

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTINOCICEPTIVO DA *Mirabilis jalapa* L. EM  
CAMUNDONGOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Cristiani Isabel Banderó Walker**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO  
DA *Mirabilis jalapa* L. EM CAMUNDONGOS**

por

**Cristiani Isabel Banderó Walker**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DA  
*Mirabilis jalapa* L. EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

**Cristiani Isabel Banderó Walker**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Juliano Ferreira, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Adair Roberto Soares dos Santos, Dr. (UFSC)**

---

**Michel Fleith Otuki, Dr. (UEPG)**

---

**Margareth Linde Athaíde, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Roselei Fachinetto, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 9 de dezembro de 2010.

*Dedico essa tese aos meus pais, Waldir e Neiva, pela educação,  
formação e amor que sempre me deram, e pelo auxílio fundamental  
em mais esta fase da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e me dá forças sempre, inclusive ao longo dessa jornada, e em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Waldir e Neiva, pelo exemplo de luta e de dignidade, e por apoiarem sempre as minhas decisões, e não medirem esforços para que elas se tornassem realidade. A vocês, todo o meu amor, carinho e gratidão.

As minhas irmãs Luana e Letícia, com quem constantemente aprendo e valorizo a importância do amor em família.

Ao meu orientador, professor Juliano Ferreira, obrigada por ter me aceito em seu grupo de pesquisa. Agradeço também pela sua orientação, amizade, dedicação e principalmente pela sua infinita paciência e pela imensa contribuição em minha formação científica.

Aos meus colegas do LABNEURO, Carin, Sara, Gustavo, Flávia, Cássia, Geresa, Franciele, Camila, Jardel, Fabiano e Patrícia Marisco pela cumplicidade e amizade demonstrados durante esses anos.

Também não posso deixar de agradecer especialmente os meus colegas e amigos Jonatas Klafke, Mariane Arnoldi e Raquel Tonello pelo apoio nos momentos difíceis e também pelos inúmeros momentos descontraídos que vivenciamos juntos tanto dentro como fora do laboratório.

Em especial, aos meus amigos queridos, Gabriela Trevisan e Mateus Rossato. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade, pois sem a dedicação e o auxílio de vocês, esse trabalho não seria possível. Obrigada por sempre estarem presentes nos momentos mais difíceis, não medindo esforços para me auxiliar.

A minha amiga Aline Amarilho, obrigada pela fiel amizade, confiança, paciência e bom humor nos meus momentos de crise.

A professora Ester Pereira e a sua aluna Carina Franciscato pela colaboração

A professora Melânia Palermo Manfron pela amizade demonstrada durante todo esse período.

Aos professores da banca, Adair dos Santos, Margareth Linde Athaíde, Michel Otuki e Roselei Fachinetto, por terem aceitado avaliar esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade e por fornecer os subsídios necessários para o desenvolvimento dos experimentos.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DA *Mirabilis jalapa* L. EM CAMUNDONGOS**

AUTORA: CRISTIANI ISABEL BANDERÓ WALKER

ORIENTADOR: Prof. Dr. JULIANO FERREIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de dezembro de 2010.

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais pela população contribuiu decisivamente para a terapêutica moderna e para a descoberta de importantes mecanismos relacionados com o processo de transmissão e o tratamento da dor. Uma planta muito utilizada pela medicina popular é a *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae). A infusão das suas folhas é utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias ou dolorosas, mas ainda não existem estudos confirmando o seu uso popular. No presente trabalho, foi avaliado o potencial antinociceptivo da *Mirabilis jalapa* em camundongos. A administração oral (v.o.) dos extratos brutos hidroetanólicos das folhas e de caules foi efetiva em inibir a nocicepção com valor de  $DI_{50}$  de 5,5 (2,3–13,1) e 18,0 (11,3–28,5) mg/kg, em um modelo de dor aguda induzida por estímulo químico (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético). Entre as frações testadas, a fração acetato de etila obtida das folhas (Eta, 10 mg/kg, v.o.) foi a mais potente em induzir a antinocicepção com valor de  $DI_{50}$  de 1,1 (0,6–2,1) mg/kg. Por isso, esta fração foi escolhida para a realização de estudos posteriores. Além disso, esses extratos também inibiram a nocicepção induzida por estímulo térmico (teste da imersão de cauda). Em adição, a Eta (10 mg/kg, v.o.) produziu antinocicepção em modelos de dor relacionada a artrite (causada por Adjuvante Completo de Freund (ACF), dor neuropática (provocada pela ligação parcial do nervo ciático) e dor pós-cirúrgica (induzida por incisão na pata de camundongos). Somente a administração repetida da Eta provocou uma diminuição do edema de pata induzido por ACF. Entretanto, a Eta não alterou o aumento dos níveis de interleucina 1- $\beta$  produzido por ACF. O efeito antinociceptivo da Eta (10 mg/kg, v.o.) não foi revertido pelo pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg, i.p.), mas sim, por atropina (5 mg/kg, s.c.) ou mecamelamina (0,001 mg/kg, s.c.). Como houve a participação do sistema colinérgico na antinocicepção induzida por esta fração, foi determinado o efeito da Eta sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* e *ex vivo*. A atividade *in vitro* da acetilcolinesterase no sangue e na medula espinhal dos animais não foi alterada pela Eta (1 e 10  $\mu$ g/mL). Já no ensaio *ex vivo*, houve um aumento da atividade desta enzima na medula espinhal de camundongos tratados com ACF, que foi completamente revertida com a administração da Eta (10 mg/kg, v.o.). Com relação aos efeitos adversos, a Eta (10 mg/kg, v.o.) não alterou a atividade locomotora, temperatura corporal, trânsito gastrointestinal e nem produziu lesões gástricas. Estes resultados demonstraram que *M. jalapa* apresenta atividade antinociceptiva em camundongos, confirmando o seu uso popular como analgésico.

Palavras-chaves: *Mirabilis jalapa*; fração acetato de etila; antinocicepção; sistema colinérgico; acetilcolinesterase.

**ABSTRACT**

Doctoral Thesis

Postgraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil**EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTINOCICEPTIVE  
EFFECTS OF *Mirabilis jalapa* L. IN MICE**

Author: Cristiani Isabel Banderó Walker

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, Dezember 9<sup>th</sup>, 2010.

The knowledge about the use of medicinal plants by the population contributed decisively to the modern therapy and the discovery of important mechanisms related to the process of transmission and treatment of pain. A plant widely used in folk medicine is *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae). The infusion of its leaves is used for the treatment of inflammatory and painful diseases; however, there are no studies confirming its popular use. In this study, we evaluated the potential antinociceptive effects of *Mirabilis jalapa* in mice. Oral administration (p.o.) of the crude hydroethanolic extracts from leaves and stems inhibited the nociception with ID<sub>50</sub> values of 5.5 (2.3 to 13.1) and 18.0 (11.3 to 28.5) mg/kg in a model of acute pain induced by chemical stimulation (test of writhing induced by acetic acid). Among the fractions tested, the ethyl acetate fraction from the leaves (Eta, 10 mg/kg, p.o.) was more effective and potent to induce antinociception with ID<sub>50</sub> value of 1.1 (0.6 to 2.1) mg/kg. Thus, this fraction was chosen for further studies. Furthermore, these extracts also inhibited the nociception induced by thermal stimulation (tail-flick test). In addition, Eta (10 mg/kg, p.o.) produced antinociception in models of pain related to arthritis (caused by Freund's Complete Adjuvant (CFA)), neuropathic pain (caused by partial sciatic nerve ligation) and post-surgical pain (induced by incision in the paw of mice). Only the repeated administrations of Eta (10 mg/kg, p.o.) cause a decrease in paw edema produced by CFA. The antinociceptive effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) was not reversed by pretreatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.), but by atropine (5 mg/kg, s.c.) or mecamylamine (0.001 mg/kg, s.c.). As the participation of the cholinergic system in antinociception was induced by this fraction, we determined the effect of Eta on the activity of acetylcholinesterase (AChE) *in vitro* and *ex vivo*. The *in vitro* activity of AChE in blood and spinal cord of animals was not altered by Eta (1 and 10 mg/mL). In the *ex vivo* assay, an increase of enzyme activity in the spinal cord of mice treated with CFA, which was completely reversed with the administration of Eta (10 mg/kg, p.o.), was observed. With regard to adverse effects, Eta (10 mg/kg, p.o.) did not alter locomotor activity, body temperature or gastrointestinal transit, nor produced gastric lesions. These results demonstrated that *M. jalapa* shows antinociceptive activity in mice, confirming its popular use as an analgesic.

