



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *Jatropha curcas* L. EM CÉLULAS
GLIAIS**

Salvador

2017

Eduardo Muniz Santana Bastos

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *Jatropha curcas* L. EM CÉLULAS
GLIAIS**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia e Rede Nordeste de Biotecnologia como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Co-orientador(a): Profa. Dr(a). Silvia Lima Costa

Salvador

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

BASTOS, EDUARDO MUNIZ SANTANA
ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATO DE FOLHAS
DE *Jatropha curcas* L. EM CÉLULAS GLIAIS / EDUARDO MUNIZ SANTANA
BASTOS. -- SALVADOR, 2017.
101 f. : il

Orientadora: VITOR HUGO MOREAU DA CUNHA.
Coorientadora: SILVIA LIMA COSTA.
Tese (Doutorado - Biotecnologia - Rede Nordeste de
Biotecnologia (Renorbio)) -- Universidade Federal da Bahia,
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2017.

1. *Jatropha curcas* L.. 2. Atividade Anti-inflamatória. 3.
Células gliais. 4. Microglia . 5. Astrócito. I. MOREAU DA
CUNHA, VITOR HUGO. II. LIMA COSTA, SILVIA. III. Título.



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbioba@ufba.br

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

**"ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATO METANÓLICO
DE FOLHAS DE *Jatropha curcas* L. EM CÉLULAS GLIAIS"**

Elaborada por:

EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS.

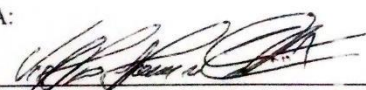
Foi aprovado por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título

de

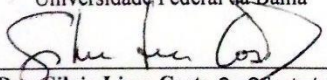
DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 30 de janeiro de 2017

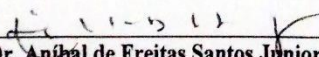
BANCA EXAMINADORA:



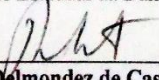
Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha (Orientador)
Universidade Federal da Bahia



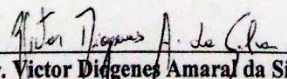
Dra. Silvia Lima Costa Co-Orientadora
Universidade Federal da Bahia



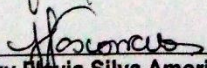
Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior
Universidade Estadual da Bahia



Dr. Renato Delmondez de Castro
Universidade Federal da Bahia



Dr. Victor Digenes Amaral da Silva
Universidade Federal da Bahia



Dra Darizy Flavia Silva Amorim de Vasconcelos
Universidade Federal da Bahia

A minha família, em especial a Lezenita Muniz Santana, querida avó, falecida em 2016, mulher guerreira, amorosa e que deixa saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria, neste momento, agradecer primeiramente a Deus e externar todos os meus sinceros agradecimentos, destacando em especial aquelas pessoas com quem compartilhei diretamente gratiosos momentos de minha história.

Ao meu orientador, Professor Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha, que não se limitou apenas em mostrar o conhecimento, mas soube criticar e elogiar no momento mais oportuno. Obrigado pelo coleguismo, pela confiança e, em especial, pela liberdade e desenvolvimento do conhecimento.

A Professora Dra. Silvia Lima Costa, pela parceria, carinho e respeito, pelos conhecimentos, pelas críticas importantes, e acima de tudo pela confiança concedida durante o desenvolvimento da pesquisa e a apresentação da proposta. Obrigado pela paciência e dedicação. Obrigado por você existir. Mil vezes obrigado.

Ao Professor Dr. Victor Diogens pelo profissionalismo, atenção, carinho e dedicação prestados a mim importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dr. Silvia Sardi e Ramon dos Santos El-Bachá por serem mediadores para o aceite no Laboratório de neuroquímica; A Professora Dra. Fátima Dias Costa sempre dispostos a ensinar e incentivar à busca do conhecimento;

Aos alunos e professores do Laboratório de Biotecnologia Industrial–LBI;

A todos os alunos, técnicos e professores do Laboratório de Neuroquímica.

Aos meus amigos, em especial Sinvaldo Brito, Alessandra Bispo; Paulo Lucas, Cristiane Santos e em especial Luiz Gonçalves pelo companheirismo e valiosos conselhos.

Aos meus primos, em especial Rafael pelo carinho;

As minhas Tias: Eliene e Helenita pelas palavras de conforto, carinho e amor;

A minha bisavó Euvira, pelo carinho e muito amor... Muita saudade;

Minha querida vó Lezenita, pelo amor, carinho, respeito e incentivo aos meus estudos. Penso em você todos os dias;

A minha mãe, meu grande amor e inspiração. Marizene, símbolo de respeito, união, perseverança e muito amor;

Aos meus irmãos, Gabriela e Herbert fonte de amor, carinho, honestidade e superação. E aos meus sobrinhos: Maria Luiza e Guilherme que desde os seus nascimentos nos trazem luz, paz e muitas alegrias.

Iluminar, iluminar para sempre... Iluminar tudo... Até os últimos dias da eternidade... iluminar e só... Eis o meu lema e o do sol.

(Vladimir Maiakóviski)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Absorvância

AD - Doença de Alzheimer

ALS - Esclerose Lateral Amiotrófica

BHE - Barreira Hemato-Encefálica

BHL - Barreira Hemato-Liquórica

BSA - Albumina Sérica Bovina

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

DAMP - Padrão Molecular Associado a Dano

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMF - dimetilformamida

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

EC50 - Efeito citotóxico cinquenta (mata 50% das células contidas na amostra).

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EGTA - Ácido etileno glicol tetracético

EJC - Extrato metanólico de folhas de *Jatropha curcas* L.

FnJC – Frações do Extrato metanólico de folhas de *Jatropha curcas* L.

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

GMB – Glioblastoma multiforme Humano

GSH - Alto Conteúdo de Glutathiona

HLA – Antígeno leucocitário Humano

IKK - Complexo de Quinases

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido Nítrico Sintase induzível

INPI – Instituto nacional de Propriedade Industrial

I κ B - Inibidor do Fator Nuclear kappa B

KOH - Hidróxido de potássio

LBP - *Lipopolysaccharide Binding Protein*, a proteína

LPS - Lipopolissacarídeo

MC – Meio condicionado

MCS – Meio Com Soro

MHC – Complexo de histocompatibilidade maior

MSS – Meio Sem Soro

MTT – Brometo de 3-(*-*dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio

MyD88 - Myeloid Differentiation Primary Responesen Protein 88

NF-kB - factor nuclear kappa B

nm – nanometro

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização mundial de Saúde

PAMP - Padrão Molecular Associado a Patógeno

PBS – Tampão fosfato salino

PPAR - Receptores Proliferador de Peroxissomo Ativadas

PRR - Receptor de Reconhecimento de Padrão

SDS - Duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SI - Sistema Imunitário

SN – Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

TBS - Tampão tris salino

TNF ALFA - Factores de Necrose Tumoral Alfa

TRL - Receptores do Tipo Toll-like

UI - Unidade internacional

UV – Ultravioleta

v-v – Volume por volume

WHO - Organizacao Mundial da Saude

λ - comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Espécie <i>Jatropha curcas</i> L.....	3
Figura 2 Região de origem e cultivo de <i>Jatropha curcas</i> L.	4
Figura 3. Desenho botânico da espécie <i>Jatropha curcas</i> L.....	5
Figura 4. Principais células do Sistema nervoso Central.....	10
Figura 5. Morfologia de células microgliais.....	12
Figura 6. Morfologia celular dos astrócitos.....	13
Figura 7. Via de sinalização NFKB evidenciada na regulação positiva de genes pro-inflamatórios.....	16

Figuras do artigo I

Figura 1. Mapa do Estado da Bahia destacando a localização do município de Mutuípe local de coleta da planta <i>J. curcas</i> L.....	23
Figura 2. Exsicata da espécie <i>Jatropha curcas</i> L. n° 118.	23
Figura 3. Processo de obtenção do Extrato metanólico de folhas de <i>Jatropha curcas</i> L. (EJC)	24
Figura 4. Triagem fitoquímica para determinação fenóis e taninos através de testes colorimétricos qualitativos pela reação com cloreto férrico (FeCl ₃).	25
Figura. 5. Triagem fitoquímica para determinação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides através de testes colorimétricos qualitativos.....	26
Figura 6. Triagem fitoquímica para determinação de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas através de testes colorimétricos qualitativos.....	27
Figura 7. Triagem fitoquímica para determinação de flavonóis, flavanonas, flavanonóides e xantonas através de testes colorimétricos qualitativos.	28
Figura 8. Triagem fitoquímica para determinação esteroides e triterpenoides (<i>Lieberman-Burchard</i>) através de testes colorimétricos qualitativos e saponinas pela formação de espumas.	29
Figura 9. Triagem fitoquímica para determinação de quinonas através de testes colorimétricos qualitativos.	30
Figura 10. Desenho experimental utilizado para obtenção de cultura primária de células glias.	32
Figura. 11. Perfil cromatográfico (A) e fracionamento (B) de EJC por CLAE.	37
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas glias, após 24 h de exposição para EJC (0,1 – 50.000 µg mL ⁻¹) sem associação com o LPS [1 µg mL ⁻¹].	38
Figura 13. Curva dose-resposta do EJC (0,1 – 50.000 µg mL ⁻¹) em células glias após de 24 h de exposição.	39
Figura 14. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas glias, após 24 h de exposição para EJC (0,1 – 50.000 µg mL ⁻¹) associado juntamente com LPS [1 µg mL ⁻¹].	40
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas glias, após 24 h de exposição para FJC (0,1 – 50.000 µg mL ⁻¹) sem associação com o LPS [1 µg mL ⁻¹].	41

Figura 16. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas gliais, após 24 h de exposição para FJC (0,1 – 50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) associado concomitantemente ao LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$].	41
Figura 17. Efeito citotóxico de extrato metanólico de <i>Jatropha curcas</i> L. na morfologia celular e indução de vacuolização de células gliais.	42
Figura 18. Análise do efeito do Extrato Metanólico de <i>J. Curcas</i> L. na morfologia celular de células gliais através da coloração <i>May grunwald</i> .	44
Figura 19. Análise do efeito do Extrato Metanólico de <i>Jatropha curcas</i> L. (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na morfologia de astrócitos e expressão de GFAP em cultura primária de glia.	46
Figura 20. Análise do efeito do EJC na morfologia, ativação de microglia (IBA-1 positivas) (A) e quantificação de células Iba-1 positivas para micróglia (B); micróglia reativa forma ameboide (C) em cultura primária de glia.	48
Figura 21. Análise do efeito do Extrato Metanólica de <i>Jatropha curcas</i> L. (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na morfologia e perfil do direcionamento quimiotático das células gliais em sítio inflamatório.	50
Figura 22. Marcação de NF-kB através da imunocitoquímica em cultura primária de glia após tratamento prévio com EJC associado ou não ao LPS.	51
Figura 23. Avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao EJC (0,1- 50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 h de exposição.	53
Figura 24. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao EJC (0,1-50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 h de exposição.	53
Figura 25. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao FJC [$0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$] durante 24 h de exposição.	54
Figura 26. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao FJC [$0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$] associado ao LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$] durante 24 h de exposição.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Coloração indicativa da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides...	26
Quadro 2. Coloração indicativa da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	27
Quadro 3. Compostos presentes no EJC revelado por ensaio fitoquímica qualitativa.	36

SANTANA-BASTOS, Eduardo Muniz. **Atividade citotóxica e anti-inflamatória de extrato de folhas de *Jatropha curcas* L. em cultura de células gliais**. 101 f. 2017. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências da Saúde, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

RESUMO

A *Jatropha curcas* L. (*J. curcas* L.), planta da família da Euforbiaceae, conhecida localmente como pinhão manso, apresenta alta plasticidade adaptativa, sendo cultivada em diferentes regiões de clima tropical e subtropical do mundo. Configura-se uma alternativa na medicina popular tradicional e veterinária para tratamentos de várias condições patológicas. Estudos demonstram que ação farmacológica como antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatório possa está associado à presença de classes de compostos bioativos como os flavonoides e taninos. No entanto, não existem relatos da ação de compostos isolados desta planta no Sistema Nervoso Central (SNC). A escassez de conhecimento técnico-científico sobre a espécie gera uma demanda por estudos mais aprofundados. Assim o presente estudo objetivou realizar um mapeamento prospectivo sistemático sobre evolução tecnológica das diversas utilizações da planta *Jatropha curcas* L., obter extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. (EJC) e suas frações (F_nEJC), realizar triagem fitoquímica qualitativa dos bioativos do EJC e investigar a atividade citotóxica e anti-inflamatória em culturas primárias de células glias submetidas a estímulo inflamatório. A prospecção de registros tecnológicos a partir da base de dados do Escritório Europeu de Patentes (Espacenet®), entre o período de 1983 a 2012, não revelou documentos de tecnológicos (patentes) com finalidade terapêutica farmacológica da *J. curcas* L. A triagem fitoquímica do EJC apresentou resultado positivo para xantonas, leucoantocianidinas, catequinas (taninos catéquicos), flavanonas e flavonoides, xantonas, esteroides, terpenoides e saponinas. Foi observada atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. e frações em células glias obtidas a partir de córtex cerebral de ratos Wistar neonatos, tratadas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS 1 µg mL⁻¹). O EJC (0,1 µg mL⁻¹ a 1.000 µg mL⁻¹) não foi citotóxica para as células glias e apresentou EC₅₀ de 10,794 µg mL⁻¹. O tratamento com LPS induziu ativação de astrócitos e microglias caracterizada por modificações morfológicas e da expressão de marcadores específicos GFAP e Iba-1, respectivamente além dada ativação do Fator Nuclear kaap B (NF-κB) em astrócitos além de aumento da produção de Oxido nítrico (NO). O Tratamento com o EJC preservou células quiescentes e atenuou ativação de células glias pós indução inflamatória. Observou-se que EJC, F₁EJC e F₂EJC (0,1 µg mL⁻¹) inibiram a produção de NO, inclusive após estímulo inflamatório com LPS. Os resultados sugerem que o EJC inibe a ativação do NF-κB por apresentar compostos bioativos da *J. curcas* L. com possível bloqueio da resposta glial na regulação de genes envolvidos no processo inflamatório. Os resultados também contribuíram para a geração do documento de depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) no intuito de assegurar as novas descobertas desenvolvidas.

Palavras chave: *Jatropha curcas* L., atividade Anti-inflamatória, células glias, micróglia e astrócito.

SANTANA-BASTOS, Eduardo Muniz. **Cytotoxic and anti-inflammatory activity of leaf extract of *Jatropha curcas* L. in glial cell culture.** 101 f. 2017. Thesis (Ph.D.) - Institute of Health Sciences, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Bahia, Salvador, 2017.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euforbeáceae), known locally as “pinhão manso”, is a plant with highly adaptable plant cultivated in different regions of tropical and subtropical regions of the world. Its adopted in traditional folk medicine for the treatment of various pathological conditions, including arthritis, wounds and especially inflammation. Parts of the plant have been demonstrated biological activities, as antimicrobial, antifungal, antioxidant, healing and anti-inflammatory, however, there are no evidences about effects on the Central Nervous System (CNS). Increasing evidence shows that glial cells, in special astrocytes and microglia, play a crucial role in the inflammatory response in the CNS, implicated in the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases. The glial reaction (gliosis) is characterized by a set of alterations including changes in the synthesis and distribution of cytoskeletal proteins, release of molecules involved in inflammation, and reduced ability to regulate extracellular neurotransmitters and ions. The objective of the present work was to perform a prospective study about the technological evolution of the various uses of the *Jatropha curcas* L., to obtain a methanolic extract from leaves of *J. curcas* L. (EJC) and its fractions (FnEJC), to perform qualitative phytochemical study of EJC and to investigate the cytotoxic and anti-inflammatory activity in primary cultures of glial cells submitted to inflammatory stimuli. The prospection of technological registrations from the database of the European Patent Office (Espacenet®), the platform with the largest number of associates in the world, between the years of 1983 and 2012, did not reveal technology documents (patents) with pharmacological therapeutic purpose of *J. curcas* L. Phytochemical screening of EJC showed positive results for xanthenes, leucoanthocyanidins, catechins (catecholic tannins), flavanones and flavonoids, xanthenes, steroids, terpenoids and saponins. Glial cell cultures were obtained from the cerebral cortex of neonates Wistar rats and treated with LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). EJC at $0.1 - 1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ was not toxic to glial cells, and presented EC₅₀ of $10.794 \mu\text{g mL}^{-1}$. Treatment with LPS induced astrocyte and microglia activation characterized by morphological modifications and changes on expression of GFAP and Iba-1, markers of astrocytes and microglia, respectively, as well as activation of transcription factor NF- κ B and production of NO. EJC treatment associated with LPS attenuated gliosis and activation of the LPS-induced Nuclear factor κ B (NF- κ B). Moreover, (EJC) and fractions F₁EJC and F₂EJC reduced LPS-induced production of NO. Together these results indicate that EJC presents anti-inflammatory activity in reactive glial cells associated to inhibition of NF- κ B. The results also contributed to the generation of the patent document of invention in the National Institute of Industrial Property (INPI) in order to ensure the new discoveries developed.

Keywords: *Jatropha curcas* L. Anti-inflammatory activity, Glial cells, microglia and astrocyte.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE QUADROS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	xv
SUMÁRIO.....	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A PLANTA <i>JATROPHA CURCAS L. (J. CURCAS L.)</i>	2
2.1.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DA <i>J. CURCAS L.</i>	3
2.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA <i>J. CURCAS L.</i>	4
2.1.3 PRINCIPAIS VANTAGENS DO CULTIVO DA <i>J. CURCAS L.</i>	6
2.1.4 TOXICIDADE DA <i>JATROPHA CURCAS L.</i>	6
2.1.5 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA <i>JATROPHA CURCAS L.</i>	7
2.2 NEUROINFLAMAÇÃO.....	9
2.2.1 ATUAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS NO SNC	10
2.2.2 CÉLULAS MICROGLIAIS.....	11
2.2.3 CÉLULAS ASTROGLIAIS	12
2.3 MECANISMOS MOLECULARES DA NEUROINFLAMAÇÃO	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. HIPÓTESE.....	18
5. ARTIGO CIENTÍFICO I.....	19
INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E DA ATIVIDADE ANTI- INFLAMATÓRIA DA <i>JATROPHA CURCAS L.</i> EM MODELO DE CUTURA PRIMARIA DE CÉLULAS GLIAIS	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT	20
5.1. INTRODUÇÃO.....	20
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22

5.3. RESULTADOS	36
5.4. DISCUSSÃO	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. ANEXO.....	76
ARTIGO CIENTÍFICO II.....	76
EVOLUÇÃO TECNOLÓGICA DAS DIVERSAS UTILIZAÇÕES DA JATROPHA CURCAS L.....	76
ARTIGO CIENTÍFICO III.....	89
PATENTE DE INVENÇÃO I	101
PATENTE DE INVENÇÃO II.....	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

Jatropha curcas L. (*J. curcas* L.), pertence ao grupo das angiospermas, da família Euphorbiaceae, a mesma da mamona (*Ricinus communis* L.) (RAJU; MONI; SUBRAMANIAN, 2006; SCARPA; GUERCI, 1982), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (MCMAHON; WHITE; SAYRE, 1995) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (BELLINI; MORAES, 2005b). Conhecida por vários nomes populares, os mais citados são pinhão manso e pinhão bravo (ALVES *et al.*, 2008). A origem precisa da *J. curcas* L. não é bem conhecida e controversa, mas a maioria dos autores relatam a probabilidade da planta ter se originado nas Américas (HELLER, 1996; OPENSHAW, 2000). É um arbusto grande, de crescimento rápido, cuja altura normal é de dois a três metros, podendo chegar até cinco metros, a depender do tipo de solo e condições climáticas especiais (ARRUDA *et al.*, 2004). A distribuição geográfica da *J. curcas* L. é bastante vasta, devido a sua rusticidade, resistência a longas estiagens e às infestações de pragas e doenças, sendo adaptável às adversidades de solo e clima (ALVES *et al.*, 2008).

Historicamente esta espécie tem sido utilizada em cultivo, tanto para proteção do solo contra erosão, como para estabelecimento de cercas vivas, e seus farmacógenos, porção vegetal onde se localizam os compostos ativos como: caule, raízes, sementes e folhas são bem conhecidos da medicina tradicional (SEVERINO *et al.*, 2006). A planta, na cultura popular, apresenta diversos usos com ação laxante, anticoagulante e antimicrobiana de feridas (OSONIYI; ONAJOB, 2003; GANDHI; CHERIAN; MULKY, 1995;). Estudos experimentais demonstraram a ação farmacológica como antibacteriana cicatrizante e anti-inflamatória (NITIN *et al.*, 2016; MUJUMDAR; SHETTY *et al.*, 2006; MISAR, 2004).

O processo inflamatório está associado à patogenia de inúmeras enfermidades, inclusive as que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC). A neuroinflamação, propriamente dita, é um dos diferentes processos apontado como responsável pela progressão de doenças neurodegenerativas no SNC (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). A resposta inflamatória, apesar de ser um processo necessário na defesa do organismo, quando exagerada pode acarretar processos degenerativos cerebrais por ativação de células gliais (HERBER *et al.*, 2006; STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004). Evidências crescentes mostram que as células gliais, em especial astrócitos e microglias desempenham papéis cruciais na resposta inflamatória, que implicam na proteção ou progressão destas enfermidades podendo constituir alvos celulares de intervenção com anti-inflamatório (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Assim, nesta Tese são apresentados os resultados obtidos, em um estudo prospectivo, sobre as diversas utilizações tecnológicas da *J. curcas* L. no mundo, a obtenção de produto vegetal, extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. e frações, e investigação do efeito citotóxico e atividade anti-inflamatória em cultura primária de células gliais, astrócitos e microglias, submetidas a estímulo inflamatório, no intuito de contribuir para descoberta de novos bioativos importantes à terapêutica das doenças neurodegenerativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A planta *Jatropha curcas* L. (*J. curcas* L.)

A *Jatropha curcas* L. (Fig. 1) caracteriza-se como uma planta de cultura perene, caducifolia, rústica, resistente ao déficit hídrico e ataque de pragas; além disso, apresenta adaptação às mais diversas condições edafoclimáticas e pode atingir aproximadamente 5 metros de altura (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009; TEIXEIRA, 2005). A depender da região do Brasil apresenta diferentes nomes populares como: pinhão-manso, pinhão-paraguaio, pinhão de purga e pinhão de cerca (PINTO *et al.*, 2009). Em outras nações é conhecida como: *yu-lu-tzu* (China), *mupuluka* (Angola), *tempate*, (Hoduras e El Salvador), *physic nut*, *purging nut* (Inglaterra/Estados Unidos), *médicinier*, *pognon d'inde*, *purghere* (França) *kadam*, (Nepal), *butuje* (Nigéria), *ratanjyot jangli erandi* (Hindi) e *piñoncillo* (México) (SATURNINO *et al.*, 2005; HELLER, 1996; MARTIN; CRUZ, 1985).

A espécie *Jatropha curcas* L. pertence à família *Euphorbiaceae* que compreende um grupo de plantas reunidas em cinco subfamílias: *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* e *Euphorbioideae* (WEBSTER, 1994; WURDACK; HOFFMANN; CHASE 2005). A algumas espécies desta família têm se destacada importância econômica, como *Manihot esculenta* Crantz (macaxeira), da qual é extraída a farinha de mandioca (COSTA; CARDOSO; OHAZE, 2003), *Hevea sp* (seringueira) pela uso do látex para a produção de borracha natural (CAMPELO, 2000), *Ricinus communis* L. (Mamona) pela extração de óleos que apresentam diversos usos na indústria de tintas, sabões, e cosméticos (COSTA *et al.*, 2009; CORRÊA; TÁVORA; PITOMPEIRA, 2006), assim como a *Jatropha curcas* L., que vem intensificando o seu cultivo para geração de óleo (produção de biodiesel), valor ornamental e medicinal (NEVES; FUNCH, VIANA, 2010; PINTO *et al.*, 2009; NUNES, 2007).

Figura 1 Espécie *Jatropha curcas* L.



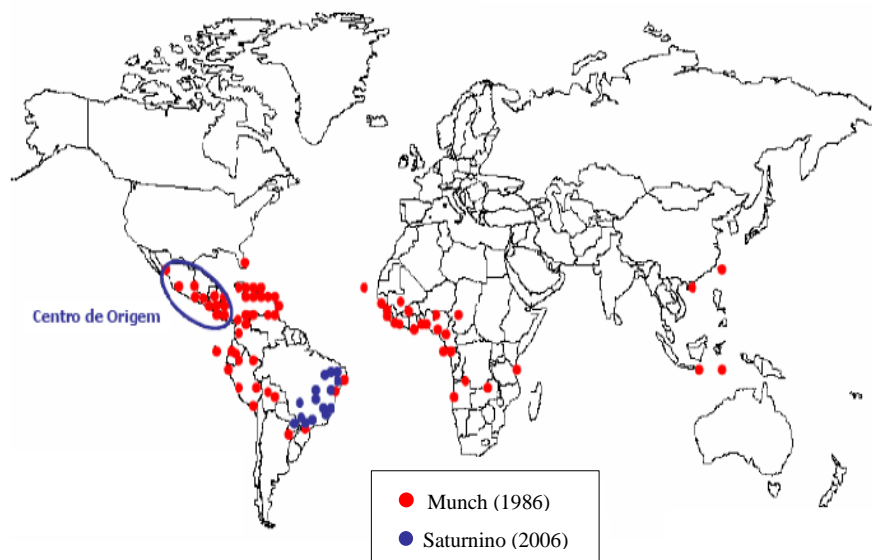
Imagem de (A) Folha; **(B)** Fruto e **(C)** Inflorescência de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).
Fonte: DE LIMA *et al.*, 2012.

2.1.1 Origem e distribuição da *J. curcas* L.

Vários pesquisadores tentaram definir a origem da *Jatropha curcas* L. (Fig. 2), porém os estudos são bastante controversos. A maioria dos relatos refere-se à América do Sul como origem provável, sendo encontrada de forma espontânea em quase todas as regiões intertropicais, ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e, em número bastante reduzido nas regiões temperadas (PEIXOTO, 1973). Para Arruda *et al.* (2004) se trata de uma espécie nativa da América Central. Outros estudos etnobotânicos sugerem que o México seja a nação de origem mais confiável da *Jatropha curcas* L., e que os povos nativos da América do Norte foram os responsáveis pela distribuição na América do Sul (TOMINAGA *et al.*, 2007). De acordo com Martins e Cruz (1985) os portugueses, no fim do século XVIII, introduziram a planta *Jatropha curcas* L. nas ilhas de Cabo Verde e em Guiné, no intuito de aproveitar as terras ainda não exploradas daquele arquipélago, cujos solos eram de pouca fertilidade e, dificilmente, poderiam ser utilizados para culturas menos rústicas, de onde mais tarde foi disseminada pelo continente africano (MARTIN; CRUZ, 1985).

Atualmente, o seu cultivo tem sido promovido por organizações governamentais e não governamentais, em países como África do Sul, Mali, Nepal, Brasil entre outros (SATURNINO *et al.*, 2005). A finalidade principal está relacionada à produção de óleo para a fabricação de biodiesel, o que despertou o interesse de empresários brasileiros, que desde 2004 vêm intensificando o plantio da *J. curcas* L. no Brasil. De acordo com Tominaga e colaboradores (2007), a distribuição geográfica desta planta no Brasil, é bastante extensa, por está relacionada a sua resistência a longas estiagens, sendo adaptáveis às condições edafoclimáticas de extrema variação, desde a região nordeste ao sudeste do país (TOMINAGA *et al.*, 2007).

Figura 2 Região de origem e cultivo de *Jatropha curcas* L.



Fonte: Adaptado por Heller, (1996).

2.1.2 Características botânicas da *J. curcas* L.

A *Jatropha curcas* L. apresenta um diâmetro do tronco de aproximadamente 20 cm; possui raízes curtas e pouco ramificadas, caule liso, de lenho pouco resistente e medula desenvolvida, floema com longos canais que se estende até as raízes, onde circula o látex. O tronco é dividido em vários ramos compridos desde a base, que apresentam cicatrizes devido à queda das folhas na estação seca, que ressurgem logo após o início de período de chuva (ARRUDA *et al.*, 2004).

A *J. curcas* L. possui folhas verdes, esparsas e brilhantes, largas alternadas de pecíolo longo na forma de coração com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior (SATURNINO *et al.*, 2006). As inflorescências são em forma de panículas cimeiras definida, com flores pequenas na cor amarela esverdeada e em um mesmo ramo podem ocorrer flores masculinas, flores femininas e flores hermafroditas (Fig. 3) (HELLER, 1996). Possuem também uma floração descontínua com frutos da mesma inflorescência de idades diferentes (ARRUDA *et al.*, 2004). Os frutos são cápsulas ovoides, de cor marrom escuro, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm, formado por um pericarpo ou casca dura e lenhosa, indeiscente, inicialmente verde e no estágio de maturação de cor preta onde são encontradas amêndoas brancas, ricas em óleo (PÉREZ *et al.*, 2004).

Segundo Frigo Sato e colaboradores (2008), dentre as culturas com potencial produtivo de óleo a partir das sementes para produção de biocombustível, a *J. curcas* L. apresenta ser, entre outros vegetais, a mais positiva pelo alto rendimento de óleo por hectare ou pela não concorrência com outros mercados, como ocorre com o milho e outras oleaginosas (FRIGO SATO *et al.*, 2008).

Figura 3. Desenho botânico da espécie *Jatropha curcas* L.

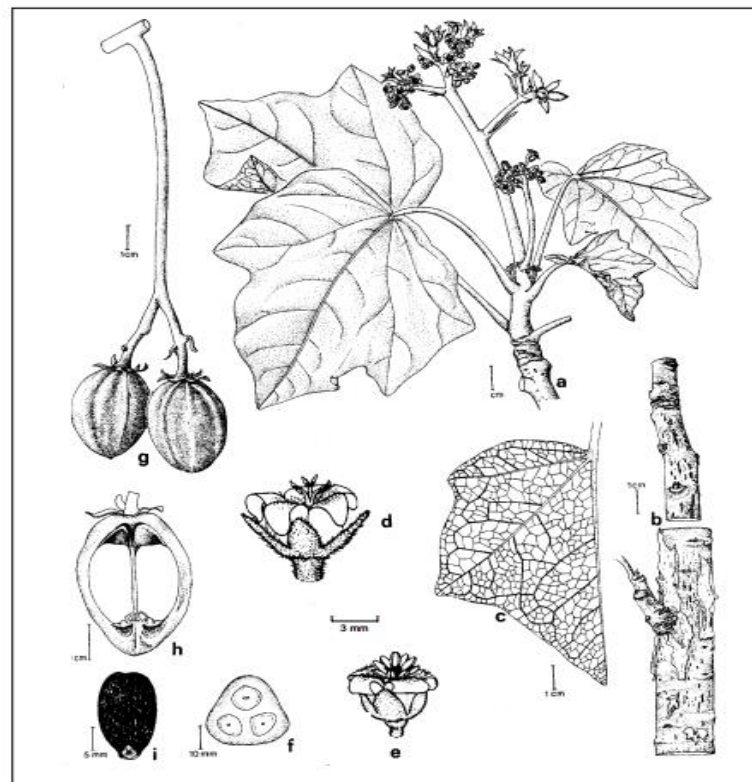


Imagem descrevendo estruturas vegetais da espécie *Jatropha curcas* L.: **a** – ramo florido, **b**- galho, **c**- folha, lado esquerdo, **d** - pistilo da flor, **e** - estame da flor, **f** – corte transversal no fruto imaturo, **g**- frutos, **h**- corte longitudinal nos frutos, **i** –semente. Fonte: adaptado por Heller, 1996.

2.1.3 Principais vantagens do cultivo da *J. curcas* L.

As principais vantagens do pinhão-mansão são o fato de ser uma planta perene e de ter longo ciclo produtivo, podendo chegar a 40 anos e manter a média de produtividade de duas toneladas por hectare (AZEVEDO, 2006). O pinhão-mansão possui vantagens em relação às outras oleaginosas como: possível uso na recuperação de áreas degradadas, além de ser usado em áreas marginais e de baixa fertilidade, como também em regiões de baixa precipitação. Outro fator importante é a não necessidade de mecanização da área a ser plantada, permitindo o uso em consórcio com outras culturas como feijão, milho, abóbora, melancia, tornando a sua utilização mais propícia à agricultura familiar (ACCARINI, 2006).

No setor produtivo, a cultura de *J. curcas* L. também apresenta como ponto atrativo o alto potencial de rendimento de óleo a partir das sementes. Enquanto a soja produz 500 Kg de óleo/ha, o pinhão-mansão tem potencial para produção de 1500 Kg óleo/ha (TEIXEIRA, 2005; FRANCIS, EDINGER; BECKER, 2005). O alto teor protéico dos frutos (58-60%) tem chamado a atenção de pesquisadores, no sentido de desintoxicar o óleo e outros extrativos para uso na alimentação animal (GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Para tanto, a espécie *J. curcas* L. ainda se encontra em processo de domesticação e vem sendo extensamente estudada, no que diz respeito aos aspectos agrônômicos, devido ao seu potencial uso como fonte de óleo para a produção de biodiesel (CAMARGO *et al.*, 2010; SATURNINO *et al.*, 2006).

2.1.4 Toxicidade da *Jatropha curcas* L.

Elevado grau de toxicidade foi verificado nas sementes cruas, cozidas ou assadas de *J. curcas* L. ratos tratados com dieta contendo estas amostras morreram num período de 2 a 16 dias (LIBERALINO *et al.*, 1988). O extrato metanólico, éter de petróleo e diclorometano das frutas apresentou efeito abortivo em ratas grávidas (GOONASEKERA, *et al.*, 1995). Os Ésteres de forbol, ou ésteres diterpenos encontrados nas sementes são as substâncias mais tóxicas presentes na *J. curcas* L., pois são indutoras de formação de tumores e resposta inflamatória. Por serem lipossolúveis grande parte dos ésteres diterpenos são extraídos juntamente com o óleo (ACHTEN *et al.*, 2010; GONÇALVES; MENDONÇA; LAVIOLA 2009). Além disso, os extratos de frutos de pinhão-mansão demonstraram ainda interrupção da gravidez em ratas, sugerindo a realização de mais estudos para elucidar se o efeito

embriotóxico é devido a uma ação específica ou resultado da toxicidade em geral (GOONASEKERA *et al.*, 1995).

