

Artigo**Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante, Anti-acetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo)**

Martins, G. V.; Alves, D. R.; Viera-Araújo, F. M.; Rondon, F.; Braz-Filho, R.; Morais, S. M.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (1), 21-36. Data de publicação na Web: 2 de março de 2018

<http://rvq.sbj.org.br>

Chemical Study and Evaluation of Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase and Antileishmanial Activities of Extracts from *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo)

Abstract: This study carried out the chemical analysis of *Jatropha gossypifolia* L. plant extracts and evaluated the activity against *Leishmania infantum*, inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant action. The ethanol extracts of leaves (EEF), the stem (EEC) and latex (EL) were obtained. Phytochemical prospecting tests have revealed a variety of chemical groups, with the presence of phenolic compounds, triterpenoids, tannins, saponins, alkaloids and steroids. The latex in relation to other extracts tested, showed a higher content of phenolic substances and showed significant antioxidant activity with IC_{50} of 5.14 µg/ml (DPPH), and 4.03 µg/ml (ABTS), whose data were statistically similar to standard quercetin. From latex an alkaloid named jatropham glucoside was isolated and characterized by NMR and infrared spectroscopy. All extracts from *J. gossypifolia* showed positive results in the inhibition of the AChE enzyme in the CCD test and by ELISA analysis. Generally, all extracts showed efficacy in inducing the death of the *Leishmania* promastigotes, and jatropham glucoside was the most active. *J. gossypifolia* leaves present important secondary metabolites as phenolic compounds or alkaloids, such as jatropham glucoside, which could have a dual action as participation in the protective antioxidant activity of the patient's body, and in the inhibition of AChE enzyme that causes damage to the membranes of *Leishmania*.

Keywords: *Jatropha gossypifolia* L.; antioxidant; inhibitors of acetylcholinesterase; *Leishmania infantum*.

Resumo

Neste estudo foi realizada a análise química de extratos da planta *Jatropha gossypifolia* L. e avaliadas as suas atividades contra *Leishmania infantum*, atividade antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Foram obtidos os extratos etanólicos das folhas (EEF), do caule (EEC) e do látex (EL). Os testes de prospecção fitoquímica revelaram que a espécie possui uma diversidade de grupos químicos, como compostos fenólicos, triterpenos, taninos, saponinas e esteroides. O látex, dentre os extratos testados, apresentou um maior conteúdo de substâncias fenólicas e maior atividade antioxidante, com IC_{50} de 5,14 µg/mL (DPPH) e 4,03 µg/mL (ABTS), cujos dados foram estatisticamente semelhantes ao padrão quercetina. O alcaloide glicosídeo jatropham foi isolado do látex e caracterizado por espectroscopia de RMN e infravermelho. Todos os extratos de *J. gossypifolia* apresentaram resultado positivo na inibição da enzima AchE no ensaio em CCD e por ELISA. De um modo geral, todos os extratos da espécie apresentaram eficácia em induzir a morte das promastigotas, com resultados considerados promissores. As folhas de *J. gossypifolia* apresentaram metabólitos secundários importantes como compostos fenólicos e alcaloides que apresentam uma dupla ação: participando da atividade antioxidante protetora do organismo do enfermo, como também na inibição da enzima AchE, que causa danos nas membranas da *Leishmania*. Estas atividades correlacionam-se em um potencial produto para o tratamento da Leishmaniose.

Palavras-chave: *Jatropha gossypifolia* L.; Antioxidante; Inibidores da acetilcolinesterase; *Leishmania infantum*.

* Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Campus Itaperi, CEP 60714-903, Fortaleza-CE, Brasil.

 selenemaiademorais@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20180004](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180004)

Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante, Anti-acetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo)

**Giulvelini V. Martins, Daniela R. Alves, Francisco Marcelo Viera-Araújo,
Fernanda Rondon, Raimundo Braz-Filho, Selene M. de Moraes***

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Campus Itaperi, CEP 60714-903,
Fortaleza-CE, Brasil.

* selenemaiademorais@gmail.com

Recebido em 1 de dezembro de 2017. Aceito para publicação em 14 de fevereiro de 2018

1. Introdução

2. Material e métodos

2.1. Material Vegetal

2.2. Preparação dos extratos de *Jatropha gossypifolia* L.

2.3. Análise fitoquímica

2.4. Análise espectroscópica (RMN-H, RMN de ^{13}C , Infravermelho)

2.5. Determinação de fenóis totais

2.6. Determinação do teor de flavonoides totais

2.7. Determinação da atividade antioxidante

2.8. Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica *in vitro*

2.9. Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica *in vitro*

2.10. Atividade anti-leishmanial *in vitro*

2.11. Análise estatística

3. Resultados e Discussão

4. Considerações finais

1. Introdução

A espécie *Jatropha gossypifolia* L. pertence à família Euphorbiaceae, família que tem se revelado bastante promissora na esfera das plantas com potencial medicinal, pois algumas de suas espécies como *J. curcas* L., *J. multifida* L. e a própria *J. gossypifolia* L.

têm demonstrado excelentes resultados em pesquisas que avaliam suas potencialidades biológicas contra diversas patologias, como as doenças de pele e as doenças neurodegenerativas.¹

J. gossypifolia vem sendo utilizada na medicina popular como analgésico, anti-inflamatório, antidiarreico, antiofídico, antitérmico, anti-hipertensivo,

antimicrobiano, anti-hemorrágico, anticoagulante, antipirético, diurético, anti-convulsionante, antisséptico, anti-hipertensivo e anti-hepatotóxico.²

Estas propriedades medicinais estão relacionadas aos grupos de substâncias específicas encontradas e identificadas nessa espécie. Podemos citar os ácidos orgânicos, alcaloides, diterpenos, esteroides, flavonoides, lignanas, taninos, entre diversos outros componentes. Em virtude disso, essa espécie tem sido alvo de estudos quanto ao seu potencial antifúngico, antibacteriano, antiviral e antiparasitário, sendo algumas propriedades já comprovadas experimentalmente³. Porém, estudos buscando avaliar a ação anti-leishmanial dos seus extratos ainda são escassos.