Key words: *Mirabilis jalapa*; ethyl acetate fraction; antinociception; colinergic system; acetylcholinesterase.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS – Ácido acetilsalicílico  
ACF – Adjuvante Completo de Freund  
ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais  
ANOVA – Análise de variância  
COX – Ciclooxigenase  
COX-1 – Ciclooxigenase do tipo 1  
COX-2 – Ciclooxigenase do tipo 2  
Eta – Fração acetato de etila das folhas da *M. jalapa*  
EB – Extrato bruto  
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
i.p. – Intraperitoneal  
*M. jalapa* - *Mirabilis jalapa*  
MAP - Proteína Antiviral da *Mirabilis jalapa*  
mL – Mililitros  
mg – Miligrama  
mg/kg – Miligrama por quilograma  
PGs – Prostaglandinas  
RIPs - Proteínas de Inativação Ribossômicas  
s.c. – Subcutânea  
SNC - Sistema nervoso central  
TGI - Trânsito gastrointestinal  
v.o. – Via oral  
 $\mu$ l – Microlitro  
 $\mu$ g - Micrograma

## LISTA DE FIGURAS

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**FIGURA 1** – *Mirabilis jalapa* L..... 31

## ARTIGO

**FIGURE 1** – (A and B) Dose-response curves for the antinociceptive effect of leaf (CrdL, A) and stem (CrdS, B) crude extracts of *Mirabilis jalapa* (p.o.) administered 1 h before acetic acid test. (C) Time-course for the antinociceptive effect of leaf crude extract (CrdL, 10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa*. (D) Effect of the oral treatment with leaf crude extract from *M. jalapa* (CrdL) or n-hexane (Hex), dichloromethane (Dich), ethyl acetate (Eta) or n-butanol (But) fractions on acetic acid-induced nociception..... 38

**FIGURE 2** – (A) Dose-response for the antinociceptive effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction (0.1-30 mg/kg, p.o) of *Mirabilis jalapa* administered 1 hour before acetic acid test. (B) Time-course for the antinociceptive effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* against acetic acid-induced abdominal constriction test..... 38

**FIGURE 3** – Time-course of antinociceptive effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction (A) or crude hydroethanolic extract (B) from (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* in the tail-flick test in mice (n=7-8)..... 38

**FIGURE 4** – Effect of castor oil, leaf ethyl acetate (Eta) fraction and hydroethanolic crude (Crd) extract (10 mg/kg, p.o) from of *Mirabilis jalapa* in the gastrointestinal transit..... 38

**FIGURE 5** – Effect of naloxone (A, 2 mg/kg, i.p.) or atropine (B, 5 mg/kg, s.c.) on the antinociceptive effect caused by leaf ethyl acetate fraction (Eta, 10 mg/kg, p.o), morphine (morph, 10 mg/kg, p.o) or pilocarpine (Pil, 1 mg/kg, s.c.) in acetic acid constriction test in mice..... 39

## MANUSCRITO

**FIGURE 1** – Effect of single (A) or repeated Eta (10 mg/kg, p.o.)

administration (1 h after in B and 24 h after in C) on mechanical allodynia induced by CFA in mice.....	72
<b>FIGURE 2</b> – Effect of single (A) or repeated Eta (10 mg/kg, p.o.) administration (1 h after in B and 24 h after in (C) on paw edema induced by CFA in mice.....	73
<b>FIGURE 3</b> – Effect of the repeated treatment with Eta (10 mg/kg, p.o.) and vehicle (10 mg/mL, p.o.) on interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) levels in paw samples of animals treated with CFA.....	74
<b>FIGURE 4</b> – Time-courses for the preventive (A) or curative (B) effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) on mechanical allodynia caused by paw incision.....	75
<b>FIGURE 5</b> – Time-courses for Eta (10 mg/kg, p.o.) single treatment on mechanical allodynia in neuropathic mice (A) and in sham-operated mice (B).....	76
<b>FIGURE 6</b> – Prevention of Eta (10 mg/kg, p.o.) antinociceptive effect on CFA-induced mechanical allodynia by atropine (A) or mecamelamyne (B). Atropine (5 mg/kg, s.c.) or mecamlamine (0.001 mg/kg, s.c.) were administered 15 minutes before Eta injection.....	77
<b>FIGURE 7</b> – Effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) and vehicle (10 mg/mL, p.o.) treatment on acetylcholinesterase activity in samples of lumbar spinal cord (A) or blood (B) of saline or CFA-treated animals.....	78
<b>ANEXO</b>	
<b>Figure 1</b> - Effect of indomethacin (100 mg/kg, p.o.), leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) from <i>Mirabilis jalapa</i> in the ulcerogenic activity in mice .....	102

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

<b>TABLE 1</b> - Acetylcholinesterase activity from blood and lumbar spinal cord samples in the presence or not of Eta.....	79
---	----

### ANEXO

<b>TABLE 1</b> - Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of <i>Mirabilis jalapa</i> on the rotatod test in mice.....	102
<b>TABLE 2-</b> Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of <i>Mirabilis jalapa</i> on the spontaneous locomotor activity in mice.....	103
<b>TABLE 3</b> - Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of <i>Mirabilis jalapa</i> on the rectal temperature in mice.....	103
<b>TABLE 4:</b> Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction (10 mg/kg, p.o.) of <i>Mirabilis jalapa</i> over the acetylcholinesterase activity in mice.....	104

**SUMÁRIO**

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Dor e nocicepção.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Mecanismos envolvidos na transmissão da dor e da nocicepção</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Sistema colinérgico.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4. Tratamento farmacológico da dor.....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Plantas medicinais com potencial analgésico.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6. <i>Mirabilis jalapa</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 ARTIGO.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 MANUSCRITO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>102</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados sob a forma de artigo e manuscrito, os quais se encontram no item **ARTIGO E MANUSCRITO CIENTÍFICOS**. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão dos Resultados** e **Referências Bibliográficas** encontram-se no próprio artigo e manuscrito.

No final desta tese encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre o artigo e manuscrito científicos contidos neste estudo.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta tese.

## 2. INTRODUÇÃO

Os transtornos dolorosos constituem um problema de saúde pública, podendo gerar repercussões que incapacitam ou limitam as atividades normais de um indivíduo (JULIUS e BASBAUM, 2001; PORRECA, OSSIPOV, GEBHART, 2002).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para que se possa entender melhor a gênese do processo doloroso e, dessa forma, poder intervir adequadamente. O uso de fármacos é, certamente, uma das condutas mais empregadas no controle da dor. Infelizmente, nem todas as modalidades de dor possuem um tratamento adequado. A maioria dos pacientes não responde aos fármacos disponíveis ou, então, apresentam juntamente com o alívio da dor, efeitos adversos que impedem a continuidade do tratamento (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Dessa forma, esses pacientes que não obtiveram o resultado esperado com o uso dos fármacos sintéticos, utilizam a fitoterapia como uma alternativa para o controle da dor. O crescente número de adeptos à fitoterapia tem despertado o interesse de pesquisadores, pois os fitoterápicos apresentam menores efeitos adversos que os medicamentos sintéticos e se mostram aparentemente eficazes em casos onde a medicina tradicional não obteve o resultado esperado (CALIXTO et al., 2000; MACIEL et al., 2002).

O conhecimento sobre as plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais vêm contribuindo ao longo dos tempos de forma relevante para a divulgação das prováveis ações terapêuticas das plantas, prescritas com frequência pelos efeitos farmacológicos que produzem, apesar de, a maioria delas, não terem seus efeitos farmacológicos cientificamente comprovados (MACIEL et al., 2002).

É comum entre os adeptos da fitoterapia o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas e devido a isso, seriam medicamentos eficazes e seguros, sem os efeitos colaterais comuns aos produtos sintéticos. No entanto, é preciso ter muito cuidado, pois as plantas medicinais possuem metabólitos secundários que podem ser tóxicos ao

organismo humano. Portanto, somente o uso tradicional não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros e sim, devem ser realizados estudos que comprovem a eficácia e a segurança destas plantas medicinais (LAPA et al., 1999 apud SIMÕES et al., 2004).

Entre as inúmeras espécies vegetais encontradas no território nacional de interesse medicinal, encontra-se a *Mirabilis jalapa* pertencente à família Nyctaginaceae. Além do Brasil, esta planta é amplamente distribuída por diversos países, possuindo muitos usos etnofarmacêuticos que variam conforme o local em que esta espécie é utilizada. No Brasil, as folhas da *M. jalapa* são utilizadas como analgésico e agente anti-inflamatório (SOMAVILLA e CANTO-DOROW, 1996). No entanto, não existem estudos que confirmem essas atividades. Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que outras plantas dessa mesma família, tais como *Boerhaavia diffusa* e *Bougainvillea spectabilis*, apresentaram atividade antinociceptiva (HIRUMA-LIMA et al., 2000; MALAIRAJAN et al., 2006).

Dessa maneira, a importância deste estudo se justifica na investigação das propriedades antinociceptivas da *Mirabilis jalapa*, tendo como base o seu emprego na medicina tradicional.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antinociceptivo da *Mirabilis jalapa* em camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Verificar o potencial antinociceptivo do extrato bruto do caule e das folhas da *Mirabilis jalapa* e suas frações em modelos de nocicepção transitória e aguda;
2. Investigar o potencial antinociceptivo da fração acetato de etila das folhas da *Mirabilis jalapa* em modelos de nocicepção inflamatória aguda ou crônica de origem inflamatória e neuropática;
3. Avaliar a participação do sistema opióide e colinérgico no mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva da *Mirabilis jalapa*;
4. Elucidar alguns possíveis efeitos adversos que podem ser provocados pela *Mirabilis jalapa*.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Dor e nocicepção

Uma das modalidades sensoriais que atraem profunda atenção da comunidade científica por sua importância clínica é a experiência dolorosa. De acordo com o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real, ou potencial; ou descrita em termos de tal dano” (LOESER e TREEDE, 2008).

A sensação de dor tem um papel fisiológico importante, funcionando como um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que ameace a integridade física do organismo (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; WATKINS e MAIER, 2002). Porém, a dor quando persistente provoca reações emocionais desagradáveis, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os processos dolorosos afetam milhões de pessoas por todo o mundo, alterando as funções físicas e emocionais, induzindo ansiedade e depressão, diminuindo a qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho. De acordo com pesquisa realizada em 1998 pela Organização Mundial de Saúde, 22% dos pacientes que procuraram serviços primários de saúde nos cinco continentes sofriam de algum tipo de dor persistente durante seu último ano de vida (ASHBURN e STAATS, 1999).

