de prevenção) e a hiperalgesia térmica ($79 \pm 14\%$ de prevenção) causadas pela injeção de MSU. O extrato bruto de *J. isabellei* também foi capaz de reduzir o edema em 2 e 4 horas com redução de $35 \pm 8\%$ e $24 \pm 3\%$, respectivamente. A colchicina impediu a formação do edema em $44 \pm 14\%$ em 2 horas.

Com a finalidade de avaliar se o extrato bruto de *J. isabellei* está atuando na inibição da migração leucocitária para dentro da articulação, optou-se por determinar colorimetricamente a quantidade de mieloperoxidase (MPO) (SUZUKI et al, 1983). A MPO é um marcador enzimático utilizado para verificar a presença de leucócitos polimorfonucleares em amostras de tecidos (SCHIERWAGEN, BYLUND-FELLENIIUS, LUNDBERG, 1990).

A acumulação de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) é um evento característico dos estágios iniciais da reação inflamatória aguda e embora estas células tenham um importante papel na reparação processos, elas também podem

contribuir para a destruição de tecidos potencialmente viáveis (SCHIERWAGEN, BYLUND-FELLENIS, LUNDBERG, 1990). Por isso, em casos como a artrite gotosa deve-se evitar ao máximo a presença de grande quantidade de leucócitos na articulação, reduzindo assim, os danos ao paciente.

A mieloperoxidase é uma enzima lisossomal presente nos leucócitos polimorfonucleares e que possui um mecanismo dependente de oxigênio para exercer sua função de defesa contra bactérias e outros corpos estranhos. A sua liberação se dá em fagolisossomos como consequência da fagocitose (CHAMPE, HARVER, FERRIER, 2006; O'BRIEN, 2000).

A injeção de cristais de MSU na articulação induz a fagocitose pelos PMNs e a liberação de mediadores inflamatórios proporciona um aumento da infiltração celular, ocorrendo um aumento de 54 ± 23 % na atividade da enzima MPO. Este aumento foi prevenido pelo extrato bruto de *J. isabellei* e pela administração de colchicina (51 ± 4 % e 60 ± 8 % de prevenção, respectivamente).

Como todos os ensaios testados no modelo de gota foram favoráveis para o extrato bruto de *J. isabellei*, optou-se em verificar se a administração desta planta poderia estar causando um efeito hipouricemiante e consequente falso positivo para os parâmetros de nocicepção, edema e MPO, uma vez que, diminuiria a quantidade de ácido úrico no sangue, prevenindo o depósito nas articulações.

Para testar este efeito, a hiperuricemia foi induzida nos ratos através da administração de um inibidor da uricase, o oxonato de potássio (PO - 250mg/kg), 1 hora antes da administração do extrato bruto (300mg/kg) e do alopurinol (10mg/kg) (NGUYEN et al, 2005). Nos mamíferos, com exceção dos primatas, a enzima uricase metaboliza o ácido úrico (formado devido à degradação das purinas), em alantoína que em alguns animais, não nos mamíferos, pode ser degradada em uréia ou amônia. A inibição desta enzima proporciona a elevação dos níveis séricos de ácido úrico, levando a um quadro de hiperuricemia. O alopurinol, utilizado como controle positivo, diminui os níveis de ácido úrico no sangue por atuar na inibição da enzima xantina oxidase, o que resulta no acúmulo de hipoxantina e xantina, que são compostos mais solúveis e, portanto, com menor probabilidade de promoverem resposta inflamatória. (CHAMPE, HARVER, FERRIER, 2006).

Os níveis de ácido úrico, uréia e creatinina foram avaliados para a determinação da excreção e de danos renais. A administração de alopurinol, como

se esperava, reduziu os níveis de ácido úrico ($89 \pm 10\%$), enquanto que o extrato bruto de *J. isabellei* não teve efeito na redução do ácido úrico excretado. Os níveis de uréia e creatinina também não foram alterados, não demonstrando injúrias renais.

Outra técnica utilizada para avaliar uma possível hipouricemia causada pela administração de *J. isabellei* foi a determinação da inibição direta da enzima xantina oxidase (ANGEL et al, 1986; LIU et al, 2008). Concordando com os efeitos nulos sobre a excreção de ácido úrico, o extrato bruto não foi capaz de inibir a enzima XO, comprovando desta forma, que a melhora do quadro inflamatório se deve às propriedades farmacológicas da planta e não devido a redução da uricemia pela inibição da biossíntese do ácido úrico. O controle positivo, alopurinol, inibiu a enzima em $70 \pm 12\%$.