A leishmaniose é uma doença grave causada por espécies de *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente e apresenta alta morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina.⁴ A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica, que se caracteriza pelo seu efeito sobre os órgãos internos, em especial o fígado, o baço e a medula óssea. É considerada fatal se não for tratada e é causada pelo complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* (LV) no leste da África, Índia e partes do Oriente Médio e *L. infantum* na Europa, Norte da África e Américas do Sul e Central, sendo este o agente etiológico da LV o mais difundido no mundo.⁵

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, que são tóxicos, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasita.⁶ A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos.⁷

De acordo com a Organização Mundial da

Saúde (OMS), a humanidade tem nas espécies vegetais a melhor e maior fonte de fármacos disponíveis. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas.⁸

Neste estudo foram avaliadas duas atividades biológicas que se correlacionam com a atividade antileishmanial, como a atividade antioxidante, que protege o organismo do animal enfermo acometido desta doença,⁹ e a atividade anti-acetylcolinesterase que está relacionada com o enfraquecimento das membranas do parasita, propiciando sua morte.¹⁰

Várias espécies vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcaloides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonoides, cumarinas e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos como eficazes na atividade leishmanicida.¹¹

J. gossypifolia, apesar de ser conhecida por seu uso na medicina tradicional, como citado acima, estudos sobre as propriedades farmacológicas e/ou químicas referentes a espécie foram pouco explorados. Desta forma, esse trabalho visa realizar o estudo fitoquímico, verificar o potencial anti-leishmanial, correlacionando-os com as atividades antioxidant e anti-acetylcolinesterase. E, com isso, poder contribuir com o conhecimento das propriedades químicas e biológicas dessa espécie.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Partes da espécie *J. gossypifolia* foram coletadas na Universidade Estadual do Ceará, no mês de março de 2015. A identificação botânica foi realizada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo botânico Luiz Wilson Lima Verde, onde está arquivada a exsicata de número

559020 da espécie em estudo.

2.2. Preparação dos extratos de *J. gossypifolia*

As folhas e caule de *J. gossypifolia* foram secas em estufa e posteriormente, acondicionadas separadamente em frascos de vidro com etanol P.A. por 15 dias para obtenção dos extratos. As soluções de cada parte da planta foram concentradas em evaporador rotatório a 60 °C, produzindo o extrato etanólico das folhas (EEF) e extrato etanólico do caule (EEC).

O látex de *J. gossypifolia* foi obtido mediante injúrias no ápice vegetativo e nó das folhas. Para separação da borracha, o látex obtido foi diluído em água destilada na proporção 1:1, em seguida, centrifugada em aparelho da marca Excelso Baby I[®], Modelo 206, separando-se o sobrenadante que foi congelado por 24 h e posteriormente, lyophilizado em aparelho da marca Liotop[®], modelo L101.

2.3 Análise fitoquímica

Testes fitoquímicos foram realizados visando evidenciar algumas classes de substâncias químicas presentes nos extratos etanólicos de *J. gossypifolia* com reagentes específicos para cada classe, por visualização de mudanças de coloração ou formação de precipitado.¹²

Isolamento dos constituintes do látex - Aproximadamente 5 g de látex tratado foi submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica sendo eluída com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em misturas de polaridade crescente. As frações eluídas com metanol foram analisadas por CCD e obteve-se um sólido branco (0,54 g).

2.4 Análise espectroscópica

O espectro de infravermelho foi obtido num instrumento FT-IR da Perkin Elmer e os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram registrados em um aparelho BRUKER[®] DRX 300 MHz pertencente ao CENAUREMN-UFC, operando nas frequências de 300 MHz para o hidrogênio e 75 MHz para o carbono. O solvente utilizado foi o metanol deuterado (CD_3OD).

2.5 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes em todos os extratos da espécie *J. gossypifolia* foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu.¹³ Cada extrato (7,5 mg) foi dissolvido em 10 mL de metanol P.A., transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 100 μL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e agitada (30 s) com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu, acrescentou-se 6 mL de água destilada e 2 mL de Na_2CO_3 (15%), agitando-se durante 60 s. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada, e mantida em repouso por 2 h. O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção da curva de calibração ($y = -0,01797 + 0,00133x$) obtida pela diluição do ácido gálico nas concentrações de 10 - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As mensurações das absorbâncias em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Electron Corporation[®], modelo Bionates 5) a 750 nm, em triplicata. Os resultados foram comparados com a curva de calibração de ácido gálico e expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (EAG).

2.6. Determinação do teor de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides seguiu-se a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006)¹⁴. Inicialmente, uma curva padrão ($y = -0,0118 + 0,04215x$) com queracetina foi construída. Alíquotas de 2-6 mL de solução etanólica de queracetina, na concentração de 50 µg/mL, foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio (2,5%). O volume final de cada balão foi ajustado com etanol 70%. Como branco do sistema foi utilizado 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em etanol 70% em balão de 25 mL. Decorridos 30 min foi realizada a leitura em 425 nm, em espectrofotômetro.

Para a quantificação de flavonoides nas amostras foram utilizados 2 mL de solução de cada extrato a 2 mg/mL (obtida pela dissolução de 20 mg dos extratos em 10 mL de etanol). Seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente foi obtida a quantidade de flavonoides de cada extrato. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de queracetina por grama de extrato (mgEQ.g⁻¹). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.7. Determinação da atividade antioxidante

2.7.1. Método DPPH

O método utilizado para determinação da atividade antioxidante baseia-se na redução do radical 2,2 difenil-1-pricrilhidrazil (DPPH),¹⁵ que ao fixar um H (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH. Os extratos foram diluídos (0,1

ml) e misturados com 3,9 mL de solução de metanol contendo radicais DPPH ($6,5 \times 10^{-1}$ mol/L) durante 1 h. A redução do radical DPPH foi medida monitorando continuamente o decréscimo na absorção a 515 nm. Após foi calculado o valor de Cl_{50} (quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH).