A sensação dolorosa, geralmente acompanha a maioria das enfermidades da humanidade. Assim como outras sensações, a dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também diferentes fatores emocionais, sociais, culturais ambientais e cognitivos (RUSSO e BROSE, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Além da experiência emocional, a dor pode estar associada a um componente sensorial, denominado nocicepção. Os termos nocicepção e dor não devem ser confundidos, pois um pode ocorrer sem o outro. A nocicepção é

uma sensação (como a visual, a auditiva e a gustativa) e a dor é a percepção desta sensação. Em se tratando da utilização de modelos experimentais de dor em animais, é mais adequado usar-se o termo nocicepção, uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor. Logo, os termos dor e analgesia são mais apropriados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção são mais adequados para os animais (JONES, 1992, LOESER e TREEDE, 2008).

A nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambar ou morder a área lesada, vocalização, ou reflexo de retirar a parte do corpo agredida do contato com o estímulo nocivo. As drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas, e aquelas que o induzem são chamadas de pró-nociceptivas ou algogênicas. Convém lembrar, que as drogas antinociceptivas não são, obrigatoriamente, analgésicas, visto que a supressão do comportamento nociceptivo pode ser desencadeada por outros fatores, como prejuízo motor e sedação, que diferem de analgesia (WALKER, FOX e URBAN, 1999).

Existem várias formas de classificar a dor, sendo que um dos critérios mais adotados é a sua duração ao longo do tempo. A dor pode ser classificada como transitória, aguda ou crônica. A dor transitória tem função de alerta, caracteriza-se por ser de curta duração (alguns segundos), desaparecendo com a resolução do processo que a originou. Neste tipo de dor, a ativação dos nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual, e desempenha função protetora do organismo contra possíveis danos teciduais. Um exemplo deste tipo de dor é o contato com uma chapa quente (LOESER e MELZACK, 1999).

A dor aguda tem duração variável (dias a meses), e é fundamental para que o indivíduo proteja o órgão lesado, e facilite a sua recuperação. Já na dor aguda ocorre uma lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado. A dor pós-operatória, que consiste na dor apresentada após um procedimento cirúrgico, é um exemplo de dor aguda. Diferentemente do que ocorre em outras dores agudas, neste tipo de dor podem ser utilizadas estratégias terapêuticas capazes de prevenir o aparecimento da dor após uma cirurgia (analgesia preventiva), assim como tratamentos que visem aliviar a dor já instalada no

período pós-operatório (LOESER e MELZACK, 1999; POGATZKI-ZAHN, ZAHN, BRENNAN, 2007). O tratamento farmacológico da dor aguda é pouco eficaz utilizando-se os fármacos existentes no mercado (PORTENOY e LESAGE, 1999).

A dor crônica está associada ao dano tecidual, inflamação ou neuropatologias em que ocorrem modificações na sensibilidade a nocicepção, alterando a relação entre o estímulo e a resposta e afetando a modulação do estado doloroso resultante. Esta persiste além do tempo necessário para a cura da lesão, estendendo-se por meses ou anos, muitas vezes, mesmo na ausência de qualquer lesão tecidual. As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais como a dor relacionada a neuropatia. Ao contrário da dor aguda, o tratamento da dor crônica é mais complexo, envolvendo múltiplas abordagens e nem sempre alcançando pleno êxito na sua erradicação (DRAY, URBAN e DICKENSON, 1994; ASHBURN e STAATS, 1999; PORTENOY e LESAGE, 1999).

Durante esses quadros patológicos, o processamento sensorial é anormal. Atualmente, a hiperalgesia é um termo utilizado para designar todas as condições de sensibilidade dolorosa aumentada. Já a alodínia é utilizada para designar a dor em resposta a um estímulo não-nociceptivo. Isto porque estímulos não-nociceptivos, como o simples roçar de uma roupa sobre a pele, o vento e o frio podem desencadear uma percepção dolorosa. Assim, durante a alodínia, a intensidade ou qualidade do estímulo provoca uma resposta dolorosa desproporcional ou inesperada (LOESER e TREEDE, 2008).

#### **4.2 Mecanismos envolvidos na transmissão da dor e da nocicepção**

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral (FURST, 1999).

A percepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas das fibras sensoriais, denominadas nociceptores, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios

das raízes dorsais e nos gânglios trigeminais e que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente. Todos os tecidos, com exceção do neurópilo do sistema nervoso central, são inervados por estas fibras aferentes. Apesar disto, as propriedades destas fibras diferem, dependendo se elas são aferentes somáticas (que inervam a pele, as articulações e os músculos), ou aferentes viscerais (que inervam os tecidos cardiovasculares e respiratórios, o trato gastrointestinal, o sistema renal e reprodutivo). Esses nociceptores podem ser ativados por estímulos locais potencialmente nocivos tais como calor, frio, compressão intensa e substâncias químicas geradas pelo dano tecidual. São distinguidos de outras espécies de receptores mecânicos e térmicos por seu limiar mais alto, porque são normalmente ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva, suficientes para causar certo grau de lesão tecidual (JULIUS e BASBAUM, 2001, HUNT e MANTYH, 2001, CRAIG 2003, BASBAUM et al., 2009).

Na percepção da dor os neurônios aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos. As fibras A $\delta$  são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda, sendo pouco mielinizadas, de médio diâmetro (2 a 6  $\mu\text{m}$ ) e velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s). Já as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa, sendo amielinizadas, de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$ ) e velocidade de condução lenta (0,5 a 2 m/s) (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001, BASBAUM et al., 2009).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas transmitem a informação nociceptiva da periferia até o corno dorsal da medula espinhal e suas terminações encontram-se principalmente nas lâminas I (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). No corno dorsal da medula espinhal, os neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, estes cruzam a medula espinhal ascendendo no trato espinotalâmico chegando até as fibras terminais localizadas principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensorial, onde existe o componente emocional da dor. Assim, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo

nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção do estímulo nociceptivo. Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral, fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular gigantocelular. Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação descendente dos neurônios de segunda ordem (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição nociceptiva descendente tais como opióides, acetilcolina, serotonina e noradrenalina parecem inibir a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (RUSSO e BROSE, 1998; FURST, 1999; MILLAN, 1999).

### **4.3 Sistema Colinérgico**

A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico, exercendo um papel crucial no sistema nervoso central. Esta é sintetizada no citosol do neurônio pré-sináptico a partir de colina e de acetil-coenzima A (SOREQ e SEIDMAN, 2001)

A colina acetiltransferase é a enzima responsável pela síntese de ACh, catalisando a transferência de um grupo acetil, proveniente de uma molécula de acetil-coenzima A, para uma molécula de colina. Os níveis de acetil-coenzima A são mantidos através do metabolismo da glicose, sob ação da enzima ATP-citrato liase, que apresenta sua expressão aumentada em neurônios colinérgicos (TOMASZEWICZ et al., 2003; BEIGNEUX et al., 2004). O suprimento de colina é provido principalmente da dieta, devido à incapacidade dos neurônios em sintetizar a colina. A colina atravessa a membrana do terminal axônico por um mecanismo de transporte ativo específico. Depois de sintetizada, a acetilcolina é armazenada nas vesículas pré-sinápticas (ZEISEL, 1981).

Após o acúmulo de ACh nas vesículas pré-sinápticas, essas são direcionadas para uma região subjacente à membrana sináptica denominada zona ativa. As vesículas são ancoradas à membrana sináptica e se tornam responsivas às mudanças na concentração intracelular de cálcio. Quando um

potencial de ação atinge o terminal nervoso, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos. As ondas de cálcio resultantes induzem a fusão de vesículas sinápticas com a membrana e a consequente liberação de ACh (SUDHOF, 2004).

A acetilcolina liberada pode ser degradada pelas colinesterases ou combinar-se com os receptores colinérgicos pós e pré-sinápticos (WESSLER, KIRKPATRICK, RACKÉ, 1998; PRADO et al., 2002). Logo após exercer sua ação, a acetilcolina sofre hidrólise pelas colinesterases, liberando o ácido acético e a colina. A colina resultante é em parte recaptada para o terminal pré-sináptico através de um mecanismo de recaptção de alta afinidade onde poderá ser reutilizada na síntese de novas moléculas de acetilcolina (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica. Estas enzimas possuem estruturas moleculares muito semelhantes, mas que diferem entre si pelas suas propriedades catalíticas, especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993).

Existem dois tipos distintos de colinesterase, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como ACh) e a BuChE ou pseudocolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A AChE é predominante no cérebro, junção neuromuscular e eritrócitos (SOREQ e SEIDMAN, 2001). Já a BuChE tem distribuição neuronal muito restrita se comparada a AChE, mas é amplamente distribuída no rins, intestinos, pulmão, fígado e plasma (MESULAM et al., 2002, JONES e DUNLOP, 2007).

Nas sinapses colinérgicas, a AChE é extremamente importante para o bom funcionamento do organismo, pois a hidrólise da acetilcolina pela AChE limita a ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos. Sabe-se que a hiperatividade destes receptores causa vários efeitos fisiológicos adversos e pode resultar em insuficiência respiratória e morte (JONES e DUNLOP, 2007).