2.1.5 Atividade farmacológica da *Jatropha curcas* L.

Desde tempos remotos a planta *J. curcas* L. é, usualmente, empregada na medicina popular (SATURNINO *et al.*, 2006). No mundo contemporâneo, o produto extraído da semente tem sido sugerido para fins energéticos. Além disso, a planta arbustiva tem sido considerada uma grande opção de cultivo agrícola, em áreas de solos pedregosos e quase inagricultáveis (NUNES; PASQUAL; DOS SANTOS, 2008).

Preparações de todas as partes do vegetal, incluindo sementes, folhas e casca, frescas ou como um decocto, são utilizadas na medicina tradicional (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O óleo das sementes tem ação laxante forte e também é, amplamente, usado para doenças de pele e para aliviar dor causada por reumatismo (GANDHI; CHERIAN; MULKY, 1995). A decocção das folhas é usada contra a tosse e como antisséptico após o nascimento (HELLER, 1996).

Nos países tropicais, a *Jatropha curcas* L. é utilizada tradicionalmente como hemostático, o que incentivou a realização de estudos que demonstram a ação coagulante do látex produzido pela planta (OSONIYI; ONAJOBI, 2003). Pesquisas apresentaram também que, o Látex, possui propriedade antimicrobiana contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* (THOMAS, 1989). O extrato hidroalcoólico bruto da casca do caule de *Jatropha curcas* L. em estudo realizado em camundongos acelerou o processo de cicatrização de feridas por vários mecanismos, ainda não esclarecidos (SHETTY *et al.*, 2006). Em 1994, Salas e colaboradores analisaram o efeito cicatrizante do látex de *Jatropha curcas* L. sobre feridas cirúrgicas na pele de camundongos. O efeito cicatrizante foi observado apenas nos camundongos machos e, doses múltiplas, numa concentração acima de 50%, apresentavam efeito cáustico sobre a pele tratada. Além disso, o extrato bruto das cascas apresentou uma efetiva aceleração no processo de cicatrização em ratos albinos (SALAS *et al.*, 1994). Confirmado por Shetty *et al.*, (2006) em testes histopatológicos observaram aceleração no processo de cura com maior concentração de colágeno em forma de feixes, observou-se diminuição de ferida e aumento de resistência do tecido epitelial da pele à ruptura (SHETTY *et al.*, 2006).

De acordo com Rau *et al.* (2006), o extrato alcoólico dos frutos promoveu ativação de Receptor Proliferador de Peroxissomo Ativado (PPAR), que possuem importante função na

homeostasia da glicose e de lipídios, o que permite relacionar uma possível função no tratamento da diabetes e da dislipidemia. O extrato aquoso de folhas de *Jatropha curcas* L. apresentou atividade antibacteriana contra patógenos em alimentos (NITIN *et al.*, 2016).

Nos estudos de Mujumdar e Misar (2004), a pasta preparada a partir do pó da raiz de *J. curcas* L. com aplicação tópica em ratos albinos apresentou atividade anti-inflamatória. Essa atividade pode estar associada a mediadores inflamatórios e ao metabolismo do ácido araquidônico produzido pela via da cicloxigenase (MUJUMDAR; MISAR, 2004). Recentemente, a atividade larvicida do extrato etérico de *Jatropha curcas* L. foi avaliada contra *Aedes aegypti*. O uso deste extrato pode ser sugerido para obtenção de uma resposta ecologicamente correta no controle dos vetores da dengue (RAHUMAN *et al.*, 2008).

No estudo de Rug e Ruppel (2000) foi sugerido que o extrato aquoso de sementes verdes trituradas e frutos maduros de *Jatropha curcas* L. poderiam ser utilizados no controle da esquistossomose, pois este apresentou atividade contra o caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* e do *S. haematobium*. Além disso, o extrato aquoso demonstrou atividade contra a cercaria e os caramujos *Biomphalaria glabrata*, *Bulinus truncatus* e *B. Natalensis* (CHIMBARI; SHIFF, 2008). Esta atividade foi associada aos ésteres de forbol (4 beta-phorbol- 13- decanoate) extraídos do óleo dessa planta (LIU *et al.*, 1997).

Muanza e colaboradores (1995) descobriram que um extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. apresenta proteção para células linfoblásticas humanas aos efeitos citopáticos do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Substâncias isoladas como: *Jatropham*, *Jatrophine* e *curcaína* foram estudadas e apresentam propriedades anticancerígenas (MUANZA *et al.*, 1995). Outros compostos bioativos de *Jatropha curcas* L. foram obtidos como proteínas funcionais aquaporinas, glucanases, esterases, lipases e peptídeos cíclicos de potencial uso farmacêutico como *Jatrophidin*, que mostrou atividade antifúngica, e a curcaciolina, a qual exibiu atividade antimalárica (MAKKAR; ADERIDIGRE, BECKER 1998).

Os dados, embora escassos, evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados. Por outro lado, indicam a existência de propriedades farmacológicas importantes da *Jatropha curcas* L. como ação biológica anti-inflamatória (OTHMAN *et al.*, 2015; MUJUMDAR; MISAR, 2004). Nos últimos anos, vem crescendo o interesse na busca de novos compostos anti-inflamatórios de origem natural, que possam atuar como agente terapêutico sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) com o propósito de prevenir ou sanar os sintomas

desencadeados por processos neuroinflamatórios, além de investigar os seus efeitos danosos nas neurodegenerações (REZAI-ZADEH *et al.*, 2008; HIRANO *et al.*, 2006).

2.2 Neuroinflamação

O Sistema Nervoso Central (SNC), local privilegiado para a comunicação adequada das células neuronais, apesar da presença de barreiras como a Barreira Hemato-Encefálica (BHE) e a Barreira Hemato-Liquórica (BHL) que lhe confere a homeostasia, está sujeito a eventos patogênicos e vigilância imunológica (RANSOHOFF; CARDONA, 2010; BROWN RUETER; ZHANG, 2014). O Sistema Imunitário (SI) em resposta biológica a um insulto físico, tóxico ou infeccioso constitui uma resposta inflamatória (STOJKOVSKA; WAGNER; MORRISON, 2015; ALLAN; ROTHWELL, 2001). Neste contexto, novas pesquisas sugerem que a resposta inflamatória representa o fator crucial em muitas enfermidades do SNC (GLASS *et al.*, 2010).

Nesta compreensão, a neuroinflamação caracteriza-se como complexa resposta celular e molecular a um estresse no SNC na tentativa de conter o dano ou infecção através da eliminação do patógeno e, morte ou dano de células hospedeiras, auxiliando na recuperação da área danificada (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002). O acúmulo de células inflamatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias contribuem para um conjunto de diferentes enfermidades no SNC, que inclui lesão, isquemia, infecções e doenças neurodegenerativas, tais como Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer (DA), nas quais, modulam atividades funcionais das células neuronais normais levando a perdas progressivas de células (ABRAMOV; CANEVARI; DUCHEN, 2004; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Os possíveis mecanismos envolvidos na progressão destas patologias cerebrais ainda não estão totalmente esclarecidos, mas estas condições patológicas compartilham características semelhantes como proteínas deformadas, estresse oxidativo, excitotoxicidade e exacerbação de inflamação que, conseqüentemente, podem gerar morte de células neuronais e gliais (LULL; BLOCK, 2010).

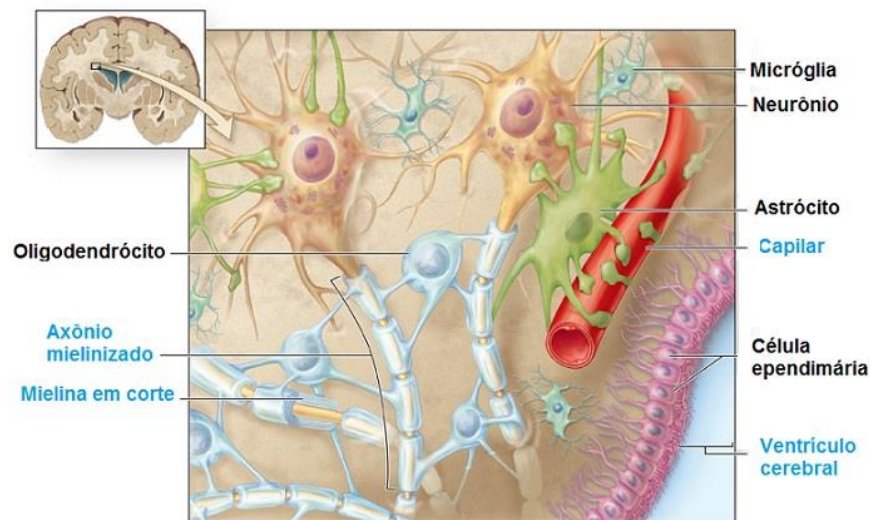
Neste contexto, o SNC difere na sua resposta inflamatória a outros tecidos, pois, em termos gerais, infiltrados celulares no cérebro em resposta à inflamação ocorrem lentamente (GLASS *et al.*, 2010). No entanto, muitas respostas inflamatórias podem ser induzidas rapidamente por células residentes (PERRY *et al.*, 1995). O processo neuroinflamatório, em especial, abrange

ativação de células glias como microglia, macrófagos residentes especializados, e astrócitos, resultando num fenótipo que apresenta aumento de expressão e liberação de mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas, citocinas e expressão de Receptor de Reconhecimento de Padrão (PRR) (VELIER *et al.*, 1999). A microglia e os astrócitos apresentam funções primordiais na defesa do cérebro; são as primeiras células no SNC que respondem a injúrias e, são fortemente ativadas em doenças neurodegenerativas (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002).

2.2.1 Atuação das Células Glias no SNC

O SNC possui origem numa área espessada do ectoderma embrionário e, assim como qualquer parte do organismo é constituído por células (BENTIVOGLIO; MAZZARELLO, 1999; LENT; UZIEL; FURTADO, 2005). Este sistema em particular (Fig. 4), é composto de neurônio, unidade sinalizadora, e de um grupo de células polivalente denominada de neuroglia ou células glias, englobando tipos celulares bem específicos e amplamente diferenciados (BEAR; CONNORS; OARADISO, 2008). As células da glia encontram-se dispostas e interrelacionam com proximidades do corpo celular, axônio e dendritos dos neurônios, os quais influenciam as suas atividades, além de estarem altamente relacionadas na manutenção da homeostasia como na detoxificação (LENT *et al.*, 2005; MOREST; SILVER, 2003; FIELD; STEVENS-GRAHAM, 2002).

Figura 4. Principais células do Sistema nervoso Central



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

Fonte: Disponível em : <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/astrocitos-protoplasmaticos/>. Acesso em ago. 2016.

Os neurônios são caracterizados distintamente das células gliais, pelos seus prolongamentos polarizados especializados, os axônios e os dendritos, que propagam potenciais de ação, realizam junções sinápticas com outros neurônios e libertam moléculas importantes como os neurotransmissores (LENT; UZIEL; FURTADO, 2005; BENTIVOGLIO; MAZZARELLO, 1999; MOREST; SILVER, 2003). Os neurotransmissores atuam de diversas possibilidades como na excreção de quimiocinas importantes na migração, proliferação de células gliais, assim como neuroproteção, plasticidade e fisiologia celular. A neuroglia pode ser classificada, no SNC, em dois grandes grupos distintos pela morfologia e funcionalidade, de acordo com sua origem embriológica: a microglia, de origem mesodermal, e a macroglia, de origem ectodermal (HAAS *et al.*, 2006; Abdo *et al.*, 2012).

2.2.2 Células Microgliais

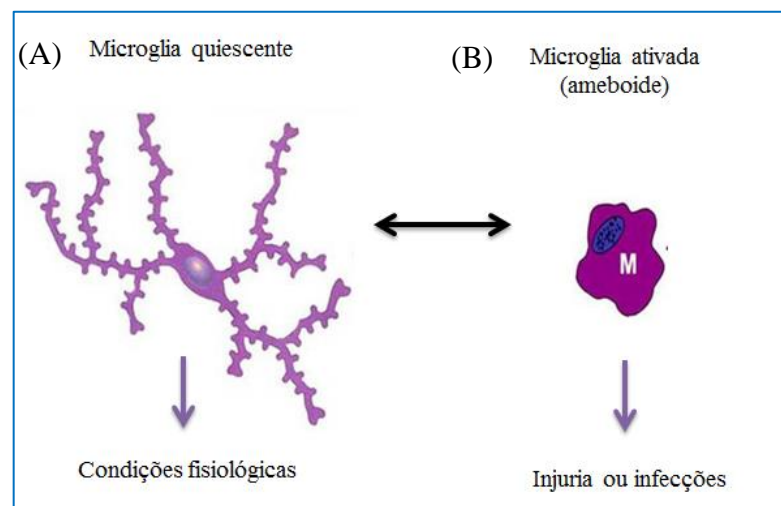
As células microgliais constituem cerca de 10% do total de células encontradas no SNC. As microgliais são células fagocíticas mononucleares, derivadas de progenitores da linhagem mielóide. Vistas como macrófagos residentes do SNC, durante a embriogênese colonizam o cérebro em desenvolvimento onde persistem ao longo da vida do indivíduo (PERRY; HOLMES, 2014). Tem como principal função resposta inflamatória do SNC, sendo, em geral, recrutada após infecções, lesões e doenças degenerativas no Sistema Nervoso (SN). Quando ativada no sítio da lesão, a microglia sofre mudanças morfológicas, tornando-se capaz de proliferar intensamente e realizar fagocitose (RANSOHOFF, CARDONA 2010).

O fenótipo microglial é determinado a partir do microambiente do SNC que apresentam formas morfológicamente distintas (PERRY; HOLMES, 2014). Sob o estado de repouso em condições fisiológicas, a microglia exibe uma morfologia complexa (Fig. 5A) composta de prolongamentos altamente ramificados que se estendem do corpo celular compacto e que, continuamente, exploram o ambiente como regiões das sinapses e extra sinápticas além de interagir primariamente com astrócitos, atuando como sensor do microambiente do SNC (STREIT; WALTER; PENNELL, 1999). Os prolongamentos possuem a capacidade de busca e eliminação de substâncias tidas como estranhas, além de fagocitar restos de células não viáveis (DALLAS; MILLER; BENDAYAN, 2006). A presença de qualquer injúria ou mesmo infecções muda a forma morfológica tornando-se ativada (Fig 5B), resultando na retração de seus prolongamentos, proliferação e regulação de vários fatores de superfície celular (SAIJO

et al., 2013; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999). Vários ligantes expressos em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, ligam-se em receptores expressos na microglia, sinalizando através destes receptores a inibição da ativação microglial (RANSOHOFF; PERRY, 2009).

Danos ou distúrbios cerebrais determinam intensa reação microglial, na qual expressa receptores do tipo Toll (TLRs) e a produção de uma variedade de citocinas envolvidas na neuroproteção, quanto na neurodegeneração (ABBASI *et al.*, 2016; GEHRMANN *et al.*, 1995). Em doenças degenerativas, em particular a microglia reativa, pode ser considerada uma mediadora de morte de neurônios, por produzir neste caso, excesso de neurotoxinas, incluindo Óxido Nítrico (NO), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SAIJO; CROTTI; GLASS, 2013; FLODEN; COMBS, 2007; SOLA *et al.*, 2002).

Figura 5. Morfologia de células microgliais



Fonte: elaborada pelo autor

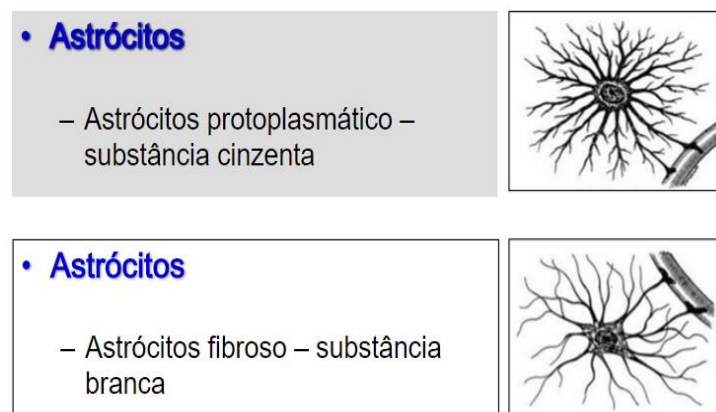
2.2.3 Células Astrogliais

As células astrogliais, comumente chamadas de astrócitos, são o tipo de célula glial mais abundante no SNC, que constituem cerca de 20-50% do volume do cérebro. O nome “astrócito” corresponde a aparência morfológica pela visualização citológica, aonde lembra um forma de uma estrela (ASCHNER; KIMELBERG, 1991; LARSSON *et al.*, 1986). Os astrócitos apresentam forma altamente fibrosa com múltiplos prolongamentos ou processos com ramificações que emanam do corpo celular. A depender da região do cérebro podem

apresentar morfologia diferente (Fig.6). Na substância cinzenta parte mais externa do encéfalo, os astrócitos protoplasmáticos são encontrados em maior concentração, os quais, apresentam morfologia com prolongamentos mais curtos, espaçados e ramificados (SANJAY *et al.*, 2012). No entanto, na substância branca, campo mais interno do cérebro, os astrócitos fibrosos apresentam fenótipo com prolongamentos extensos, finos e muito ramificados (PETER *et al.*,2013) . Corresponde um tipo celular diversificado quanto à morfologia, desenvolvimento, metabolismo e fisiologia nos quais possuem versatilidade no SNC (REICHENBACH; WOLBURG, 2009).

Os astrócitos desempenham diversas funções essenciais para a homeostase do SNC, exercem influências tróficas essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios, direcionamento de axônios e formação e funcionamento das sinapses (ASCHNER; KIMELBERG, 1991). Ao mesmo tempo, influenciam a expressão fenotípica de proteínas endoteliais específicas e estabilizam, através de interações com células endoteliais, a Barreira Hemato-Encefálica (LUAN *et al.*,2012)

Figura 6. Morfologia celular dos astrócitos



Fonte: Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/294050/>. Acesso em nov. 2016.

Além disso, os astrócitos mantêm um controle rígido da concentração de íons, aporte de substratos metabólicos e energia como a glicose aos neurônios e, controle do ambiente, como a homeostasia do pH (KOEHLER; GEBREMEDHIN; HARDER, 2006). E participa na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e do acoplamento neurovascular, bem como no auxílio na defesa imune, por meio da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias (ROUACH *et al.*, 2008). Ainda, os astrócitos reciclam resíduos neuronais, que incluem

subprodutos metabólicos e neurotransmissores sequestrados por captação ativa durante a transmissão sináptica. Estas células expressam diversos receptores que permitem não só participar no processamento de sinais, mas funcionar especialmente como célula ativadora e vigilante (HANISCH, 2002).

Na manutenção e estabelecimento da homeostasia no SNC, os astrócitos apresentam uma resposta adaptativa a qualquer processo de estresse. Para isso, ocorre a elevação da atividade metabólica dos astrócitos juntamente com a produção de fatores tróficos e liberação para aporte de moléculas relacionadas a sobrevivência do neurônio e células gliais, imprescindíveis para a remodelagem tecidual. Normalmente, com a diminuição de energia e aumento de radicais livres, os astrócitos adquirem elevada capacidade para a proteção de células do SNC (KOEHLER; GEBREMEDHIN; HARDER, 2006).

Os astrócitos semelhantes às células microgлияis, tornam-se ativados em resposta às mudanças sutis no microambiente e ao dano tecidual intenso, nos quais, uma das reações celulares mais amplamente relatada como resposta aos danos do sistema nervoso é a astrogliose reativa (MOORE; PERSAUD, 2008). A astrogliose apresenta-se como uma resposta não homogênea e levemente graduada que varia de acordo com o tipo, gravidade e duração do insulto e, que é caracterizada pela proliferação, hipertrofia e supraexpressão da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), que compõe filamentos intermediários como componentes dos prolongamentos ou mesmo do citoesqueleto dos astrócitos (SOFRONIEW; VINTERS, 2010)

Entre as células neurais, os astrócitos são as células mais resistentes ao estresse oxidativo e proporcionam proteção aos neurônios, principalmente, devido a seu alto conteúdo de Glutationa (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, e também considerado o principal antioxidante cerebral (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005). Além disso, os astrócitos expressam vários tipos de Receptor de Reconhecimento de Padrão (PRRs) incluindo os receptores TLRs como TLR4 (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; PATRICK; KURT, 2014). Através do reconhecimento e ligação a estes receptores, os astrócitos respondem a insultos como o LPS, que aumenta a secreção de citocinas, fatores neurotróficos, como fator de transformação do crescimento, citocinas pro-inflamatórias e enzimas, como Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) (LEONID; HYEON-SOOK; SUNHEE, 2014; STIPURSKY *et al.*, 2010).

Assim, devido a sua primordial função na resposta imunológica no SNC, os astrócitos têm sido amplamente referidos pela sua contribuição no início e na progressão da maioria das doenças neurodegenerativas (PARPURA *et al.*, 2012). No entanto, este fato tem demonstrado a participação dos astrócitos como componentes-chave no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e desordens neurológicas. Embora a presença dos astrócitos reativos no SNC seja componente-chave no desenvolvimento de doenças degenerativas e desordens neurológicas, o papel dos astrócitos reativos ainda é escasso (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006).

2.3 Mecanismos moleculares da neuroinflamação

Dentro do estudo do sistema imunitário, a participação da imunidade inata representa a linha de defesa inicial do organismo contra a invasão de patógenos e é efetiva no controle de injúria instalada até que as células do sistema imune adaptativo iniciem uma resposta mais específica. Entre os componentes envolvidos na resposta imunológica estão os receptores “Toll-Like” (TLRs) (DAVALOS *et al.*, 2005). Estes receptores reconhecem não somente Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP), como os lipídeos derivados de bactérias, o Lipopolissacarídeo (LPS), mas também constituintes moleculares endógenos conhecidos como Padrão Molecular Associado a Dano (DAMP) como, por exemplo, proteínas de choque térmico e alarminas (KAWAI; AKIRA, 2006).

Os receptores TLRs têm sido identificados como sensores primários na imunidade inata, tendo o papel principal na infecção, mas também em doenças não infecciosas no SNC (SOPHIE *et al.*, 2012). Os receptores TLRs são proteínas que estão presentes em compartimentos intracelulares como endossoma e retículo endoplasmático e, reconhecem ácido nucleico viral, assim como, os TLR4 que estão localizados na superfície celular e reconhecem partes da parede de microrganismos como o lipopolissacarídeo (LPS) em bactérias ou partículas virais (MOGENSEN 2009; KAWAI; AKIRA, 2009).

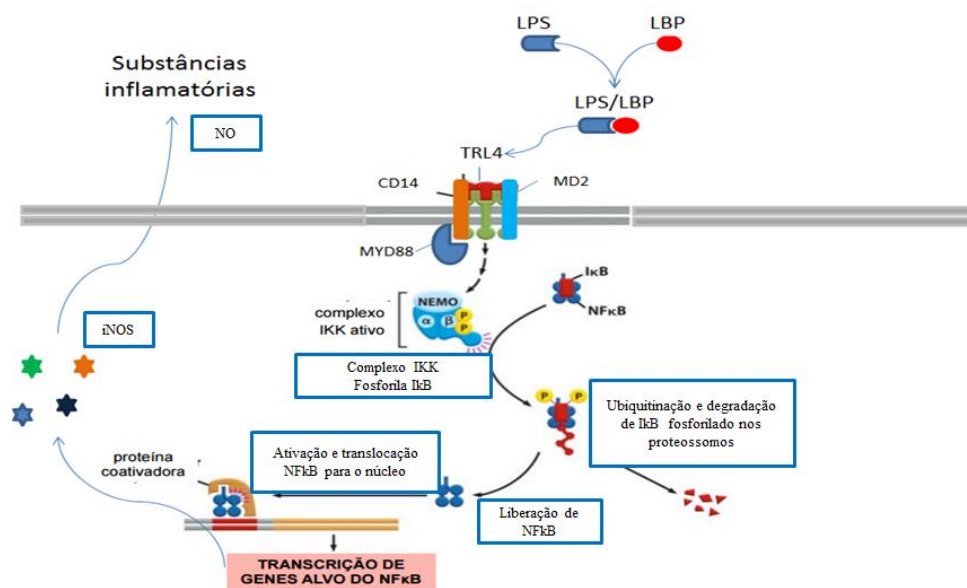
O reconhecimento do LPS é mediado por proteínas auxiliares como *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP), a proteína CD14 que pode estar sobre a forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular (sCD14 e mCD14, respectivamente) e, ainda, a Proteína Mielóide Diferenciadora (MD-2). Estas moléculas proteicas auxiliares como LBP, CD14 e MD-2 na forma livre são responsáveis por transferir LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2 na superfície celular (GLEZER;

SIMARD; RIVEST, 2007). A ligação no TLR4 induz ativação do NF- κ B, dimerizam e induz uma cascata de sinalizações intracelular (Fig 7) que desencadeia o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, através de interações específicas por via dependente ou independente da proteína Myd88, do inglês, *myeloid differentiation primary response protein 88* (KAWAI; AKIRA, 2006).

Ambas as vias que podem ser ativadas convergem para ativação do Complexo de Quinases (IKKs), que por sua vez ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da Proteína Inibitória I κ B, proteína responsável por manter o NF- κ B no citoplasma e sua degradação permite a liberação do fator de transcrição ao núcleo da célula para se ligar aos elementos responsáveis no Ácido desoxirribonucleico (DNA) (CARMODY; CHEN, 2007; LU; YEH; OHASHI, 2008).

Esta cinética ou via de sinalização NF- κ B, pode ser evidenciada na regulação positiva de genes pro-inflamatórios alvos que codificam citocinas (TNF), Interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), enzimas como iNOS, Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e outras moléculas como a própria transcrição da proteína repressora I κ B, o que resulta na auto-inibição do sistema (KAWAI; AKIRA, 2006; KARIN; BEN-NERIAH, 2000).

Figura 7. Via de sinalização NF κ B evidenciada na regulação positiva de genes pro-inflamatórios



Fonte: Adaptado por Ghosh e Hayden (2008).

Considerando os efeitos das respostas inflamatórias por células gliais e os aspectos anti-inflamatórios potenciais da *Jatropha curcas* L. torna importante investigar os efeitos citotóxicos e anti-inflamatórios bem como e mecanismos de ação de produtos, como extratos de farmacógenos desta planta, em sistemas mais complexos de interação de células SNC e determinação de alvos celulares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade citotóxica e anti-inflamatória do extrato e frações metanólicas obtidos de suas folhas em culturas primárias de células gliais.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter extrato metanólico (EJC) e frações (FnJC) a partir de folhas da *J. curcas* L. e realizar triagem fitoquímica qualitativa, preliminar de bioativos.
- ✓ Avaliar os efeitos do EJC e FnJC sobre a viabilidade e indução de alterações morfológicas em células gliais (astrócitos e micróglia) derivadas do córtex cerebral de ratos Wistar neonatos.
- ✓ Investigar os efeitos anti-inflamatórios de EJC e FnJC em cultura de células gliais, após estímulo com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS).
- ✓ Investigar mecanismos de ação associados aos efeitos anti-inflamatórios do EJC em cultura de células gliais.

4. HIPÓTESE

Extrato metanólico de folhas de *Jatropha curcas* L. reduz efeito inflamatória por LPS em cultura primária de células gliais.

5. ARTIGO CIENTÍFICO I

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Jatropha curcas* L. EM MODELO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS

Eduardo Muniz Santana Bastos; Alessandra Bispo da Silva; Paulo Lucas Cerqueira Coelho
Vitor Hugo Moreau da Cunha¹ Silvia Lima Costa¹

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil.

(eduardomunizm@hotmail.com).

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euforbeáceae), conhecida localmente como "pinhão manso", é uma planta com planta altamente adaptável, sendo cultivada em diferentes das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Configura-se uma alternativa na medicina popular tradicional para o tratamento de várias condições patológicas, incluindo artrite, feridas e especialmente processos inflamatórios. Em estudos científicos, farmacógenos da planta demonstraram ação farmacológica como antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatória, porém, não há evidências de efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Evidências crescentes mostram que as células gliais, em especial astrócitos e microglia, desempenham um papel crucial na resposta inflamatória no SNC, na patogênese e progressão de doenças neurodegenerativas. A reação glial (gliose) é caracterizada por um conjunto de alterações incluindo alterações na síntese e distribuição de proteínas citoesqueléticas, liberação de moléculas envolvidas na inflamação e redução da capacidade de regular neurotransmissores extracelulares e íons. Neste estudo, investigou-se a atividade citotóxica e anti-inflamatória do extrato metanólico obtido a partir de folhas de *J. curcas* L. (EJC) e frações (F_nEJC) em culturas primárias de células gliais submetidas a estímulo inflamatório por lipopolissacarídeo (LPS). Culturas de células gliais enriquecidas de astrócitos foram obtidas a partir do córtex cerebral de ratos Wistar recém-nascidos e tratadas com LPS (1 µg mL⁻¹). EJC em 0,1 - 1000 µg mL⁻¹ não era tóxico para células gliais, e apresentou EC50 de 10794 µg mL⁻¹. O tratamento com LPS induziu a ativação de astrócitos e microglias, caracterizada por modificações morfológicas e alterações na expressão de GFAP e Iba-1, marcadores de astrócitos e microglia, respectivamente, bem como ativação do fator de transcrição NF-κB e produção de NO. O EJC associado com LPS atenuou gliose e ativação do LPS-induzida nuclear kappa B Factor (NF-κB). Além disso, (EJC) e as frações F₁EJC e F₂EJC reduziram a produção de NO induzido por LPS. Os resultados indicam que a EJC apresenta atividade anti-inflamatória em células reativas associadas à inibição do fator de transcrição NF-κB.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória; *Jatropha curcas* L.; Células gliais.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euforbiaceae), known locally as “pinhão manso”, is a plant with highly adaptable plant cultivated in different regions of tropical and subtropical regions of the world. Its adopted in traditional folk medicine for the treatment of various pathological conditions, including arthritis, wounds and especially inflammation. Parts of the plant have been demonstrated biological activities, as antimicrobial, antifungal, antioxidant, healing and anti-inflammatory, however, there are no evidences about effects on the Central Nervous System (CNS). Increasing evidence shows that glial cells, in special astrocytes and microglia, play a crucial role in the inflammatory response in the CNS, implicated in the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases. The glial reaction (gliosis) is characterized by a set of alterations including changes in the synthesis and distribution of cytoskeletal proteins, release of molecules involved in inflammation, and reduced ability to regulate extracellular neurotransmitters and ions. In this study we investigated the cytotoxic and anti-inflammatory activity of the methanolic extract obtained from leaves of *J. curcas* L. (EJC) and fractions (FnEJC) in primary cultures of glial cells submitted to inflammatory stimulus by lipopolysaccharide (LPS). Enriched glial cell cultures of astrocytes were obtained from the cerebral cortex of neonates Wistar rats and treated with LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). EJC at $0.1 - 1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ was not toxic to glial cells, and presented EC_{50} of $10.794 \mu\text{g mL}^{-1}$. Treatment with LPS induced astrocyte and microglia activation characterized by morphological modifications and changes on expression of GFAP and Iba-1, markers of astrocytes and microglia, respectively, as well as activation of transcription factor NF- κ B and production of NO. EJC treatment associated with LPS attenuated gliosis and activation of the LPS-induced Nuclear kappa B Factor (NF- κ B). Moreover, (EJC) and fractions F1EJC and F2EJC reduced the LPS-induced production of NO. Together these results indicate that EJC presents anti-inflammatory activity in reactive glial cells associated to inhibition of NF- κ B.

Keywords: Anti-inflammatory activity; *Jatropha curcas* L.; Glial cells.

5.1. INTRODUÇÃO

Entre as numerosas espécies que fazem parte do arsenal de plantas com propriedades terapêuticas, encontra-se a *Jatropha curcas* L. (*J. curcas* L.). Espécie da família das Euforbiaceae, encontrada no mundo, em toda região tropical, como arbustos e como cercas vivas, sendo que sua utilização principal relatada tem sido a partir das sementes, pois estas contêm grande quantidade de óleo armazenado (SEVERINO *et al.*, 2006).

A *Jatropha curcas* L. é uma planta nativa no Brasil, uma oleaginosa perene que apresenta um longo ciclo produtivo, podendo chegar a 40 anos e manter a média de produtividade de sementes em cerca de duas toneladas ou mais por hectare (AZEVEDO, 2006). Seu cultivo pode ocorrer em áreas marginais, em solos pouco ricos do ponto de vista agrônomico e que sofrem com escassez de chuva. O plantio pode ser feito em consórcio com outras culturas

como feijão, milho, abóbora, melancia tornando a sua utilização propícia a agricultura familiar e evitando o empobrecimento do solo (ACCARINI, 2006).

As raízes, caules, casca, folhas, sementes e frutos, frescos ou cozidos da *Jatropha curcas* L. são amplamente utilizados na medicina popular tradicional e veterinária em muitos países para o tratamento de várias doenças (SILVA, 1998; SCHVARTSMAN, 1992; PIOCORRÊA, 1984). De acordo com Shetty *et al.* (2006), o extrato etanólico da casca de *J. curcas* L. é capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas, experimentalmente induzidas em ratos. Avaliação direta de folhas esmagadas da planta em cortes e feridas mostrou-se efetiva na aceleração da coagulação sanguínea (OSONIYI; ONAJOBI, 2003). Assim como, a aplicação tópica de uma pasta preparada a partir do pó da raiz de *Jatropha curcas* L. em ratos albinos mostrou efeito anti-inflamatório (MUJUMDAR; MISAR, 2004). Em estudos apresentados por Othman *et al.* (2015) resultados demonstraram que extratos, frações e compostos bioativos a partir de folhas e raízes da *J. curcas* L. apresentam atividade anti-inflamatória em cultura de macrófagos de ratos *in vitro*. No entanto, dados, embora escassos, evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados. Por outro lado, indicam a existência de propriedades farmacológicas importantes da *Jatropha curcas* L. como atividade anti-inflamatória caracterizando importante aplicação terapêutica (SALAS *et al.*, 1997). Visto que vem crescendo o interesse na busca de novos compostos bioativos anti-inflamatórios como estratégia terapêutica importante em processos inflamatórios (RANG *et al.*, 2003; BOHLIN, 1995) e em especial nas patologias neurodegenerativas no Sistema Nervoso Central.