Todos os testes descritos acima foram igualmente realizados para a fração purificada de alcalóides, uma vez que esta classe de metabólitos secundários pode estar contribuindo na melhora dos sintomas e do quadro inflamatório da gota induzida nos ratos. A fração purificada de alcalóides ($0,15\text{mg/kg}$) foi capaz de prevenir a aloíndia mecânica ($83 \pm 12\%$ de prevenção), a hiperalgesia térmica ($43 \pm 6\%$ de prevenção), o edema da articulação ($61 \pm 11\%$ de prevenção) e a infiltração de leucócitos polimorfonucleares ($46 \pm 5\%$ de prevenção) no tempo de 2 horas após a administração dos cristais, de maneira similar como ocorreu com o extrato bruto e a colchicina.

A existência de possíveis efeitos colaterais foi avaliada durante os experimentos, uma vez que as plantas possuem uma ampla gama de metabólitos secundários responsáveis por diferentes respostas farmacológicas e que os anti-inflamatórios não esteroidais em sua maioria causam lesões gástricas devido a inibição da COX-1.

A capacidade exploratória e locomotora, bem como os efeitos sobre a mucosa estomacal e danos hepáticos e renais foram avaliados. A administração do extrato bruto de *J. isabellei* e da fração purificada de alcalóides não induziu o desenvolvimento de lesões gástricas, como já comprovado anteriormente por Pertino et al (2007). Também não foram observadas alterações na atividade das enzimas AST e ALT, bem como na atividade locomotora.

6 CONCLUSÕES

- A fração acetato de etila apresentou a melhor atividade antioxidante e o melhor valor de IC₅₀ frente ao radical DPPH, com perfil semelhante ao do padrão ácido ascórbico. Esta fração também apresentou os melhores valores para os doseamentos de polifenóis, flavonóides e taninos condensados, demonstrando que existe uma relação positiva entre o conteúdo destas substâncias e a atividade antioxidante.
- A fração butanólica e o extrato bruto tiveram bons resultados na inibição do DPPH, enquanto que a fração diclorometano apresentou fraca atividade antioxidante. Para estas amostras, o conteúdo de polifenóis, flavonóides e taninos condensados foi relativamente proporcional à sua capacidade antioxidante.
- A partir da fração diclorometano foi possível isolar uma mistura de substâncias descritas pela primeira vez para esta espécie, o sitosterol 3-O-β-D glicosídeo e estigmasterol. O ácido acetil aleuritólico, já conhecido para esta espécie foi novamente isolado pelo nosso grupo de pesquisas.
- A indução da peroxidação lipídica com o Fe(II) revelou que todas as frações e o extrato bruto de *J. isabellei*, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foram capazes de inibir significativamente a produção de TBARS, alcançando os níveis basais.
- Na atividade antimicrobiana, a fração diclorometano apresentou os melhores resultados frente aos fungos *S. schenckii* e *F. proliferatum* e frente a bactérias do gênero *Micrococcus*, com concentração inibitória mínima de 250 µg/mL para cada microorganismo.
- O extrato bruto de *J. isabellei* apresentou efeitos antinociceptivos e anti-edematogênicos em modelo animal para artrite gotosa, fatos que comprovam sua ação anti-inflamatória e o uso popular desta planta no tratamento da gota.
- A fração purificada de alcalóides apresentou efeitos antinociceptivos e anti-edematogênicos em modelo animal para artrite gotosa, o que sugere que os alcalóides desta planta possam estar envolvidos, em parte, na atividade anti-inflamatória desta planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFITO-Associação Brasileira de Indústrias de Fitoterápicos. Perspectivas do setor de fitoterápicos. In: IBAMA/CENARGEN. Reunião técnica sobre recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Estratégias para conservação e manejo sustentável. Brasília, 2001.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.

AGRAWAL, P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**. v.31, n.10, p.3307-3330, 1992.

AHERN, M.J. et al. Does colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. **Aust NZ Journal of Medicine**. v.17, p.301-304, 1987.

AIYELAAGBE, O.O. et al. The Antimicrobial Activity of Roots of *Jatropha podagrica* (Hook). **Phytotherapy Research**. v.14, p.60-62, 2000.

ANGEL et al. The etiological role of free radicals in human hematoma-induced flap necrosis. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v.77, p.795–801, 1986.

ARAÚJO, E.C. et al. Uso de plantas medicinais por pacientes com câncer nos hospitais públicos em João Pessoa (Pb). **Revista Espaço para a Saúde**, v.8, nº 2, p. 44-52, 2007.

AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p. 90-97, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, 2006.