As numerosas e importantes ações fisiológicas da acetilcolina são iniciadas pela sua ligação a duas classes distintas de receptores da membrana

plasmática: os receptores nicotínicos e muscarínicos (JONES e DUNLOP, 2007).

A ação rápida da acetilcolina é mediada pela interação com receptores nicotínicos da acetilcolina, que são estruturas pentaméricas atuando como canais iônicos controlados por ligantes. As cinco subunidades que formam o complexo receptor-canal apresentam uma estrutura similar, e já foram identificados e clonados 16 diferentes membros da família, designados como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , e  $\epsilon$ . As diferentes associações destas subunidades conferem propriedades estruturais e funcionais distintas aos diferentes subtipos de receptores nicotínicos (DAJAS-BAILADOR e WONNACOTT, 2004; JONES e DUNLOP, 2007).

Ao agir sobre a membrana pós-sináptica de uma sinapse nicotínica, a acetilcolina provoca grande aumento na permeabilidade dessa membrana a cátions, principalmente ao sódio, que promove rápida despolarização dando início a um potencial de ação na fibra muscular e a liberação de outros neurotransmissores como a dopamina (DAJAS-BAILADOR e WONNACOTT, 2004; JONES e DUNLOP, 2007).

A acetilcolina também tem seus efeitos mediados pelos receptores muscarínicos, e são conhecidos cinco subtipos moleculares (M1-M5). Baseado na sua habilidade em ativar diferentes classes de proteína G, os cinco subtipos podem ser agrupados em duas principais classes funcionais. Os receptores M2 e M4 acoplam-se a proteína  $G_i$ , inibindo a adenilil-ciclase e reduzindo assim o AMPc intracelular. Já os receptores M1, M3 e M5 acoplam-se a proteína  $G_q$  para ativar as vias fosfato de inositol. Diferentes abordagens experimentais têm demonstrado que receptores muscarínicos estão presentes em todos os órgãos, tecidos ou tipos celulares (WESS, EGLIN, GAUTAM, 2007; JONES e DUNLOP, 2007).

Os efeitos dos agonistas de ambos os receptores (muscarínicos e nicotínicos) e dos inibidores da AChE, coletivamente denominados colinomiméticos, tem efeitos já bem estabelecidos. Estes compostos inibem a sinalização da dor em humanos e animais e já comprovaram a sua eficácia em diferentes modelos pré-clínicos e clínicos de dor (JONES e DUNLOP, 2007).

A medula espinhal é o maior sítio de ação dos colinomiméticos na analgesia. A administração de substâncias colinérgicas pela via intratecal

causa antinocicepção por mimetizar a liberação de ACh dos nervos espinhais. Estímulos nocivos aumentam a liberação de acetilcolina na medula espinhal, como foi visto no fluido cérebro-espinhal de ovelhas depois de um estímulo nocivo (EISENACH, HOOD e CURRY, 1997).

Um dos fármacos mais utilizados na clínica para a inibição da AChE é a neostigmina. A neostigmina quando administrada por via intratecal em seres humanos saudáveis, aumentou os níveis de ACh no fluido cérebro-espinhal destes, provocando analgesia frente a estímulos nocivos. Esse dados sugerem que há uma liberação de ACh na medula espinhal, cujas ações estão aumentadas na presença deste inibidor (HOOD et al., 1997).

Além da participação do sistema colinérgico na analgesia da dor aguda, alguns estudos sugerem que a modulação deste sistema é viável para o tratamento da dor neuropática. A alodínia mecânica observada em ratos tratados com estreptozotocina foi revertida pelo inibidor da AChE, a neostigmina. Esses dados sugerem um potencial terapêutico na dor neuropática (CHEN, WESS e PAN, 2005).

Apesar da eficácia dos inibidores da colinesterase, seu uso clínico é limitado devido aos efeitos adversos que estes inibidores provocam. No entanto, estudos têm demonstrado que a co-administração de uma baixa dose de neostigmina pode melhorar as ações dos opióides, sem aumentar os seus efeitos colaterais (HOOD et al., 1997).

#### **4.4 Tratamento farmacológico da dor**

Várias estratégias podem ser adotadas para o controle da dor, porém a abordagem farmacológica é, sem dúvida, a mais utilizada. O tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), que incluem a dipirona, o diclofenaco, o paracetamol, entre outros (WARNER e MITCHELL, 2004).

Os opióides são drogas derivadas do ópio e incluem a morfina, a codeína e uma ampla variedade de congêneres semi-sintéticos derivados destes. É bem descrito na literatura que os opióides interagem com três tipos de receptores, chamados receptores opióides clássicos  $\mu$  (MOR),  $\delta$  (DOR) e  $\kappa$

(KOR). Estes receptores pertencem à família de receptores acoplados à proteína Gi/o, estes provocam a inibição da adenil-ciclase e a redução do conteúdo intracelular de monofosfato de adenosina cíclico. Eles também facilitam a abertura dos canais de potássio (causando hiperpolarização) e inibem a abertura dos canais de cálcio, o que reduz a excitabilidade de neurônios envolvidos na transmissão da informação nociceptiva (FRIES, 1995; DICKENSON e KIEFFER, 2006).

Os opióides são muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, porém a sua utilização é limitada, pois estes apresentam muitos efeitos adversos, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição e depressão respiratória. Além disso, a tolerância aos opióides instala-se rapidamente (NUKI, 1983; RUSSO e BROSE, 1998; CAMU & VANLERSBERGUE, 2002).

Os AINEs têm vantagem sobre os analgésicos opióides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico. Embora os AINEs sejam bastante eficazes no tratamento de quadros dolorosos, muitas vezes o seu uso é limitado devido à ocorrência de efeitos adversos tais como hemorragias, úlcera gástrica, falência renal e hepática, reações cutâneas, crises asmáticas e problemas cardiovasculares (WOLFE, LICHTENSTEIN e SINGH, 1999; BOELSTERLI, 2003; WARNER e MITCHELL, 2004; CORUZZI, VENTURI e SPAGGIARI, 2007).

Em 1971, Vane demonstrou que o principal mecanismo de ação dos AINEs era inibir a síntese de prostaglandinas (PGs), através da inibição da atividade da enzima ciclooxigenase (COX). Vários anos se passaram até a descoberta da existência de pelo menos duas isoformas de COX envolvidas na ação não específica dos AINEs, a COX-1 e a COX-2. A maioria dos AINEs é de inibidores de ambas as isoenzimas como o diclofenaco, a indometacina e o ibuprofeno (BOELSTERLI, 2003; RAO e KNAUS, 2008).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, inclusive nas plaquetas do sangue. Está envolvida na homeostase dos tecidos e é responsável pela produção de PGs envolvidas na citoproteção gástrica, na agregação plaquetária e na auto-regulação do fluxo sanguíneo renal (CORUZZI, VENTURI e SPAGGIARI, 2007).

Por outro lado, a COX-2 não é normalmente expressa sob condições fisiológicas e sim, induzida nas células inflamatórias quando são ativadas.

Desta forma, esta isoforma é responsável pela produção de PGs envolvidas na inflamação (WEIR et al., 2003; CORUZZI, VENTURI e SPAGGIARI, 2007). Acreditava-se que a ação anti-inflamatória dos AINEs estava relacionada com a inibição da COX-2, enquanto que seus efeitos indesejáveis, particularmente o efeito gastrointestinal, resultavam da inibição da COX-1. Porém, recentemente foi demonstrada a associação entre agentes seletivos para COX-2, como por exemplo, o rofecoxib e os distúrbios cardiovasculares graves. Assim, é imprescindível considerar que cada uma das isoformas da COX parece exercer papéis importantes na fisiologia celular e que, provavelmente, ambas as isoformas participem do processo inflamatório, cada uma sob circunstâncias particulares (CORUZZI, VENTURI e SPAGGIARI, 2007).

De maneira geral, o emprego do arsenal terapêutico atual raramente resulta na eliminação da dor, principalmente a dor crônica. Ao contrário, muitos pacientes continuam refratários aos tratamentos, seja pela persistência das crises ou por efeitos colaterais. Diante deste contexto, o emprego de terapias combinadas vem sendo preconizado para se obter um melhor efeito analgésico, utilizando doses menores de cada droga, objetivando reduzir os efeitos adversos. No entanto, a necessidade de se identificar novos fármacos que possam ser úteis no tratamento da dor continua sendo de grande interesse.

#### **4. 5 Plantas medicinais com potencial analgésico**

A utilização de plantas medicinais para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Em todas as fases de desenvolvimento de várias civilizações pode-se observar que sempre prevaleceu uma estreita relação entre o homem e as plantas (VEIGA e PINTO, 2005).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças, apresenta fundamentalmente, influência da cultura indígena, africana e européia. Observações populares sobre a utilização e a eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das ações terapêuticas das plantas. Estas são utilizadas com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitos não terem seus constituintes químicos e suas

propriedades tóxicas conhecidas (MACIEL et al., 2002).

De acordo com Calixto e colaboradores (2000), apesar dos grandes avanços na medicina moderna, os produtos naturais, principalmente os metabólitos secundários originados de plantas, contribuíram decisivamente para a terapêutica moderna e para o nosso conhecimento sobre importantes mecanismos relacionados com o processo de transmissão e o tratamento da dor, como a caracterização dos tipos de receptores e dos ligantes endógenos envolvidos no processo nociceptivo.

Em países de clima tropical, como o Brasil, que apresentam grande biodiversidade, há um crescente interesse da indústria farmacêutica para a produção de agentes terapêuticos de origem natural. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detêm cerca de 20-22% das plantas e microrganismos do planeta (CALIXTO et al., 2005).