Pois, devido à especificidade dos mediadores e subtipos celulares envolvidos em cada tipo de inflamação uma terapia efetiva para o controle do processo inflamatório torna-se inexistente, pois os compostos ativos utilizados em processos patológicos, tais como Anti-inflamatórios Não-Esteróides (AINES), Glicocorticóides, e os Anti-reumatóides apresentam diversos efeitos indesejáveis (YUNES *et al.*, 2001).

Evidências relatadas na literatura demonstram que, embora os mecanismos inflamatórios participem dos fenômenos de reparação tecidual, também estão envolvidos em processos de degeneração secundária em doenças agudas e crônicas do Sistema Nervoso Central (SNC) (WYSS-CORAY AND MUCKE, 2002). Várias pesquisas baseadas nas propriedades farmacológicas em sistemas biológicos a partir do uso de produtos naturais de utilização na terapêutica popular têm sido desenvolvidas com êxito (CALIXTO *et al.*, 2000; SIMÕES, 2007).

Levando-se em consideração os vários estudos descritos acima, neste trabalho buscou-se investigar o efeito anti-inflamatório do extrato metanólico a partir de folhas da planta *Jatropha curcas* L. em modelo inflamatório induzido por Lipopolissacarídeo (LPS), em cultura primária de células gliais derivadas de córtex cerebral de ratos neonatos Wistar.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

O estudo consistiu num modelo experimental de inflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS) avaliando efeitos do tratamento de cultura primária de astrócitos com o extrato e frações metanólicas de folhas da *J. curcas* L. Para isso foram avaliados: citotoxicidade pelo teste do MTT em diferentes condições; morfologia celular por microscopia (contraste de fase) e imunofluorescência, além da atividade anti-inflamatória pela imunomarcação de NF-kB e dosagem de nitrito (Reação de Griess).

Coleta e identificação da *J. curcas* L.

As folhas de *Jatropha curcas* L. foram coletadas, a partir do auxílio da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), no município de Mutuípe, localizado no sudoeste da Bahia (Fig. 1), especificamente na zona fisiográfica do Recôncavo Baiano, região do Vale Jequiriçá, de clima quente e úmido e solo do tipo latossolo. Uma exsicata do material vegetal contendo: flores, folhas, frutos e caule (Fig. 2) foi depositada no Herbário da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC) em Salvador (BA), sob o número 118, onde foi realizada a identificação da espécie da planta pela Botânica, Sonia Sales de Oliveira, coordenadora do referido Herbário.

Figura 1. Mapa do Estado da Bahia destacando a localização do município de Mutuípe local de coleta da planta *J. curcas* L.



Latitude: 13° 13' 43" S

Longitude: 39° 30' 17" W

Altitude: 271 m

Área: 274,4 Km²

Fonte: Disponível em: Google maps, dados cartográficos, <http://maps.google.com.br/maps>. Acesso em jan. 2017.

Figura 2. Exsicata da espécie *Jatropha curcas* L. n° 118.



Fonte: Herbário FTC/Salvador-Ba, 2010.

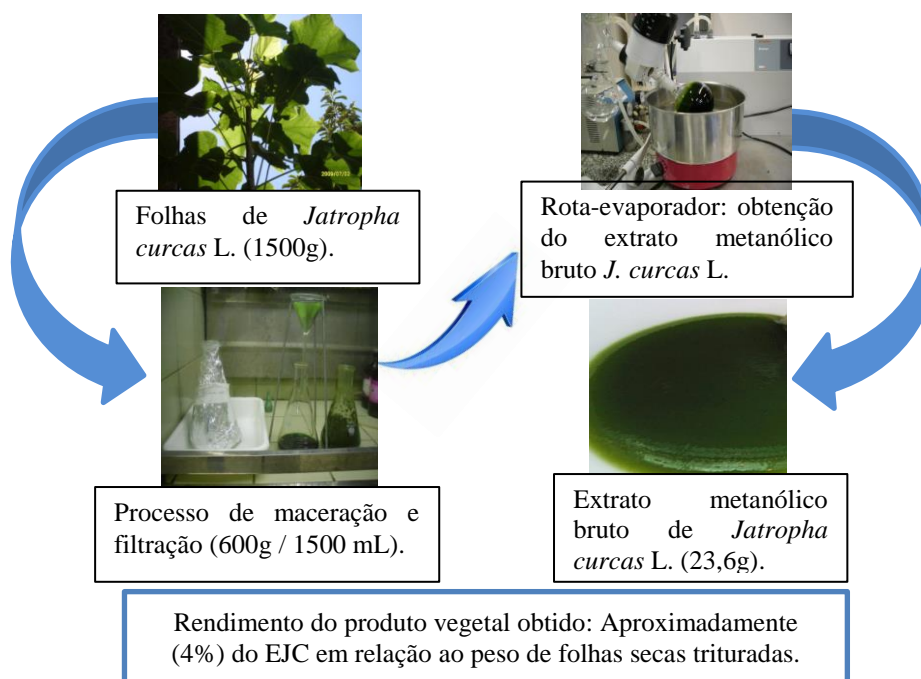
Produção do extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L.

Folhas da *Jatropha curcas* L. de massa inicial de 1500g foram secadas em estufa de circulação de ar a 45°C, por 48 horas. Em seguida, os pecíolos foram descartados e preservou-se apenas a região do limbo foliar para o processo de trituração em multiprocessador (WALITA). O material vegetal seco triturado, adionizou-se 600g de pó verde que, foi transferido para um erlenmeyer de 2 L. Logo depois, adicionou-se 1,5 L de solvente (Metanol 98% P.A). A vidraria foi coberta por folha de alumínio com pequenos furos para a evaporação do solvente volátil, iniciando o processo de maceração (Fig. 3).

A cada três dias, filtrou-se o líquido da maceração em um frasco *erlenmeyer*, utilizando-se funil de cano longo e papel de filtro (*Watman*), obtendo-se o extrato metanólico bruto, sendo concentrado em rota-evaporador a uma pressão reduzida (-700 atm, 40 °C e 90 rpm).

O extrato metanólico bruto foi ressuspenso em 20 mL de metanol para remoção total do extrato seco do balão de conservação. O extrato foi armazenado e seco em um béquer. Foi pesado em capela com exaustor, no intuito de evaporar todo o metanol utilizado. Após 24 h, foi produzido apenas o extrato metanólico bruto de folhas de *J. curcas* L. com rendimento de aproximadamente 4% (23,6g) em relação ao peso (600g) bruto das folhas secas trituradas da planta.

Figura 3. Processo de obtenção do Extrato metanólico de folhas de *Jatropha curcas* L. (EJC)



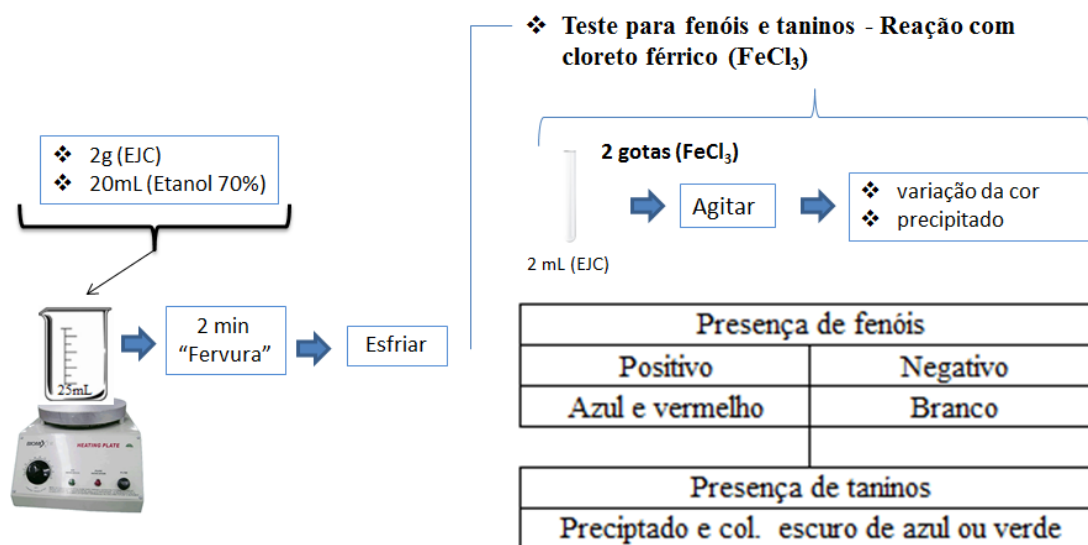
Triagem fitoquímica qualitativa preliminar do EJC

O extrato metanólico de *J. curcas* L. obtido foi direcionado à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários, a partir de reações químicas que procedem por coloração e/ou precipitação, característico para cada classe de substâncias (MATOS, 1997). Na triagem fitoquímica, 2g de extrato vegetal de *J. curcas* L. foi pesado em um béquer sendo adicionado etanol a 70% até completar 20 mL. Aqueceu o extrato em chapa aquecedora até atingir temperatura (100 °C) por 2 min. Em seguida, foi resfriado espontaneamente, a mistura foi filtrada em funil de vidro com o auxílio de algodão. O filtrado foi usado para realizar os testes fitoquímicos qualitativos a seguir:

Teste para fenóis e taninos - Reação com cloreto férrico (FeCl_3)

Transferiu-se 2 mL do extrato bruto para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2 gotas de solução etanólica de cloreto férrico a 2,5%. Agitou-se e observou-se variação da cor e formação de precipitado comparando-se a um teste branco. Colorações entre o azul e o vermelho são indicativas da presença de fenóis, quando o “branco” for negativo. Precipitado escuro em tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis; e verde, a presença de taninos condensados (Fig. 4).

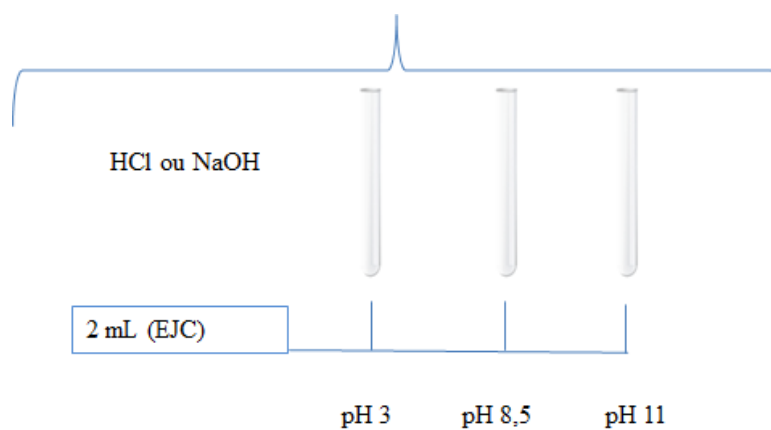
Figura 4. Triagem fitoquímica para determinação fenóis e taninos através de testes colorimétricos qualitativos pela reação com cloreto férrico (FeCl_3).



Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

A técnica foi iniciada pela transferência de 2 mL do extrato filtrado em três tubos nomeados com os valores de pH 3 para acidificado, e alcalinos pH 8,5 e 11. Posteriormente foi observado mudança na coloração da amostra de acordo com o (Quadro 1), padronizado, indicativo da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides (Fig. 5).

Figura. 5. Triagem fitoquímica para determinação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides através de testes colorimétricos qualitativos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Quadro 1. Coloração indicativa da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Constituintes	Cor do meio		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelha púrpura
Flavanonóis	-	-	Vermelha Laranja

(-) sem mudança na coloração

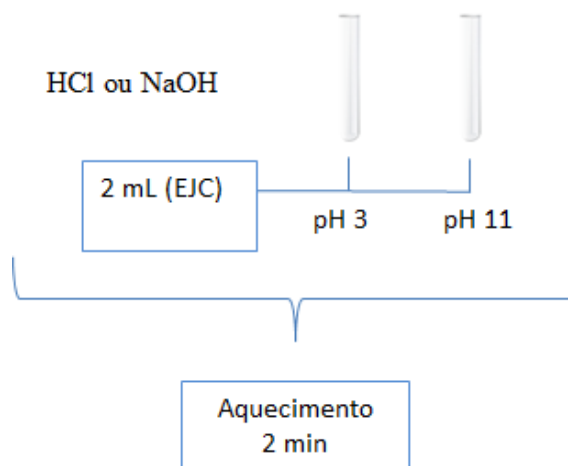
Fonte: Matos,1997.

Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Dois tubos contendo 2 mL do extrato filtrado foram respectivamente, acidificado com HCl até pH =3 e outro alcalinizado com NaOH até pH 11. Em seguida foram aquecidos durante 2 minutos, e foi observado, de acordo com o (Quadro 2), o aparecimento ou intensificação da cor indicativa do constituinte, por comparação com os tubos correspondentes ao pH = 3 e pH

= 4 do teste anterior. Neste teste a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa de outro (Fig. 6).

Figura 6. Triagem fitoquímica para determinação de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas através de testes colorimétricos qualitativos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Quadro 2. Coloração indicativa da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Constituintes	Cor do meio	
	pH 3	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Amarela	-
Flavanonas	-	Vermelha Laranja

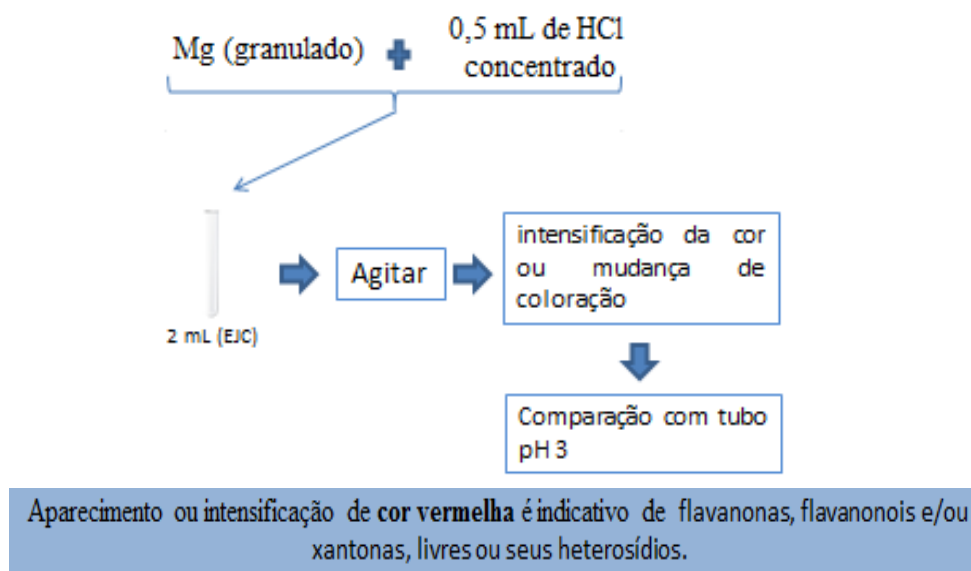
(-) sem mudança de coloração

Fonte: Matos, 1997.

Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóides e xantonas

Em um tubo, alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado foram adicionados. Ocorrência de reação que gera efervescência, observou-se por comparação do tubo de pH = 3 usado para o (Quadro 3), a mudança na cor da mistura. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavanonas, flavanonois e/ou xantonas, livres ou seus heterosídios (Fig. 7).

Figura 7. Triagem fitoquímica para determinação de flavonóis, flavanonas, flavanonódes e xantonas através de testes colorimétricos qualitativos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

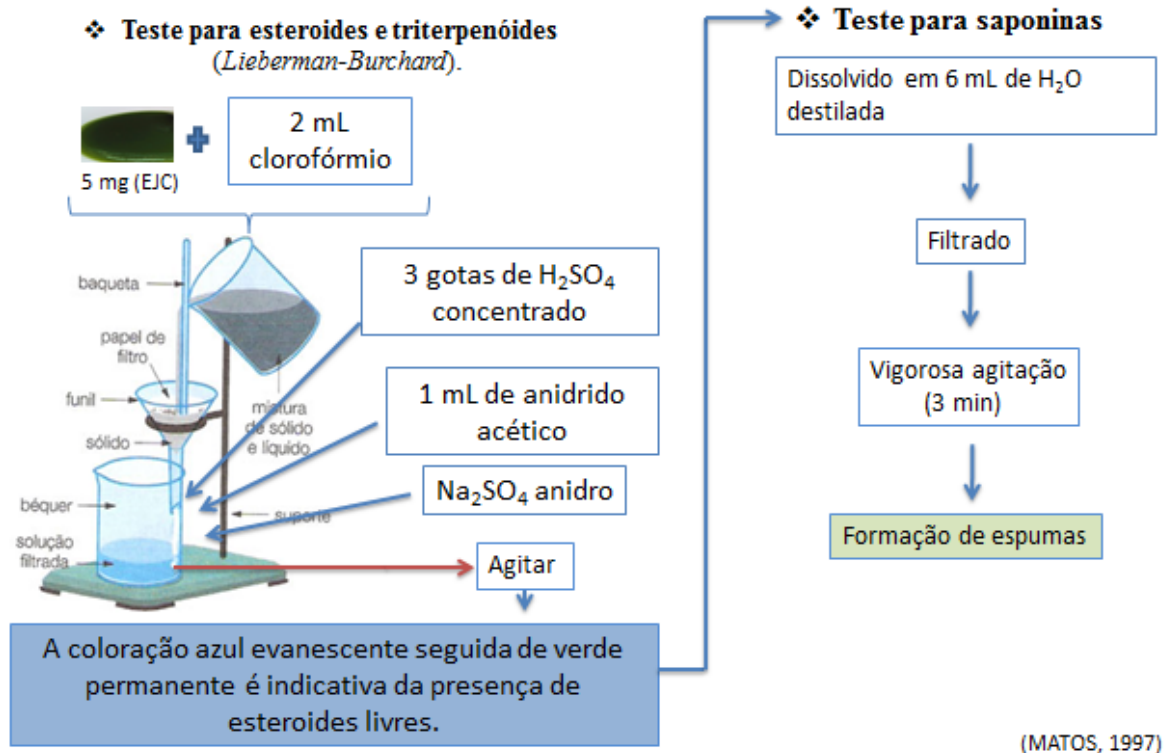
Teste para esteroides e triterpenoides (*Lieberman-Burchard*)

Uma porção do resíduo seco do extrato 5 mg foi extraída com 2 mL de clorofórmio e filtrado em um funil fechado com algodão e alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. Ao filtrado foi adicionado 1 mL de anidrido acético e juntou-se, cuidadosamente, três gotas de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se suavemente, para se observar o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres (Fig. 8).

Teste para saponinas

O resíduo anterior do extrato, insolúvel em clorofórmio, foi dissolvido em 6 mL de H_2O destilada e filtrado. A solução foi agitada fortemente por 3 minutos, e observou-se a formação de espuma. A espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (Fig.8).

Figura 8. Triagem fitoquímica para determinação esteroides e triterpenoides (*Lieberman-Burchard*) através de testes colorimétricos qualitativos e saponinas pela formação de espumas.

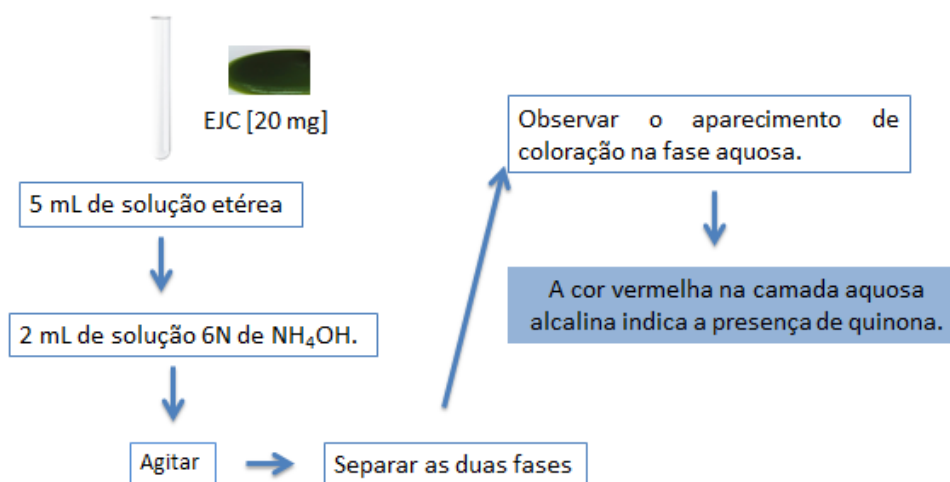


Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Teste para quinonas

Em 5 mL de solução etérea foi adicionada 20 mg de extrato, após solubilização foi adicionado 2 mL de solução 6N de NH_4OH . Agitou-se bem a mistura e deixou-se separar as duas fases para se observar o aparecimento de coloração na fase aquosa. A cor vermelha na camada aquosa alcalina indica a presença de quinona (Fig 9).

Figura 9. Triagem fitoquímica para determinação de quinonas através de testes colorimétricos qualitativos.



Fonte: elaborada pelo autor, 2017.

Perfil cromatográfico e fracionamento do EJC através da Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica, para o fracionamento do extrato metanólico bruto de *Jatropha curcas* L. foi realizado com auxílio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de marca *LaChrom ELITE* (modelo L-2420) com sistema isocrático de injeção manual, bomba e detector UV-Vis (VWR International USA), no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA) Salvador-Ba. Na CLAE foi utilizado uma coluna *Lichrospher Merck C18* semi-preparativa (4,5 mL de volume de leito de poros e 10 mm) com coluna equilibrada a 40 °C a um fluxo de 6 mL/min. A detecção foi feita por absorvância no UV a 210 nm. Na fase móvel, utilizou-se o Metanol (MeOH) Ultrapuro específico para CLAE. O extrato analisado foi preparado na concentração de extrato 1 mg mL⁻¹ de MeOH. O volume de injeção foi de 1mg mL⁻¹ com detecção por absorvância no UV a 210 nm, utilizando-se o metanol na eluição. A partir do perfil cromatográfico do EJC foi realizada nova análise para separar grupos de frações. Todos os parâmetros utilizados para a investigação do perfil do EJC foram utilizados. O eluente que neste caso em particular foi utilizado na eluição isocrática 90:10 foi o metanol/água. Após várias corridas no CLAE as frações do EJC, foram coletadas do cromatógrafo a partir da análise do tempo de retenção e formação de “picos”. De cada corrida no CLAE as frações individualmente separadas foram reunidas obtendo um conjunto de frações e direcionadas

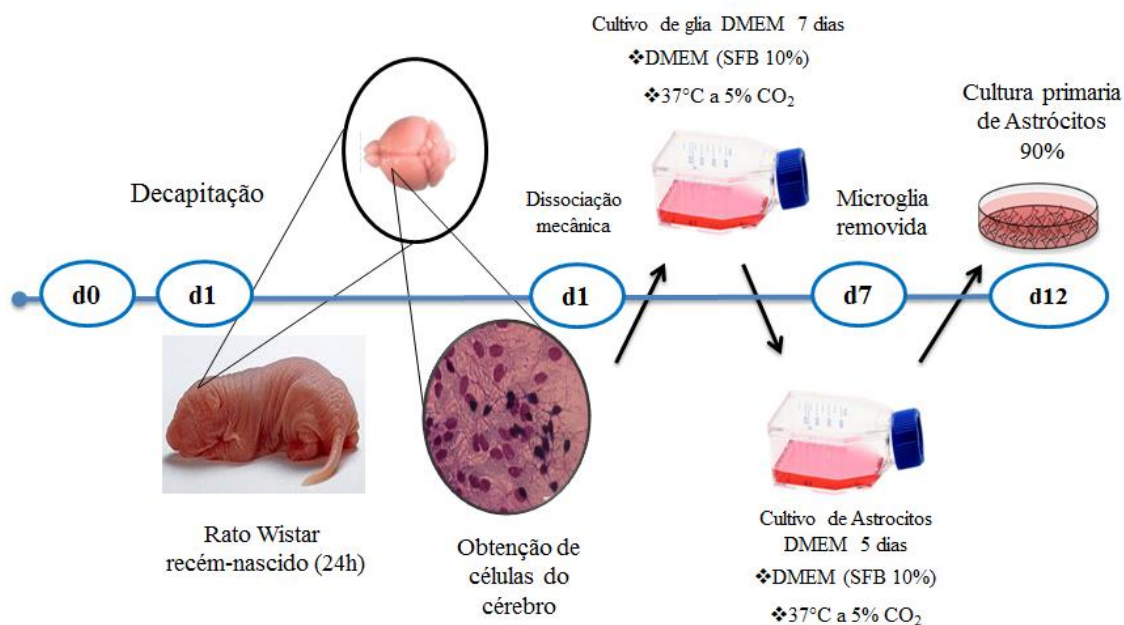
para o rotaevaporador *EG Technic* modelo 9200 nas condições (-700 atm, 40 °C e 90 rpm). As frações separadas do eluente (metanol/água) foram ressuspensas em metanol P.A com (500 µL), que posteriormente foram secadas em capela protegidas da luz, congeladas à -70 °C e direcionadas para de liofilizador (*Labotec* 01.JLG). Em seguida foram previamente pesadas e armazenadas em geladeira a -20 °C. O cromatograma foi obtido com eluição isocrática, com metanol a 90%.

Culturas primárias de células gliais

As culturas celulares foram preparadas a partir de hemisférios cerebrais de ratos Wistar, obtidos junto ao Departamento de Biorregulação, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brasil) e realizada de acordo com o Comitê Local de Ética em Experimentação Animal aprovada sob o Protocolo CEUA-ICS nº 99/2016.

A obtenção de cultura primária de células gliais (Fig. 10) foi preparada de acordo com método descrito por (COOKSON; PENTREATH, 1994). Resumidamente, a partir dos hemisférios cerebrais de crias de ratos *Wistar* de um dia de idade (d1) pós-natal, o córtex foi isolado assepticamente e as meninges foram removidas com auxílio de lupa para posterior dissecação mecânica do tecido cortical. As células foram posteriormente dispostas em frascos de cultura de 75 cm² em meio DMEM (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI mL⁻¹ de penicilina G, estreptomicina 100 µg mL⁻¹, 2 mM de L-glutamina, 0,011 gL⁻¹ de piruvato, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 10% de Soro Fetal Equino(SFE), 3,6 mg L⁻¹, Hapes e 33 mM de glicose (Cultilab, SP, Brasil) e cultivadas em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37° C. Após 7 dias (d0-d7), as culturas confluentes foram direcionadas para um agitador rotativo 200 rpm durante 2 horas; o sobrenadante contendo em sua maioria microglia foi removido e as células aderidas contendo aproximadamente 90% de astrócitos foram adicionadas ao meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e cultivadas em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37° C por mais 5 dias (d7-d12). As células foram contadas numa câmara de *Neubauer* e plaqueadas a uma densidade de 3 x 10⁶ (LIMA, 2001).

Figura 10. Desenho experimental utilizado para obtenção de cultura primária de células gliais.



Fonte: elaborada pelo autor, 2017.

Efeito biológico do extrato metanólico das folhas de *J. curcas* L. (EJC) em cultura primária de células gliais

Para a avaliação da atividade biológica do extrato metanólico da *J. curcas* L. e frações foram realizadas diluições para obter diferentes concentrações testadas. Após adquirir o EJC utilizou o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St Louis MO) para a dissolução do EJC. Assim foi preparada concentração 500 mg mL⁻¹ de EJC em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM/DMSO 1%) no intuito de obter concentrações variando entre 0,1 – 50.000 µg mL⁻¹ de EJC em DMSO a 0,1%. As frações em particular após liofilização, o peso variaram entre 105 - 200 µg foram diretamente diluídas em meio DMEM com 0,1% de DMSO. O grupo controle foi tratado com (DMEM +DMSO 0,1%) não demonstrou nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados em comparação com células moduladas apenas com o meio DMEM. Conforme este resultado preliminar foi utilizado como controle o DMEM com 0,1% de DMSO (veículo de diluição do EJC).

Viabilidade celular: Curvas de Dose - reposta

Análise de concentração-resposta foi realizada a partir do teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma, St. Louis, MO). O teste baseia-se na redução do sal tetrazolato de cor amarela em cristais de formazan de cor violácea. Essa conversão é realizada por células viáveis e pode ser quantificada por espectrofotometria com o comprimento de onda de 540 nm.

O experimento constituiu-se em placas de 96 poços (TPP Suíça) com culturas de células gliais. As células foram incubadas nas concentrações [0,1-50000 $\mu\text{g mL}^{-1}$] de extrato metanólico bruto de folhas de *Jatropha curcas* L. ou 0,1% de DMSO (controle) comparado ao lipopolissacarídeo (LPS) indutor de inflamação durante 24 h. A viabilidade celular foi quantificada pelo índice de conversão do MTT (cor amarela) por desidrogenases mitocondriais de células vivas evidenciadas pela formação de cristais formazan (cor violácea) (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

As células, em condições controle e tratadas, foram incubadas com MTT a uma concentração final de 1 mg mL^{-1} , durante 2 h. Em seguida, as células foram expostas a lise com 20% (peso/volume) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% (v-v⁻¹) de dimetilformamida (DMF) (pH 4,7). As placas foram incubadas durante a noite a 37 °C, para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica de cada amostra foi medida a 540 nm utilizando um espectrofotômetro (*Thermo-Plate Reader*). Os resultados foram apresentados como porcentagem da absorvância do controle.

O experimento foi realizado com oito poços duplicados para cada análise. Os resultados do teste de MTT foram expressos como percentuais de viabilidade dos grupos tratados em comparação com o grupo controle. A regressão não linear foi realizada usando o *software Graphpad Prism 3.0*, para realização de análises estatísticas e para calcular a EC₅₀ do EJC, que representam as concentrações eficazes para matar 50% das células.

Análise de alterações morfológicas

Coloração *May Grunwald*

Para análise de alterações morfológicas foi utilizada a coloração de *May Grunwald*, que é uma técnica de coloração de esfregaço para células não utiliza corantes ácidos e básicos, uma vez

que seu princípio utiliza corantes neutros. (VALLADA, 1999). As células após exposição por diferentes condições já citadas, na própria placa de 96 poços foram coradas com 100 μL do corante durante 3 minutos, como fixador. Posteriormente, cada poço contendo a células confluentes, foi lavado com 200 μL de água destilada de reação neutra, por 1 minuto, homogeneizando-se por 5 minutos. A solução foi escorrida, e depois de seca, foi observada ao microscópio de contraste de fase.

Imunocitoquímica

Após exposição às condições de tratamento do EJC 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 24h, o meio de cultura foi desprezado e os poços com tapete celular foram lavados por três vezes com Tampão Fosfato Salino (PBS) em $\text{pH} = 7,4$. As células foram então fixadas e permeabilizadas com metanol durante dez minutos a -20°C . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% e bloqueadas com PBS/ Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% por 1 h e incubadas com o anticorpos IgG policlonais para proteína IBA-1 produzidos em coelhos (1:300, Wako), com anticorpo policlonal de coelho anti-GFAP (1:300 em PBS, Santa Cruz), durante a noite em câmara úmida a 4°C . Decorrido o tempo de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com o anticorpos IgG secundários, produzidos em camundongos contra IgG de coelho, de camundongo ou de rato, conjugados à fluoresceína diluído em PBS na proporção de (1:500; Boehringer, Mannheim, Germany), sob agitação lenta, por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidrocloreto (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 10 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas em lâminas com líquido de montagem (Dako, Carpinteria, CA) e mantidas no escuro a 4°C , analisadas por microscopia de fluorescência (*Olympus BX70*) por comprimento de onda específico e fotografado utilizando uma câmara digital (*CE Roper Scientific*). Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos. Para cada condição foram analisadas 10 fotos de três experimentos independentes e, em seguida, quantificada no Photoshop CS3 Windows.

Nesta marcação de NF-kB foi seguido o mesmo procedimento da imunocitoquímica; no entanto, a exposição das células as condições de tratamento foi de 1 hora. As células foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-GFAP (1:300 em PBS, DAKO, EUA) *overnight* e, em seguida, incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de tetrametilrodamina (1:500 em PBS, Sigma). Com mesmo procedimento, paralelamente, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal de coelho anti-NF-kB (1:100 em PBS, Santa Cruz) e incubada com anticorpo IgG secundários Alexa fluor 488 de cabra Anti-rato IgG (H+L) durante 30 min à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Dosagem de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida como a concentração de nitrato acumulado no meio de cultura das células utilizando uma reação colorimétrica baseada na reação de Griess (WANG *et al.*, 2002). Cinquenta microlitros do sobrenadante das amostras foram incubados com um volume igual de um reagente de cor (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil-etilenediamina em 2,5% de ácido fosfórico). Após 10 a 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 560 nm usando-se um leitor fotocolorimétrico (Thermo Plate TP-Reader). As concentrações de nitrato foram calculadas por comparação a uma curva de calibração padrão obtida por dosagem de nitrato de sódio diluído em meio de cultura (NaNO_2 , 1,26 – 100 pg mL^{-1}).

Análise estatística

Os resultados são expressos em média \pm desvio-padrão. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Student-Newmann-Keuls* foram usados para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos que diferem em apenas um parâmetro. Teste t de *Student* foi utilizado para as comparações entre dois grupos. Valores de (*) $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.3. RESULTADOS

Estudos Fitoquímicos preliminares

Paralelo à pesquisa prospectiva tecnológica sobre a *Jatropha curcas* L. (Anexo I), realizou-se triagem fitoquímica qualitativa preliminar do EJC. Obteve-se resultado positivo (Quadro 3) para xantonas, leucoantocianidinas, catequinas (taninos catéquicos), Flavanonas e flavonoides, xantonas, esteroides e terpenoides e Saponinas.