BIEBER, J.D.; TERKELTAUB, R.A. Gout: On the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. **Arthritis & Rheumatism**. v.50, n.8, p.2400-2414, 2004.

BOLIGON, A.A. et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**. v.100, p.6592-6498, 2009.

BOLIGON, A.A. et al. Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.29, n.3, p.450-453, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** – Série B, 60p. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**. v.74, n.17, p. 2157-2184, 2004.

CALIXTO, J.B. et. al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261- 279, 2001.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**, v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CARLUCCIO, M.A. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. n.23,p.622-629, 2003.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p. 3583-3589, 2004.

CHAPLAN, S.R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **The Journal of Neuroscience**. v.53, p.55-63, 1994.

CHAURASIA, N.; WICHTL, M. Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. **Journal of Natural Products**. v.50, n.5, p.881-885, 1987.

CHEN, J.J. et al. Antimicrobial triterpenoids from *Vladimiria muliensis*. **Journal of Natural Products**. v.71, p.547-550, 2008.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**. v.163, p. 1161-1168, 2002.

CODERRE, T.J., WALL, P.D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain**. v.28, p.379-393, 1987.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**. v.257, n.11, p.1050-1055, 1992.

CORTEZ, D.A.G. et al. Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell.(Meliaceae). **Acta Scientiarum**. v.20, n.2, p.243-245, 1998.

DE-EKNAMKUL, W., POTDUANG, B. Biosynthesis of b-sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**. v.62, p.389-398, 2003.

EMMERSON, B.T. The management of gout. **Drug Therapy**. v.334, n.7, p.445-451, 1996.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipidoxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 57, p. 779-785, 1993.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FORGO, P.; KÖVER, K. Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**. v.69, p.43–50, 2004.

GALOTTA, A.L.Q.A; BOAVENTURA, M.A.D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açai (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**. v.28, n.2, p.610-613, 2005.

GOULART, M.O.F. et al. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**. v.16, n.2, p.95-100, 1993.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. cap.1, p.13-28.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.246, p.501-514, 1986.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p.481-504, 2000.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. v.32, p.77-88, 1988.

HERTOG, M.G.L et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v.342, n.887, p.1007-1011, 1993.

HUNG, C.Y., YEN, G.C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v.34, p.306-311, 2001.

JAIN, S.C.; SINGH, B.; JAIN, R. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticu*. **Fitoterapia**. v.72, p.666-668, 2001.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KAUR, I.P., GEETHA, T. Screening methods for antioxidants-a review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. v.6, p.305-312, 2006.

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, n.1, p. 1-10, 2008.

LAWRENCE, G.H.M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**. Vol 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.

LIU, X. et al. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. **Chemico-Biological Interactions**. v.176, p.137-42, 2008.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MALACRIDA, C.R., MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MATHABE, M.C. et al. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.116, p.194-197, 2008.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2. ed. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 1994.

MATTHAUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, n.12 p. 3444-3452, 2002.

MENSOR, L.L. et al, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p. 27-30, 2001.

MIDDLETON JR., E.; CHITHAN, K.; THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**. v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.

NGUYEN, M.T. et al. Hypouricemic effects of Acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.28, p.2231-2234, 2005.

NOVAES, G.S. Gota: atualização. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. v.10, n.2, p.1-6, 2008.

O'BRIEN, P.J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**. v. 129, p.113-139, 2000.

PERES, M.T.L.P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.56, p.223-226, 1997.

PERTINO, M. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, n.3, p.553-559, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanagara Koogan, 2001.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, n. 4, p. 448-453, 2001.

REEDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**. v.99, p.1-13, 2003.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**. v.20, n.10, p.933-956, 1996.

SCARTEZZINI, P., SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 23-43, 2000.

SCHIERWAGEN, C., BYLUND-FELLENIS, A.C., LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. **Journal of Pharmacological Methods**. v.23, p.179-183, 1990.

SCHULTZ, A. **Introdução à botânica sistemática**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, v.2, 1985.

SHAHAT, A.A. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Planta Med.** V.68, n.6, p.539-541, 2002.

SILVA, D.A. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanagara Koogan, 2006.

SINGH, B.; DUBEY, M.M. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *in vivo* and *in vitro*. I. Antimicrobial Screening. **Phytotherapy Research**. v.15, p.231-234, 2001.

SINGH, B.; SAHU, P.M.; SHARMA, M.K. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. **Phytomedicine**. v.9, p.355-359, 2002

SINGH, B.; SINGH, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytotherapy Research**. v.17, p.814-816, 2003.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, p. 351-355, 2007.