Atualmente, os esforços para a descoberta de novos fármacos são dirigidos no sentido de buscar alternativas para superar a dependência externa, já que 84% dos fármacos são importados, no que concerne ao Brasil, e que 78% da produção brasileira é produzida por empresas multinacionais (CALIXTO et al., 2005).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas medicinais, incluindo dentre outros a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, a quinina, a atropina e a escopolamina. A *Papaver somniferum* têm sido utilizada popularmente por suas propriedades analgésicas desde 3000 a.C. No látex desta planta estão contidos alcalóides como a morfina, a codeína e a papaverina que são os responsáveis pela sua atividade analgésica (HASS, 1983; WALKER, 1995; CALIXTO et al., 2000).

Outro exemplo que destaca a importância das plantas neste aspecto é o ácido salicílico, que teve origem na casca do salgueiro, árvore do gênero *Salix* (Salicaceae). No século XVII, descobriu-se que a casca do salgueiro é tão amarga quanto à de uma árvore do Peru, a *Cinchona magnifolia* (quina), cujo extrato era o remédio supremo contra a malária. Assim, a infusão da casca de salgueiro passou a ser usada como medicamento antitérmico pelos europeus. Em 1829, o francês Leurox obteve da casca do salgueiro uma substância que

denominou salicina e em 1838, foi sintetizado o ácido salicílico. O ácido salicílico foi a primeira substância usada como antipirético e tamb. Em 1859, a partir do ácido salicílico, o cientista Gilm, obteve o ácido acetilsalicílico, que é consumido em grande escala por todo o mundo, como analgésico e antitérmico (HASS, 1983; WALKER, 1995).

Atualmente, a procura por novas substâncias que possam ser utilizadas para a melhoria da qualidade de vida da sociedade tem despertado o interesse principalmente das indústrias farmacêuticas por plantas empregadas na medicina popular. Desta forma, a abordagem etnofarmacológica é de grande importância, pois combina informações adquiridas nas comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos.

#### **4.6 *Mirabilis jalapa***

A *Mirabilis jalapa* pertencente à família Nyctaginaceae (Figura 1) é nativa da América tropical (LORENZI e SOUZA, 1999) e foi introduzida na Europa no começo do século XVII. Esta planta era muito utilizada devido as suas propriedades purgativas. Seu emprego já foi muito intenso, tendo decaído pelo aparecimento de outros medicamentos mais eficazes e mais agradáveis ao uso, pois esta tem efeito irritante sobre as mucosas intestinais (CORRÊA, 1978).

Gregório Mendel usou essa planta para a condução de ensaios comprobatórios para as suas leis da Hereditariedade. Cruzando as flores de *Mirabilis* de coloração branca com as de coloração vermelha observou a transmissão de caracteres dominantes e recessivos, com segregação nas gerações subsequentes (KISSMANN e GROTH, 1995).

*M. jalapa* é uma planta ornamental muito cultivada pela beleza de suas flores, que, entretanto não ficam abertas durante a maior parte do dia. À noite e em dias escuros manifestam a sua beleza e exalam um cheiro agradável. As raízes têm sido usadas para fins medicinais e em compêndios antigos de Farmacopéias aparecem identificadas como “*Radix Nyctaginis Mechoacannae*”, recomendadas como catárticas (KISSMANN e GROTH, 1995).

Conhecida popularmente como batata-de-purga, belas-noites, boa-morte, boa-noite, bonina, beijos-de-frade, pó-de-arroz, flor-das-quatro-horas,

jalapa, jalapa-falsa, maravilha-branca, maravilha-de-forquilha, maravilha-vermelha, entre outras denominações que variam de acordo com a localidade. A sinonímia desta planta é *Jalapa odorata* L., *Mirabilis corymbosa* Sieber e *Mirabilis dichotoma* L (CORRÊA, 1984; LORENZI e MATOS, 2002).

A origem do nome *Mirabilis* conforme Kissmann e Groth (1995) é devido esta planta ser antigamente conhecida como “*admirabilis*” que significa admirável, bela. Linnaeus abreviou o adjetivo para *mirabilis*. O termo jalapa é pela semelhança das raízes de *Mirabilis* com as de *Convolvulus jalapa*, que são citadas em algumas farmacopéias como medicinais.



Figura 1- *Mirabilis jalapa* L.

Fonte: <http://www.toptropicals.com>

A *M. jalapa* é utilizada popularmente para o tratamento de infecções, inflamações e dores (DIMAYUGA, VIRGEN e OCHOA, 1998). Na América Latina, esta planta é utilizada devido as suas propriedades purgativas e eméticas, as quais são atribuídas as suas raízes (PERROT, 1943 apud CHIFUNDERA, BYAMANA e MBUYI, 1991). Em Madagascar o seu uso é para atenuar a dor intestinal. No sul da África, as raízes são utilizadas como drogas purgativas e as flores são usadas como repelente de mosquitos, devido ao forte odor que estas exalam a noite (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962 apud CHIFUNDERA, BYAMANA e MBUYI, 1991; KUSAMBA, BYAMANA e MBUYI, 1991).

No México esta planta é utilizada para o tratamento de diversas condições dolorosas como a dor produzida por picadas de escorpião e de abelha (DIMAYUGA, VIRGEN e OCHOA, 1998). Além disso, um levantamento

do uso de plantas medicinais realizado em Santa Maria, RS, revelou que a população faz uso das folhas de *M. jalapa* para o tratamento de dores, inflamação, hemorróidas e nos processos digestivos (SOMAVILLA e CANTO-DOROW, 1996).

Existem poucas descrições na literatura sobre a caracterização fitoquímica e a atividade farmacológica da *M. jalapa*. Alguns compostos foram isolados das partes aéreas desta planta, como  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, estigmasterol, ácido oleanólico e ácido ursólico (SIDDIQUI et al., 1990, 1994).

Os extratos metanólicos de caules, folhas, sementes e flores (botões florais, cálices e pétalas) da *M. jalapa* foram testados na contratibilidade muscular do intestino de coelhos. Os extratos das flores apresentaram uma maior atividade inibitória quando comparados aos extratos de caule, folhas e sementes. O composto  $\beta$ -sitosterol, obtido por purificação do extrato das flores, não mostrou nenhum efeito na contratibilidade do intestino de coelhos (ARROYO, CHACÓN e MAKI, 2004). Outro estudo demonstrou o envolvimento do sistema adrenérgico e serotoninérgico no efeito inibitório do extrato metanólico de flores da *M. jalapa* na contratibilidade muscular do intestino de coelhos (AOKI et al., 2008).

Walker e colaboradores (2007, 2009) observaram que os extratos brutos e as frações dos caules e das folhas da *M. jalapa* apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana. As melhores respostas para a atividade antimicrobiana foram obtidas para *Staphylococcus aureus* com a fração diclorometano do caule e para *Saccharomyces cerevisiae* com a fração acetato de etila das folhas. Além disso, observou-se que extrato bruto do caule e as frações acetato de etila do caule e das folhas da *M. jalapa* não apresentaram toxicidade no teste de letalidade frente à *Artemia salina*. Também se verificou um teor de quercetina de 0,19% no extrato das folhas através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Diversos estudos como os de Kataoka et al. (1991, 1992) e Wong et al. (1992) apontam *M. jalapa* como antiviral. A inibição viral é atribuída a uma proteína isolada chamada Proteína Antiviral de *Mirabilis jalapa* (MAP), encontrada em maior concentração nas raízes a qual contém as Proteínas de Inativação Ribossômicas (RIPs), que exibem potente efeito inibitório na síntese protéica eucariótica e procariótica.

Por esta planta ser muito utilizada popularmente em diversas partes do mundo é de extrema importância estudos que comprovem a eficácia e a segurança desta. Devido a isso, a relevância deste trabalho é a comprovação do uso etnofarmacêutico da *M. jalapa*.

## 5. ARTIGO E MANUSCRITO CIENTÍFICOS

Os resultados inseridos nesta tese apresentam-se sob a forma de artigo e manuscrito científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no artigo e no manuscrito. O artigo está disposto na mesma forma que foi publicado na revista científica. O manuscrito está disposto da mesma maneira que será submetido à revista Journal of Ethnopharmacology.