2.7.2. Método ABTS

Para obtenção da atividade antioxidante foi utilizado o método do radical livre ABTS (2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazoline-6-ácido sulfônico)).¹⁶

Uma solução padrão de ABTS^{•+} (7 mM, 5 mL) foi misturada com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi agitada e mantida no escuro por 16 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi retirado 1 mL e completado o volume para 100 mL com etanol PA (Vetec) para se obter uma absorbância ($\log I_0/I$) em torno de 0,7 (0,715 neste experimento). Foram preparadas diferentes concentrações dos extratos de *J. gossypifolia* (99-0,01 µg/mL) sendo retirados 30 µL e adicionados a 3,0 mL da solução de ABTS^{•+}. Após 6 minutos, foi realizada a leitura em 734 nm. A porcentagem de sequestro do radical ABTS^{•+} foi calculada e o resultado expresso em Cl_{50} .

2.8. Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica *in vitro*

Na obtenção da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi utilizado um ensaio baseado em método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica,¹⁷ adaptado para cromatografia em camada delgada.¹⁸

Foram usadas soluções de ácido 5,5'-ditiobiis-2-nitrobenzoico (DTNB) e iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão. As amostras foram aplicadas em cromatoplaca. Após evaporação do solvente, pulverizou-se a

mistura do substrato (ATCl, 1 mM em tampão) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão). Após 3 a 5 minutos borrifou-se a enzima (3 U/mL) e em 10 minutos a placa apresentou cor amarela. Halos brancos apareceram em torno das amostras indicando a inibição. Os halos foram medidos e comparados com o padrão, o alcaloide fisostigmina.

2.9. Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica *in vitro*

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida utilizando leitora Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software “Gen5 V2.04.11”, baseando-se na metodologia descrita por Ellman e colaboradores (1961)¹⁷. Em placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] na solução Tris/HCl (50 nM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O. (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman), 50 µL da solução Tris/HCl (50 nM, pH = 8, com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), 25 µL da amostra de extrato dissolvida

em metanol e diluída 10 vezes na solução Tris/HCl (50 mM, pH=8) para obter uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹¹⁸. A absorbância foi aferida em 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,25 U.mL⁻¹) e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 minutos de incubação da enzima. Como padrão negativo, foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se a amostra. Para o padrão positivo foi utilizada a fisostigmina.

As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizadas nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 20 mg/mL sendo: 200 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹, 6,25 µg.mL⁻¹, 3,12 µg.mL⁻¹, 1,56 µg.mL⁻¹, e 0,78 µg.mL⁻¹.

Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais dos extratos. A reação final por poço faz com que a acetiltiocolina gere como subprodutos tiocolina, acetato de tiocolina e ditiobisnitrobenzoico e por consequência, a cor amarela. Para análise dos dados o coeficiente do ânion amarelo, formado a partir desta reação, também foi extinto através da seguinte equação¹⁷:

$$\text{unidade (moles/l. min)} = \frac{\Delta \text{absorbância/min}}{1,36 \cdot 10^4}$$

A equação transforma as taxas de leitura em unidades absolutas para que seja realizada a análise estatística. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (considerada atividade total da AChE, 100%). O padrão utilizado como controle positivo, a fisostigmina, foi utilizada na concentração de 1,56 µg.mL⁻¹. Todas as amostras foram analisadas com 3 réplicas e 2 repetições.

2.10. Atividade anti-leishmanial *in vitro*

O cultivo de *Leishmania infantum* L. estirpe IOC/L0579 (MHOM /BR /1974 /PP75), na forma promastigota, doada pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, foi realizado de acordo com Tempone e Andrade (2005)¹⁹. Os parasitos foram cultivados em M199 (Cultilab[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab[®]), HEPES (Sigma-Aldrich[®]), hemina bovina (Inlab[®]), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich[®]) e gentamicina (40 mg.mL⁻¹) (Inlab[®]), perfazendo um pH igual a 7,3. As

culturas foram mantidas em estufa do tipo BOD a 23,6 °C, sendo renovadas a cada três ou quatro dias.

Para o teste anti-leishmanial *in vitro* contra promastigotas de *L. infantum* foram utilizados o constituinte isolado do látex e os extratos de *J. gossypifolia* em placas de 96 poços.²⁰ Em resumo, foi realizada a diluição seriada de cada extrato obtendo as seguintes concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 e 0,09 µg/mL. As formas promastigotas de *L. infantum* foram usadas na concentração de 1,25x10⁶ parasitas/poço. Os produtos de referência utilizados foram o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e a anfotericina B, considerados controles positivos. O controle negativo foi o meio M199 (Cutilab®) suplementado, sem as drogas. Os parasitos foram incubados a 23,6 °C durante 24 horas.

A viabilidade celular foi avaliada pela conversão do sal de tetrazólio solúvel MTT (3-[4,5-dimetiltiozol-2-yl] 2,5-difeniltetrazolium bromide) (Sigma®) em formazan insolúvel por enzimas mitocondriais. Onde, 20 µL/poço de MTT (5 mg/mL) foi adicionado à microplaca e após 24 horas de incubação a 23,6 °C na BOD foi realizado a adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% no volume de 20 µL/poço.

Tabela 1. Triagem fitoquímica de *Jatropha gossypiifolia*

Amostras	Classes de compostos					
	Fenóis	Flavonoide	Saponina	Triterpeno	Esteroide	Alcaloide
EEC	+	+	+	-	+	-
EEF	+	+	+	+	-	-
Látex	+	+	-	-	-	+

(+) presença; (-) ausência. EEC: Extrato etanólico do caule. EEF: Extrato etanólico das folhas.