Quadro 3. Compostos presentes no EJC revelado por ensaio fitoquímica qualitativa preliminar.

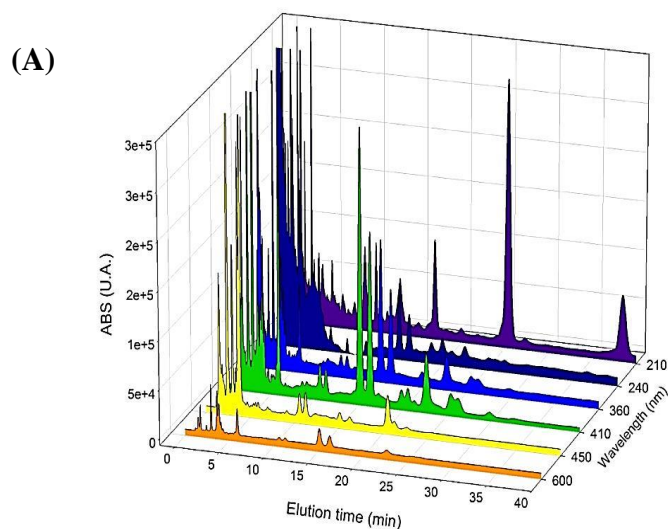
Composto químico pesquisado	Folha de <i>J. curca</i> L.
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Xantonas	+
Leucoantocianidinas	+
Catequinas (taninos catéquicos)	+
Flavanonas e flavonoides	+
Esteroides e terpenoides	+
Quinonas	-
Saponinas	+

(+) presença e (-) ausência

Perfil cromatográfico do EJC por CLAE

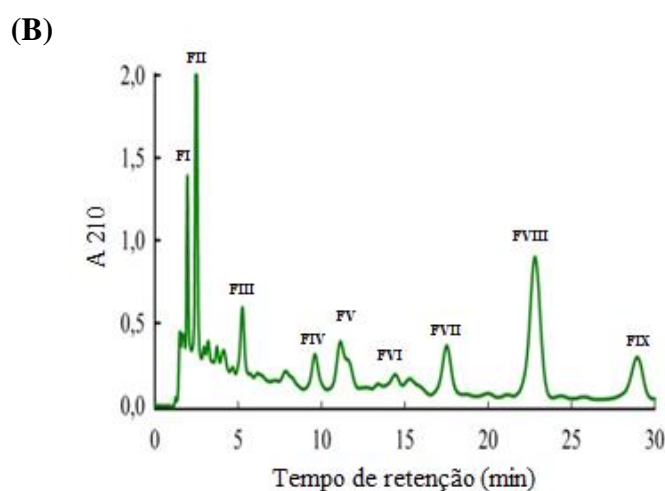
Na análise cromatográfica com o auxílio da CLAE foi possível o monitoramento de alterações no perfil cromatográfico decorrentes do processo de extração do material vegetal. Para isso, procedeu-se com a escolha do λ (comprimento de onda) a ser utilizado no detector do equipamento CLAE, através da análise do espectro do UV (Fig. 11A). Na análise dos cromatogramas foi possível detectar com nitidez, o perfil do extrato utilizando o comprimento de onda (λ) 210 nm evidenciado de cor violeta. Os espectros de absorção ou “picos” apresentados pela absorvância dos compostos presentes no extrato analisado, apresentaram reduzida intensidade de sinal quando aumentou o λ na detecção pela CLAE.

Figura. 11. Perfil cromatográfico (A) e fracionamento (B) de EJC por CLAE.



Fonte: elaborada pelo autor, 2017.

Imagem dos perfis cromatográficos do EJC representados por cores de acordo com absorvância em função do comprimento de onda (210 a 600 nm). Este cromatograma demonstrou vários grupos de picos que foram enumerados como: F₁-F₉ do Extrato metanólico de *J. curcas* L. (FnJC); neste caso em particular (n) é o número da fração detectada pelo absorção de Luz de cromóforos da amostra no CLAE (Fig. 11B). Todas as frações separadamente foram investigadas a citotoxicidade, pelo teste do MTT e a ação inibitória dos níveis de nitrito produzidos de células gliais (Reagente de Greiss).



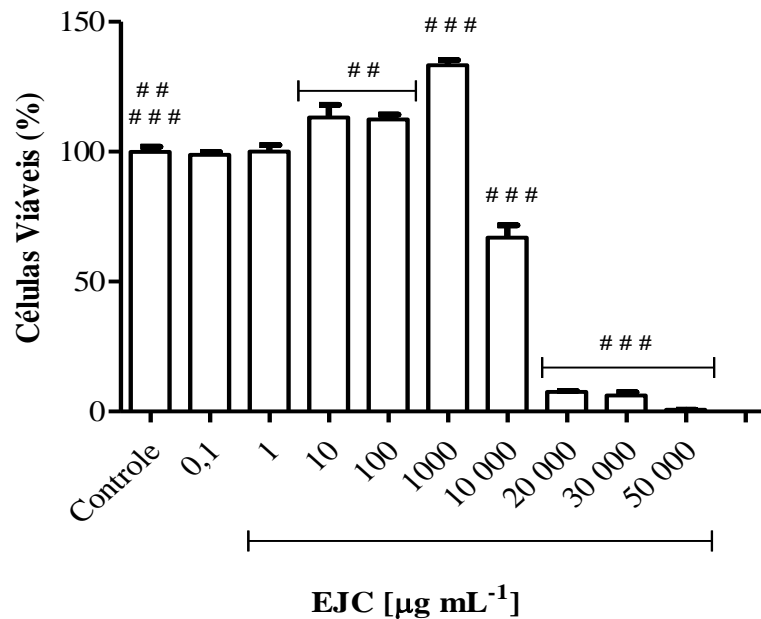
Fracionamento a partir do extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. por CLAE com eluição isocrática MeOH/H₂O 90:10.

Fonte: elaborada pelo autor, 2017.

Efeito do EJC e Frações (F_nEJC) sobre a viabilidade de células gliais pelo teste do MTT

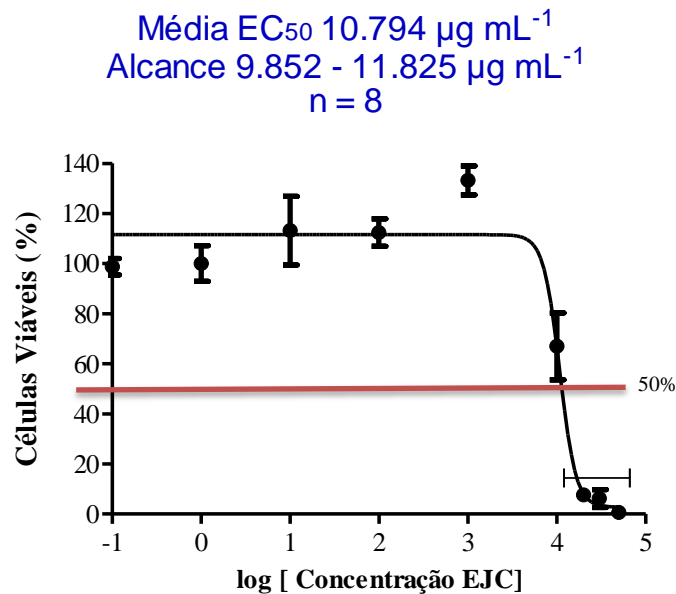
A investigação da toxicidade do Extrato Metanólico obtido a partir de folhas de *J. curcas* L. foram avaliadas por teste MTT, que mede a redução do sal de tetrazólio a cristais de formazan de cor púrpura, por enzimas desidrogenases presentes em mitocôndrias de células vivas. Após o período de 24 horas de exposição de culturas primárias de células gliais a 0,1 - 50.000 µg mL⁻¹ de EJC (Fig.12) visualizou-se uma redução dose-dependente da atividade das desidrogenases mitocondriais. Diante desse achado, o valor da EC50(%) (Fig.13) foi calculado através de regressão não linear, que correspondeu a 10.794 µg mL⁻¹, nas quais, as equações utilizadas foram disponibilizadas pela biblioteca do programa estatístico *Graphpad*.

Figura 12. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas gliais, após 24 h de exposição para EJC (0,1 – 50.000 µg mL⁻¹) sem associação com o LPS [1 µg mL⁻¹].



Resultados expressos em percentagem da absorvância em relação ao controle (DMSO 0,1%) considerado como 100%. Com Significância estatística (##) e $p < 0,001$ e (###) $p < 0,0001$ referente ao controle.

Figura 13. Curva dose-resposta do EJC ($0,1 - 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) em células gliais após de 24 h de exposição.

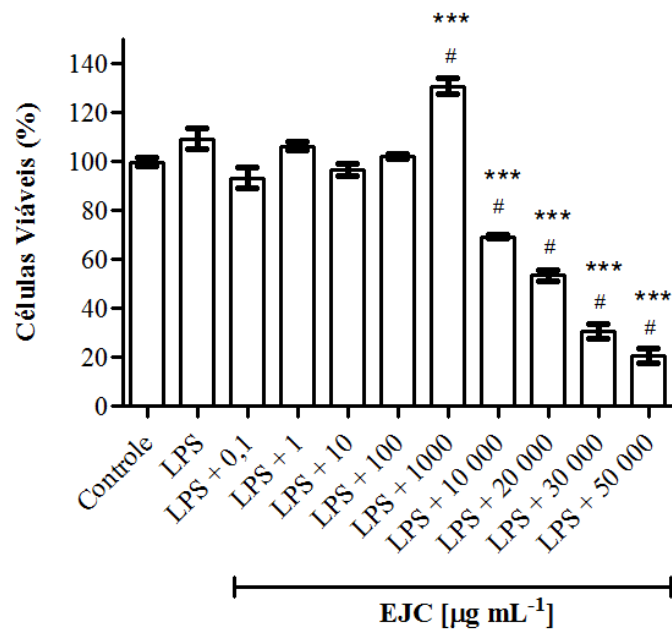


Resultados expressos em percentagem da absorvância em relação ao controle (DMSO 0,1%) considerado como 100%.

A análise prospectiva das concentrações testadas do EJC, com base no teste do MTT, revelou que EJC nas concentrações de $0,1$ a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ não induziu efeito citotóxico quando comparado ao controle (DMSO 0,1%), com aumento significativo da atividade das desidrogenases mitocôndrias nas concentrações de 10 a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

No entanto, verificou-se redução significativa da viabilidade de células gliais expostas a partir da concentração igual e superior a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ do EJC. Por outro lado, verificou-se que o tratamento com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e em associação com EJC, não apresentou efeito citotóxico nas concentrações $0,1$ a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, com aumento significativo da atividade das desidrogenases mitocôndrias na associação de LPS com $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Redução da viabilidade celular foi verificada na associação de LPS e EJC nas concentrações de 10.000 a $50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig.14).

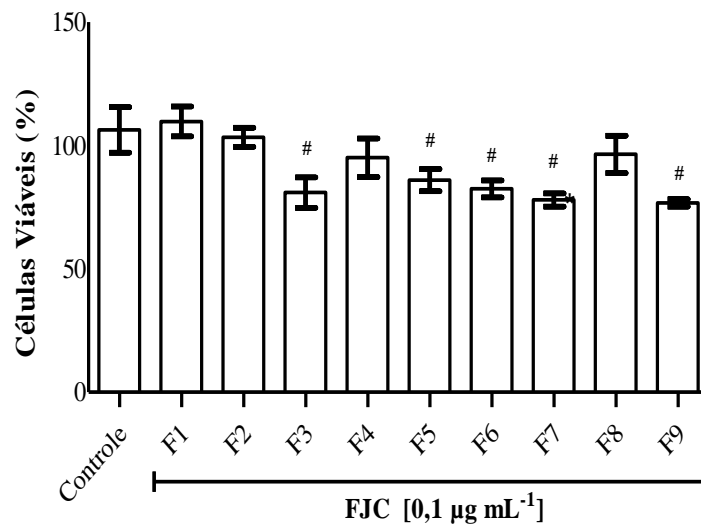
Figura 14. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas gliais, após 24 h de exposição para EJC (0,1 – 50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) associado juntamente com LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$].



Resultados expressos em percentagem da absorvância em relação ao controle (DMSO 0,1%) considerado como 100% e Indutor de inflamação (LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). A significância estatística representa (#) $p < 0,05$ comparado ao controle e (***) $p < 0,0001$ comparado ao LPS.

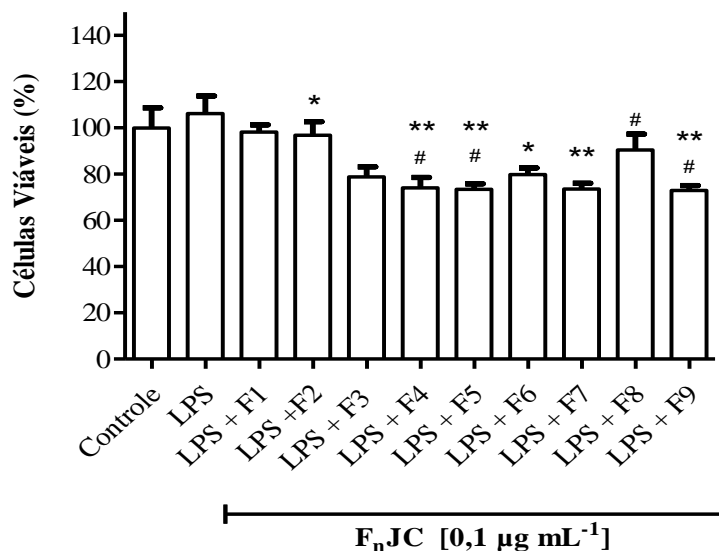
A citotoxicidade de nove frações de EJC obtidas por CLAE foi investigada pelo teste MTT na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Das frações testadas verificou-se que a F_1 EJC e F_2 EJC não induziram efeito citotóxico quando comparadas ao controle; no entanto, as frações F_3 a F_9 EJC apresentaram toxicidade (Fig. 15). De mesma forma, verificou-se a preservação da viabilidade celular em culturas de glia tratadas com F_1 EJC e F_2 EJC após associação ao indutor de inflamação LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). As demais frações testadas F_3 - F_9 EJC em associação ao LPS também induziram redução da viabilidade celular, quando comparadas com o grupo controle (Fig. 16).

Figura 15. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas gliais, após 24 h de exposição para FJC ($0,1 - 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem associação com o LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$].



A significância estatística representa (#) $p < 0,05$; (##) comparado ao controle (DMSO 0,1%).

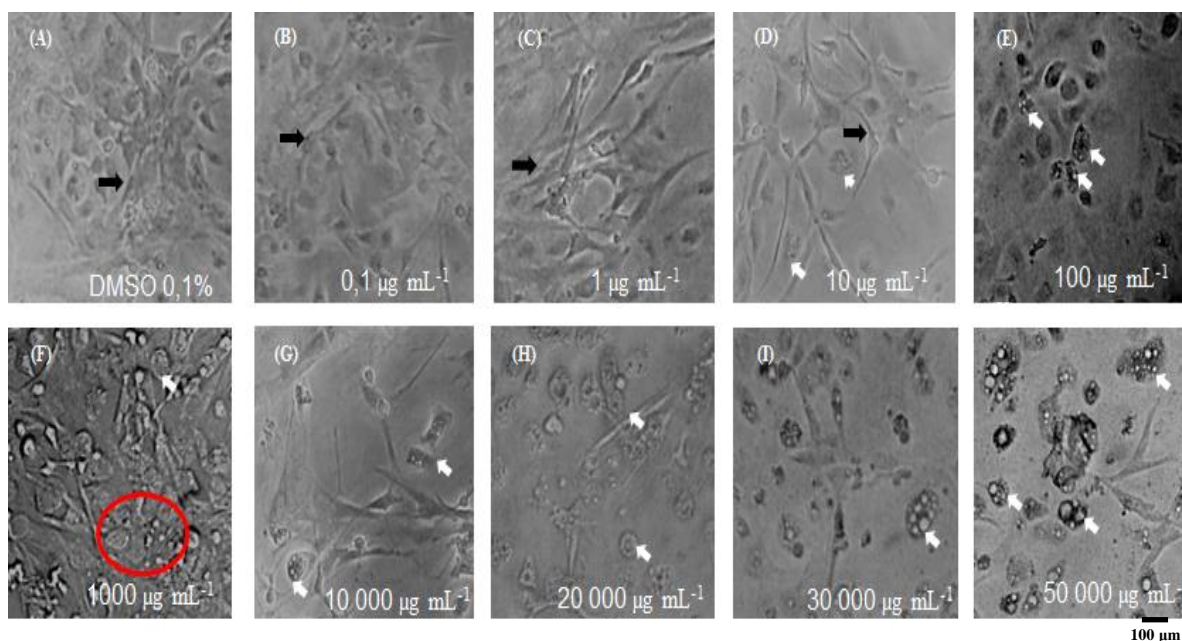
Figura 16. Avaliação da citotoxicidade (teste MTT) em culturas gliais, após 24 h de exposição para FJC ($0,1 - 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) associado concomitantemente ao LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$].



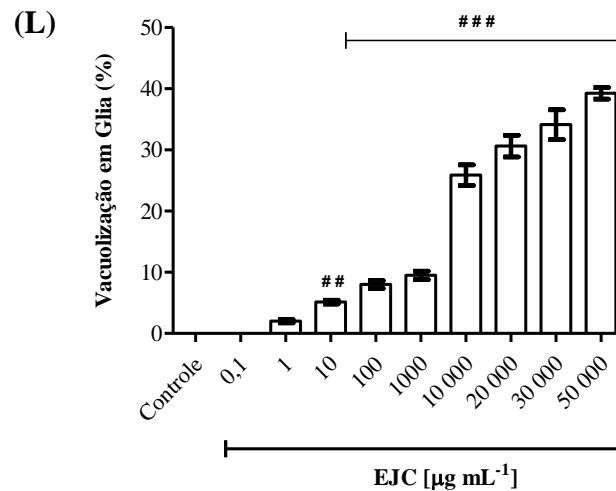
Resultados expressos em porcentagem da absorvância em relação ao controle (DMSO 0,1%) considerado como 100% e Indutor de inflamação (LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). A significância estatística representa (#) $p < 0,05$; (##) e $p < 0,001$ comparado ao controle e (*) $p < 0,05$; e (**) $p < 0,001$ comparado ao LPS.

Paralelamente, aos ensaios de viabilidade celular por MTT verificou-se alterações na morfologia glial através de imagens em microscópio de contraste de fase por objetiva de 20x (Fig. 17). Nas culturas de células gliais expostas EJC na concentração $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, as células apresentaram morfologia celular preservada. No entanto, nas culturas expostas a EJC nas concentrações $1- 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi possível evidenciar células com vacuolizações citoplasmáticas e alterações fenóticas, com redução de prolongamentos celulares. Partindo dessa compreensão, as concentrações que provocaram efeitos citotóxicos, foram excluídas do estudo, e utilizou-se a menor concentração subtóxica ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) de EJC para a realização dos demais testes.

Figura 17. Efeito citotóxico de extrato metanólico de *Jatropha curcas* L. na morfologia celular e indução de vacuolização de células gliais.



Imagens por microscópio de contraste de fase (objetiva de 20x) de culturas primárias de glia pós 24 h de tratamento. (A) Culturas em condições controle, veículo de diluição DMSO (0,1%); (B) EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (C) EJC $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (D) EJC $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (E) EJC $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; EJC (F) $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$; (G) $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ EJC; (H) $20.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ EJC ; (I) $30.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ EJC e EJC e (K) $50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ EJC. A seta de cor preta indica o corpo celular glial; a seta de cor branca indica células com vacuolização citoplasmática e demarcação circular de cor vermelha indica nódulos gliais; barra de escala = $100 \mu\text{m}$.



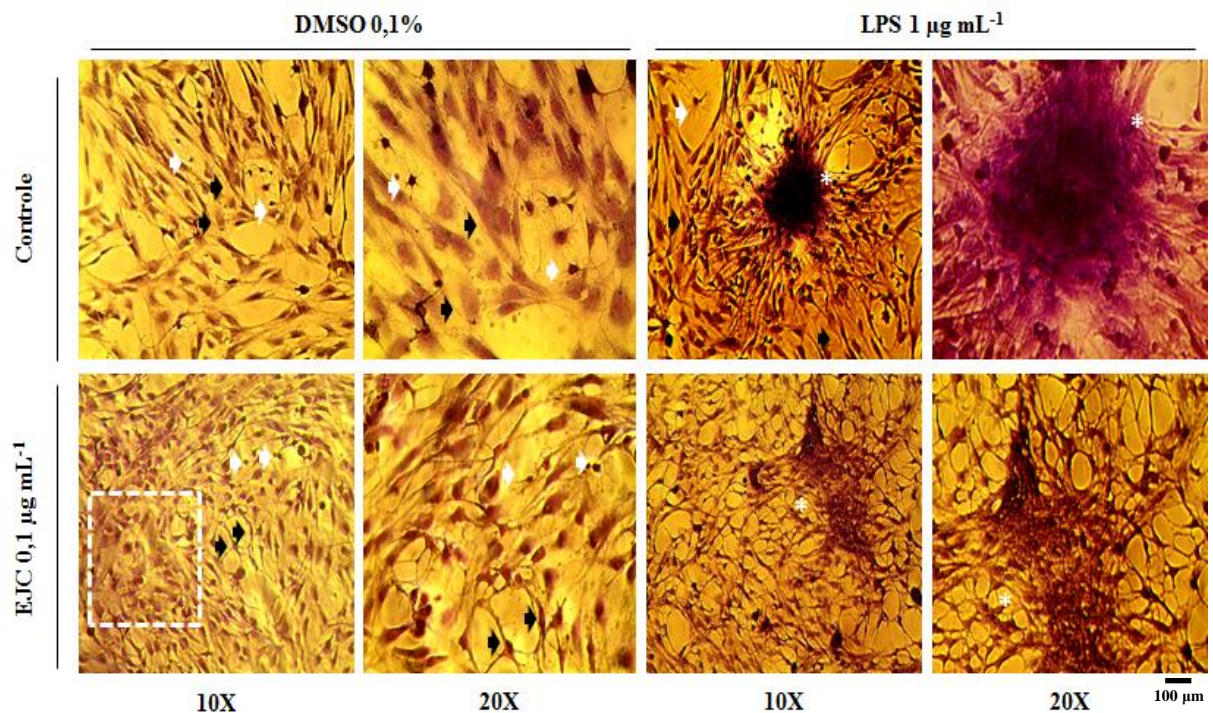
Quantificação de células gliais em vacuolização após 24 h de tratamento; os resultados estão expressos como vacúolos/glias totais, desvio padrão (DS); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados ao controle.

Efeito do EJC sobre morfologia de células gliais

Para investigar, com maiores detalhes, as alterações morfológicas de células gliais (astrócito e micróglia) expostas ao EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizou-se a coloração de *May grunwald*; e a imunocitoquímica, marcação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em astrócitos e proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado (Iba1) para microglia. As culturas celulares foram visualizadas com auxílio de microscopia óptica de contraste de fase (Olympus BX70) e microscopia de fluorescência, respectivamente. Posteriormente, utilizou-se câmara digital (CE RoperScientific) para a obtenção de imagens representativas à análise de alterações morfológicas (Fig. 18). Pois torna-se, importante, observar como as células respondem fenotipicamente. As culturas coradas por *May Grunwald* (Fig. 18) em condição controle apresentaram células gliais distribuídas homogeneamente caracterizado por monocamada densa típica de astrócitos com fenótipo plano/poligonal e uma pequena proporção células de corpo celular contraído e núcleo eletrodense sugestivo de micróglia. No entanto, culturas de células gliais expostas ao LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram alterações na confluência da monocamada glial. Os astrócitos apresentaram alterações morfológicas com redução das uniformidades celulares e do número de prolongamentos que se apresentaram mais espessos e longos. Também foram observadas, após tratamento com LPS, a formação de colônias celulares por astrócitos e microglia sugerindo gliose reativa. Nas culturas expostas a EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) os astrócitos apresentaram possível ativação celular, alterações morfológicas discretas, reduzida contração do corpo celular, com preservação do número e comprimento

dos prolongamentos ramificados, semelhantes quanto à distribuição, homogeneidade e integridade morfológica das células em condições controle. Entretanto, nas culturas submetidas ao tratamento concomitantemente com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) as alterações celulares observadas após tratamento com LPS foram atenuadas, revelando aumento do número de prolongamentos ramificados com redução dos seus comprimentos assim como redução da formação de colônias celulares, característica da exposição apenas com o LPS, mas preservando a uniformidade celular quando comparado à condição de tratamento contendo apenas o controle (DMSO 0,1%).

Figura 18. Análise do efeito do Extrato Metanólico de *J. Curcas* L. na morfologia celular de células gliais através da coloração *May grunwald*.

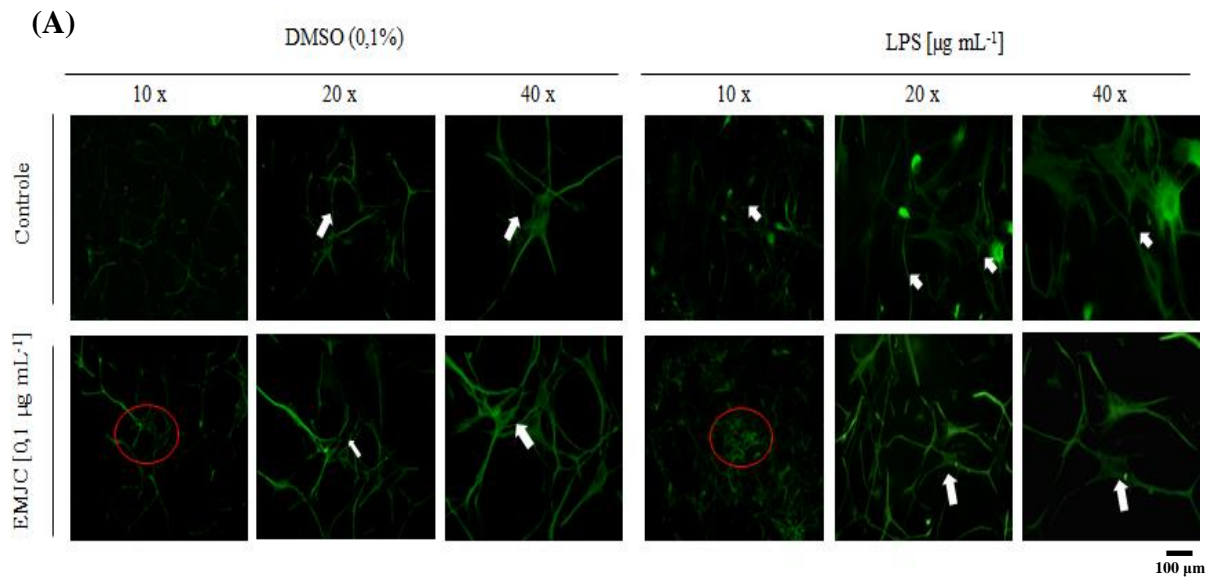


Análise morfológica por microscopia de contraste de fase (Obj. 10-20X) em culturas fixadas e coradas com *May grunwald*. Culturas primárias de glia foram tratadas EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) na ausência ou presença de LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), por 24 h. Foi utilizado como controle, tratamento com (DMSO 0,1%) e tratamento com (LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) indutor de inflamação. A seta (preta) indica astrócito; a seta (branca) indica microglia; asterisco indica formação de colônias celulares; quadro com linhas pontilhadas de cor branca demarca astrogliose quando comparado ao controle negativo. Barra de escala = 100 μm ; n = 8.

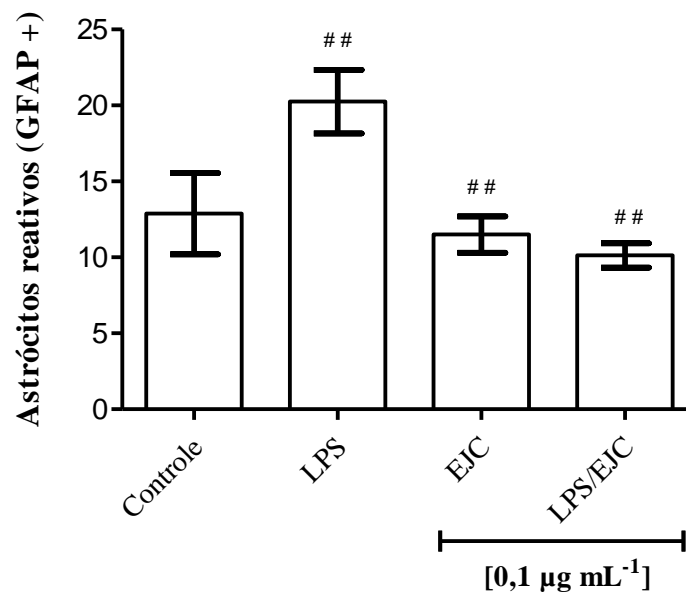
A caracterização morfológica dos astrócitos através da marcação imunocitoquímica para proteína do citoesqueleto (GFAP)

A astrogliose reativa é observada na neuroinflamação e serve como um marcador para várias neuropatias, mas seu papel não é totalmente compreendido. Para tratar desta questão, foi realizado por imunocitoquímica à expressão da proteína do citoesqueleto de astrócitos, Proteína Ácida Fribilar Glial (GFAP), marcador específico de reatividade astrocitária (astrogliose), nas culturas de glia cortical, contendo aproximadamente 10 – 20% de microglia, nas diferentes condições experimentais (Fig. 19). Astrócitos em condição controle (DMSO 0,1%) revelaram como monocamada de células com morfologia plana/poligonal de prolongamentos contendo ramificações finas com GFAP distribuída ao longo de todo corpo e processos celulares. No entanto, mudanças na morfologia dos astrócitos foram observadas em culturas tratadas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nesta condição em particular, observou-se maior número de astrócitos reativos pelo aumento da expressão da GFAP, hipertrofia, prolongamentos mais alogados e espessos, distinguindo-se dos astrócitos normais controles. Nas culturas tratadas com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se reduzida contração do corpo celular dos astrócitos, com prolongamentos espaçados e ramificações bipolares, além de evidente presença de astrocitos justapostos gerando uma interação celular semelhante ao controle. O tratamento com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) preservou morfologia celular de astrócitos por apresentar prolongamentos ramificados finos e intensidade de fluorescência de GFAP próximos do controle. Entretanto, na condição de tratamento LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentou redução do tamanho de corpo celular e prolongamentos, que se apresentaram mais ramificados e finos, sugerindo atenuação de astrogliose.

Figura 19. Análise do efeito do Extrato Metanólico de *Jatropha curcas* L. ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) na morfologia de astrócitos e expressão de GFAP em cultura primária de glia.



(B)



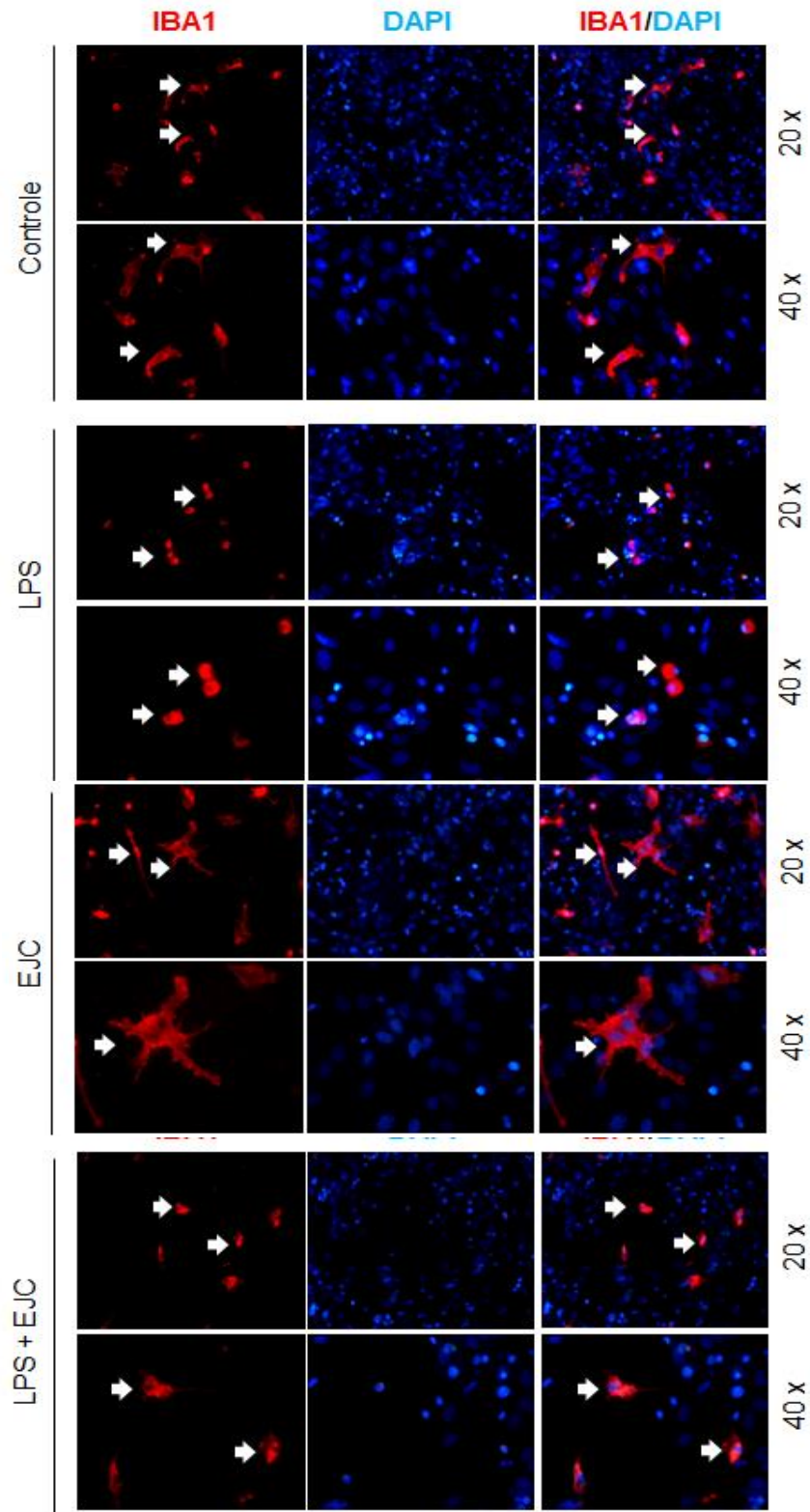
Análise da expressão da proteína GFAP por imunocitoquímica e microscopia de fluorescência em culturas de células glias 24 h após tratamentos. **(A)** Micrografias de culturas em condições controle (DMSO 0,1%), tratadas com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), tratadas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tratadas com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), setas brancas indicam astrócitos GFAP+ e circunferência de vermelho indicam astrócitos justapostos. **(B)** Quantificação de astrócitos GFAP positivos (GFAP⁺) em condições controle ou tratadas com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) na ausência ou presença de LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) ^{##}p<0,001 comparados ao controle. Obj. 10, 20 e 40x. Escala = 100 μm . n = 8.