### 5.1 Artigo: Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice

Cristiani I.B.Walker, Gabriela Trevisan, Mateus F. Rossato, Carina Franciscato, Maria E. Pereira, Juliano Ferreira\*, Melânia P. Manfron

Journal of Ethnopharmacology 120 (2008) 169–175



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in miceCristiani I.B. Walker<sup>a,b</sup>, Gabriela Trevisan<sup>a</sup>, Mateus F. Rossato<sup>a</sup>, Carina Franciscato<sup>c</sup>, Maria E. Pereira<sup>c</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,\*</sup>, Melânia P. Manfron<sup>b</sup><sup>a</sup> Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 December 2007

Received in revised form 29 July 2008

Accepted 2 August 2008

Available online 8 August 2008

## Keywords:

*Mirabilis jalapa*

Nyctaginaceae

Tail-flick

Constriction test

Gastrointestinal transit

Gastric lesion

Muscarinic

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** The infusion or decoction of *Mirabilis jalapa* leaves is used in traditional medicine in Brazil to treat inflammatory and painful diseases.**Aim of the study:** The present study examined the antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* extracts from leaves and stems in models of pain in mice.**Materials, methods and results:** The crude hydroethanolic extract from leaves (CrDL) was more potent than the crude extract from stems (CrDS) to inhibit abdominal constrictions induced by acetic acid, with ID<sub>50</sub> values of 5.5 (2.3–13.1) and 18.0 (11.3–28.5) mg/kg, respectively. Among the fractions tested, the Eta fraction from leaves (Eta) was more effective (maximal inhibition of 83 ± 8%) and potent (ID<sub>50</sub> of 1.1 (0.6–2.1) mg/kg) to induce antinociception. Eta and CrDL also possessed an antinociceptive effect in the tail-flick test. Pre-treatment with naloxone did not modify the antinociceptive effect of Eta, but co-administration with atropine completely prevented it. This suggests that the antinociceptive effect might depend on the cholinergic system. Instead, Eta was not able to alter the acetylcholinesterase activity in blood or spinal cord. Concerning side effects, Eta did not alter locomotor activity, body temperature, gastrointestinal transit and did not produce gastric lesions.**Conclusion:** Our results demonstrate that *Mirabilis jalapa* presents antinociceptive activity in mice, which supports its folkloric use as an analgesic.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Over the years, natural products have contributed to the development of important therapeutic drugs used currently in modern medicine. The study of plants that have been traditionally used as pain killers should still be seen as a fruitful and logical research strategy, in the search for new analgesic drugs and pain mechanisms (Calixto et al., 2000). *Mirabilis jalapa* belongs to the family Nyctaginaceae and is known as 'maravilha' or 'bonina' in Brazil and 'four o'clock', 'marvel-of-Peru', 'belle de nuit' or 'dondiego de noche' in different countries (Corrêa, 1984). In spite of its wide cultivation in several countries as a decorative plant, it is native of tropical America (Lorenzi and Souza, 1999).

*Mirabilis jalapa* has been well characterized with respect to its chemical components. Several compounds have been isolated from its aerial parts, such as β-sitosterol, stigmasterol, ursolic acid, oleanolic acid and brassicasterol (Siddiqui et al., 1990, 1994), and *Mirabilis* antiviral protein has been isolated from its roots (Kataoba et al., 1991). Regarding its biological activity, this plant has antibacterial and antiviral activities (Kusamba et al., 1991; Kataoba et al., 1991; Dimayuga et al., 1998). Cosmetic or dermo-pharmaceutical compositions containing *Mirabilis jalapa* are claimed to be useful against inflammation and dry skin (Linter, 2002). Moreover, methanolic extracts from the flowers, stems and leaves induced contractions of isolated jejunum muscle, and the most effective was the flowers extract (Cortés et al., 2004). Another recent study has shown the involvement of adrenergic and serotonergic mechanisms in the inhibitory effect of *Mirabilis jalapa* flower extract on smooth muscle contractility (Aoki et al., 2008).

*Mirabilis jalapa* leaves are used in traditional folk medicine in the South of Brazil to treat inflammatory and painful diseases and as a laxative (Corrêa, 1984; Siddiqui et al., 1990; Somavilla and Canto-Dorow, 1996). As a laxative, 2–4 g of root powder in water are indicated for adults (Quer, 1962). For analgesic purposes, the infusion or decoction of leaves is popularly used (Somavilla and

**Abbreviations:** CrDL, crude extract from leaves; CrDS, crude extract from stems; Hex, *n*-Hexane fraction; Eta, ethyl acetate fraction; But, *n*-Butanol fraction; Dich, dichloromethane fraction.

\* Corresponding author at: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: [ferreiraj99@gmail.com](mailto:ferreiraj99@gmail.com) (J. Ferreira).

Canto-Dorow, 1996). Thus, the major aim of this study is to evaluate the possible antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* extracts, in models of visceral and thermal pain, in mice. We also investigated some possible mechanisms of action and adverse effects caused by *Mirabilis jalapa*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The plant was collected in March 2006, in Santa Maria, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. A voucher specimen number SMDB 10.077 was deposited at the Herbarium of the Botany Department, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

### 2.2. Extraction and fractionation

Fresh leaves and stems were dried in a ventilated oven (45 °C). Previously powdered dried leaves and stems were macerated with ethanol (70%) at room temperature. The crude hydroethanolic extracts from leaves (CrDL) or from stems (CrDS) were concentrated until dryness in a rotary evaporator. The dry hydroethanolic extract from leaves was dissolved in methanol (10%) and partitioned with *n*-hexane (Hex), dichloromethane (Dich), ethyl acetate (Eta) or *n*-butanol (But), respectively. The yields of CrDL and CrDS are 14,25 and 22,45% (w/w), respectively. The yields of these fractions in relation to the CrDL were 23, 6, 4 and 35% (w/w) for Hex, Dich, Eta and But, respectively.

### 2.3. Animals

Adult male albino Swiss mice (25–35 g) bred in our animal house were used. Animals were housed at controlled temperature (22 ± 2 °C) with a 12 h light/dark cycle and with standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. Each animal was used only once. All protocols employed have been approved by the Local Ethic's Committee (process number: 23081.010134/2007-66) and are in accordance the US guidelines for the care and use of Laboratory animals (NIH publication #85-23, revised in 1985). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

### 2.4. Visceral pain model

To investigate the possible antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa*, leaf or stem crude extracts (1–100 mg/kg, p.o.) were tested in the writhing test induced by intraperitoneal injection of acetic acid 0.6% (Ferreira et al., 2000). Morphine (10 mg/kg, p.o.) was used as a positive control. We also tested the effect of some fractions from the leaf extract and compared their actions with the CrDL. The doses tested (10, 2.3, 0.6, 0.4 and 3.5 mg/kg, p.o., for CrDL, Hex, Dich, Eta or But fractions, respectively) were based on the fraction yield (see above). The animals were placed in glass chambers for 30 min before the experiment for habituation. One hour after oral treatment, the animals received an intraperitoneal injection of acetic acid solution, and the number of writhes was assessed during 30 min after the injection. The decrease in the number of writhes was considered the antinociceptive index. In this same manner, we evaluated the dose–response and time-course of antinociceptive effects of *Mirabilis jalapa* CrDL and Eta or CrDS (0.1–100 mg/kg, p.o.) in other groups of animals.

### 2.5. Investigation of some mechanisms of action

In order to investigate the participation of the muscarinic or opioid system in the antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* leaf Eta, mice were pre-treated with atropine (5 mg/kg, s.c.), naloxone (2 mg/kg, i.p.) or vehicle 1 h before the experiment. Eta (10 mg/kg, p.o.) or pilocarpine (1 mg/kg, s.c., used as positive control for atropine pre-treatment), morphine (10 mg/kg, p.o., used as positive control for naloxone pre-treatment) or vehicle was administered and 1 h later the animal was exposed to the acetic acid writhing test as described above. The choice of the dose of agonists and antagonists and their treatment times were based on previous data described in the literature (Sheardown et al., 1997; Yue et al., 2007).

### 2.6. Thermal pain model

Another test used to evaluate the possible antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* was the tail-flick test, which consists of measuring the reaction time to tail-flick after the tail was immersed in a bath heated to 48 °C (D'Amour and Smith, 1941). Before the test, the baseline latency (6–7 s) was determined. At 0.5, 1, 2 and 4 h after the administration of vehicle (10 mL/kg, p.o.), Eta or CrDL (10 mg/kg, p.o.) tail-flick latency was reassessed, and differ from the control and test were calculated. An 18 s maximum latency was employed to avoid tissue damage. Antinociception was expressed as percentage of maximum possible effect calculated as: %MPE = [(test – baseline)/(18 – baseline)] × 100.

### 2.7. Acetylcholinesterase activity

For the assay, animals were treated with vehicle, Eta or CrDL (10 mg/kg, p.o.) and then euthanized by pentobarbital overdose (10 mg/kg, i.p.). Blood was then immediately collected from the hepatic vein, using a heparinized syringe. The sample was diluted 1:100 in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) with 0.03% Triton X-100. Samples of the spinal cord were also collected from the same animals by mechanical extrusion using cold saline. These samples were homogenized in 1 mL of potassium phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4) and diluted 1:5 in the same buffer. After preparation, both samples were frozen until analysis. For the assay, 500 µL of sample were added to 1 mL of phosphate buffer (blood) or potassium buffer (spinal cord), 50 µL of DTNB 10 mM and 25 µL of acetylthiocholine (ATC; 28.4 mM). The tubes were incubated in a water bath at 37 °C during 3 min. Then, 10 µL of ethopropazine (3 mM), an inhibitor of butyrylcholinesterase, were also added. The development of color was measured at 435 nm for blood (Worek et al., 1999) and 412 nm for spinal cord (Pereira et al., 2004). Results were expressed in µM ATC hydrolysed/hour/mg protein.

### 2.8. Gastrointestinal transit

As *Mirabilis jalapa* is popularly used for its laxative effect, we also decided to test the possible effect of *Mirabilis jalapa* CrDL and Eta in the gastrointestinal transit. In this study, mice were fasted for 18–24 h (water *ad libitum*) before the gastrointestinal transit analyses, as described previously (Milano et al., 2008). The animals were treated with Eta (10 mg/kg, p.o.), CrDL (10 mg/kg, p.o.), castor oil (10 mL/kg, p.o., used as positive control) or vehicle (10 mL/kg, p.o.) and 55 min later, a standard charcoal meal (5% charcoal, 20% Arabic gum, 0.3 mL) was given to mice by gavage. Five minutes after administration of the charcoal meal, the animals were euthanized and their stomachs and small intestines were removed to measure the length of the intestine (from the pyloric sphincter to the ileum–caecal junctions, the total gut length) and the distance traveled by the charcoal meal. Propulsive activity of the gut was

determined by the percentage of gastrointestinal traveled charcoal, calculated as:  $\text{traveled\%} = 100 \times (\text{charcoal traveled distance} / \text{total gut length})$ .