Os resultados positivos para flavonoides e fenóis (todas as partes da planta em estudo), saponinas (caule e folhas), triterpenos (folhas), esteroides (caule), e alcaloides (látex) corroboram dados encontrados em literatura.²¹

Outras substâncias são descritas em diferentes órgãos de *J. gossypiifolia*, como a

Posteriormente, foi adicionado solução de HCl 4N e, depois de 45 segundos de agitação foi realizada a leitura da densidade óptica em 570 nm em espectrofotômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata e o cálculo do número de parasitos inviáveis mortas foi utilizado para a obtenção da concentração capaz de inibir 50% da cultura de *L. infantum* (CI₅₀).

2.11. Análise estatística

Todos os dados foram analisados comparativamente entre os grupos tratados e os controles positivos pela ANOVA two-way seguido do teste de Bonferroni, utilizando o software estatístico GraphPad Prism 6.0. Com intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados e Discussão

A pesquisa fitoquímica permite caracterizar os metabólitos secundários relevantes nas plantas e diversidade de classes químicas de compostos (Tabela 1).

presença de alcaloides nas folhas,³ diterpenos e flavonoides em toda a planta,²¹ esteroides no caule e folhas,²² fenóis no caule, folhas e látex,²¹ taninos no caule e folhas.²² Os resultados obtidos no estudo podem ter sido influenciados por fatores abióticos, como os climáticos e os edáficos.

Comparando os espectros de RMN de ^1H dos três extratos (Figura 1) com as análises fitoquímicas encontradas na prospecção preliminar, algumas classes de compostos foram observados.

No espectro de RMN de ^1H do extrato do caule (Figura 1A), observa-se na faixa de 0,8 a 2,0 ppm sinais correspondentes aos hidrogênios de metilas de esteroides e/ou triterpenoides, em 3,3 a 4,5 ppm sinais característicos de açúcares, em 5,4 ppm de hidrogênio 6 da ligação dupla ($\text{C}_5\text{-C}_6$) de um esterol como o β -sitosterol, que apresenta deslocamento em 5,36 ppm (t , 1H, $J = 6,4$ Hz)²³, confirmando assim a presença de esteroides e de saponinas, conforme a triagem fitoquímica. Os compostos fenólicos e/ou os flavonoides não foram evidenciados no espectro.

No espectro de RMN de ^1H do extrato das folhas (Figura 1B), observa-se na faixa de 0,8 a 2,0 ppm um maior número de sinais que podem justificar a presença de metilas de triterpenos como indica o teste fitoquímico. A presença de glicose também ficou evidenciada através das absorções entre 3,3 a 4,5 ppm, confirmando a possibilidade de glicosídeos, como saponinas e flavonoides (que podem ser glicosilados, também) a presença dos hidrogênios fenólicos e dos flavonoides foi evidenciada através de sinais fracos na região de 6,5 a 7,5 ppm, característica de H aromáticos, porém, em menor quantidade.

Em trabalho anterior foi mostrado que o látex de *J. curcas* contém os alcaloides jatrophine, jatropham e curcaine, com propriedades anti-cancerígenas.²⁴ Absorções no espectro de RMN de ^1H do látex de *J. gossypifolia* (Figura 1C) mostram-se similares as do alcaloide jatropham em 6,62 ppm (IH, H-4), 5,43 ppm (IH, H-5), 1,63 ppm (3H, Me), indicando a possibilidade da presença deste composto ou de seu glicosídeo devido também a absorções na faixa de açúcares (3,5 a 5,0 ppm).²⁵ Pela análise espectral não

foram detectados compostos fenólicos que absorvem na faixa de 6,5 a 7,5 ppm.

O extrato do látex foi cromatografado em coluna de sílica gel para isolamento de seus constituintes. O principal constituinte isolado do látex de *J. gossypifolia* apresentou 10,8% de rendimento. Em testes fitoquímicos usando os reagentes de Mayer e Dragendorff, caracterizaram a natureza alcaloídica. O espectro de infravermelho mostrou uma banda entre 3650 - 3200 cm^{-1} , de estiramento de ligação O-H, uma banda forte em 1680 cm^{-1} , de grupo carbonila de amida e uma absorção fraca em 1640 cm^{-1} , relativa à ligação C=C. A figura 2 mostra o espectro de RMN de ^1H do alcaloide isolado.

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (Tabela 1), mostram um sinal de hidrogênio anomérico in δ 4,46 ppm (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-I') e outras absorções da glicose entre 3,2 a 3,8. O grupo lactama foi caracterizado pelo hidrogênio N-H em 6,78 ppm (IH, H-4), 5,53 ppm (IH, H-5), 1,84 ppm (3H, Me). A estrutura foi definida pela análise combinada do espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado, o experimento DEPT 135 e os experimentos COSY, HSQC e HMBC. Onze sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C referem-se a: um núcleo lactama com uma carbonila absorvendo em δ 176 (C-2), uma dupla trissubstituída em δ 140,23 (C-4) e 137,62 (C-3), um carbono oxigenado em δ 86,57 (C-5), e um grupo CH_3 em δ 10,51, como também os carbonos da glucose em δ 103,57 (C-I'), 78,07 (C-3'), 92,75 (C-5'), 249,34 (C-2'), 71,65 (C-4') e 62,85 (C-6').

O glicosídeo jatropham (Figura 3) é derivado do jatropham ($\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$), composto isolado de *Jatropha macrorhiza* por Wiedhopf et al. (1973). Sua presença também foi relatada em *Lillium martagon* (Shimomura et al., 1987) e em várias outras espécies do gênero *Jatropha*. A presença do glicosídeo de jatropham em *J. gossypifolia* é relatada pela primeira vez neste estudo.