Alguns marcadores microgliais específicos são usados para discriminar microglia de astrócitos e caracterizar reatividade microglia (microgliose), caracterizada entre outros aspectos por mudanças no fenótipo. No presente estudo, realizou-se 24 h após tratamentos, análise após marcação imunocitoquímica da expressão da proteína ligante de cálcio (Iba-1) específica do citoesqueleto de microglias. A imunomarcação no tratamento contendo unicamente a exposição ao LPS apresentou-se com maior número de células GFAP positivas que Iba-1-positivas em comparação ao controle.

Nas culturas primárias de glia em condição controle (DMSO 0,1%) foram observadas células Iba-1 positivas com núcleo com forma de bastão ou vírgula, e fenótipo poligonal com poucos processos celulares, ou bipolares em forma de haste sugestivo de micróglia quiescente (ou em repouso) como indicado na (Fig. 20A). Na presença do LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se uma ativação drástica da micróglia, caracterizada por alterações morfológicas, um aumento significativo de células redondas ou ameboides e redução de células com processos ramificados. O tratamento com o EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou poucas alterações do volume celular, no entanto, preservou características conforme o controle (DMSO 0,1%). Nas culturas tratadas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em associação com o EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi possível verificar que a reatividade microglial induzida por LPS foi atenuada, sobretudo, pela proporção de células com retração de corpo celular (células ameboides) (Fig. 20C) e preservação de prolongamentos ramificados em sua maioria bipolar, semelhantes ao controle (DMSO 0,1%). Por outro lado, não houve diferença significativa na proporção de células de micróglia (Iba-1⁺) em nenhum dos tratamentos quando comparado ao controle (Fig. 20B).

Figura 20. Análise do efeito do EJC na morfologia, ativação de microglia (IBA-1 positivas) (A) e quantificação de células Iba-1 positivas para micróglias (B); micróglia reativa forma ameboide (C) em cultura primária de glia.

(A)



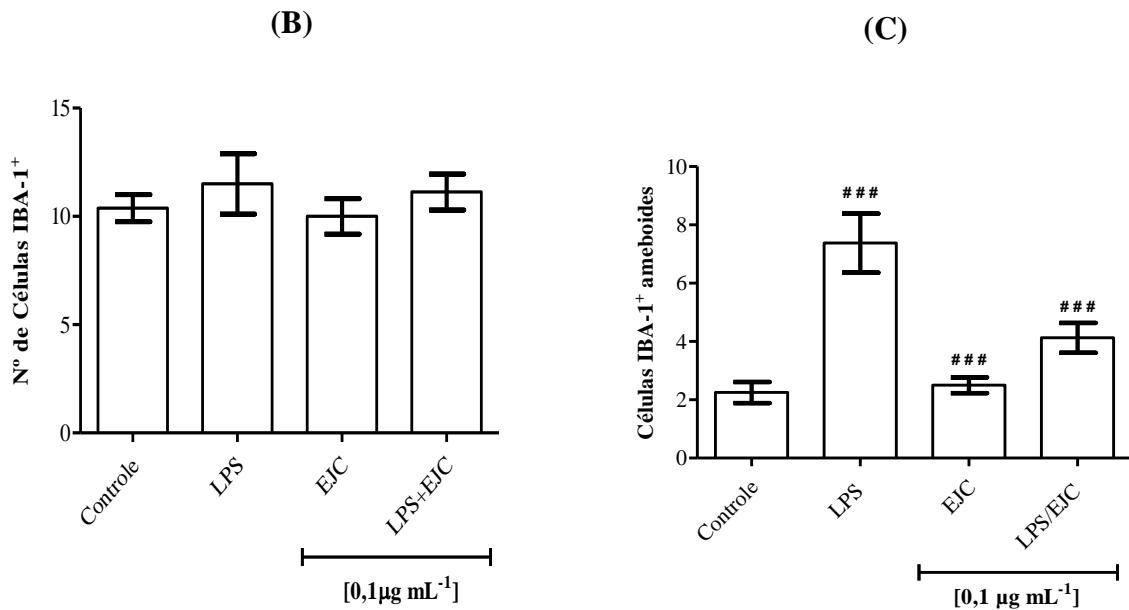


Imagem obtida por microscopia de fluorescência (Objetiva de 10x; 20x e 40x) de culturas primárias de glia imunocoradas para corpo citoplasmático de micróglia (IBA-1) e núcleo celular (DAPI), vermelho e azul respectivamente. As Culturas primárias de glia foram tratadas EJC (0,1 μg mL⁻¹) na ausência ou presença de LPS (1 μg mL⁻¹), por 24 h. Foram utilizados como controles, tratamentos com (DMSO 0,1%) controle e tratamento com LPS (1 μg mL⁻¹) Indutor de inflamação. Barra de escala = 100 μm. A seta (branca) indica micróglia IBA-1 positiva por diferentes condições de tratamento. Quantificação de células Iba-1 positivas para micróglia (B); micróglia reativa forma amebóide (C), expressa como uma porcentagem da média em razão de micróglia possuindo forma amebóide / micróglia totais e desvio padrão (DP), ^{###}P < 0,0001, comparado ao LPS. N = 5.

As análises realizadas por imunocitoquímica para GFAP e Iba-1 nos aglomerados celulares sugestivos de sítios inflamatórios, ou nódulos gliais, evidenciados após estímulo com LPS (1 μg mL⁻¹), revelaram que estes são constituídos por astrócitos reativos (GFAP⁺) e microglia infiltradas (Fig. 21). Os astrócitos GFAP⁺ expostos ao LPS (1 μg mL⁻¹) apresentaram expressiva reatividade caracterizada por extensos processos que vão além dos domínios individuais astrocitários, nos quais, formam um entrelaçamento substancial destes processos e sobreposições de corpos celulares em pontos específicos da monocamada glial em forma de colônias com desfocagem e ruptura. Nesta mesma condição, células microgliais Iba-1 positivo com fluorescência emitida de coloração vermelha (Fig. 21), apresentaram concentradas nas proximidades destas colônias astrogliais. Estas análises também evidenciaram diminuição da frequência e do tamanho dos nódulos gliais na associação LPS/EJC, sugerindo atenuação da gliose reacional.

Figura 21. Análise do efeito do Extrato Metanólica de *Jatropha curcas* L. ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) na morfologia e perfil do direcionamento quimiotático das células gliais em sítio inflamatório.

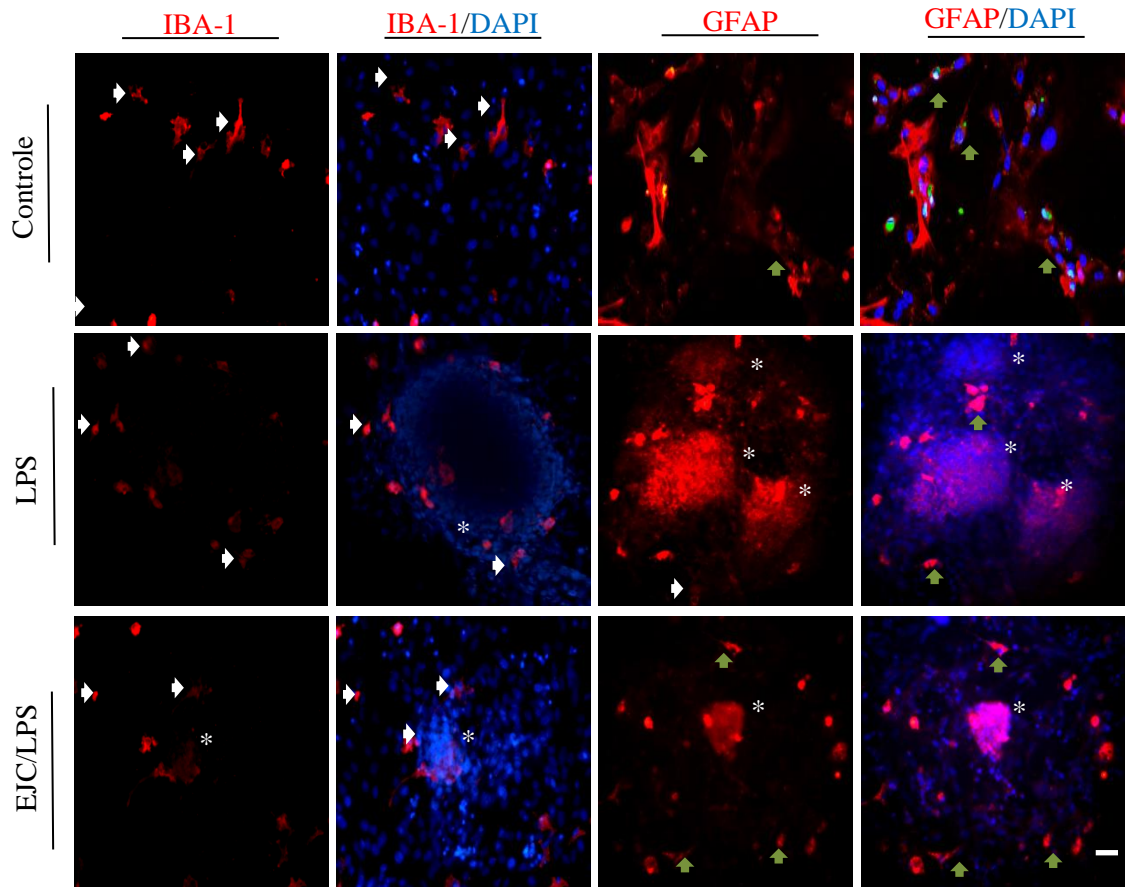


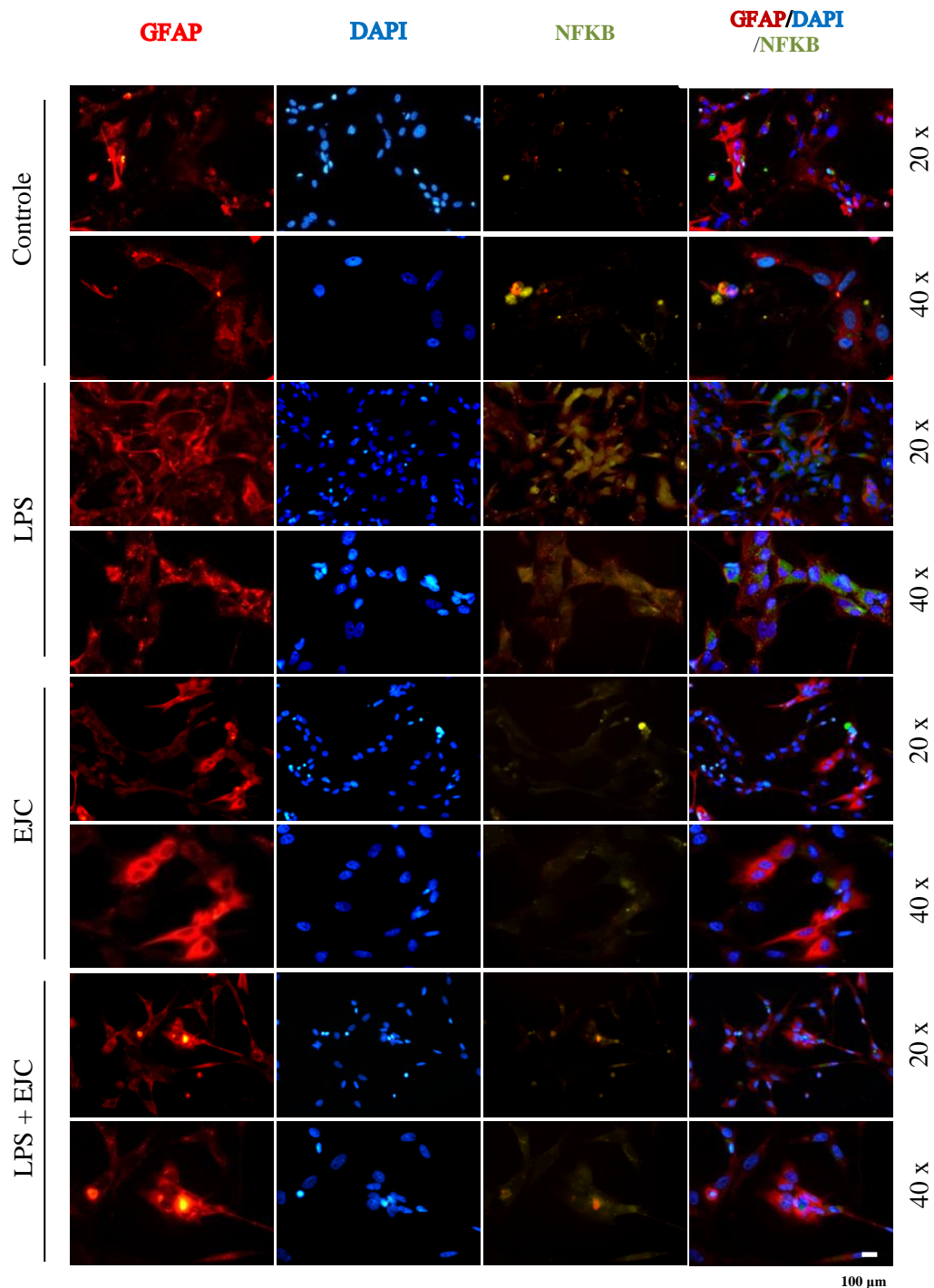
Imagem obtida por microscopia de fluorescência de culturas primárias de glia imunocoradas para micróglia (IBA-1) ou astrócitos (GFAP); núcleos corados com DAPI (azul). As culturas primárias de glia foram cultivadas em condições controle (DMSO 0,1%), tratadas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou com a associação de LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e analisadas após 24 h. Objetiva de 20x; Barra de escala = 100 μm . Setas horizontais (branca) indica micróglia (IBA-1⁺); setas verticais (verde) indica astrócitos (GFAP⁺); asterisco (branca) indica formação de colônias de células gliais. N = 8.

Atuação de EJC a resposta inflamatória induzida em astrócitos

A fosforilação de NF- κ B, complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição, se mantem em níveis relativamente baixos em células em repouso, sem nenhum processo de injúria (BETHEA *et al.*, 1998; BRAMBILLA *et al.*, 2005). No entanto, após alguns estímulos, como estresse induzido por LPS, há um intenso aumento da expressão de NF- κ B^p, fosforilação e translocação para o núcleo de proteínas fosforiladas em células reativas, regulando a expressão de genes alvo associados à resposta inflamatória. (MEMET, 2006; ASHALL *et al.*, 2009). Nesse sentido, adotaou-se como um segundo parâmetro de análise de resposta inflamatória a imunomarcagem de NF- κ B^p fosforilado, 1 h após os

diferentes tratamentos, associada com imunomarcação para GFAP e Iba1. Em condições controle (0.1% DMSO) e nas culturas expostas ao EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se pouca marcação de NF-kB, restringindo a pequenos pontos isolados em astrócitos GFAP⁺ (Fig. 22) e micróglia Iba1⁺ (dados não apresentados). O tratamento das culturas com a toxina LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) induziu forte fluorescência na marcação de NF-kB citoplasmática nas células gliais sugerindo ativação do fator de transcrição NF-kB. No entanto, a exposição das culturas ao EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) associada ao LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) atenuou a fluorescência proveniente da fosforilação do NF-kB.

Figura 22. Marcação de NF-kB através da imunocitoquímica em cultura primária de glia após tratamento prévio com EJC associado ou não ao LPS.

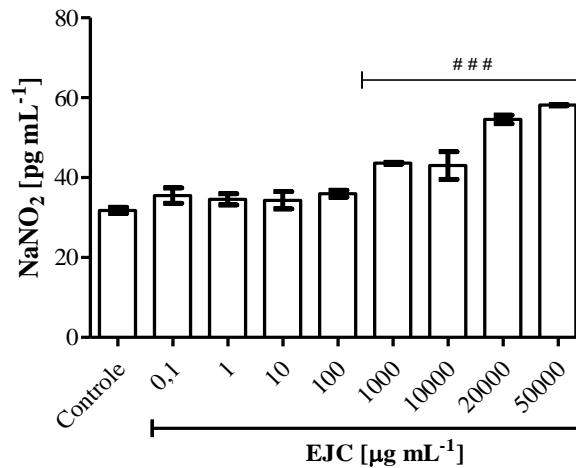


Fotomicrografia (obj. 20-40x) ilustrando presença de NF-kB em células gliais expostos ou não ao EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) 24 h. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (vermelho), DAPI (marcador nuclear – azul) e anti-NF-kB (verde) em culturas primárias de glia de córtex cerebral de ratos neonatos *Wistar*. Culturas tratadas com DMSO 0,1% controle negativo, culturas tratadas com LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (controle positivo), culturas tratadas com EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e culturas tratadas com LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ + EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Barra de escala $100 \mu\text{m}$.

Modulação da resposta astrogliar pelo EJC e FnEJC e redução de NO

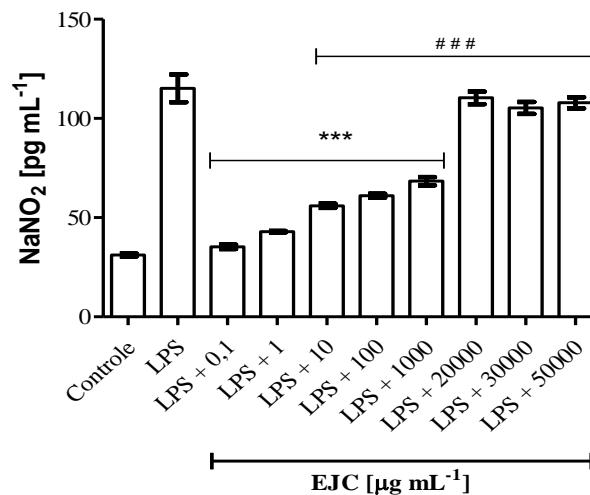
Visando caracterizar o perfil inflamatório, os níveis de nitrito, forma estável de NO, produzido pela células gliais, foi medido através da Reação de *Griess* no meio de cultura 24 h após diferentes tratamentos. Em condições controle (DMSO 0,1%), as culturas apresentaram níveis muito baixos de nitrito ($32,55 \pm 0,77 \text{ pg mL}^{-1}$). Comparado ao controle não ocorreu alteração significativa nos níveis de nitrito no meio de cultura das células tratadas apenas com EJC ($0,1 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), que permaneceram entre ($33,32 \pm 1,9 \text{ pg mL}^{-1}$ a $35,49 \pm 0,85 \text{ pg mL}^{-1}$). No entanto, EJC adotado nas concentrações de $1000 - 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ induziu acúmulo de nitrito no meio de cultura ($43,60 \pm 0,23 \text{ pg mL}^{-1}$ e $58,14 \pm 0,17 \text{ pg mL}^{-1}$) superior ao controle. Culturas tratadas concomitantemente com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram valores próximos do controle ($35,00 \pm 1,9 \text{ pg mL}^{-1}$) (Fig 23). Após tratamento com o LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) os níveis de nitrito aumentaram significativamente para $122,2 \pm 0,58 \text{ pg mL}^{-1}$, em aproximadamente 4 vezes os valores do controle confirmando o seu uso como indutor de resposta inflamatória. No meio contendo os EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ associado com LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig 24), apresentou valores de nitrito próximo do controle ($35,00 \pm 0,23 \text{ pg mL}^{-1}$). No entanto, nas concentrações de $1 - 50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EJC com LPS induziram acúmulo de nitrito no meio de cultura ($42,21 \pm 0,34 \text{ pg mL}^{-1}$ e $58,14 \pm 0,17 \text{ pg mL}^{-1}$) superior ao controle. As células gliais quando expostas às frações $F_1\text{JC}$ e $F_2\text{JC}$ ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem a presença do LPS (Fig 25), reduziram de forma significativa a produção de NO, com níveis de nitrito de ($35,04 \pm 0,57 \text{ pg mL}^{-1}$ e $47,55 \pm 1,3 \text{ pg mL}^{-1}$), respectivamente. As exposições das células às demais frações $F_3\text{JC}$ e $F_9\text{JC}$ apresentaram os níveis de nitrito superiores ao controle. As exposições celulares às demais frações $F_3\text{JC}$ e $F_9\text{JC}$ mantiveram os níveis de nitrito superiores ao controle. Culturas tratadas concomitantemente com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $F_2\text{JC}$ e $F_9\text{JC}$ ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig 26), apresentaram valores superiores ao controle ($44,00 \pm 1,5 \text{ pg mL}^{-1}$ a $83,51 \pm 0,19 \text{ pg mL}^{-1}$). Entretanto foi observado na condição de tratamento contendo LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e $F_1\text{JC}$ ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) concomitantemente, redução da produção de nitrito ($20,6 \pm 1,7 \text{ pg mL}^{-1}$) em culturas de células gliais.

Figura 23. Avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao EJC (0,1- 50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 h de exposição.



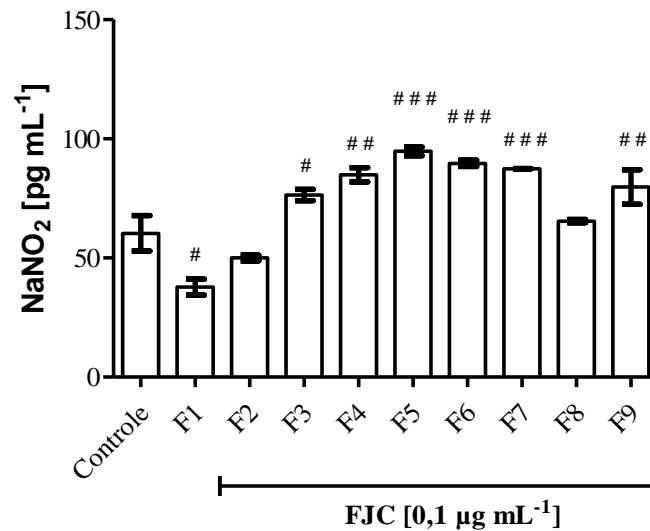
Controle negativo (DMSO 0,1%) e LPS 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dados representados por média \pm desvio padrão (**#) $p < 0,0001$ em comparação com o controle tratado com o veículo DMSO 0,1%, $n = 5$ (ANOVA, Tukey Test).

Figura 24. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao EJC (0,1-50.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 h de exposição.



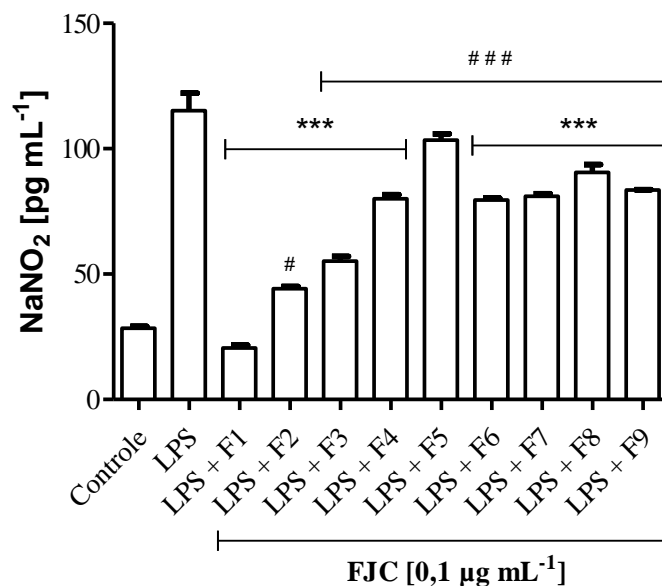
Controle negativo (DMSO 0,1%) e LPS $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dados representados por média \pm desvio padrão (***) $p < 0,0001$ comparado ao controle DMSO 0,1% e (**#) $p < 0,0001$ comparado ao LPS, $n = 5$ (ANOVA, Tukey Test).

Figura 25. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostos ao FJC [$0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$] durante 24 h de exposição.



Controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dados representados por média \pm desvio padrão (#) $p < 0,05$; (##) $p < 0,001$; (###) $p < 0,0001$ comparado ao controle DMSO 0,1% $n = 5$ (ANOVA, Tukey Test).

Figura 26. A avaliação da atividade anti-inflamatória pela produção de nitrito em cultura de glia expostas ao FJC [$0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$] associado ao LPS [$1 \mu\text{g mL}^{-1}$] durante 24 h de exposição.



Controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dados representados por média \pm desvio padrão (#) $p < 0,05$; (##) $p < 0,001$; (###) $p < 0,0001$ comparado ao controle DMSO 0,1% e (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,0001$ comparado ao LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $n = 5$ (ANOVA, Tukey Test).

5.4. DISCUSSÃO

O estudo, aqui exposto, é o primeiro a avaliar atividade anti-inflamatória de extrato metanólico de folhas da planta *Jatropha curcas* L. em células gliais, astrócitos e microglias, do SNC. Na prospecção para a validação da patente de invenção retratada no subtítulo técnica relacionada, a descoberta científica mais recente e publicada na forma de artigo foi o estudo sobre atividade anti-inflamatória da planta *J. curcas* L. de Othman e colaboradores (2015), onde que observaram por ensaios biodirecionados atividade anti-inflamatória de extratos obtidos por diferentes partes como raízes, caule e folhas da planta *J. curcas* L. realizado em culturas de macrófagos de ratos.

São inúmeras as metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos considerado o mais adequado para a análise química farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcolico - etanol/água, pois apresenta grande eficácia quanto à solubilidade de constituintes fitoquímicos (YUNES; CALIXTO, 2001).

As análises qualitativas do perfil fitoquímico dos constituintes de extratos a partir de plantas fornecem informações necessárias para o direcionamento das investigações a cerca da presença de metabólitos secundários, sobretudo, para o estabelecimento de possíveis relações entre constituintes bioativos e o efeito biológico (SIMÕES, 2007; SANTOS, 2002). Nesta visão, ao analisar os resultados do perfil fitoquímico qualitativo preliminar do extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. verificou-se que alguns destes compostos químicos estão compatíveis com os descritos na literatura sobre esta espécie como: xantonas; leucoantocianidinas, catequinas (taninos), flavonas e flavonoides, esteroides e terpenoides e saponinas.

De acordo com pesquisas Shetty e colaboradores (2006); assim como, Mujumdar e Misa (2004) comprovaram a presença de taninos em diversas partes da *J. curcas* L. e suas atividades anti-inflamatória e cicatrizante em feridas. As folhas e outras partes da planta são usadas como tratamento de várias doenças. Os taninos ajudam no processo de cicatrização de feridas, assim como redução de inflamações através da formação de uma camada protetora sobre a pele danificada (SANTOS *et al.*, 2007).

Compostos bioativos da classe dos flavonoides exibem uma ampla diversidade de atividade biológica como propriedade analgésica, antibacteriana, antialérgica e anti-inflamatória,

antioxidante e anti-inflamatória (DANGLES, DUFOUR; 2005). Alguns estudos mostram ação anti-inflamatória, pela inibição de mediadores inflamatórios (DI CARLO, 1999). Das folhas de *J. curcas* L. foram isoladas compostos da classe dos flavonoides como biflavona-di-C-glicosídeo 6,6''-di-C-beta-D-glicopirailosídeo-metileno-(8,8'')-biapigenina juntamente com outros seis compostos conhecidos: apigenina-7-O-beta-D-neohesperidosídeo, apigenina-7-O-beta-D-galactosídeo, orientina, vitexina, vicenin II e apigenina (ABDA-ALLA; MOHARRAM; GAARA; EL-SAFETY, 2009; CHHABRA; MAHUNNAH; MSHIU, 1990).

Considerando o potencial farmacológico da *Jatropha curcas* L. pela presença, em especial, das classes de compostos como taninos e flavonoides, neste estudo investigou-se os efeitos biológicos do extrato metanólico de folhas de *J. curcas* L. (EJC) e das frações (F_nEJC) em cultura primária de células gliais. As células gliais, em particular astrócitos e micróglia, apresentam funções importantes para a integridade de células neuronais e que impactam na homeostasia no SNC. (CUNNINGHAM, 2013; DAVALOS *et al.*, 2005).

Evidências demonstram papéis importantes dos astrócitos e microglia na fisiologia do SNC e nos mecanismos da patogênese de várias enfermidades neurológicas (BUSKILA *et al.*, 2005; SALVEMINI *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1993) assim como na resposta à agentes infecciosos e químicos (CHANG, KARIN, 2001). Torna-se de suma importância a pesquisa sistemática deste sistema biológico e a investigação da toxicidade de compostos bioativos com ação em células do SNC.

Segundo MARTINS e colaboradores, (2009) em uma abordagem prospectiva farmacológica devem ser realizada primariamente pela a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em que, as culturas celulares são expostas com diretamente compostos ativos por concentrações diversas com o intuito de verificar o seu efeito biológico (MARTINS *et al.*, 2009). Neste estudo, foi evidenciada citotoxicidade nas culturas primárias de glia nas concentrações do extrato acima de 10.000 µg mL⁻¹ apresenta em dados da literatura, apesar de escassos sobre a *J. curcas* L., onde mostram que extratos de *Jatropha curcas* L. em cultura de macrófagos de murinos *in vitro* são utilizados a concentração de 1.000 µg mL⁻¹ de extratos metanólico e frações deste (AHMAD *et al.*, 2015) assim como nos estudos de (OSKOUUEIAN 2011; EHSAN *et al.*, 2011) estes dados corroboram com os estudos deste trabalho, onde não se apresentou efeitos citotóxicos nas concentrações inferiores a 1.000 µg mL⁻¹ de EJC quando comparado ao controle. As frações dos EJC, após ensaio biodirecionado com o EJC e determinação da concentração 0,1 µg mL⁻¹ subtóxica ideal para investigações subsequentes, nos quais,

verificou-se que as células gliais quando expostas a fração F₁EJC e F₂EJC de *J. curcas* L. não foram suficientes para reduzir a viabilidade celular determinada pela atividade das desidrogenases mitocondriais pelo teste MTT.

O processo autofágico caracteriza-se pela degradação e reciclagem de componentes intracelular como lipídios, proteínas e organelas disfuncionais por lipossomos (MIZUSHIMA, 2007). Para Degtyarev e colaboradores (2008), em geral, substâncias químicas afetam no processo autofágico resultando no acúmulo de vacúolos não processados e tóxicos para as células, nos quais passam a acumular proteínas e lipídios oxidados ou mesmo mitocôndrias funcionalmente irregulares (DEGTYAREV *et al.*, 2008).

Os dados evidenciados mostram que, os astrócitos apresentam no SNC como células polivalentes, pois participam intesamente nas fendas sinápticas, na regulação de neurotransmissores, modulação de respostas imunes e produção de moléculas da matriz extracelular e contribuem para a integridade da Barreira hemato-encefálica (DONG; BENVENISTE, 2001). Mas também, participam na ativação e migração celular importante para manter as ações dos mediadores inflamatórios durante endotoxemia aguda (WALZ, 1989; WESTERGAARD; SONNEWALD; SCHOUSBOE, 1995; MOLOFSKY *et al.*, 2012). Astrócitos e microglias são ativadas em respostas a perturbações no microambiente inclusive durante processos neuroinflamatórios. Esta ativação caracteriza-se como gliose reativa (astrogliose e microgliose), processo pelo qual células gliais respondem a injúrias no SNC que varia de acordo com o tipo, gravidade e duração do insulto (SOFRONIEW, 2009; DONG; BENVENISTE, 2001; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Astrócitos e microglias são capazes de responder estímulo como ao LPS através de um processo heterogêneo molecular e celular (MUCKE; EDDLESTON, 1993; MYER *et al.*, 2006). A resposta inflamatória rápida pelos astrócitos é caracterizada primariamente por hipertrofia, proliferação celular e em especial expressão aumentada de filamento intermediário (GFAP), um marcador de astrócitos terminalmente diferenciado que, apresenta principalmente expressa no desenvolvimento tardio, mas também, na ativação astrocitária em condições patológicas (MOLOFSKY *et al.*, 2012) o que resulta na liberação de substâncias citotóxicas e inflamatórias (VERGARA *et al.* 2010).

Para induzir a inflamação aguda no modelo de cultura primária de células gliais (astrócitos e micróglias), deste estudo em questão, foi utilizado o Lipopolissacarídeo (LPS) amplamente

usado em modelos de neuroinflamação. Com base em estudos científicos, astrócitos e microglias são capazes de responder ao LPS (MEFFERT, BALTIMORE, 2005; KARIN, BEN-NERIAH, 2000). Neste trabalho, os resultados demonstraram que o LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h) foi capaz de ativar células da glia (induzir gliose reacional) visto que, apresentou após coloração de *May grunwald* morfologia celular heterogenea, característicos de proliferação, por sobreposição celular, com formação de nódulos gliais. Além disso, células tratadas durante 24 h com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) revelaram morfologia uniforme entre as células, sem sobreposição, semelhante ao controle. No entanto, as células tratadas com EJC ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) associado ao LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram atenuar os efeitos gerados pela exposição das células ao LPS, na indução de reatividade astrocitária e formação de agregados celulares (formação de colônias celulares).