### 2.9. Ulcerogenic activity

To evaluate the gastric tolerability of animals after oral administration of *Mirabilis jalapa*, mice were fasted for 18 h prior to drug exposure (water *ad libitum*). The animals were treated with Eta, CrdL (10 mg/kg, p.o.), indomethacin (100 mg/kg, p.o., used as positive control) or vehicle (10 mL/kg, p.o.). Four hours later, animals were euthanized and the stomachs were opened by cutting along the greater curvature, washed with saline 4 °C. Immediately after that, the development of lesions was assessed with support of a magnifying glass. The quantification of gastric mucosal lesions was scored according to their number and size in a scale from 0 up to 8 points, adapted from Magistretti et al. (1988), as follows: (0) without injury, (1) color modification, (2) few petechia/alterations of villous, (3) 1–3 small injuries ( $\leq 1$  mm length), (4) 1–3 big injuries ( $\leq 1$  mm length), (5) 1–3 big injuries ( $> 1$  mm), (6) more than three small injuries, (7) more than three big injuries and (8) more than three deep injuries.

### 2.10. Rectal temperature

To evaluate whether Eta or CrdL was able to change the body temperature, rectal temperature was determined before and 0.5, 1, 2 and 4 h after drug administration (10 mg/kg, p.o.), as previously described (Otuki et al., 2001). The difference between pre-injection and post-injection values was calculated ( $\Delta$  °C).

### 2.11. Locomotor activity

In order to investigate the possible effect of Eta or CrdL over the forced and spontaneous locomotor performance was tested in the rotarod and open-field tests, respectively (Milano et al., 2008). Twenty-four hours before the tail-flick test, all animals were trained in the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 r.p.m.) until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the day of the experiment, right after the measurement of tail-flick latency, each mouse was tested in the rotarod. The latency to fall and the number of falls from the apparatus were recorded with a stopwatch for up to 4 min. The open-field test was performed in another group of animals. The apparatus was a rectangular arena (28 cm  $\times$  18 cm  $\times$  12 cm) with the floor divided into 18 equal squares. The number of areas crossed with all paws and number of rearing responses were recorded.

### 2.12. Acute toxicological evaluation

To assess the acute toxicity of *Mirabilis jalapa*, we attempted to determine the LD<sub>50</sub> value from the Eta and CrdL using the up-and-down method as described by Bruce (1985). After the administration of one single dose of *Mirabilis jalapa* (10, 30, 100, 300, 1000, 3000 mg/kg, p.o.), the survival of animals was observed during 24 h. If an animal survived at any given dose, the dose for the next animal was logarithmically increased; if it died, the dose was decreased. Doses above 3000 mg/kg were not tested due to solubility problems.

### 2.13. Drugs and reagents

All extracts were prepared in the Laboratory of Pharmacognosy from UFSM, diluted in 5% Tween 80, 20% polyethylenoglycol and 75% saline and administered orally. Morphine sulphate (Cristália, Brazil), indomethacin (Sigma) and pilocarpine (Merck) were also

diluted in the same vehicle and administrated by oral route. Naloxone sulphate and atropine sulphate were purchased from Sigma and diluted in saline solution for intraperitoneal administration. 5,5'-Dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB), ethopropazine and acetylthiocholine were purchased from Sigma. Arabic gum, activated charcoal, acetic acid and Triton X-100 were purchased from VETEC (Rio de Janeiro, Brazil).

### 2.14. Statistical analysis

The results of antinociceptive and side effects were expressed as means  $\pm$  S.E.M., and the gastric lesion scores were expressed as median, and ID<sub>50</sub> values (i.e. the dose of compounds that reduces nociceptive responses to the order of 50% relative to the control value), which were reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), or *t*-test when appropriate. Post hoc tests (Student–Newman–Keuls test–SNK) were carried out when appropriate. Non-parametric Kruskal–Wallis followed by Dunn's test was used to analyze gastric lesion scores. The ID<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis using a sigmoidal dose–response equation of individual experiments using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA).

## 3. Results

### 3.1. Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* extracts and its fractions

Firstly, we verified the effect of CrdL and CrdS on the nociception induced by acetic acid. Both CrdL and CrdS treatments (1–100 mg/kg, p.o.) reduced the number of abdominal writhes induced by acetic acid (Fig. 1A and B). CrdL and CrdS had similar efficacy to produce antinociception (maximal inhibitions of  $65 \pm 13$  and  $77 \pm 6\%$ , respectively), but CrdL was more potent than CrdS with calculated ID<sub>50</sub> values of 5.5 (2.3–13.1) and 18.0 (11.3–28.5) mg/kg, respectively. Thus, we choose the CrdL to conduct further studies. The antinociceptive effect produced by CrdL was induced quickly, being observed as early as 30 min after oral treatment, but it was short-lasting, not lasting more than 1 h (Fig. 1C). Next, we assessed the effect of several fractions from CrdL in the same nociception test. When tested in doses based on their yields in CrdL, only treatment with the Eta produced antinociceptive action (Fig. 1D).

The antinociceptive effect of Eta was of the same magnitude as that produced by CrdL. For this reason, the Eta was chosen for dose–response and time-course studies (Fig. 2A and B). The Eta had an antinociceptive effect from 0.5 up to 2 h after treatment, with an ID<sub>50</sub> value of 1.1 (0.6–2.1) mg/kg and maximal inhibition of  $77 \pm 8\%$ . The antinociceptive effect of Eta was of the same magnitude as that produced by morphine (10 mg/kg, p.o.).

To confirm their antinociceptive effect, we also investigate Eta and CrdL action in the tail-flick test. In this model, both extracts also showed significant antinociceptive effect (10 mg/kg; p.o.) (Fig. 3A and B). The antinociceptive effect observed for CrdL started at 0.5 and lasted up to 1 h after treatment, while the Eta antinociceptive effect lasted up to 2 h.

### 3.2. Side effects investigation

Firstly, we evaluated the alteration in gastrointestinal transit produced by *Mirabilis jalapa*. In this study, Eta did not change gastrointestinal motility. On the other hand, CrdL or castor oil increased the gastrointestinal transit in treated mice (Fig. 4).

We also evaluated the possible ulcerogenic activity of *Mirabilis jalapa*. Neither Eta nor CrdL (10 mg/kg, p.o.) were induced ulcero-

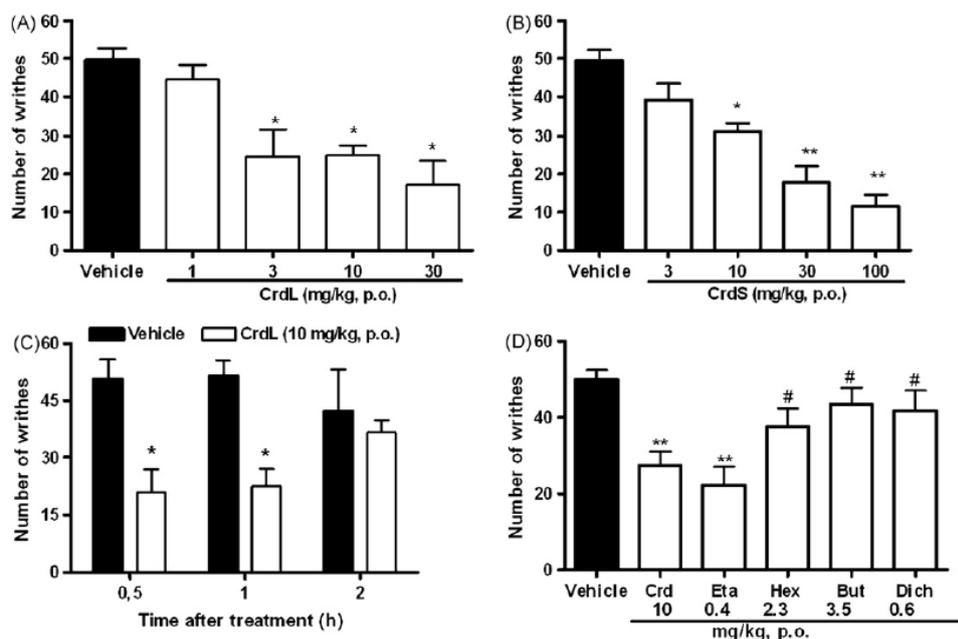


Fig. 1. (A and B) Dose–response curves for the antinociceptive effect of leaf (CrDL, A) and stem (CrDS, B) crude extracts of *Mirabilis jalapa* (p.o.) administered 1 h before acetic acid test. (C) Time–course for the antinociceptive effect of leaf crude extract (CrDL, 10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa*. (D) Effect of the oral treatment with leaf crude extract from *Mirabilis jalapa* (CrDL) or *n*-hexane (Hex), dichloromethane (Dich), ethyl acetate (Eta) or *n*-butanol (But) fractions on acetic acid-induced nociception. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of number of writhes observed 30 min after the administration of acetic acid (0.6%, 10 mL/kg, i.p.) in mice ( $n=7-8$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with vehicle group; # $P<0.05$  compared with Eta group; one-way ANOVA followed by SNK test.