SPIILBERG, I. et al. Mechanism of action of colchicine in acute urate crystal-induced arthritis. **J. Clin. Invest.** The American society for clinical investigation. v.64, p.775-780, 1979.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometer method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**. v.86, p.1124-1127, 2003.

STEFANELLO, M.E.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.251-254, 2006.

SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**. v.132, p.345–352, 1983.

TABOPDA, T.K. et al. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. **Planta Medica**. v.75, p.522-527, 2009.

URZUA, A. et al. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.62, p.251-254, 1998.

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v.29, n.2, p.326-337, 2006.

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 2006.

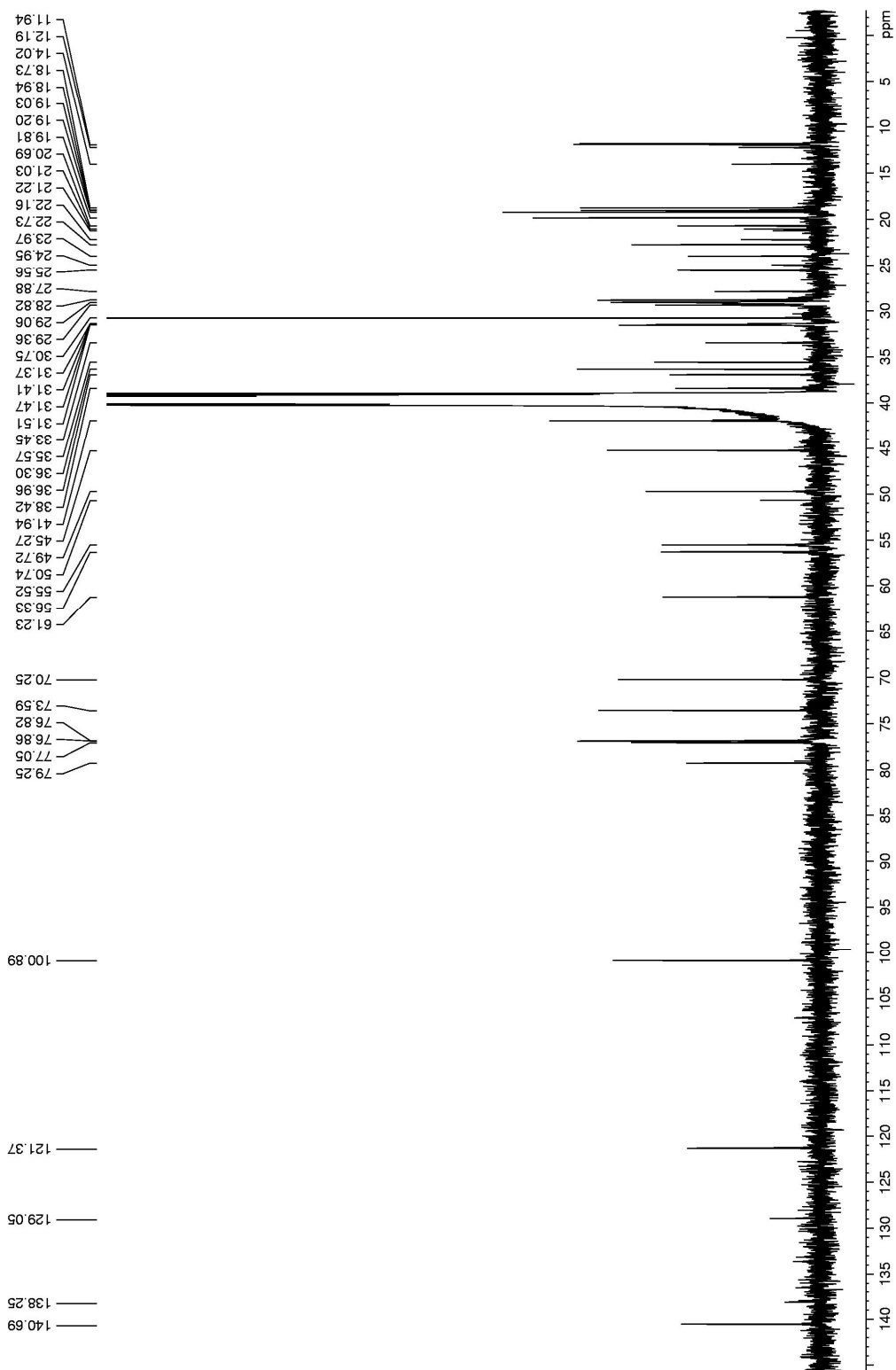
WEBERLING, F.; SCHWANTES, H.O. **Taxonomia Vegetal**. 4. ed. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1986.