Para Pekny e colaboradores (2014), a astrogliose, que está associada a alterações na expressão de muitos genes e características morfológicas, pode ter uma influência benéfica ou prejudicial em distúrbios do SNC como as doenças neurodegenerativas (PEKNY *et al.*, 2014). Estas características foram observadas em culturas expostas ao LPS, em que os astrócitos GFAP positivos apresentaram aumento do corpo celular (hipertrofia) e emissão de prolongamentos citoplasmáticos longos e grossos indicando astrogliose reativa. No entanto, na condição de tratamento LPS/EJC ($1 \mu\text{g mL}^{-1} + 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), observou-se atenuação dos efeitos do LPS $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentando redução da hipertrofia astrocitária, além de proporcionar formação de prolongamentos mais finos de comprimento reduzidos e uniformes comparada aos controles. Estas características reveladas pela exposição ao tratamento com o EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ sugere que os astrócitos por preservarem suas morfologias quiescentes, corpo celular denso e prolongamentos ramificados finos e complexos, contribuem para o metabolismo, homeostasia e preservação do SNC. Um equilíbrio entre os efeitos pró e anti-inflamatórios proveniente da astrogliose determinará eventualmente o resultado da resposta inflamatória benéfica como regulação (KOEHLER; GEBREMEDHIN; HARDER, 2006) e reparação (DARLINGTON, 2005) do SNC em muitos processos inflamatórios patológicos (SOFRONIEW, 2005; LU; YEH; OHASHI, 2008). Apesar das células microgлияis, entre outras funções serem consideradas as células inflamatórias residentes no SNC, os astrócitos também apresentam como importantes mediadores celulares no processo inflamatório (SCHIPKE *et al.*, 2001; SALTER; BEGGS, 2014).

Estudos têm demonstrado respostas inflamatórias importantes nas condições patológicas do SNC, tal como infecção, isquemia, doença neurodegenerativa, o papel das células microgлияis

ativadas, e transformadas do estado quiescente (ramificado) para o estado amebóide (DAVALOS *et al.*, 2005; TEELING; PERRY, 2009). Portanto, tornou-se necessário neste estudo também entender a resposta microglial relacionada à astrogliose induzida pelo LPS e, se o EJC modulava esta resposta. Observou-se que nas culturas controle apresentaram fenótipos quiescentes ou “de repouso”. Entretanto, as culturas expostas ao LPS apresentou um predomínio de células microgliais com fenótipo ativado amebóide. As micróglia expostas somente ao EJC ou em associação com LPS apresentaram leve alteração do volume celular, no entanto, preservaram as características conforme o controle de fenótipo quiescente.

Células gliais são, também, importantes na produção de fatores pró-inflamatórios e neurotróficos durante a gliose. De acordo com os estudos de SHIH-HENG e colaboradores (2015), culturas altamente enriquecidas de astrócitos não respondem à estimulação de LPS, no entanto, na presença de microglia, os astrócitos tornam-se reativos por processos secundários a partir da liberação de TNF- α por microglia ativadas. Neste estudo, observou-se que os astrócitos expostos ao LPS apresentaram formação de colônias celulares com intensa reatividade representado por pontos de extensos prolongamentos entrelaçados sobrepondo os corpos celulares. Além disso, verificou-se a presença de microglia nas proximidades das colônias de astrócitos reativos. No entanto, na presença do EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciou-se o predomínio de células em domínios individuais sugerindo reduzir a astrogliose e consequentemente a quimiotaxia em resposta a estímulos moleculares gerados pelas células astrogliais. Nas culturas expostas apenas o EJC (as células gliais (GFAP+ e IBA-1+) não apresentaram formação de colônias, semelhante ao controle. Microglia transformadas (estado ativado) migram para o local do dano no SNC e, dessa forma, participam do processo inflamatório no intuito de impedir a propagação dos danos (DAVALOS *et al.*, 2005). Os dados obtidos neste estudo, sugerem que a microglia migrou para os nódulos gliais após exposição ao LPS efeito que foi atenuado pelo EJC $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Valendo-se do conhecimento de que a ativação de células gliais também resulta na expressão de mediadores inflamatórios (VILHARDT, 2005; BAEUERLE, 1991) foi investigado produção de NO e da ativação do fator de transcrição NF- κ B. O NO como demonstrado nos estudos de Dawson; Snyder (1994) está entre os principais fatores produzidos pela microglia e astrócitos ativados. Considerado como potente mensageiro biológico, o NO é caracterizado como um radical livre de vida curta que medeia uma variedade de funções incluindo neurotransmissão, ação microbicida, atividade antitumoral e citotoxicidade (DAWSON; SNYDER, 1994; (AUPPERL *et al.*, 2001). Os agentes anti-inflamatórios, em especial

fármacos esteroidais, usados como padrões eficientes na redução ou mesmo bloqueio de processos inflamatórios que atuam na redução de síntese de NO (FANG *et al.*, 2010). As células gliais expressam na superfície membranar receptores específicos para LPS que proporcionam modificações morfológicas do estado quiescente para o reativo, além disso, as células após ativação é iniciada uma cascata de sinalizações no citoplasma celular e, conseqüentemente, ativam genes importantes na liberação de substâncias inflamatórias como o óxido nítrico (NO). (JANA *et al.*, 2005; HENN *et al.*, 2009).

Por outro lado, o fator de transcrição NF-kB é importante na regulação da transcrição da expressão de enzimas envolvidas no processo inflamatórios como Óxido nítrico Sintase induzida (iNOS) e Ciclo-oxigenase-2 (COX – 2) (BAEUERLE, 1991). A expressão desses genes inclui a libertação de muitas de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão moléculas envolvidas nos processos inflamatórios (MEMET, 2006; ASHALL *et al.*, 2009). Isto pode levar à formação de um ânion superóxido (O₂⁻) e o óxido nítrico (NO), que pode formar peroxinitrito, um agente oxidante muito potente (KIM; CHOI; LEE. 2005). De acordo com Meffert e Baltimore (2005), apesar do NF-kB ser um fator de transcrição multifuncional, ele é um alvo importante para controlar a inflamação, uma vez que a transcrição de muitas moléculas pró-inflamatórias depende de sua ativação. Neste estudo, observou-se que as células gliais expostas ao EJC 0,1 µg mL⁻¹ mantem os níveis de nitrito, forma estável do NO, semelhante à linha de base do controle e, quando expostas as frações F₁JC e F₂JC, reduziram a produção de NO. As células gliais responderam ao estímulo inflamatório com LPS produzindo níveis elevados de nitrito. Entretanto, células expostas ao LPS associado ao EJC 0,1 µg mL⁻¹ e todas as frações testadas reduziram significativamente à produção de NO sugerindo ação anti-inflamatória. Ao analisar o perfil cromatográfico sugere-se que os compostos bioativos com capacidade inibitória da liberação de NO por células gliais estejam presentes nas frações 1 e 2 do EJC, pois foi observado que nestas frações em particular apresentaram reduzir a produção de NO em células gliais na presença do LPS.

Neste trabalho, também se observou que a modulação de células gliais com EJC 0,1 µg mL⁻¹ na presença do LPS, induziu redução da ativação do NF-kB quando comparado a condição contendo unicamente o LPS sugerindo que o mecanismo de ação relacionado ao bloqueio da resposta glial associada à inflamação por compostos da *J. curcas* L. seja via inibição da ativação desse fator de transcrição e conseqüente regulação na liberação de NO.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com esta pesquisa permitiram demonstrar que:

O extrato metanólico obtido da folha de *Jatropha curcas* L. (EJC) por meio de extração alcoólica e triagem fitoquímica qualitativa preliminar, apresenta em sua constituição xantonas; leucoantocianidinas, catequinas (taninos), flavonas, flavonoides, esteroides, terpenoides e saponinas.

Através da avaliação da citotoxicidade o EJC e frações (F₁EJC e F₂EJC) na concentração 0,1 µg mL⁻¹ foram capazes de preservar a viabilidade de células glias.

O EJC 0,1 µg mL⁻¹ conservou morfologia de células glias, astrócitos e microglias, além de promover redução de gliose e formação de agregados celulares induzidos por LPS.

Tratamentos contendo o EJC 0,1 µg mL⁻¹ induziu a supressão do NF-κB sugerindo bloqueio da resposta glial na regulação de genes envolvidos no processo inflamatório, estejam associados por atividade de compostos bioativos da *J. curcas* L.

As células glias expostas ao EJC 0,1 µg mL⁻¹, e frações F₁EJC e F₂EJC reduziram a produção de NO sugerindo que os compostos bioativos com capacidade inibitória da liberação deste mediador inflamatório por células glias.

Finalmente, foi observado que o EJC 0,1 µg mL⁻¹ e todas as suas frações testadas F₁EJC e F₂EJC reduziram a produção de NO em células glias frente ao estímulo inflamatório por LPS, reiterando o potencial anti-inflamatório de componentes presentes no extrato metanólico de folhas *J. curcas* L.

Este estudo tem como perspectiva o isolamento, caracterização e elucidação de aspectos estruturais de componentes ativos presentes no EJC de *J. curcas* L. e frações, assim como traz subsídios para maior compreensão da resposta das células glias durante a neuroinflamação.

7. REFERÊNCIAS

- ABBASI, H. S.; SABOUNI, F.; MOGHIMI, A.; ANSARI, M. S. Modulation of Lipopolysaccharide Stimulated Nuclear Factor kappa B Mediated iNOS/NO Production by Bromelain in Rat Primary Microglial Cells. **Iran Biomed J.** 20(1):33-40. 2016.
- ABDA-ALLA, H. I.; MOHARRAM, F.A. GAARA, A. H.; EL-SAFTY, M. M. Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L leaves and their immunomodulatory activity on humoral and cell mediated immune response in chicks. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C. J biosci.* 64(7-8): 495-501. 2009.
- ABDO, H.; MAHÉ, MM.; DERKINDEREN, P.; BACH-NGOHO, K.; NEUNLIST, M.; LARDEUX, B. The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- Δ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. **J Physiol.** (11):2739-50. 2012.
- ABRAMOV, A. Y.; CANEVARI, L; DUCHEN, M. R. Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. **Biochim Biophys Acta.**1742(1-3):81-7. 2004.
- ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. In: Bahia Análise e Dados. Salvador, v. 16, nº 1. Junho, p. 51-63. 2006.
- ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. In: **Bahia Análise e Dados. Salvador**, v. 16, nº 1. Junho, 51-63. 2006.
- ACHTEN, W.; NIELSEN, L.; AERTS, R.; LENGKEEK, A.; KJAER, E.; TRABUCCO, A., HANSEN, J.; MAES, W.; GRAUDAL, L.; AKINNIFESI, F.; MUYS, B. Towards domestication of *Jatropha curcas*. **Biofuels**, 1, 91-107. 2010.
- AHMAD, R. OTHMAN, N. A.; SYAHIDA, A.; INTAN S. I.; MOHAMAD P. Z. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complement Altern Med.** 15: 11. 2015
- ALLAN, S. M. ROTHWELL N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci.** 2(10):734-44. 2001.
- ALVES, E. U.; ANDRADE, L. A.; BARROS, H. H. A.; GONÇALVES, E. P.; ALVES, A. U.; GONÇALVES, G. S.; OLIVEIRA, L. S. B.; CARDOSO, E. A. Substratos para testes de emergência de plântulas e vigor de sementes de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, p. 69-82, 2008.
- ARRUDA, F. P.; MACÊDO, N. E. B.; ANDRADE, A. P.; WALTER, E. P.; LIV S. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.
- ASCHNER, M.; KIMELBERG, H. K. The use of astrocytes in culture as model systems for evaluating neurotoxic-induced-injury. **Neurotoxicology.** 12:505–517, 1991

- ASHALL L, HORTON CA, NELSON DE, PASZEK P, HARPER CV, SILLITOE K, RYAN S, SPILLER DG, UNITT JF, BROOMHEAD DS, KELL DB, RAND DA, SEE V, WHITE MR Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription. **Science**. 324: 242–246. 2009.
- AUPPERLE, K.; BENNETT, B.; HAN, Z; BOYLE, D.; MANNING, A.; FIRESTEIN, G. NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. **J Immunol**. 15;166(4):2705-11. 2001.
- AZEVEDO, H. Pinhão manso é lançado pelo presidente Lula como opção para o biodiesel – Vegetal é de fácil cultivo. **Biodiesel**, 2006. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso>. Acesso em: 12 set. 2009.
- AZEVEDO, H. Pinhão manso é lançado pelo presidente Lula como opção para o biodiesel – Vegetal é de fácil cultivo. Hoje em Dia. 2006. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso>. Acesso em: 12 set. 2011.
- BAEUERLE, P. A: The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. **Biochim Biophys Acta** 1991, 1072:63–80.
- BELLINI, M. R.; MORAES, G. J.; FERES, R.J.F. Plantas de ocorrência espontânea como substrato alternativo para fitoseídeos (Acari: Phytoseiidae) em cultivos de seringueira (*Hevea brasiliensis* Arg., Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Zool**. 22(1):35-42, 2005b.
- BENARDETE, E. A.; KRIEGSTEIN, A. R. Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia*. 43(9):970-82, 2002.
- BENTIVOGLIO, M.; MAZZARELLO, P. The history of radial glia. **Brain Res Bull**.;49(5):305-15. 1999.
- BETHEA, J. R.; CASTRO, M.; KEANE, R. W.; LEE, T. T.; DIETRICH, W. D.; YEZIERSKI, R. P. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. **J Neurosci**. 18: 3251– 3260. 1998.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. **Nature**. 1;252(5478):55–56, 1974.
- BOHLIN, L. Structure-activity studies of natural products with antiinflammatory effects. In: K HOSTETTMANN ed., *Phytocgemistry of Plants Used in traditional e*. Clarendon Press, **Oxford**, p. 137-161. 1995.
- BRAMBILLA, R.; BRACCHI-RICARD, V.; HU, W. H.; FRYDEL, B.; BRAMWELLA, KARMALLY, S.; GREEN, E. J.; BETHEA, J. R. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. **J Exp Med** 202:145–156. 2005.
- BROWN, J. W.; RUETER, L. E.; ZHANG, M. Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia preclinically. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 3;49:53-62, 2014.

- BUSKILA Y, FARKASH S, HERSHFINKEL M, AMITAI Y: Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. **Glia**. 52:169-176, 2005.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p.401-418. 2000.
- CAMARGO, R DE. ; MALDONADO, A. C. D. ; SILVA, P. A.; COSTA, T. R. DA; Biossólido como substrato na produção de mudas de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.1304-1310, 2010.
- CAMPELO, J. H. Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeriologia**. Santa Maria, v 8, n 1, p. 35-42, 2000.
- CARMODY, R. J.; CHEN, Y. H. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. **Cell Mol Immunol**. (1):31-41. 2007.
- CARMODY, R. J.; CHEN, Y. H. Nuclear Factor-kB: Activation and regulation during Toll-like receptor signaling. **Cellular & Molecular Immunology**. 4: 31-41,2007.
- CHANG, L.; KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature** 410: 37–40. 2001.
- CHHABRA, S. C.; MAHUNNAH, R. L. A.; MSHIU, E. N. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. III Angiosperms (Euophorbiaceae to Menispermaceae). **J. Ethnopharmacol.**, 28: 255. 1990.
- CHIMBARI, M. J.; SHIFF, C. J. A. Laboratory assessment of the potential molluscicidal potency of *Jatropha curcas* aqueous extracts. **African Journal of Aquatic Science**. 33, n. 3, p. 269-273, 2008.
- COOKSON, M.R.; PENTREATH, V.W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicol. In vitro**, v.8, p.351-359, 1994.
- CORRÊA, M. L. P.; TÁVORA, F. J. A. F.; PITOMPEIRA, J. B. Comportamento de cultivares de mamona em plantio consorciadas com caupi e sorgo granífero. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 37, n. 02, p. 200-207, 2006.
- COSTA, F. X. et al. Efeito do lixo orgânico e torta de mamona nas características de crescimento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Revista Engenharia Ambiental**. v. 06, n. 01, p. 259-268, 2009.
- COSTA, M. R; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-164, 2003.
- CUNNINGHAM C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. **Glia**. 61, 71-90, 2013.

- DALLAS, S; MILLER, D. S; BENDAYAN, R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. **Pharmacol Rev.** Jun;58(2):140-61. 2006.
- DANGLES, O.; DUFOUR, C. Flavonoids–protein interactions. In: Andersen, M, Markham KR (eds) Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. **CRC Press**, 443–469, 2005.
- DARLINGTON, C. L. Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. **Curr Opin Investig Drugs.** 6:700-703. 2005.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron.** 39(6):889-909, 2003.
- DAVALOS D., GRUTZENDLER J., YANG G., KIM J. V., ZUO Y., JUNG S., LITTMAN D. R., DUSTIN M. L. AND GAN W.-B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat. Neurosci.** 8, 752-758, 2005.
- DAVALOS, D; GRUTZENDLER, J; YANG, G; KIM J.V; ZUO, Y; JUNG, S; LITTMAN, D. R; DUSTIN, M. L; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci.** 8:752–758, 2005.
- DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.** v. 14, p. 5147-5159, 1994.
- DEGTYAREV, M. et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. **Journal of Cell Biology**, v. 183, p. 101–116, 2008.
- DI CARLO, G.; MASCOLA, N.; IZZO, A. A. e CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4, p. 337-353, 1999.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: **Editora Universidade Estadual Paulista**. 604p. 2002.
- DONG, Y; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia.** 36: 180-190. 2001.
- EHSAN OSKOEI N. ABDULLAH; SYAHIDA AHMAD,² WAN ZUHAINIS SAAD,¹ ABDUL RAHMAN OMAR; YIN WAN HO⁴ Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract. **Int J Mol Sci.**; 12(9): 5955–5970. 2011.
- ESPAENET. [Base de dados – Internet]. **European Patent Office**, 2016. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com>> Acesso em 06 de mai. 2016.
- FANG, B.; HONG, Q.; PING M.; LILI, Z.; KYUNG-CHUL, Y.; STEPHEN C. P. An Immunoprotective Privilege of Corneal Epithelial Stem Cells Against Th17 Inflammatory Stress by Producing Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor. **Stem Cells.** Volume 28, 2172–2181, 2010.

- FERRÃO, J. E. M., Ferrão, A. M. B. C. & Patrício, M. T. S. Purgueira da Ilha do Fogo. Composição da semente, algumas características da gordura, **Garcia da Orta: Série de Estudos Agronômicos**, Brasil, s.n., p. 175-178, 1983.
- FIELD, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New Insights into Neuron-Glia Communication. **Science**, v.298, p. 556 – 562, 2002.
- FLODEN, A M.; COMBS, C. K. Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. *Journal of neuroscience methods*, 164, p. 218-224, 2007.
- FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potencial and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, Hoboken, v. 29, p. 12-24, 2005.
- FRIGO, M. S. et al. Análise energética do primeiro ano de cultivo do pinhão manso em sistema irrigado por gotejamento. *Irriga*, **Jaboticabal**, 13, p.261-271, 2008.
- GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Toxicological studies on ratanjyot oil. **Food and Chemical Toxicology**. v.33, p.39-42, 1995.
- GEHRMANN, J.; BANATI, R. B.; CUZNER, M. L.; KREUTZBERG, G. W.; NEWCOMBE, J. Amyloid precursor protein (APP) expression in multiple sclerosis lesions. **Glia**. 15(2):141-51. 1995.
- GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**. 140(6): 918–934. 2010.
- GLEZER, I.; SIMARD, A. R.; RIVEST, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. **Neuroscience**, 147, 867-883, 2007.
- GONÇALVES, S. B., MENDONÇA, S., LAVIOLA, B. G. Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no Pinhão Manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio. Circular Técnica EMBRAPA **Agroenergia**, pp. 1-5, 2009.
- GOONASEKERA, M. M.; GUNAWARDANA, V. K.; JAYASENA, K.; MOHAMMED, S. G.; BALASUBRAMANIAM, S. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats, **J Ethnopharmacol.**, 47(3):117-23, 1995.
- GHOSH, S., HAYDEN, M.S. New regulators of NFkappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, 11, 837-848, 2008.
- HAAS, B.; SCHIPKE, C. G; PETERS, O.; SÖHL, G., WILLECKE, K.; KETTENMANN H. Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. **Cereb Cortex**. (2):237-46. 2006.
- HANISCH, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40, p. 140-155.
- HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*.119(2):203-10. 1989.

- HELLER, J. *Physic nut. Jatropha curcas L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.* 1 ed. **Roma: IPGRI**, 66, 1996.
- HENN, A.; LUND, S.; HEDTJÄRN, M.; SCHRATTENHOLZ, A.; PÖRZGEN, P. et al. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* 26: 83–94, 2009.
- HERBER, D. L.; MALONEY, J. L., ROTH, L. M.; FREEMAN, M. J.; MORGAN, D.; GORDON, M. N. Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharide. *Glia.* 53: p. 382-391, 2006.
- HIRANO, T.; ARIMITSU, J.; HIGA, S.; NAKA, T.; OGATA, A.; SHIMA, Y.; FUJIMOTO, M.; YAMADORI, T.; OHKAWARA, T.; KUWABARA, Y.; KAWAI, M.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Luteolin, a flavonoid, inhibits CD40 ligand expression by activated human basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 40:150–6, 2006.
- JANA M, ANDERSON JA, SAHA RN, LIU X, PAHAN K. Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free. Radic. Biol. Med.* 38: 655–664. 2005.
- KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 18: 621-663. 2000.
- KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF κ B activity. *Annu Ver Immunol*, 18:621-663. 2000.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, 21, 317-337, (2009)
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816-82, 2006.
- KIM J.H, CHOI JS, LEE B. H. PI3K/Akt and MAPK pathways evoke activation of FoxO transcription factor to undergo neuronal apoptosis in brain of the silkworm BOMBYX MORI (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE). *Cell Mol Biol.* 58: OL1780-5, 2005.
- KOEHLER, R. C; GEBREMEDHIN, D.; HARDER, D. R. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol.* 100:307-317, 2006.
- LARSSON, O. M; Gram, L; Schousboe, I; Schousboe, A. Differential effect of gamma-vinyl GABA and valproate on GABA-transaminase from cultured neurones and astrocytes. *Neuropharmacology.* 25: 617–625. 1986.
- LEE, S. C; DICKSON, D. W.; LIU, W.; BROSNAN, C. F.; Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol*, 46:19-24. 1993.
- LENT, R.; UZIEL, D.; BAUDRIMONT, M.; FALLET, C. Cellular and molecular tunnels surrounding the forebrain commissures of human fetuses. *J Comp Neurol.* 21;483(4):375-82, 2005.

- LENT, R.; UZIEL, D.; FURTADO, D. A. **Neurônios**. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole, p. 232-234. 2005.
- LEONID, T.; HYEON-SOOK S.; SUNHEE, C. L. LPS AND IL-1 DIFFERENTIALLY ACTIVATE MOUSE AND HUMAN ASTROCYTES: ROLE OF CD14. **GLIA**. 62(6): 999–1013, 2014.
- LI, X.; CHIKAKO, S.; RYOJI, I. Stem cell therapy for central nerve system injuries: glial cells hold the key. **Neural Regen Res**. 9(13): 1253–1260, 2014.
- LIBERALINO, A. A. A.; BAMBIRRA, E. A.; MORAES-SANTOS, T.; VIEIRA, C. E. *Jatropha curcas* L. Seed. Chemical analysis and toxicity. Arquivos de. **Biologia e Tecnologia** v.31, p.539-550, 1988.
- LIMA, F. R.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; NETO, V. M.; MALLAT, M. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. **J Neurosci**. 21, 2028-38. 2001.
- LIU, S. Y.; SPORER, F.; WINK, M.; JOURDANE, J.; HENNING, R.; LI, Y.L.; RUPPEL, A. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*, **Trop. Med. Int. Health**. 2(2):179-88. 1997.
- LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**. (2):145-51. 2008.
- LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytocine**. 42: 145-151. 2008.
- LUAN, P. D.; JULIANA, C. A.; VANESSA, T.; CHARLES V. L. et al., Astrocyte-induced Synaptogenesis Is Mediated by Transforming Growth Factor β Signaling through Modulation of D-Serine Levels in Cerebral Cortex Neurons **J Biol Chem**. 287(49): 41432–41445, 2012.
- LULL, M. E.; BLOCK, M. L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics**. (4):354-65. 2010.
- MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factory Food. **Chem**. v. 62, 207-2015, 1998.
- MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature clinical practice*. **Neurology**, 2(12), p. 679-689, 2006.
- MARTINS M. D. ; MARQUES, M. M. ; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; PAVESI, V. C. S.; WADT, N. S.; FERNANDES, K. P. CITOTOXICIDADE in

vitro de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). Con **Scientiae Saúde**, vol. 8, núm. 1, p. 99-104, 2009.

MARTINS, E. R. F., CRUZ, N. D. Pesquisas em desenvolvimento com pinhão-paraguaio no Instituto Agronômico. **O Agrônomo**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 109-113, 1985.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2 ed. Fortaleza: **Edições UFC**, 1997.

MCMAHON, J. M.; WHITE, W. L.B. ; SAYRE, R. T. Review Article: Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **J Exp Bot** 46 (7): p.731-741, 1995.

MEFFERT, M.K., Baltimore, D. Physiological functions for brain NF- κ B. **TRENDS in Neurosciences**. 28: 27–43, 2005.

MEMET, S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. **Biochem Pharmacol**, 72: 1180–1195. 2006.

MIZUSHIMA, N. Autophagy : process and function. **Genes & development**. v. 21, n. 22, 2861– 2873, 2007.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**. (2):240-73. 2009.

MOLOFSKY AV, KRECIK R, ULLIAN EM, TSAI HH, DENEEN B, RICHARDSON WD, BARRES BA, ROWITCH DH. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. **Genes & development**. 26:891–907. 2012

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. EMBRIOLOGIA CLÍNICA 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

MOREST, D. K.; SILVER, J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? **Glia**. Jul;43(1):6-18. 2003.

MOREST, D.K.; SILVER, J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going?. **Glia**. v.43, p.6-18, 2003.

MUANZA D. N. et. al. Screening for antitumor and anti-HIV activities or nine medicinal plants from Zaire, **Int J Pharmacol**. 33:98, 1995.

MUCKE, L.; EDDLESTON, M. Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. **FASEB J** 7: 1226–1232. 1993.

MUJUMDAR, A. M; MISAR, A.V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats, **J. Ethnopharmacol**, 90(1):11-5, 2004.

MUJUMDAR, A.M; MISAR, A.V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats, **J. Ethnopharmacol**, 90(1):11-5, 2004.

MUJUMDAR, A.M; MISAR, A.V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats, **J. Ethnopharmacol**. 90(1):11-5, 2004.

- MÜNCH, E. D. Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.) - Botanik, Ökologie, Anbau. Diploma thesis. University Hohenheim, Stuttgart. 1986.
- MYER, D. J, GURKOFF, G. G.; LEE, S. M; HOVDA, D. A.; SOFRONIEW, M. V. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**. 129: 2761–72, 2006.
- NEVES, E. L.; FUNCH, L. S.; VIANA, B. F. Comportamento fenológico de três espécies de *Jatropha*. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 3, n. 1, p. 155 - 166, 2010.
- NITIN, C.; AMIT, K. TYAGI, P. K.; ANUSHREE, M. Antibacterial Potential of *Jatropha curcas* Synthesized Silver Nanoparticles against Food Borne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**. V.7 Art. 1748, 2016
- NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; DOS SANTOS, D. N. Different supplements for in vitro embryo culture of physic nut. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. 43, p.9-14, 2008.
- NUNES, C.F. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Lavras, p78, 2007.
- OCHOA-CORTES, F. TURCO, F. LINAN-RICO, A.; SOGHOMONYAN S.; , WHITAKER, E.; WEHNER, S.; CUOMO, R. CHRISTOFI F. L. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis**. (2): p. 433–449, 2016.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass & Bioenergy*, **Silver Spring**, n. 19, p. 1-15, 2000.
- OSKOEIAN E, ABDULLAH N, SAAD WZ, OMAR AR, AHMAD S, KUAN WB, ZOLKIFLI NA, HENDRA R, HO YW. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. **J Med Plants Res**.;5:49–57. 2011.
- OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 101-105, 2003.
- OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**. 89, 101-105, 2003.
- OTHMAN, A. R. et al. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 11. 2015.
- OTHMAN, A. R. et al. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complement Altern Med**. v. 15, p. 11. 2015.
- PARPURA, V.; HENEKA, M. T.; MONTANA, V.; OLIET, S. H.; SCHOUSBOE, A.; HAYDON P. G.; STOUT, R. F. JR.; SPRAY, D. C. REICHENBACH, A. PANNICKE, T.; PEKNY, M. PEKNA, M.; ZOREC R.; VERKHRATSKY, A. Glial cells in (patho) physiology. **J Neurochem**. (1):4-27. 2012.

- PATRICK, M. B.; KURT, F. H. Glial Modulators as Potential Treatments of Psychostimulant Abuse. **Adv Pharmacol.** 69: 1–69. 2014.
- PEIXOTO, A.R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo: **Nobel**, p284, 1973.
- PEKNEY, M., WILHELMSSON, U., PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neurosci Lett** 565, 30-38. 2014.
- PÉREZ, S. C. J. G. A. Envoltórios. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 125-134, 2004.
- PERRY, V. H.; HOLMES, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol.** (4):217-24. 2014.
- PERRY, V.; BELL, M.; BROWN, H.; MATYSZAK, M. Inflammation in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 636–641, 1995.
- PETER, J.; TOMAS, G.; VICTORIA, G.; CHEN G. Astrocytes differentially respond to inflammatory autoimmune insults and imbalances of neural activity. **Acta Neuropathol Commun.** 1: 70, 2013.
- PINTO, T. L. F.; FILHO, J.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 195-2001, 2009.
- PINTO, T. L.; FILHO, J. M.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F. G. PIOCORRÊA M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura** - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal v.5, p.485. 1984.
- PIOCORRÊA M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura** - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal v.5, p.485, 1984.
- RAHUMAN, A. A.; GOPALAKRISHNAN G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. PARASITOL RES. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (**Diptera: Culicidae**). 102(5):867-73. 2007.
- RAHUMAN, A.A.; GOPALAKRISHNAN, G.; VENKATESAN, P; GEETHA, K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), **Parasitol. Res.**, 102(5):867- 73, 2008.
- RAJU, I.; MONI, M.; SUBRAMANIAN, GEHRMANN. Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* root extract. **Journal of Ethnopharmacology.** 103 p.478–480, 2006.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: Farmacologia, 5º ed., **Elsevier**, Rio de Janeiro, p 246 – 274. 2003.
- RANSOHOFF R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol.** 27:119-45. 2009.

- RANSOHOFF, R. M.; CARDONA, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**. 468(7321):253-62. 2010.
- RAU, O.; WURGLICS, M.; DINGERMAN, T.; ABDEL-TAWAB, M & SCHUBERTZSILAVECZ, M. Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor, **Pharmazie**. 61(11):952-6, 2006.
- REICHENBACH, A.; WOLBURG, H. Astrocytes and ependymal glia. In: Parpura A, Haydon P, editors. Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system. New York: **Springer**; p. 19–33, 2009.
- REZAI-ZADEH K.; EHRHART J.; YUN B.; SANBERG, P. R.; BICKFORD, P.; JUN T.; . SHYTLE, R. D. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. **J Neuroinflammation**. 5: 41, 2008.
- ROUACH, N. et al. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*, v.5, 322, n.5907, p.1551-5, 2008.
- RUG, M & RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes, **Trop. Med. Int. Health**, 5(6):423-30, 2000.
- SAIJO, K.; CROTTI, A.; GLASS, C. K. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. **Glia**. 61(1):104-11, 2013.
- SALAS, J.; TELLO, V.; ZAVALETA, A.; VILLEGAS, L.; SALAS, M.; FERNÁNDEZ, I.; VAISBERG, A., Cicatrization effect of *Jatropha curcas* latex (Angiospermae: Euforbiaceae), **Rev Biol Trop**. 42(1-2):323-6. 1994.
- SALTER, M. W.; BEGGS, S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. **Cell**. 158(1):15-24, 2014.
- SALVEMINI D, MOLLACE V, PISTELLI A, ANGGARD E, VANE J: Cultured astrocytoma cells generate a nitric oxide-like factor from endogenous L-arginine and glyceryl trinitrate: effect of *E. coli* lipopolysaccharide. **Br J Pharmacol** 106:931-936, 1992.
- SANJAY, M.; DREW, F.; GARRETT, B.; ALBERTO S.; CARLOS L. Coincident Generation of Pyramidal Neurons and Protoplasmic Astrocytes in Neocortical Columns **J Neurosci**. Apr 4; 32(14): 4762–4772. 2012.
- SANTOS, E. M. Florística Etnobotânica e Tipagem Fitoquímica de espécies medicinais de uso popular nos cerrados dos municípios de Caxias e Timon, Maranhão. Seminário de Iniciação Científica da **UEMA**, 2002.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES CM. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da **UFRGS**; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- SATURNINO, H. M. et al. Cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). Informe Agropecuário, **Belo Horizonte**. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

- SATURNINO, H. M. *et al.* Implantação de unidades de validação de tecnologia pinhão-manso. Nova Porteirinha, 2006. 5 p. Projeto de Pesquisa, Centro Tecnológico do Norte de Minas Gerais, **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, Nova Porteirinha, 2006.
- SCARPA, A. GUERCI, A. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.) a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v 5 p.117 – 137, 1982.
- SCHIPKE, C. G.; OHLEMEYER, C. MATYASH, M.; NOLTE, C.; KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. **FASEB J.** 15(7):1270-2. 2001.
- SCHVARTSMAN S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. São Paulo: **Sarvie** 1992.
- SEVERINO, L. S.; MORAES, C. R. DE A.; GONDIM, T. M. DE S.; Cardoso, G. D.; Beltrão, N. E. de M. Crescimento e produtividade da mamoneira influenciada por plantio em diferentes espaçamentos entre linhas. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, p.50-54, 2006.
- SEVERINO, L. S.; MORAES, C. R. DE A.; GONDIM, T. M. DE S.; Cardoso, G. D.; Beltrão, N. E. de M. Crescimento e produtividade da mamoneira influenciada por plantio em diferentes espaçamentos entre linhas. **Revista Ciência Agronômica**. v.37, p.50-54, 2006.
- SHETTY, S.; UDUPA, S. L.; UDUPA, A. L.; VOLLALA, V. R., Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats, **Saudi Med. J.**, 27(10):1473-6. 2006.
- SHETTY, S.; UDUPA, S.L.; UDUPA, A. L.; VOLLALA, V. R. Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats, **Saudi Med. J.** 27(10):1473-6, 2006.
- SHETTY, S.; UDUPA, S.L.; UDUPA, A.L & VOLLALA, V.R. Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats, **Saudi Med. J.**, 27(10):1473-6, 2006.
- SHIH-HENG, C.; ESTEBAN, A.; OYARZABAL, Y. S.; CHUN-HSIEN, C. QINGSHAN, W.; SHIOU-LAN C.; RU-BAND, L.; JAU-SHYONG H. Microglial Regulation of Immunological and Neuroprotective Functions of Astroglia. **Glia**. Jan; 63(1): 118–131. 2015.
- SILVA. Euphorbiaceae da Caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso. 132p. **Tese de Doutorado-Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo. 1998.
- SIMÕES, C. M. O. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.
- SIMÕES, C. M. O. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.
- SOFRONIEW M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** 119(1):7-35. 2010.