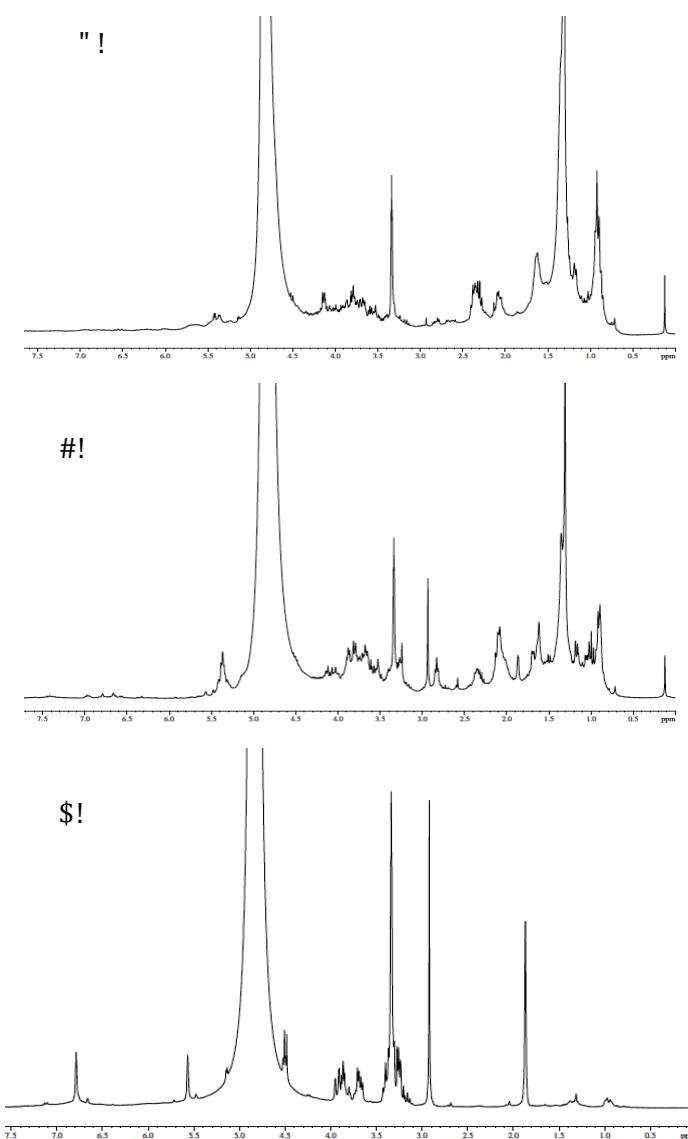


Figura 1. Espectros de RMN de hidrogênio dos extratos do caule (A), folhas (B) e látex do pião roxo (C) (300 MHz, CD_3OD).

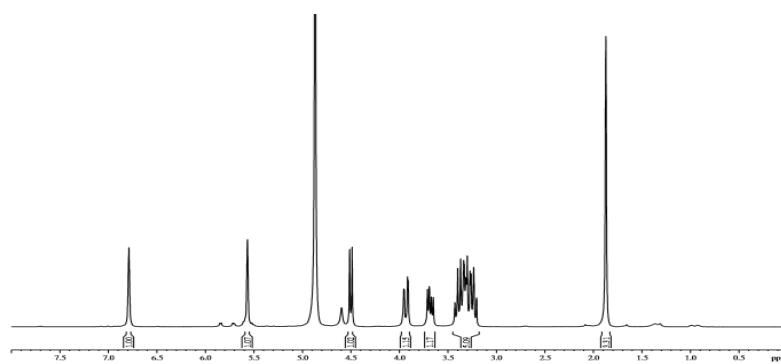


Figura 2. Espectro de RMN de hidrogênio do composto isolado do látex de *Jatropha gossypifolia* L. (300 MHz, CD_3OD)

Tabela 1. Dados espetrais de RMN de ^1H e de ^{13}C do glicosídio do jatropham em MeOD (300 MHz, CD_3OD)

	HSQC		HMBC		Shimomura et al, 1987	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
2	175,45	-		H-5; 3H-6	172,2	-
3	137,60	-	H-4; 3H-6	H-5	-	-
CH						
4	140,78	6,78 (sl)	H-5	3H-6	138,8	6,76
5	86,65	5,67 (sl)	H-4	H-1'	84,3	5,89
1'	103,44	4,49 (d, 7,7)	H-2'	H-5	101,8	5,12
2'	74,94	3,23 (dd, 7,7, 8,6)	H-3'		73,2	4,52-3,92
3'	78,03	3,40 (t, 8,6)	H-2'; H-4'		77,2	4,52-3,92
4'	71,62	3,23 (m)	H-3'	2H-6'	70,0	4,52-3,92
5'	78,47	3,33 (m)	H-4'; H-6'		76,5	4,52-3,92
CH₂						
6'	62,82	3,93 (dd, 11,9, 1,5) 3,68 (dd, 11,9, 5,9)			61,6	4,52-3,92
CH₃						
6	10,51	1,87 (s)			10,0	1,64

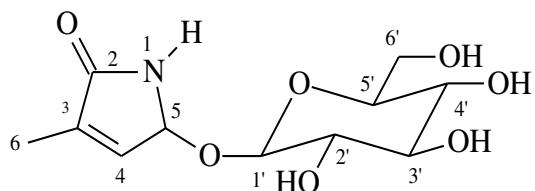


Figura 3. Representação estrutural do glicosídeo do jatropham

Na tabela 2 encontram-se o teor de fenóis (FT) e flavonoides totais (FlaT) e atividade antioxidante dos extratos de *J. gossypifolia*. O resultado observado na determinação dos fenóis totais, expresso como equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato

bruto, foi que o extrato do látex apresentou o maior valor ($37,25 \pm 1,14 \text{ mg EAG.g}^{-1}$) em comparação com os outros extratos: EEF ($21,13 \pm 1,88 \text{ mg EAG.g}^{-1}$) e EEC ($9,35 \pm 1,56 \text{ mg EAG.g}^{-1}$). E para os teores de flavonoides (FlaT), onde os resultados obtidos foram

expressos como equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato bruto, o látex apresentou $0,76 \pm 0,06 \text{ mgEQ.g}^{-1}$, o EEF $6,34 \pm 0,02 \text{ mgEQ.g}^{-1}$ e o EEC $4,46 \pm 0,08 \text{ mgEQ.g}^{-1}$.