ZHANG, X.P. et al. Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*. **Chemistry & Biodiversity**. v.6, p.2166-2183, 2009.

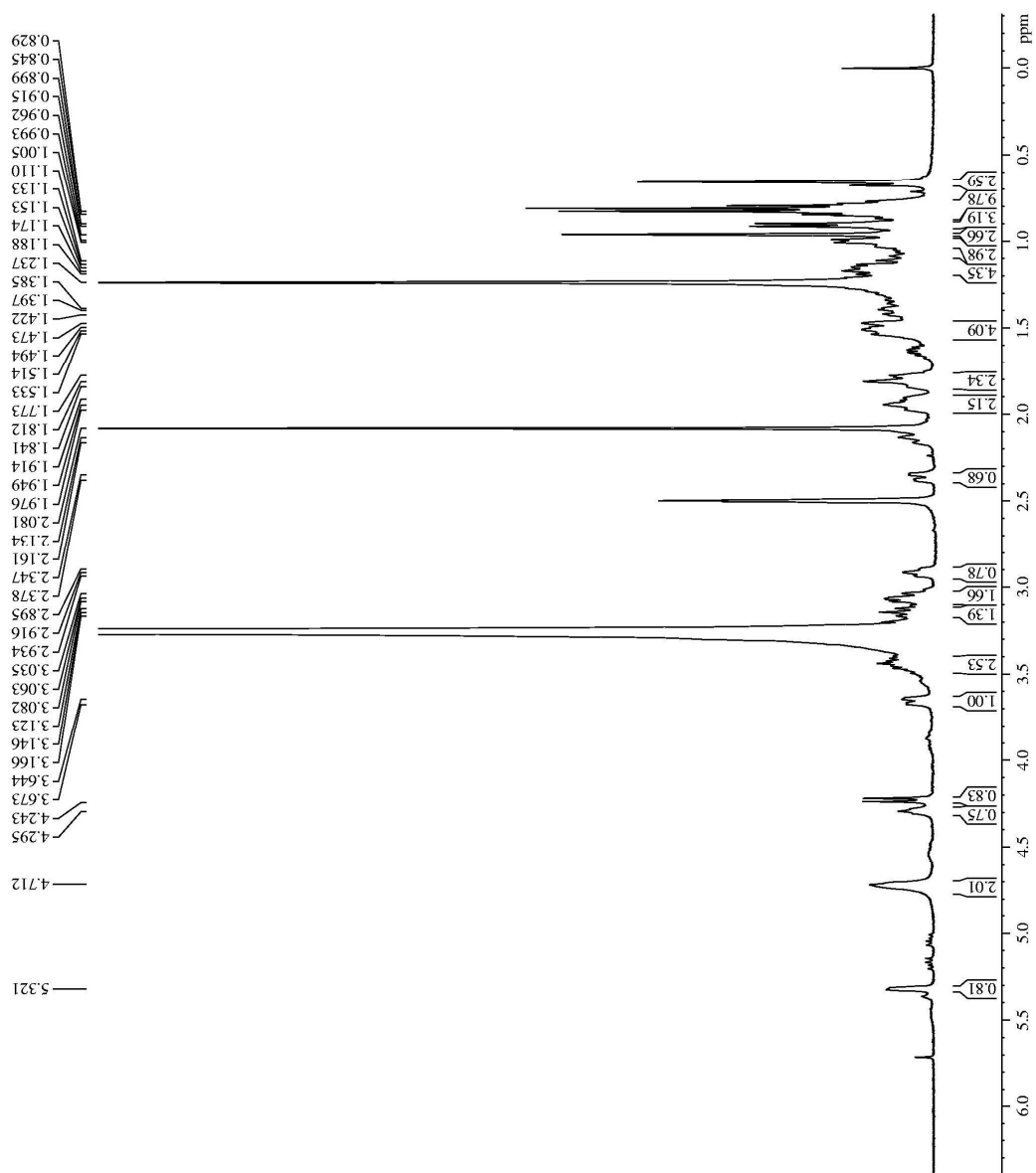
ZANON, R.B. et al. Fitoconstituintes isolados da fração diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.226–229, 2008.

ANEXOS

ANEXO 01: Espectro de ^{13}C -RMN (100MHz, DMSO): Sitosterol 3-O- β -D glicosídeo e estigmasterol



ANEXO 02: Espectro de ^1H -RMN (400MHz, DMSO): Sitosterol 3-O- β -D glicosídeo e estigmasterol



ANEXO 03: Espectro de ^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3): Ácido acetil aleuritólico