- SOFRONIEW, M.V; VINTERS, H. V; Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119:7–35, 2010.
- SOLÀ C¹, CASAL C, TUSELL JM, SERRATOSA J. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. *Eur J Neurosci.* 16(7):1275-83, 2002.
- SOPHIE, L. ; CHARLOTTE, A.; DENES, A.; NILSSON, O.; MAYSAMI, S. BOWIE. A. ET AL. Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration *in vitro*. *J Neuroinflammation.* 9: 230, 2012
- STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. (Org.). *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy.* Springer, v.1, p.145-164, 2010.
- STOJKOVSKA, I.; WAGNER, B. M.; MORRISON, B. E. Parkinson's disease and enhanced inflammatory response. *Exp Biol Med* (Maywood). 240(11):1387-95, 2015.
- STREIT, W. J.; MRAK, R. E. GRIFFIN WS: Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation.* 1:14, 2004.
- STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNEL, N.A. Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology*, v.57, p.563 -581, 1999.
- TEELING, J. L; PERRY, V. H. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience.* 158:1062–1073. 2009.
- TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*, v. 26, n. 229, p. 8-27, 2005.
- THOMAS, O. O. Re-examination of the antimicrobial activities of *Xylopiya aethiopica*, *Carica papaya*, *Ocimum gratissimum* and *Jatropha curcas*. *Fitoterapia*, v. 60, n. 2, p.147-155, 1989.
- TOMINAGA, N.; KAKIDA, J.; YASUDA, E.K.; SOUSA, L.A.S.; RESENDE, P.L.; SILVA, N. D. Cultivo do pinhão-mansão para produção de biodiesel. Viçosa-MG, Centro de Produções Técnicas - CPT, p.220, 2007.
- VALLADA, E. P. Atheneu,. *Manual de Técnicas Hematológicas* (São Paulo [s.n.]). ISBN 85-7379-136-5. 1999.
- VELIER JJ¹, ELLISON JA, KIKLY KK, SPERA PA, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci.* 19(14):5932-41. 1999.
- VERGARA, D., MARTIGNAGO, R., BONSEGNA, S., DE NUCCIO, F., SANTINO, A., NICOLARDI, G. AND MAFFIA, M. IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol*, 221, 115-120, 2010.

- VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 37, p. 17-21. 2005.
- VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.6, n.8, p.626-40, 2005.
- WALZ W. Role of Glial-Cells in the Regulation of the Brain Ion Microenvironment. **Progress in Neurobiology**. 33:309–333. 1989.
- WANG Z, LI D, LIANG Y, WANG D, CAI N. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release. **Acta Pharmacol Sin.** 23(11):974–80. 2002.
- WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae, *Annals of Missouri Botanical Garden* 81: 3-32. 1994b.
- WESTER GAARD N, SONNEWALD U, SCHOUSBOE A. Metabolic Trafficking between Neurons and Astrocytes - the Glutamate Glutamine Cycle Revisited. **Dev Neurosci-Basel**. 17:203–211. 1995.
- WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. **American Journal of Botany** 92(8): 1397-1420, 2005.
- WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. **Neuron**. 35, n. 3, p. 419-32. 2002.
- YUNES RA, CALIXTO J. B. Plantas medicinais - sob a ótica da **química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001.

8. ANEXO

8.1 Artigos científicos publicados diretamente relacionados à tese

Artigo Científico II

Cad. Prospec., Salvador, v. 8, n. 1, p. 64-73, jan./mar. 2015

D.O.I.: 10.9771/S.CPROSP.2015.008.008

EVOLUÇÃO TECNOLÓGICA DAS DIVERSAS UTILIZAÇÕES DA *JATROPHA CURCAS* L.

Eduardo Muniz Santana Bastos¹; Vitor Hugo Moreau da Cunha¹

¹Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil.
(eduardomunizm@hotmail.com).

Rec.: 05.07.2014. Ace.: 08.03.2015

RESUMO

A *Jatropha curcas* L., planta oleaginosa, arbustiva, das Euforbiáceas, conhecida popularmente como pinhão-mansão, é apontada como uma alternativa para a produção de biodiesel pelo alto teor de óleo, possibilidade de cultivo em ambientes desfavoráveis e por não competir com a indústria alimentícia. Além disso, pesquisas mostram atividades farmacológicas relevantes como cicatrizante; hipoglicemiante; hemostático; anticancerígeno e antimicrobiano. O presente artigo objetiva ao estudo de prospecção tecnológica relacionada à *Jatropha curcas* L. O delineamento experimental realizou-se ao escopo estratégico por palavras-chave através da pesquisa avançada no site Espacenet®. A pesquisa resultou em 189 tecnologias protegidas por diferentes países, ano de registro, inventores e código internacional de patentes no período de 1983 a 2012. Nesta perspectiva, foi possível verificar que países investem em biotecnologia, no que diz respeito à *Jatropha curcas* L., pois o vegetal apresenta infinitas de utilizações importantes de cunho científico a ser explorado.

Palavras Chave: *Jatropha curcas* L.; patentes e prospecto.

ABSTRACT

Jatropha curcas L., oil seed plant, shrub, popularly known as the Euphorbiaceae, “pinhão manso”, is considered an alternative for the production of biodiesel by high oil content, the possibility of growing in harsh environments and not compete with the food industry. Furthermore, research shows relevant pharmacological activities such as healing; hypoglycemic; hemostatic; anticancer and antimicrobial. This article aims to study technological forecasting related to *Jatropha curcas* L. The experiment took place at the strategic scope for

keywords through advanced research in Espacenet® site. The re-search resulted in 189 different countries protected, year of registration, inventors and international code of patents in the period 1983-2012 technologies. Accordingly, we found that countries invest in biotechnology, with regard to *Jatropha curcas* L., because the plant has myriad of important uses of a scientific nature to be explored.

Keywords: *Jatropha curcas* L.; patents and prospectuses.

Área tecnológica: Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

Plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados ao longo da história da humanidade (LACERDA, 2008). Seu uso surge a partir da própria necessidade humana e vem sendo praticado e transmitido de gerações em gerações (LORENZI e MATOS, 2002). As plantas não apenas proporcionam alimentos saborosos, mas também toda a classe de remédios para a recuperação ou conservação da saúde (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta fundamentalmente influência da cultura indígena, africana e, naturalmente, européia (DEAN, 1996). No entanto, milhares de plantas medicinais ainda não foram estudadas cientificamente do ponto de vista farmacológico, biológico ou clínico (YUNES; CALIXTO, 2001). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com êxito baseadas principalmente nas propriedades antimicrobiana, antiinflamatórias, cicatrizante, hipoglicemiante, hemostático, larvicida e anticancerígeno de plantas conhecidas na terapêutica popular (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, o uso não racional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas de micro-organismo multirresistentes a drogas, impulsionando à comunidade científica à pesquisa de plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções que contribuem para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (FENNER *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003). Entre as numerosas espécies que fazem parte do arsenal de plantas com propriedades terapêuticas, encontra-se o *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso). Espécie da família das Euforbiáceas, encontrada no mundo em toda região tropical como arbustos e como cercas vivas, sendo que, sua utilização principal relatada tem sido a partir das sementes, pois estas contêm grande quantidade de óleo armazenado (SEVERINO *et al.*, 2006).

A *Jatropha curcas* L. (pinhão manso) é uma oleaginosa que está sendo cogitada, potencialmente, como fonte de óleo para a produção de biodiesel, contribuindo no aspecto industrial, econômico, ambiental e social no mundo atual (BERCHMANS e HIRATA, 2008). Além disso, o pinhão-manso é muito empregado pela cultura popular no tratamento de várias doenças e possui algumas de suas atividades farmacológicas comprovadas em estudos laboratoriais (SANTOS *et al.*, 1999). Em pesquisas são relatadas a importância do látex de pinhão-manso na terapêutica como hemostático (OSONIYI e ONAJOBI, 2003); o extrato bruto alcoólico de frutos é relatado como cicatrizante (SHETTY *et al.*, 2006); e como hipoglicemiante (RAU *et al.*, 2006); a curcina, proteína tóxica presente principalmente nas sementes, tem sido relatada como agente antitumoral (MUANGMAN *et al.*, 2005) e antibacteriana (BINTENCOURT *et al.*, 2011).

O presente trabalho objetiva através da prospecção tecnológica, avaliar a evolução anual de depósitos de patentes relacionados às diversas utilizações do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) por países, inventores independentes, academia e empresa de maior relevância, e classificação por códigos internacional de patentes no banco de dados de patentes europeu (Espacenet®).

METODOLOGIA

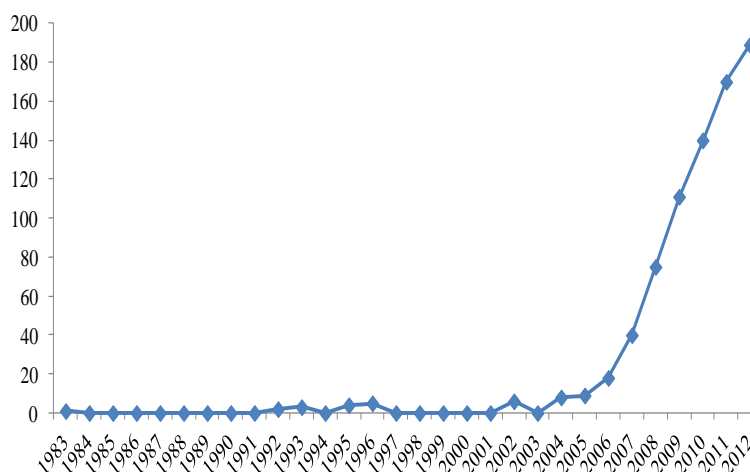
O estudo por documentos de patentes referentes às diversas utilizações da planta *Jatropha curcas* L. (Pinhão-manso) realizou-se pelo o escopo estratégico contendo palavras chaves através da pesquisa avançada no site Espacenet®. A pesquisa propriamente dita resultou em 189 tecnologias protegidas por diferentes países, ano de registro, inventores e código internacional de patentes. A base de dados escolhida para analisar os códigos foi a *International Patent Classification* (IPC), banco de dados mundial de acesso livre. A pesquisa por códigos de patentes revelou-se imprópria, pois não destacava o assunto especificamente *Jatropha curcas* excluindo patentes de interesse. Dessa forma, foi seguida a estratégia *Jatropha* and curcas* no resumo ou no título.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação realizou-se, a partir, do banco de dados de patentes europeu (Espacenet®), apresentou uma variedade de registros de documentos de patentes sugestiva a diversas utilizações da espécie *Jatropha curcas* L. No entanto, todos os documentos de patentes obtidos a partir desta base de dados não garantem o direito de exclusividade aos inventores em outros países não sendo de origem, pois o direito da propriedade intelectual refere-se apenas a nação onde ocorreu o registro da patente.

O primeiro documento de patente analisado é datado em 13 de dezembro de 1983 pela Austrália e tem como inventor tecnológico a empresa YUKO CHEMICAL CO LTD: “*Jatropha curcas*oil for use with gasoline and diesel”. O total de registros de documentos de patentes avaliados por distribuição anual pelo estudo soma um total de 189 patentes depositadas entre 1983 a 2012, evidenciada pela evolução acumulativa de patentes pela Figura 1. Durante este período, especificamente entre o ano de 2008 e o ano de 2009 ocorreu um aumento considerável no depósito de patentes relacionado ao pinhão-manso, representada pela Figura 2. Em 2008, ano Internacional do planeta Terra, de acordo com Organização das Nações Unidas (ONU). Em 2009, iniciava-se o incentivo de políticas na defesa da biodiversidade global. Neste período, apresentou maior número de depositadas, (70) patentes no total. Destas patentes, a China registrou (45) documentos de patentes, enquanto os Estados Unidos depositou (8) documentos, a Índia registrou (6), México (3) registros de patentes, o Japão (2) patentes, a Colômbia com (2) registros e a França, União de países da Europa, Grã-Bretânia e Malásia apresentaram apenas (1) depósito cada país do total desses documentos.

Figura 1: Evolução anual acumulativa do depósito de patentes relacionada as diversas utilizações do *J. curcas* L. no mundo na Base de dados Europeia.



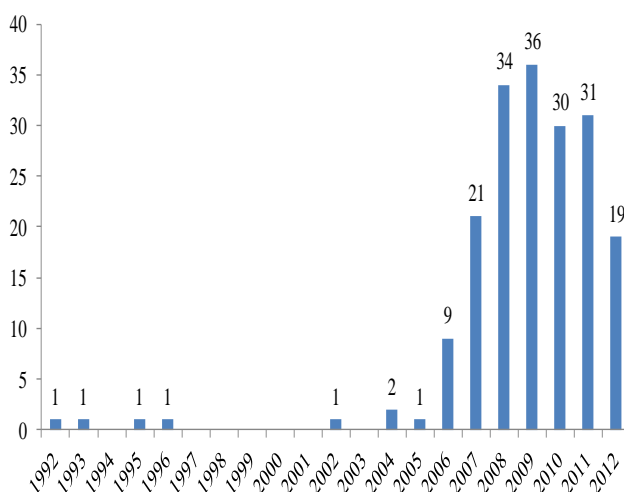
Fonte: Autoria própria, 2014.

Ao analisar a Figura 2, é possível verificar que nos anos de 2005 a 2007, houve uma evolução pela China com (21) documentos e a Índia com (8) registros de patente. Neste momento, coincide com a investida dos Estados Unidos na produção de biodiesel, a partir, de óleos e gorduras derivados de fontes animais e vegetais. O governo americano incentivou acréscimo do biodiesel, a partir de gordura vegetal especificamente, em 2% ao diesel derivado do petróleo. Isso se refere, ao cenário de evolução do preço do petróleo considerado no Plano Nacional de Energia (PNE 2030) ao acréscimo da necessidade mundial de derivados principalmente pela China e Estados Unidos.

Além disso, a utilização do biodiesel vem como uma resposta global aos potenciais efeitos das emissões de derivados de petróleo e a formação de preços de petróleo nos mercados futuros (KNOTHE et. al., 2006). Nesta ocasião, no Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), órgão regulamentador de derivados de petróleo e combustíveis no Brasil, determinou que o biodiesel fosse utilizado de forma facultativa misturado ao óleo diesel na proporção máxima de 2% de biodiesel para 98% de diesel, formando o chamado combustível B2. Sua adição ao óleo diesel nesta proporção passou a ser obrigatória em janeiro de 2008 (CNPE, 2008).

Em 2009, apresentou-se como ano de maior depósito de patentes com um total de (36) documentos. Sendo que, a China registrou (22) patentes, os Estados Unidos (4) e a Índia também (5), União de Países da Europa, Japão e Malásia apresentaram (1) único depósito de patente cada. Neste mesmo ano de 2009 foi considerado o ano das fibras naturais e iniciava-se o período mundial da defesa da biodiversidade, considerada pela Organização das Nações Unidas (ONU).

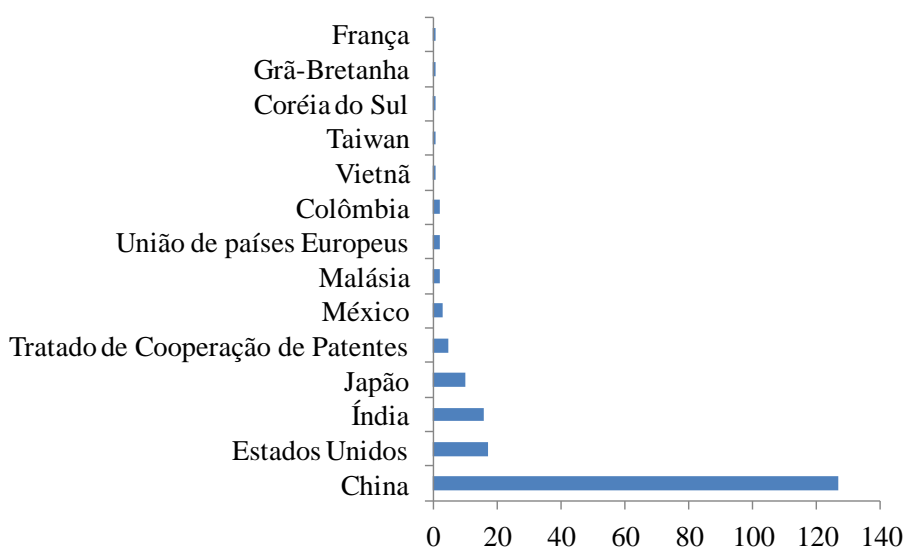
Figura 2: Evolução anual do depósito de patentes relacionada à *Jatropha curcas L.* no mundo na Base de dados Europeia.



Fonte: Autorial própria, 2014.

De acordo com o tema pesquisado, a China, Estados Unidos Índia e Japão são os grandes depositantes de patentes, no que diz respeito, à espécie vegetal *Jatropha curcas* L., que apresentaram 126, 17, 16, e 10 depósitos de patentes respectivamente de (Figura 3). Sem deixar de ressaltar, o Brasil, apesar de possuir dimensões continentais e clima propício para o cultivo do pinhão-manso, resultados apresentados, não foram identificados nenhum depósito de patente na base de dados Europeia.

Figura 3: Distribuição de depósitos por país de origem da tecnologia



Fonte: Autoria própria, 2014.

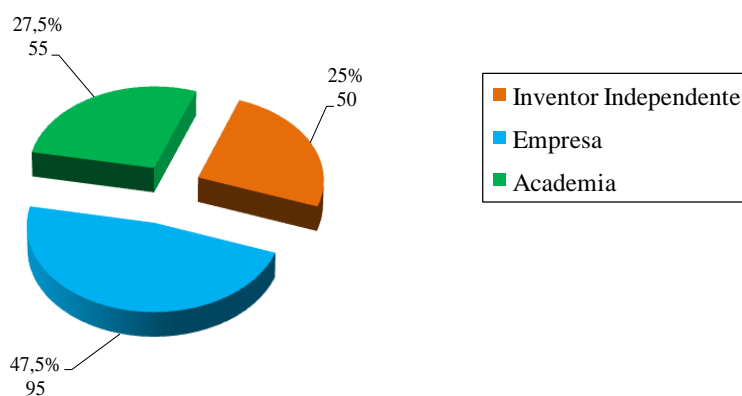
O número de patentes depositadas pela China (126) é maior que o número de patentes depositadas por todos os países juntos, que somadas representam apenas (63) patentes registradas (Figura 3). A partir desses resultados por países de maior relevância é possível evidenciar que (67%) dos documentos encontrados foram depositadas pela China, pelo Estados Unidos (9%), pela Índia (8%), o Japão, (5%), pelo tratado de cooperação de Patentes (2,7%), México (1,6%) e outros países apresentaram igual ou inferior a 1,2%.

A busca por depositantes de patentes no banco de dados Espacenet® resultou em três classificações tais como: Empresa, Academia e Inventor independente. As Empresas foram os maiores possuidores de depósitos de patentes com 47,5% dos documentos armazenados, seguido pela Academia com 27,5% e por último os inventores independentes com apenas 25% dos documentos depositados como segue na Figura 4.

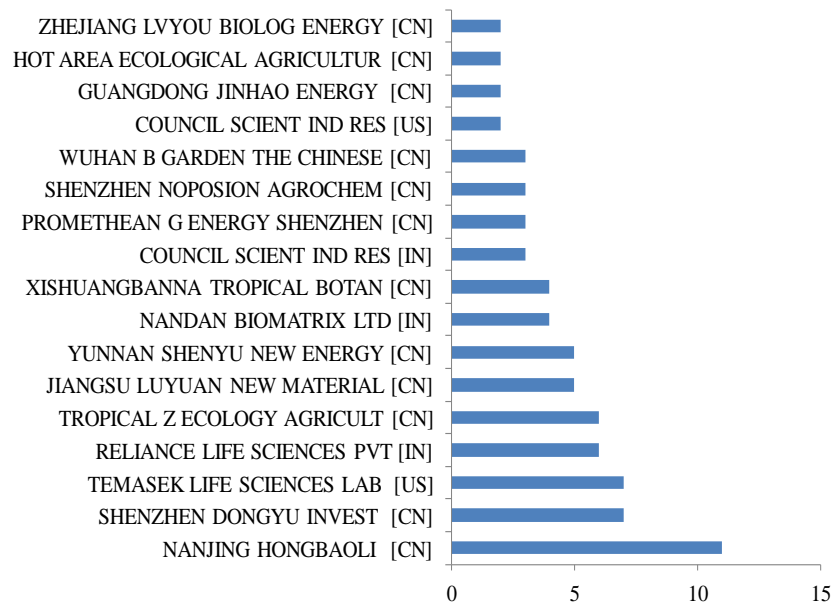
A empresa NANJING HONGBAOLI LTD da China apresentou maior número de depósitos de patentes com foco no desenvolvimento de competências na área de biotecnologia (Alimentos, produtos alimentícios, remoção de material indesejado, por ex., desodorização, desintoxicação, Forragem a partir de leveduras, Microrganismos ou enzimas, Horticultura, Florestamento e Irrigação), totalizando seis patentes registradas, sendo que, três foram depositadas no ano de 2007, duas patentes no ano de 2009 e uma em 2010. A empresa chinesa SHENZHEN DONGYU INVEST e empresa TEMASEK LIFE SCIENCES LAB dos Estados Unidos, ambas apresentaram em segundo lugar com (7) patentes registradas no Espacenet. No entanto, a China apresentou mais participações de empresas depositantes de patentes, totalizando 20 participações (Figura 5).

Entre os inventores independentes que mais produziram documentos de patentes destacam-se a Índia (BHAVANASI JAYKUMAR) com (4) patentes e a (KARANAM K. RAO) com 3 patentes, e logo atrás os Estados Unidos (CREA ROBERTO) com a participação de (2) documentos de patentes registrados. Todos os outros inventores depositantes apresentaram (1) único registro (Figura 6).

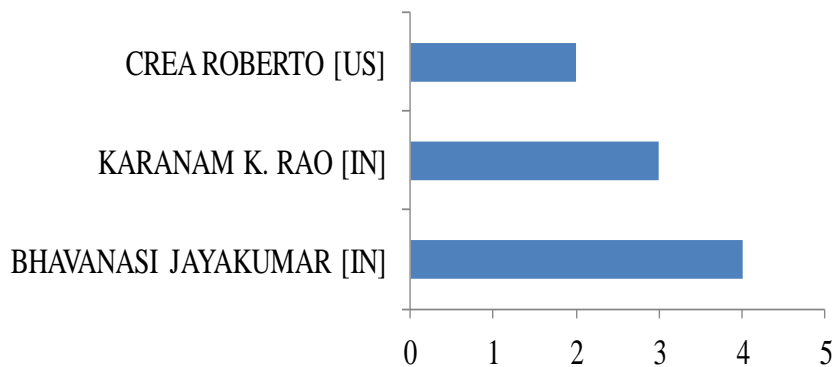
Figura 4: Distribuição de patentes por tipo de instituição



Fonte: Autoria própria, 2014.

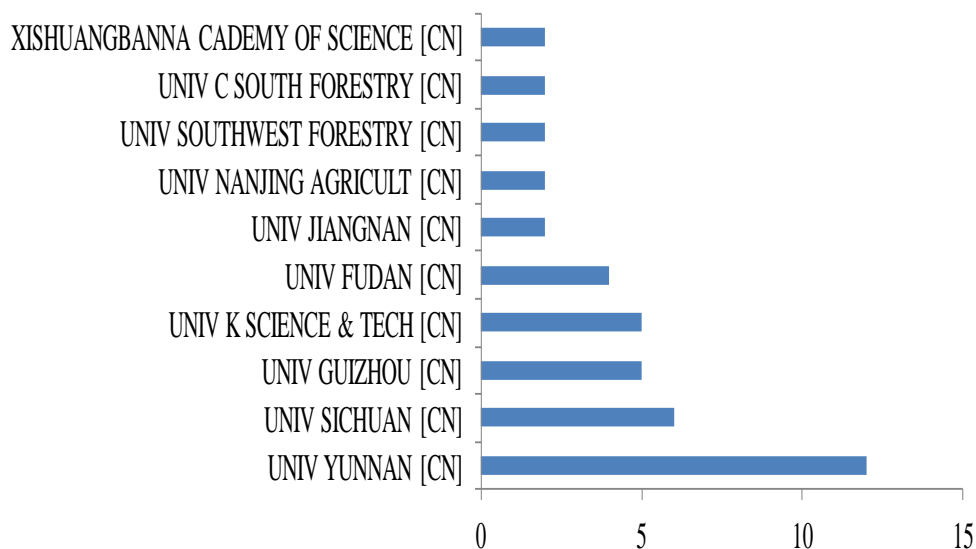
Figura 5: Número de patentes por empresas depositantes de maior relevância

Fonte: Autoria própria, 2014.

Figura 6: Número de patentes por inventores

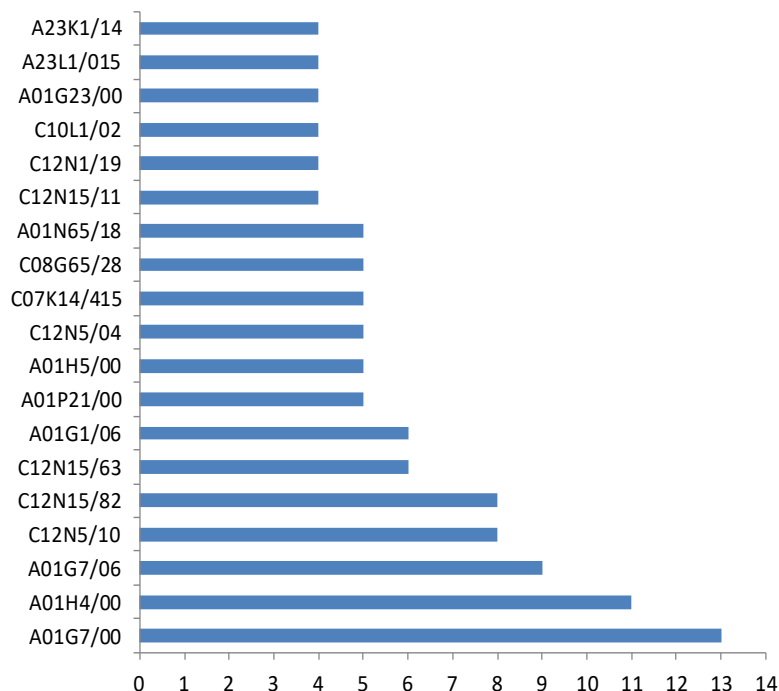
Fonte: Autoria própria, 2014.

Quanto à academia, a China apresentou como sendo a nação com maior investida no depósito de patentes totalizando em (52) documentos registrados, sendo que a UNIVERSITY YUNNAN apresentou o maior número de patentes no total de (12) documentos (Figura 7).

Figura 7: Número de patentes por Academia depositante.

Fonte: Autoria própria, 2014.

O código de patente mais utilizado por inventor independente, academia e empresas (Figura 8), foi o código A01G1/00 no registro de (13) documentos no total que de acordo com o código internacional de patentes refere-se a horticultura, cultura de vegetais; florestamento, irrigação. O código A01H4/00, Plantas novas ou processos para obtê-las; Reprodução de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos apresentou também com bastante evidência (11) registros no total. Outras áreas de atuação por inventores foram C12N5/10 (Micro-organismos ou enzimas, Suas composições; Propagação, preservação, ou manutenção de micro-organismos ou tecido, engenharia genética ou de mutações, Meios de cultura); O C07K14/415 referi-se a utilização de peptídeos; Já o código C08G65/28, representa a chave para busca de tema como: compostos macromoleculares obtidos por outras reações que não as que compreendem ligações insaturadas carbono-carbono. C10L1/02 Combustíveis; Gás natural; Gás liquefeito de petróleo; Adição de substâncias a combustíveis ou ao fogo para reduzir fumaça ou depósitos indesejáveis ou para facilitar a remoção de fuligem; Acendedores de fogo.

Figura 8: Código internacional de patentes mais relevantes

Fonte: Autoria própria, 2014.

A partir da análise dos códigos de maior relevância verificou-se, que a maioria das patentes (53) no total tratam de metodologias referentes ao melhoramento do cultivo da *Jatropha curcas* L. seguido do uso de óleo para a produção de biocombustível (biodiesel). Assim, não houve registro de documentos de patentes com o propósito de atividade farmacológica como: ação anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante entre outros aspectos importantes, apesar de existir registros em artigos científicos sobre estes assuntos (SHETTY et al., 2006; YUNES e CALIXTO, 2001).

CONCLUSÃO

No emprego das patentes depositadas na base de dados (Espacenet®) por diferentes países entre o período de 1983 a 2012, sobre a planta *Jatropha curcas* L., foi possível verificar que existe um forte crescimento de depósito de patentes por países como a China, Índia, Estados Unidos e Colômbia. A maioria das patentes foram depositadas por empresas e de acordo com Código Internacional de Patentes estão associadas ao desenvolvimento de novos processos do uso do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), principalmente no melhoramento de técnicas

voltadas a horticultura, cultura de vegetais; florestamento, irrigação e produção de biodiesel. No entanto, não foi identificado documento de patente depositado com finalidade terapêutica (atividade farmacológica).

PERSPECTIVAS

O Brasil não apresentou registro de patente. Nesta perspectiva, são necessários incentivos que visem o aumento da capacidade de inovação do país principalmente no que norteia o uso atual da *Jatropha curcas* L. Pois, o Brasil, apresenta uma grande biodiversidade ambiental que deve ser rapidamente registrada em bancos de dados relevantes no mundo que assegure as novas técnicas desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1716-1721, 2008.

BINTENCOURT, M. J. C.; SANTANA-BASTOS, E. M.; MOREAU, V. H.; GONZALES, A. D. F. Desenvolvimento de cosmecêuticos a partir de extratos antibacterianos de pinhão-mansão. **Diálogos & ciência**, n. 27, set. 2011.

CNPE. Conselho Nacional de Política Energética. 2008. Resolução CNPE 02/2008. Disponível em: <www.mme.gov.br/site/menu>. Acesso em: 01 fev. 2014.

DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica Brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 1996.

Espacenet, **Europeanpatent Office**. Disponível em: <<http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>> Acesso em 19/06/2014 as 14:40.30h.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A. E RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online]. v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. Edgard Blucher, São Paulo, 340p. 2006.

LACERDA, V. D. Quintais do Sertão do Ribeirão: Agrobiodiversidade sob um enfoque etnobotânico. p.55, Monografia (Graduação) - UFSC, Florianópolis. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. et al. Plantas Mediciniais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p 429-438. 2002.

MUANGMAN, S.; THIPPORNWONG, M.; TOHTONG, R. Anti-metastatic effects of curcusone B, a diterpene from *Jatropha curcas*. **In Vivo**. v. 19, n. 1, p. 265-8, 2005.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 101-105, 2003.

RAU, O.; WURGLICS, M.; DINGERMANN, T.; ABDEL-TAWAB, M.; SCHUBERTZSILAVECZ, M. Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor. **Pharmazie**, v. 61, n. 11, p. 952-6, 2006.

SANTOS, A. F., SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl). **Phytotherapy Research.**, v. 13, n. 8, p. 660-664, 1999.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D. Avaliação da produtividade e teor de óleo de dez genótipos de mamoneira cultivados em altitude inferior a 300 metros. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 188-194, 2006.

SHETTY, S.; UDUPA, S. L.; UDUPA, A. L.; VOLLALA, V. R. **Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats**, **Saudi Med. J.**, v. 27, n. 10, p. 1473-6, 2006.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER M. B.; KRUEGER, M. R. O.; Freitas, R. A.; Bella Cruz, R. C. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, SC: Ed. Univali; p.239. 2003.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica**. Texto contexto – enfermagem. Florianópolis, v. 15, n. 1, 2006.

YUNES RA, CALIXTO J. B. **Plantas medicinais - sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001.

ZACCHINO, S. **Estratégias para descobrir novos agentes antifúngicos**. IN: CALIXTO, J. B; YUNES, R. A. Plantas Mediciniais sob a ótica da Moderna Química Medicinal. (orgs)., p.1-13. 2003.

Artigo Científico III

Submetido no periódico “CADERNOS DE PROSPECÇÃO”, 2016.

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DA *Jatropha curcas* L. ATRAVÉS DA PROSPECÇÃO DE PATENTES

Caio Lopes Borges Andrade¹; Eduardo Muniz Santana Bastos¹; Vitor Hugo Moreau da Cunha¹

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil.

RESUMO

A *Jatropha curcas* L., planta arbustiva da família das Euforbiáceas, faz parte do grupo de oleaginosas com um potencial promissor para a produção de biodiesel, por apresentar altas taxas de lipídeos em suas sementes, resistência a diversas condições de plantio e não competir com a indústria alimentícia. Além de um possível substituto aos combustíveis fósseis, estudos apontam diversos usos na indústria farmacêutica, assim cresce a produção de patentes para as mais diversas aplicações da *Jatropha curcas* L. O presente trabalho faz uma análise da prospecção tecnológica a cerca das aplicações da *Jatropha curcas* L. A metodologia consiste na utilização da ferramenta de pesquisa avançada do site Espacenet® para pesquisar palavras chave em títulos e resumos de patentes disponibilizadas pelo banco de dados, resultando em 242 patentes depositadas de 1983 a 2015. Assim foi possível analisar o ano de depósito, ano de publicação, nome do depositante, e países nos quais foram depositadas as patentes.