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilos em anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Compostos fenólicos antioxidantes padrão como o Trolox apresenta $\text{Cl}_{50} = 0,250 \mu\text{g/mL}$, o BHT, $\text{Cl}_{50} = 3,48 \mu\text{g/mL}$ e a rutina $\text{Cl}_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$, salientando-se que quanto menor o valor de Cl_{50} , maior o poder antioxidante do produto.^{27, 28} Neste estudo, a atividade antioxidante foi expressa em Cl_{50} , concentração mínima da amostra capaz de sequestrar 50% dos radicais, utilizando os ensaios com o DPPH e ABTS, dos extratos da *J. gossypifolia*. Estes ensaios revelaram que o extrato do látex apresentou excelente atividade antioxidante, com Cl_{50} de $5,14 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ no teste do DPPH e $4,03 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, sendo semelhante estatisticamente ao padrão quercetina, tanto pelo método DPPH com Cl_{50} de $5,0 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$, quanto pelo o método de ABTS com Cl_{50} de $1,44 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

A atividade antioxidante pelo método do DPPH para os extratos etanólicos das folhas, caule e raízes da *J. gossypifolia* foi relatada anteriormente,²⁹ cujos valores de Cl_{50} foram: $65,27 \pm 3,70 \mu\text{g/mL}$ (folhas), $10,79 \pm 1,56 \mu\text{g/mL}$ (caule), $98,63 \pm 2,60 \mu\text{g/mL}$ (raízes), revelando considerável atividade antiradicalar. Noutro estudo do extrato aquoso da *J. gossypifolia* exibiu significativa inibição de radicais, com Cl_{50} de $11,4 \mu\text{g/mL}$, valor próximo ao padrão utilizado: rutina (Cl_{50} de $10 \mu\text{g/mL}$).³⁰ Ambos os autores correlacionaram atividade positiva entre a atividade antiradical de *J. gossypifolia* com a presença de compostos fenólicos presentes nos extratos, e mostram que essa espécie pode ser uma potente fonte de antioxidante natural.

Portanto, a atividade antioxidante encontrada no extrato aquoso do látex de *J. gossypifolia* aponta para um estudo mais aprofundando visando o isolamento e caracterização de substâncias, além de compostos fenólicos, que possam também estar envolvidos nessa efetiva atividade antioxidante encontrada no extrato do látex da espécie.

Tabela 2. Teor de fenóis totais e flavonoides totais e atividade antioxidante

Extratos	Fenois Totais (mg EAG.g ⁻¹)	Flavonoides (mg EQ.g ⁻¹)	Atividade antioxidante ($\text{Cl}_{50} \mu\text{g/mL}$)	
			DPPH	ABTS
EEF	$21,13 \pm 1,88^b$	$6,34 \pm 0,02^a$	$131,61 \pm 4,25^c$	$63,20 \pm 0,38^c$
EEC	$9,35 \pm 1,56^c$	$4,46 \pm 0,08^b$	$163,08 \pm 2,07^b$	$8,01 \pm 0,04^b$
Látex	$37,25 \pm 1,14^a$	$0,76 \pm 0,06^c$	$5,14 \pm 0,16^a$	$4,03 \pm 0,016^a$
Quercetina ¹			$5,0 \pm 0,18^a$	$1,44 \pm 0,01^a$

Letras sobreescritas diferentes indicam diferenças significativas em $p < 0,05$ comparando entre as linhas. ¹Substância antioxidante de referência.

As doenças neurodegenerativas crônicas como aterosclerose, mal de Parkinson e doença de Alzheimer (DA) estão relacionadas com os radicais livres,³¹ e que terapias antioxidantes e dietas ricas ou enriquecidas com substâncias que combatem os radicais

livres parecem prevenir ou pelo menos atenuar a deterioração orgânica por um excessivo estresse oxidativo.³²

As plantas que têm mostrado efeitos favoráveis em relação a perturbações cognitivas, incluindo a atividade anti-

acetilcolinesterase (AChE), atividades anti-inflamatórias e antioxidantes ou outras atividades farmacológicas relevantes são potencialmente de interesse para uso clínico para a doença de Alzheimer (DA).³²

A fim de descobrir novas fontes potenciais para inibir enzimas envolvidas com o sistema colinérgico, como AChE, ensaios em microplacas foram utilizados para o rastreio de substâncias que podem ser inibidoras da acetilcolina. Todos os extratos da *J. gossypifolia* L. apresentaram resultado positivo na inibição da enzima AchE tanto no ensaio de placa de CCD, como em análise na leitora ELISA, o extrato da folha mostrou-se mais eficaz (Tabela 3).

Estudos anteriores relatam que *J. gossypifolia* L. é uma fonte potencial de compostos anticolinesterásicos, testando o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase de extratos de acetato de etila e metanol de plantas medicinais brasileiras. Este autor afirma que as espécies mais ativas foram *Ipomoea asarifolia* ($IC_{50} = 120 \mu\text{g/mL}$), *Jatropha curcas* ($IC_{50} = 250 \mu\text{g/mL}$), *Jatropha gossypifolia* ($IC_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$), *Kalanchoe brasiliensis* ($IC_{50} = 160 \mu\text{g/mL}$) e *Senna alata* ($IC_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$). E dentre as espécies, um dos extratos mais promissores foi o da espécie *J. gossypifolia*, assumindo a presença de compostos com atividade semelhante à galantamina ($IC_{50} = 0,37 \mu\text{g/mL}$).³³ O extrato das folhas de *J. gossypifolia* mostrou a melhor ação frente a AChE ($24,511 \pm 0,207 \mu\text{g/mL}$) neste estudo.

Numa revisão da atividade anticolinesterásica de compostos isolados de plantas, 260 compostos demonstram ação de inibição da enzima da AChE. Entre eles, alcaloides, terpenoides, cumarinas, flavonoides, heterociclos oxigenados, sesquiterpenoides, estilbenos, lignanas, compostos sulfurados, policíclicos, quinoides, benzoxazinona, carotenoides e alicíclicos.³⁴

J. gossypifolia revelou a presença de alguns destas classes de compostos que podem estar envolvidos na atividade de inibição da acetilcolinesterase (Tabela 1), e

um estudo químico desta espécie, em especial ao extrato da folha, deverá contribuir para aumentar o número de compostos químicos ativos pertencentes a estas classes de metabólitos secundários, os quais poderão ser potenciais candidatos para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Todos os extratos de *J. gossypifolia* demonstraram bons resultados em relação à atividade sobre promastigotas de *Leishmania infantum*. Os dados obtidos pelo teste *in vitro* comprovaram que tanto o EEF ($IC_{50} de 4,76 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$), o EEC ($IC_{50} de 6,51 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$) e principalmente o glicosídeo do jatropham com $IC_{50} de 0,47 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$) foram efetivos quando comparados aos obtidos pelo controle positivo Anfotericina B ($IC_{50} de 0,48 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$).³⁵

J. gossypifolia apresentou atividade promissora no combate às formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Com relação aos constituintes químicos, os extratos utilizados em nosso estudo apresentaram: alcaloides, esteroides, triterpenoides saponinas e compostos fenólicos. De acordo com Cham-Bacab e Rodríguez-Peña (2001)³⁶, estes compostos estão envolvidos na atividade anti-leishmanial. A caracterização do alcaloide glicosídeo de jatropham com atividade semelhante ao padrão confirma a ação

Os mecanismos de ação envolvidos na ação anti-leishmanial das drogas atuais, ainda não foram bem elucidados. Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da *Leishmania*, por meio de glicólise e beta-oxidação, que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aceito é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte desses protozoários.³⁷

O extrato das folhas de *J. gossypifolia* apresentou os melhores resultados da atividade anti-leishmanial ($4,76 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) e atividade anti-AchE ($24,511 \pm 0,207 \mu\text{g/mL}$), portanto a inibição desta enzima pode contribuir para o mecanismo da ação anti-leishmanial. *Leishmania infantum*

necessita de colina para sintetizar fosfolipídeos de membrana. A presença da enzima acetilcolinesterase, resulta em um declínio de colina e, consequentemente, a membrana do parasito perde a consistência, podendo sofrer lise.¹⁰ O isolamento do glicosídeo do Jatropham com atividade

antileishmanial semelhante ao controle positivo credencia a planta como potencial fornecedora de agentes antileishmaniais. Testes de toxicidade deste material são necessários para uma futura utilização no combate a leishmaniose.

Tabela 3. Potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase e atividade anti-leishmanial de *Jatropha gossypifolia* L.

Amostras	Inibição da enzima AchE por CCD	Inibição da enzima AchE por leitora Elisa	Atividade anti- leishmanial
		(CI ₅₀ = µg/mL)	(CI ₅₀ = µg/mL)
EEC	+	163,240 ± 0,257 ^c	6,51 ± 1,03 ^b
EEF	+	24,511 ± 0,207 ^b	4,76 ± 0,79 ^b
Látex	+	208,826 ± 0,194 ^d	51,29 ± 8,70 ^c
GJ	+		0,47 ± 0,05 ^a
Fisostigmina	+	19,526 ± 0,084 ^a	-
Anfotericina B	-	-	0,48 ± 0,03 ^a
Glucantime	-	-	34,63 ± 3,58 ^c

Letras sobreescritas diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$, comparando entre as linhas na mesma coluna. (-) = Não testado. EEC = Extrato etanólico do caule, EEF = extrato etanólico das folhas, GJ = Glicosídio do Jatropham

4. Considerações finais

Os extratos estudados de *J. gossypifolia* L. apresentam metabólitos secundários importantes como flavonoides e compostos fenólicos que apresentaram atividade antioxidant, contribuindo possivelmente para o fortalecimento do organismo contra o estresse oxidativo causados pela leishmaniose como também na inibição da enzima AchE gerando danos nas membranas dos parasitos. Essas atividades correlacionam-se com os resultados promissores na inibição das formas promastigotas de *L. infantum*.

Apesar dos vários estudos nesta área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial ação sobre parasitos do gênero *Leishmania* a serem avaliadas. Baseado nas

fontes pesquisadas, este é o primeiro relato na literatura nos quais extratos de *J. gossypifolia* são submetidos a ensaios sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*.