Palavras chave: *Jatropha curcas* L. Patentes. Prospecto.

ABSTRACT

The *Jatropha curcas* L., shrubby plant of the Euphorbia family, is part of the oil group with a promising potential for biodiesel production, due to its high lipid rates in its seeds, resistance to different growing conditions and not compete with the food industry. In addition to a possible substitute for fossil fuels, studies show various uses in the pharmaceutical industry, so grows the production of patents for various applications of *Jatropha curcas* L. This work is an analysis of the technological foresight about the applications of *Jatropha curcas* L. The methodology consists of using the advanced search tool Espacenet® site to search keywords in titles and abstracts of patents provided by the database, resulting in 242 patents filed from 1983 to 2015. So it was possible to analyze the year of deposit, year of publication, the depositor's name, and countries where were you deposit patents

Keywords: *Jatropha curcas* L. Patents. Prospectus.

Área tecnológica: Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

A *Jatropha curcas* L., popularmente conhecida como Pinhão manso, pertence à família Euforbiáceae, plantas do gênero *Jatropha* com 160 espécies, aproximadamente, apresentam valor medicinal, ornamental e algumas são produtoras de óleo (SEVERINO *et al.*, 2006). Ainda não se sabe ao certo a origem desta planta, mas ocorre de forma nativa em todas as regiões tropicais do globo e, principalmente, nos países tropicais e subtropicais, tais como na América do Sul, China e Índia (OPENSHAW, 2000). A *Jatropha curcas* L. se caracteriza como um arbusto de dois a três metros de altura podendo chegar até cinco metros a depender de boas condições de plantio, solo, umidade. Suporta bem climas áridos e semiáridos.

Esta oleaginosa é encontrada naturalmente de forma nativa no nordeste brasileiro que apresenta solo semiárido e não aparece em regiões de elevada umidade como na região Amazônia (DEHGAN; SCHUTZMEN, 1994). As folhas deste arbusto, de cor verde, aparecem alternadas na forma de coração, as flores são pequenas na cor amarelo-esverdeada, em um mesmo ramo podem ocorrer flores masculinas, flores femininas e flores hermafroditas. Os frutos, quando maduros, são cápsulas de cor marrom escuro contendo três sementes dentro das quais se encontra a amêndoa branca, rica em óleo (PÉREZ *et al.*, 2007).

Nas sementes do pinhão manso existe grande quantidade de óleo, que pode ser extraído em quantidades que variam de 40 a 77% a depender da técnica de extração. Este óleo vem sendo usado com diferentes aplicações variando entre aplicações energéticas e não energéticas. A utilização não energética inclui a produção de sabão, tintas de impressão e vernizes. Já como fonte energética inclui além da produção de biodiesel, a queima direta em motores agrícolas e iluminação de ambientes domésticos em países da África e na Índia (FERRÃO *et al.*, 1983; LI *et al.*, 2007). Ademais a planta como um todo apresenta multiuso, as partes aéreas da planta são usadas como lenha para cozinha doméstica (meio rural e urbano), lenha para caldeiras, estacas, postes e até produção de carvão (OPENSHAW, 2000; KUMAR; SHARMA, 2008). Uma utilização de destaque do pinhão manso é como cerca viva para a delimitação das propriedades agrícolas, uma vez que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas (PEIXOTO, 1973). Outra utilização importante, principalmente para o nordeste brasileiro que tem clima semiárido e rios necessitando de revitalização, é que esta planta, por ser perene, pode ser utilizada na conservação dos solos, pois os recobre com uma camada de matéria seca diminuindo, desta forma, a erosão e perda de água por evaporação.

Com tamanha variedade de aplicações para a *Jatropha curcas* L., as instituições precisam otimizar seus esforços para garantir um retorno justificável. A prospecção tecnológica consiste na aplicação de métodos de gerenciamento e análise de tecnologias, com o objetivo de prever possíveis quadros futuros ou mudanças que alterem metas previamente delineadas

(AMPARO *et al.*, 2012). O uso devido da prospecção tecnológica exerce função marcante no atual mercado globalizado. Com o objetivo de melhor direcionar o empenho na pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias, os setores público e privado em diversos países tem aplicado métodos de prospecção tecnológica (MAYERHOFF, 2008). O presente trabalho tem como objetivo avaliar o desenvolvimento de tecnologias relacionadas à *Jatropha curcas* L., através da análise de dados referentes a 242 patentes disponibilizadas no banco de dados de patentes europeu (Espacenet®).

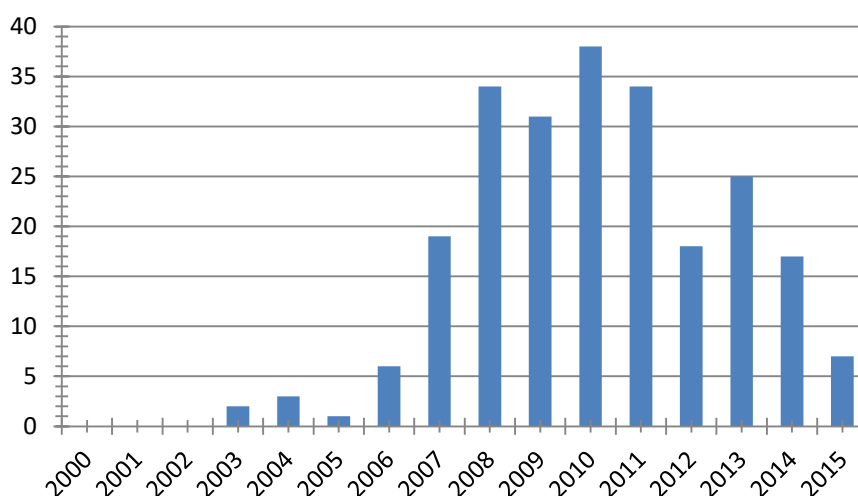
METODOLOGIA

A análise das aplicações diversas da *Jatropha curcas* L. foi realizada através da avaliação de documentos de patentes, por meio de um banco de dados de patentes Europeu, o Espacenet®, que oferece o acesso gratuito a informação sobre desenvolvimento tecnológico. Utilizando “*Jatropha** and *curcas*” como palavras chave no sistema de busca avançada, realizou-se uma pesquisa de patentes as quais apresentavam em seu título ou resumo os termos de interesse. Assim foi possível obter dados de 242 patentes relevantes ao tema. Dentre os dados obtidos, foram analisados: data da submissão; data da publicação; país da submissão; classificação internacional; responsáveis pela submissão.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Após a busca no banco de patentes Espacenet®, foram obtidos registros de 242 documentos de patente submetidos mundialmente a partir do ano de 1983 até o ano de 2015, com patentes concedidas até Março de 2016. Das tecnologias relacionadas à *Jatropha curcas* L. protegidas por patente encontradas, menos de 10% foram depositadas pelo *World Intellectual Property Organization* (WIPO), que garante a proteção da propriedade intelectual em todos os 188 países membros (ESPACENET, 2016).

Figura 1 – Evolução anual do número de patentes depositadas referentes a *Jatropha curcas* a partir do ano de 2000 na base de dados Espacenet®.

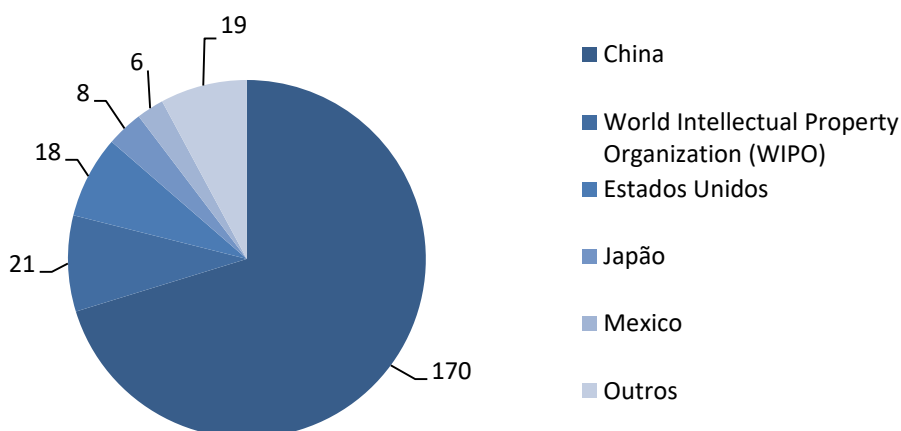


Fonte: Autoria própria, 2016.

Até o ano 2000, apenas 7 patentes referentes a *Jatropha curcas* L. foram depositadas, todas por empresas, com as duas primeiras tecnologias protegidas pertencentes a classificação internacional C10L1 (combustíveis carbonáceos líquidos), sendo a primeira publicada em Junho de 1983 na Austrália e a segunda em Outubro de 1983 no Japão. Na década seguinte, foram depositadas no Japão 3 novas patentes, duas com classificação internacional A61K8 e uma A61K35, no campo de cosméticos e farmacêutico respectivamente.

A partir do ano de 2000 até o ano de 2006 foram registradas 12 patentes, porém, com a crise do Petróleo de 2003 e a ratificação do Protocolo de Quioto em 2005, a busca por meios mais eficientes de produção de energia renovável gerou um impacto positivo no desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas a produção da *J. curcas*, assim como de suas aplicações econômicas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2016; LIMA, 2004). Assim, de 2007 a 2014 foi verificada uma média de 27 patentes submetidas por ano (Figura 1).

Figura 2 – Distribuição de patentes depositadas por país no qual o documento será protegido.



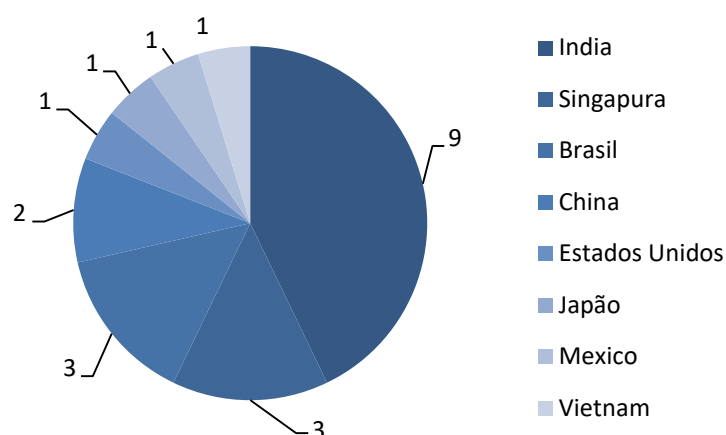
Fonte: Autoria própria, 2016.

Das 242 patentes encontradas, 70% foram depositadas na China (Figura 2). Como uma das principais potências econômicas mundiais, fortes incentivos a pesquisa e desenvolvimento e a ocorrência endêmica da *Jatropha curcas* L., a China possui indústrias produzindo energia renovável, medicamentos e pesticidas (LI *et al.*, 2007). A China mantém seu maior plantio na região de *Yunnan*, da qual se originam cerca de 20% das patentes depositadas na China, provenientes de empresas e universidades da província, localizada no sudoeste da China. Este fato se deve ao clima da região sudoeste ser favorável ao crescimento da *Jatropha curcas* L. O forte investimento realizado pela China para o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas a produção de biodiesel, consequentemente produção de patentes referentes ao pinhão manso, se deve a forte necessidade de suprir a demanda eminente de maior eficiência na produção do biodiesel capaz de atender ao mercado interno (LIMA *et al.*, 2008).

Com a exceção da China, que claramente detém a maior parte das patentes produzidas, destacam se também no cenário global outros 6 países. Juntos estes países correspondem a 20% de todas as patentes relacionadas à *Jatropha curcas* L., com 19 patentes desenvolvidas pelos Estados Unidos, 11 pela Índia, 9 pelo Japão, 7 pelo México, 5 por Singapura e 3 pelo Brasil (Figura 3). Dos seis países apresentados, três depositaram a maior parte de suas patentes no escritório de patentes da WIPO.

A urgente demanda por alternativas a importação de combustíveis fósseis torna o biodiesel uma opção promissora nos Estados Unidos. Assim o país busca formas de incentivar o crescimento da produção nacional de biodiesel que atualmente corresponde a 80 bilhões de litros (LIMA *et al.*, 2008; NBB, 2016; LIMA, 2004).

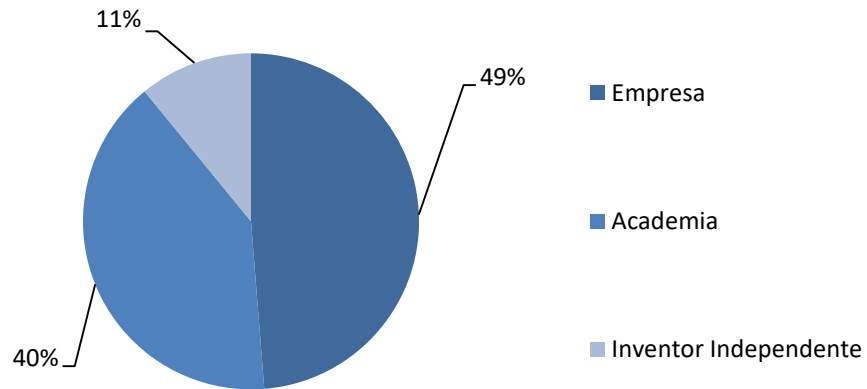
Figura 3 – Distribuição de patentes depositadas pelo escritório da WIPO por país de origem da tecnologia



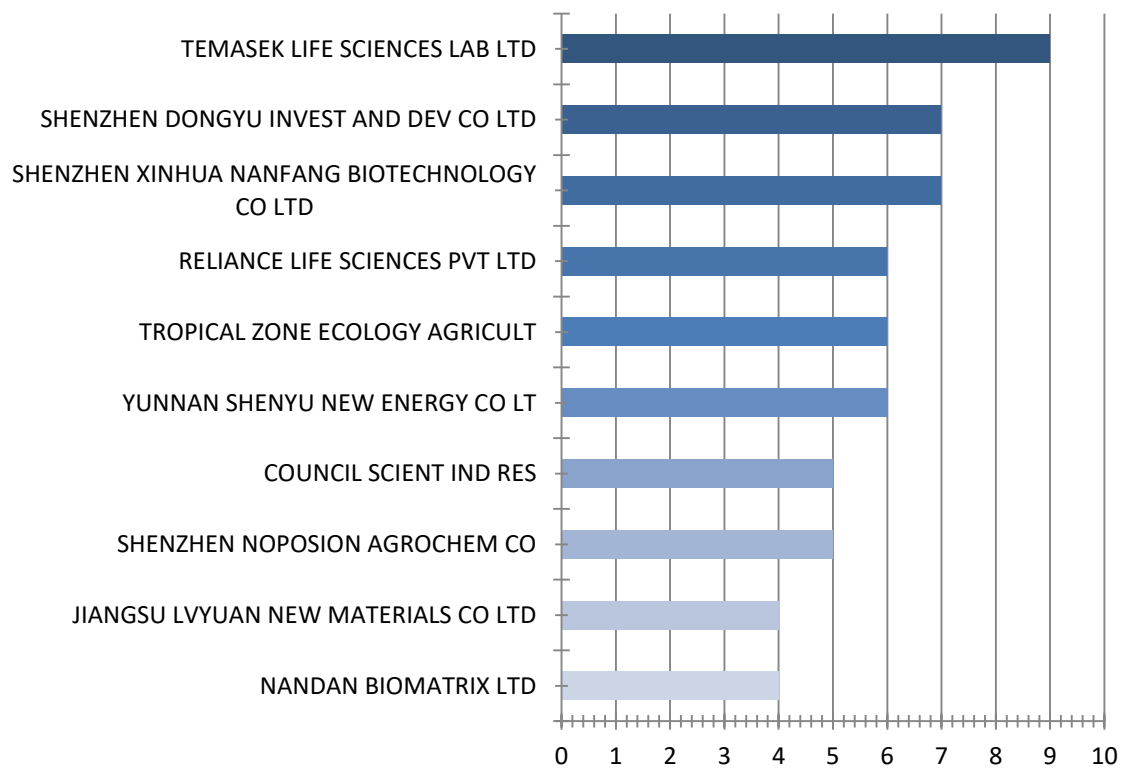
Fonte: Autoria própria, 2016.

Apesar do Brasil possuir condições favoráveis aos diversos cultivos para produção de biodiesel, o pinhão manso estar entre as oleaginosas mais promissoras a produção do biodiesel e ser endêmico em grande parte do país, estabelecer parâmetros legislativos por meio da Agência Nacional de Petróleo e Gás que prevê a utilização do combustível B2 (2% de biodiesel para 98% de diesel) e fornecer incentivos fiscais pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS), que oferece subsídio a produção do biodiesel, o Brasil ainda possui baixa representatividade no quadro mundial de patentes depositadas referentes a *Jatropha curcas* L. (LIMA *et al.*, 2008; SANTANA-BASTOS; CUNHA, 2015).

Dos três únicos registros encontrados no banco de dados Espacenet®, todos foram depositados pelo escritório WIPO (FIGURA 3), sendo que dois foram depositados pelo inventor independente Gilson Soares Dourado e um pela empresa Petróleo Brasileiro S. A., Petrobras. Em conjunto ao fato do baixo investimento em ciência e tecnologia no país, a expressiva lentidão no processo de avaliação de patentes que atingiu a média de 13 anos para liberação do resultado pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI (AMPROTEC, 2014).

Figura 4 – Distribuição de patentes por depositante

Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 5 – Distribuição de patentes por instituição depositante (Empresa)

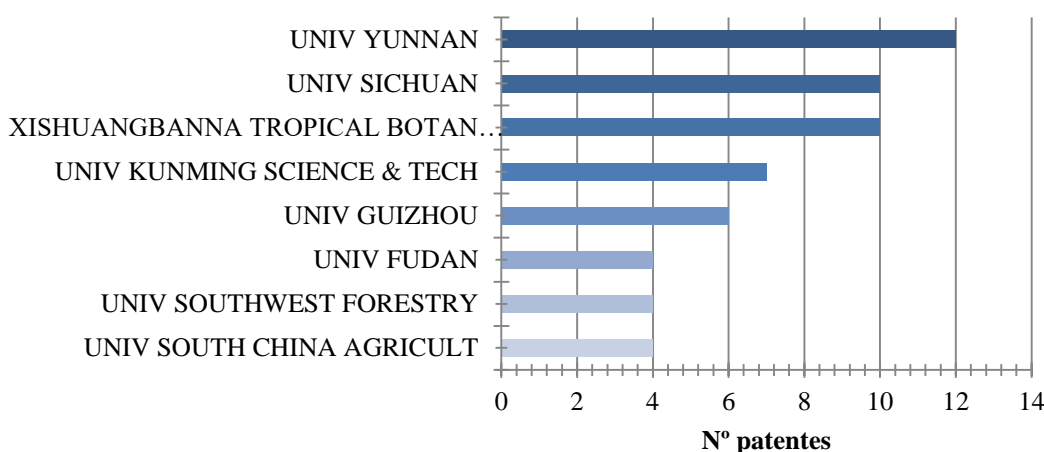
Fonte: Autoria própria, 2016.

Para a análise das instituições responsáveis pela produção tecnológica a gerar as patentes do presente estudo, estas instituições foram classificadas em três grupos (Empresa; Academia; Inventor Independente) de acordo com a informação referente ao depositante da patente. A distribuição de patentes por depositantes (Figura 4) demonstra como no atual quadro global, Empresas (49%) e Academia (40%) apresentam um equilíbrio no desenvolvimento de inovação relacionada ao pinhão manso. Com um menor impacto quantitativo, Inventores Independentes representam apenas 11% dos depositantes de patentes no mundo.

Da mesma forma (Figura 5), é evidente a clara dominância Chinesa, no que tange a produção de tecnologias protegidas por propriedade intelectual, bem como o número de patentes depositadas no país por empresas, relacionadas à *Jatropha curcas* L. As regiões Sul e Sudoeste da China se destacam como um ponto de referência no desenvolvimento tecnológico, relacionado ao pinhão manso, devido a grande concentração de empresas detentoras de patentes na região. Apesar da *Temasek Life Sciences Laboratory* ser uma empresa de Singapura, esta depositou apenas uma patente no país de origem, sendo que a empresa depositou outras três patentes no escritório de patentes WIPO, duas nos Estados Unidos, duas na China e uma em Israel.

No que tange a relevância em número de patentes depositadas referentes à *Jatropha curcas* L., dentre as instituições classificadas no grupo Academia, 100% daquelas consideradas quantitativamente mais impactantes são instituições Chinesas (Figura 6). Novamente, o destaque maior vai para a região Sudoeste da China, em especial a província de Yunnan, a qual desempenha um papel importante no cultivo do pinhão manso (LI *et al.*, 2007).

Figura 6 – Distribuição de patentes por instituição depositante (Academia)

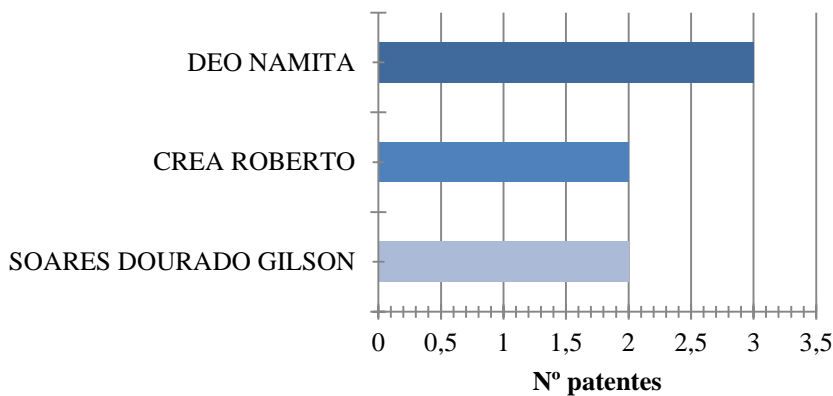


Fonte: Autoria própria, 2016.

Dos 22 inventores independentes com patentes relacionadas à *Jatropha curcas* L., apenas três se destacam por deterem mais de uma patente cada (Figura 7). Primeiramente a inventora

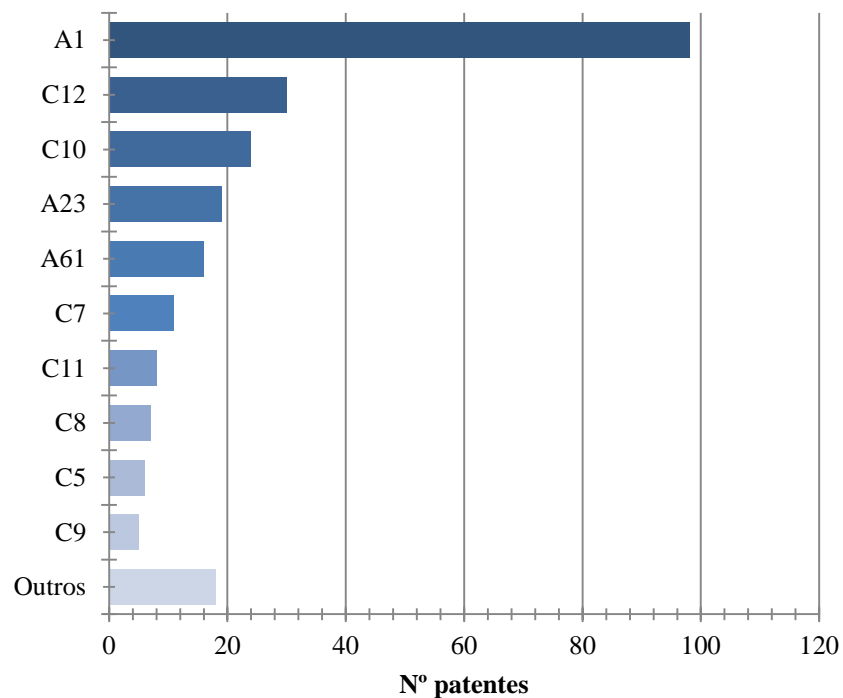
Namita Deo da Índia, com três patentes depositadas sendo duas na categoria internacional de cosméticos (A61 K8) e uma na categoria de medicamentos contendo peptídeos (A61 K36). Em segundo o inventor Roberto Crea dos Estados Unidos, com duas patentes depositadas, uma na categoria de medicamentos contendo peptídeos (A61 K36) e uma na categoria de forragem para alimento de gado (A23K1). Por fim, o inventor Gilson Soares Dourado do Brasil, com duas patentes depositadas referentes a um equipamento de secagem e separação de sementes (B2B1).

Figura 7 – Distribuição de patentes por instituição depositante (Inventor Independente)



Fonte: Autoria própria, 2016.

Figura 8 – Distribuição de patentes por classificação internacional



Fonte: Autoria própria, 2016.

Dentre as diferentes aplicações e metodologias utilizadas referentes ao pinhão manso, protegidas como propriedade intelectual (Figura 8), cinco áreas se destacam como os principais focos no desenvolvimento de novas tecnologias. O código A1 apresenta o maior número de patentes, neste campo estão classificadas as patentes referentes ao cultivo da *Jatropha curcas* L. com 98 patentes depositadas. Em segundo lugar, com 30 documentos de patente, encontra-se o código C12, relativo a biomoléculas de interesse e processos envolvendo estas, como aplicações de enzimas e alteração de material genético.

Nesta perspectiva, na terceira posição, com 24 patentes depositadas, esta o código C10 o qual concerne a produção de combustíveis. Em seguida, com 19 patentes depositadas, tem-se o código A23, que é referente à produção de alimentos, podendo ser para o consumo humano ou animal. Por fim, com 16 patentes registradas, encontra-se a classificação A61, a qual remete a produção de medicamentos e cosméticos, de uso médico ou veterinário.

Os avanços no cultivo da *Jatropha curcas* L. e extração de partes com aplicação industrial são essenciais para garantir uma produção em massa de seus subprodutos. Apesar do investimento evidente neste quesito, patentes relacionadas ao uso dos subprodutos do pinhão manso como alimento ou ração, pesticida, cosmético, medicamento, combustível, lubrificante e outras aplicações, apresentam significativo apelo econômico (KUMAR; SHARMA, 2008).

CONCLUSÃO

O progressivo aumento no número de patentes depositadas referentes à *Jatropha curcas* L., desde o primeiro documento depositado em 1983 até o mais recente em 2015 encontrados na base de dados Espacenet®, fica clara a relação entre a crise mundial de matriz energética e a busca por aperfeiçoamento da produção do biodiesel. Tendo em vista esse conceito, a China demonstra grande empenho na busca pelo desenvolvimento e patenteamento de novas tecnologias as quais ajudem a amenizar sua dependência de combustíveis fósseis. A participação de empresas e academia tem sido quantitativamente equivalentes, responsáveis pela maior parte das patentes pertinentes ao pinhão manso. Apesar, do biodiesel, ser o objetivo maior da produção atual da *Jatropha curcas* L., este não é a classe de inovações a apresentar o maior número de patentes, sendo as tecnologias relacionadas ao cultivo do pinhão manso, no intuito de elevar a produtividade para suprir a demanda energética, a conter disparadamente o maior número de patentes depositadas.

PERSPECTIVAS

A *Jatropha curcas* L. esta presente de maneira endêmica em diversos países de localização tropical e subtropical, ocorrendo em todas as regiões do Brasil, é uma oleaginosa que apresenta grande potencial econômico para o setor agrícola e as indústrias energética e farmacêutica. Apesar da representatividade do Brasil no atual quadro de proteção a propriedade intelectual de tecnologias relacionadas à *Jatropha curcas* L. ser mínima, este

representa um campo de pesquisa e desenvolvimento de grande apelo econômico para empresas, inventores independentes e academia, o qual deve ser incentivado.

REFERÊNCIAS

AMPARO, K. K. S.; RIBEIRO, M. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica, **Perspectivas em Ciência da Informação**, Brasil, v. 17, n. 4, p. 195-209, out./dez. 2012.

AMPROTEC, Brasil é o penúltimo em ranking de patentes, **Associação Nacional de Entidades Promotoras de Empreendimentos Inovadores**, Brasil, 2014. Disponível em: <<http://anprotec.org.br/site/2014/04/brasil-ocupa-penultima-posicao-em-ranking-de-patentes/>> Acesso em 18 de mai. 2016.

SANTANA-BASTOS, E. M.; CUNHA, V. H. M. Evolução tecnológica das diversas utilizações da *Jatropha curcas* L., **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 64-73, jan./mar. 2015.

BRASIL, Impacto do preço do petróleo sobre contas externas, **Banco Central do Brasil**, Brasil, jun. 2004.

BRASIL, Protocolo de Quioto, **Ministério do Meio Ambiente**, Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/protocolo-de-quioto>> Acesso em 18 de mai. 2016.

DEHGAN, B.; SCHUTZMAN, B. Contributions towards a monograph of neotropical *Jatropha*: phonetic and phylogenetic analysis. **Annals Missouri Botanical Garden**, St Louis, v.81, n.2, p.349-367, 1994.

ESPAENET. [Base de dados – Internet]. **European Patent Office**, 2016. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com>> Acesso em 06 de mai. 2016.

FERRÃO, J. E. M., Ferrão, A. M. B. C. & Patrício, M. T. S. Purgueira da Ilha do Fogo. Composição da semente, algumas características da gordura, **Garcia da Orta: Série de Estudos Agronômicos**, Brasil, s.n., p. 175-178, 1983.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review, **Industrial Crops and Products**, Índia, v. 28, p. 1-10, jan. 2008.

LI, K.; YANG, W.; LI, L.; ZHANG, C.; CUI, Y.; SUN, Y. Distribution and development strategy for *Jatropha curcas* L. in Yunnan Province, southwest China. **Forestry Studies in China**, China, v. 9, n. 2, p. 120-126, jun. 2007.

LIMA, D. O.; SOGABE, V. P.; CALARGE, T. C. C. Uma análise sobre o mercado mundial do biodiesel. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., Acre, 2008.

LIMA, P. C. R. O biodiesel e a inclusão social, Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados, Brasília, 2004.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma análise sobre estudos de prospecção tecnológica, Cadernos de Prospecção, Brasil, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2008.

NBB, Biodiesel production rises in 2015 as consumers seek cleaner fuels, National Biodiesel Board, Estados Unidos, 2016. Disponível em: <<http://www.biodiesel.org>>. Acesso em: 18 mai. 2016.

OPENSHAW K. A review of Jatropha curcas: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Estados Unidos, v. 19, p. 1-15, mar. 2000.

PEIXOTO. A. R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo. Nobel, 1973.

PÉREZ, J. Á. S.; GARCÍA, A. A. D.; LÓPEZ, S. M. O.; ATALA, Y. V.; PAVÓN, S. G. Potencialidades energéticas y medioambientales del árbol jatropha curcas l en las condiciones edafoclimáticas de la región semiárida de la provincia de Guantánamo. **Tecnología Química**, Guantánamo, v. 28, n. 2, 2007.

SEVERINO, L. S. Método para medição da área foliar do pinhão manso, In: **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, v. 1, 2006.

8.2 Patentes de invenção

- Patente de invenção registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) diretamente relacionados à tese

Patente de Invenção I

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L., PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L. E SEUS USOS".

Patente de invenção depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)

Número de registro: **BR 10 2016 021368 1 (2016)**

- Patente de invenção registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)

Patente de Invenção II

"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L., PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L. E SEUS USOS".

Patente de invenção depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)

Número de registro: **BR 102014010104-7 A2 (2014)**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 021368 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal da Bahia

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 15180714000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110060

País: Brasil

Telefone: (71)3263 7000

Fax: (71)3263 7027

Email: npi@ufba.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L., PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA CONTENDO EXTRATOS DE *Jatropha curcas* L. E SEUS USOS".

Resumo: A presente invenção refere-se ao processo de obtenção e uso de produto vegetal com atividade anti-inflamatória de *Jatropha curcas*, espécie da família das Euphorbiaceae. Mais particularmente, do processo de obtenção e do uso de produtos elaborados a partir de extratos, frações e compostos bioativos isolados de farmacógenos elaborados a partir das partes aéreas da *Jatropha curcas*. A aquisição de insumos farmacêuticos ativos de origem naturais, especificamente vegetais, ocorre por processos físico-químicos em particular, extrator a frio, presentes nas referidas matérias-primas com atividade farmacológica. Os extratos e frações da espécie da planta *J. curcas* apresentam atividade anti-inflamatória sobre os efeitos biológicos induzidos por lipopolissacarídeo em modelo pré-clínico em cultura de células gliais primárias de ratos Wistar. A principal aplicação da presente invenção envolve a formulação e uso de especialidades farmacêuticas com atividade anti-inflamatória para uso interno e externo, como por exemplo, mas não restrito a, comprimidos, cápsulas, drágeas, xaropes, loções, cremes, pomadas, etc. As referidas especialidades farmacêuticas podem ser utilizadas para tratamento e prevenção de doenças.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: EDUARDO MUNIZ SANTANA BASTOS

CPF: 00985834501

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Av. José Leite, n 84, granvelle monet, bloc. 02, ap,202, bairro:
Picaíia

Cidade: Lauro de Freitas

Estado: BA

CEP: 42700-000

País: BRASIL

Telefone: (71) 988 887855

Fax:

Email: eduardomunizm@gmail.com

Inventor 2 de 7

Nome: VITOR HUGO MOREAU DA CUNHA

CPF: 07315922717

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Av. praia de Itamaracá, sn. Cond. Top Vilas, casa 33. Vilas do
Atlantico

Cidade: Lauro de Freitas

Estado: BA

CEP: 42700-000

País: BRASIL

Telefone: (71) 981 755469

Fax:

Email: vhmoreau@yahoo.com.br

Inventor 3 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/09/2016 às
12:38, Petição 870160052050