J. gossypifolia é uma espécie, que se encontra em todas regiões tropicais, tendo sua distribuição geográfica bastante vasta devido a sua rusticidade, resistência a longas estiagens, pragas e doenças, sendo adaptável a condições edafo-climáticas muito variáveis, sendo uma espécie muito conhecida por seu potencial biológico,² o que torna promissora a busca por princípios ativos, associados à atividade anti-leishmanial, em estudos futuros. Este é o primeiro relato da atividade antileishmanial do glicosídeo do Jatropham.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) e ao Prof. Edilberto Rocha Silveira pelos espectros e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- ¹ Sabandar, C. W.; Ahmat, N.; Jaafar, F. M.; Sahidin, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* **2013**, 85, 7. [\[CrossRef\]](#)
- ² Félix-silva, J.; Giordan, R. B.; Silva-JR, A. A.; Zucolotto, S. M.; Fernandes-Pedrosa, M.F. *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, 2014, 1. [\[CrossRef\]](#)
- ³ Mariz, S. R.; Borges, A. C. R.; Melo-Diniz, M. F. F.; Medeiros, I. A. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypiifolia* L.: uma revisão narrativa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. **2010**, 12, 346. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴ Dujardin, Jean-Claude. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology* **2006**, 22, 4. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵ Lukes, J.; Mauricio, I. L.; Schonian, G.; Dujardin, J. C.; Soteriadou, K.; Dedet, J. P.; Kuhls, K.; Tintaya, W. Q.; Jirku, M.; Chocholova, E.; Haralambous, C.; Pratlong, F.; Oborni, M.; Ayala, F. J.; Miles, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104, 9375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶ Croft, S. L.; Coombs, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* **2003**, 19, 502. [\[CrossRef\]](#)
- ⁷ Nakamura, C. V.; Santos, A. O.; Vendrametto, M. C.; Luize, O. S.; Dias filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Ueda-nakamura, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2006**, 16, 61. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Moreira, R. C. R.; Rebêlo, J. M. M.; Gama, M. E. A.; Costa, J. M. L. Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* **2002**, 18, 187. [\[CrossRef\]](#)
- ⁹ Almeida, B. F.; Narciso, L. G.; Melo, L. M.; Preve, P. P.; Bosco, A. M.; Lima, V. M.; Ciarlini, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *The Veterinary Journal* **2013**, 198, 599. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁰ Vila-Nova, N. S.; Morais, S. M.; Falcão, M. J. C. Beviláqua, C. M. L.; Rondon, F. C. M.; Wilson, M. E.; Vieira, I. G. P.; Andrade, H. F. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **2012**, 32, 1164. [\[CrossRef\]](#)
- ¹¹ Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macêdo, R. O.; Barbosa Filho, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **2005**, 12, 514. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Matos, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2º ed. Editora UFC: Fortaleza, 1997.
- ¹³ Sousa, C. M. M.; Silva, H. R. E.; Vieira, J.; Gerardo M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Calvalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, E; Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas

- medicinais. *Química Nova* **2007**, 30, 351. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Funari, C. S.; Ferro, V. O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimento* **2006**, 26, 171. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁵ Yepez, B.; Espinnosa, M.; Lópes, S.; Bolanões, G. Producing antioxidant fractions from hebarceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria* **2002**, 194, 879. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁶ Re, R.; Pellegrini, N.; Protegente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice, E. C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, 1231. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres J. R., V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, 7, 88. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Rhee, I. K.; Meent, M. V.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amarillidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography* **2001**, 915, 217. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁹ Tempone, A.G.; Andrade Jr, H.F. Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against experimental visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **2005**, 67, 131. [\[Link\]](#)
- ²⁰ Rondon, F. C.; Bevilacqua, C. M. L.; Accioly, M. P.; Morais, S. M.; Andrade-Junior, H. F.; Machado, L. K.; Cardoso, R. P.; Almeida, C. A.; Queiroz-junior, E. M.; Rodrigues, A. C. In vitro effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary parasitology* **2011**, 178, 235. [\[CrossRef\]](#)
- ²¹ Matos, F. J. A. *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*. Editora UFC: Fortaleza, 2004.
- ²² Abreu, I.; Marinho, A. S. S.; Paes, A. M. A.; Freire, S. M. F.; Olea, R. S. G.; Borges, M. O. R. B.; Borges, A. C. R. Hypotensive and vasorelaxant effects of the ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. *Fitoterapia* **2003**, 74, 650. [\[CrossRef\]](#)
- ²³ Chaturvedula, V. S.; Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* **2012**, 1, 239. [\[Link\]](#)
- ²⁴ Thomas, R.; Sah N. K.; Sharma, P. B. Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: a mini review. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2008**, 9, 315. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁵ Shimomura, H.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; Minegishi, Y. Jatropham glucoside from the bulbs of *Lilium hansonii*. *Phytochemistry* **1987**, 26, 582. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁶ Angelo, P. M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* **2007**, 66, 01. [\[Link\]](#)
- ²⁷ Moniruzzaman, M.; Asaduzzaman, M.; Hossain, M. S.; Sarker, J.; Rahman, S. M.; Rashid, M.; Rahman, M. M. In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of *Phyllanthus acidus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2015**, 9, 403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁸ Mechergui, K.; Coelho, J. A.; Serra, M. C.; Lamine, S. B.; Boukhchina, S.; Khouja, M. L. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2010**, 90, 1745. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁹ Tanggal, N. D. Antioxidant activity of *Jatropha curcas* and *Jatropha gossypifolia* by DPPH method. *Farmasains* **2015**, 2, 281. [\[Link\]](#)
- ³⁰ Jain, S.; Choudhary, G. P.; Jaina, D. K. In vitro free radical scavenging activity of *Jatropha gossypifolia* Linn. containing phenolic compounds Sachin. *Journal of Medicinal Plants Research* **2013**, 7, 1424. [\[Link\]](#)
- ³¹ Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies* **2004**, 327, 649. [\[CrossRef\]](#)
- ³² Morais, S. M.; Lima, K. S. B.; Siqueira, S. M. C.; Cavalcanti, E. S. B.; Souza, M. S. T.; Menezes, J. E. S. A.; Trevisan, M. T. S.

Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2013**, 15, 575. [[CrossRef](#)]

³³ Feitosa, C. M.; Freitas, R. M.; Luz, N. N. N.; Bezerra, M. Z .B.; Trevisan, M. T. S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology* **2011**, 71, 783. [[CrossRef](#)]

³⁴ Barbosa, F. G.; Lima, M. A. S.; Braz-filho, R.; Silveira, E. R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2006**, 34, 819. [[CrossRef](#)]

³⁵ Cardona, W.; Quiñones, W.; Robledo, S.; Vélez, I. D.; Murga, J.; García-Fortanet, J.; Carda, M.; Cardona, D. ; Echeverria, F. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. *Tetrahedron* **2006**, 62, 4086. [[CrossRef](#)]

³⁶ Chan-bacab, M. J.; Peña-Rodríguez, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* **2001**, 18, 674. [[CrossRef](#)]

³⁷ Berman, J. D.; Waddell, D.; Hanson, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1985**, 27, 916. [[CrossRef](#)]