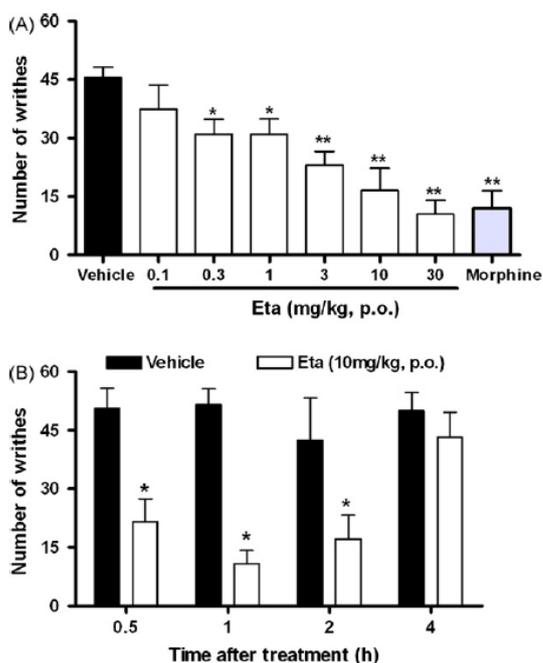


Fig. 2. (A) Dose–response for the antinociceptive effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction (0.1–30 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* administered 1 h before acetic acid test. (B) Time–course for the antinociceptive effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* against acetic acid-induced abdominal constriction test. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of number of writhes observed 30 min after the administration of acetic acid (0.6%, 10 mL/kg, i.p.) in mice ( $n=7-8$ ). \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$  and \*\*\* $P<0.001$ , one-way ANOVA followed by SNK test (A) or two-way ANOVA followed by Bonferroni test (B).

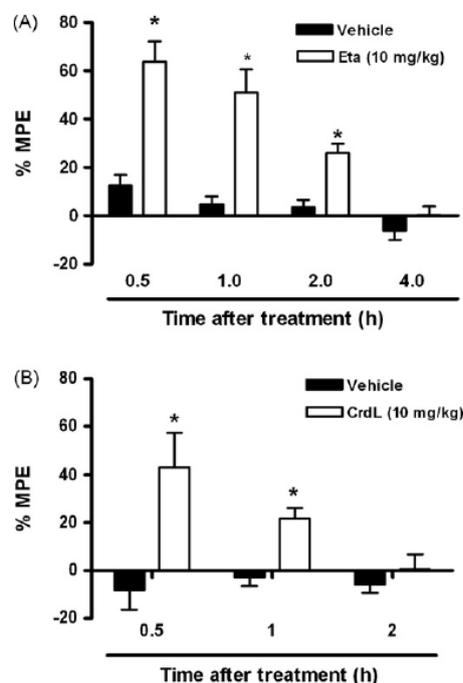


Fig. 3. Time–course of antinociceptive effect of leaf ethyl acetate fraction (Eta) fraction (A) or crude hydroethanolic extract (B) from (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* in the tail–flick test in mice ( $n=7-8$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \* $P<0.05$  and \*\*\* $P<0.001$ , two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

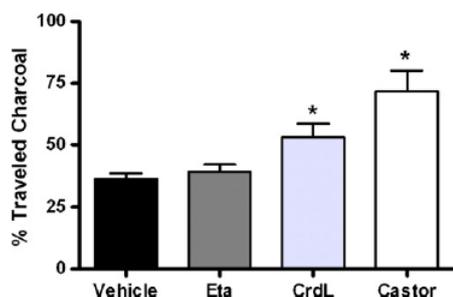


Fig. 4. Effect of castor oil, leaf ethyl acetate (Eta) fraction and hydroethanolic crude (CrDL) extract (10 mg/kg, p.o.) from of *Mirabilis jalapa* in the gastrointestinal transit. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by SNK post hoc test.

genic activity, while indomethacin (100 mg/kg, p.o., positive control) induced the formation of gastric lesions [the medians (25–75 percentiles) with lesion scores of 0.5 (0–1.5), 5.0 (4.5–5.5), 2.0 (1.5–2.0) and 0 (0–0.5) for vehicle, indomethacin, CrdL and Eta, respectively].

We also investigated the effect of Eta or CrdL on motor performance and body temperature. Neither Eta nor CrdL (10 mg/kg, p.o.) altered body temperature or forced and spontaneous locomotion, assessed in the rotarod and open-field tests, respectively (data not shown). Finally, we assessed acute toxicity after Eta or CrdL administration. Treatment with either Eta or CrdL up to 3000 mg/kg did not cause mortality in any of the animals.

### 3.3. Some possible mechanisms of action

In order to investigate some possible mechanisms of action of Eta antinociceptive action, animals were pre-treated with opioid or muscarinic receptor antagonists. Treatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.) did not change the antinociceptive effect of Eta (Fig. 5A), but greatly reversed the antinociception produced by morphine. On the other hand, pre-treatment with atropine (10 mg/kg, i.p.) completely prevented the antinociceptive effect of Eta (Fig. 5B) and pilocarpine (positive control). This result suggests that the muscarinic system, rather than the opioid system, might be involved in the antinociceptive effect of Eta.

### 3.4. Acetylcholinesterase activity

As the muscarinic system is involved in the Eta antinociceptive effect, we investigated the possible action of Eta on acetylcholinesterase activity in blood and spinal cord. We observed that Eta treatment *in vivo* (10 mg/kg, p.o.) did not alter acetylcholinesterase activity in blood or spinal cord of treated mice (acetylthiocholine hydrolyzed per hour per mg protein of  $21.7 \pm 5.6$  and  $17.9 \pm 5.9$  or  $0.30 \pm 0.07$  and  $0.28 \pm 0.04$  in blood or spinal cord after treatment with vehicle and Eta, respectively).

## 4. Discussion

*Mirabilis jalapa* is a native plant of tropical America that currently is widely cultivated in several countries as a decorative plant (Lorenzi and Souza, 1999). Moreover, different parts of *Mirabilis jalapa* have medicinal uses in several regions of the world, such as Latin America, South Africa, Zaire, Madagascar, India and Pakistan, where they are used as a laxative and to treat infections, inflammation, and allergic and painful conditions (Kusamba et al., 1991; Somavilla and Canto-Dorow, 1996; Dimayuga et al., 1998; Cortés et al., 2004). *Mirabilis jalapa* is used as an analgesic in Madagascar and Mexico to treat several painful conditions, including intestinal pain

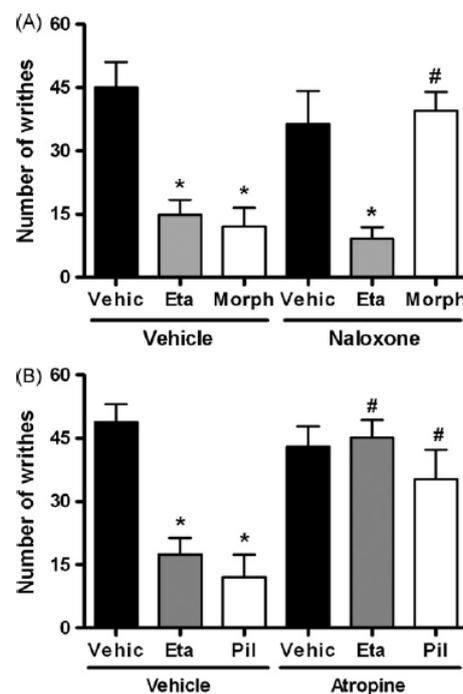


Fig. 5. Effect of naloxone (A, 2 mg/kg, i.p.) or atropine (B, 5 mg/kg, s.c.) on the antinociceptive effect caused by leaf ethyl acetate fraction (Eta, 10 mg/kg, p.o.), morphine (morph, 10 mg/kg, p.o.) or pilocarpine (Pil, 1 mg/kg, s.c.) in acetic acid constriction test in mice. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $P < 0.001$ , as compared with vehicle plus vehicle group, # $P < 0.05$ , compared with vehicle plus morphine or pilocarpine groups, one-way ANOVA followed by SNK test.

and that produced by scorpion and bee stings (Kusamba et al., 1991; Dimayuga et al., 1998). Furthermore, in the state of Rio Grande do Sul in the South of Brazil, where the current study was carried out, the leaves of *Mirabilis jalapa* are popularly used as an analgesic and anti-inflammatory agent (Somavilla and Canto-Dorow, 1996). However, to our knowledge, there is no study confirming the analgesic activity of *Mirabilis jalapa* in laboratory conditions. However, it has been demonstrated that some other plants of the Nyctaginaceae family, such as *Boerhaavia diffusa* and *Bougainvillea spectabilis*, presented analgesic activity (Hiruma-Lima et al., 2000; Malairajan et al., 2006). Here, we have shown that crude extracts from leaves and stems of *Mirabilis jalapa* as well as the Eta from leaves have antinociceptive activity in mice. Moreover, the antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* seems to be related to stimulation of the muscarinic system, but not related with alterations of motor ability, body temperature, gastrointestinal transit and stomach integrity.

One of the most used tests for screening possible analgesic compounds is the writhing test using diluted acetic acid (Negus et al., 2006). This test revealed that crude extracts from leaves and stems of *Mirabilis jalapa* exhibited antinociceptive activity. However, the leaf extract was about three-fold more potent to produce antinociception than the stem extract. Among all fractions tested from the leaf extract, Eta was the only one that produced antinociceptive action in a dose compatible with its yield in the crude extract. Moreover, Eta was about five times more potent than the CrdL in the writhing test and displayed a longer time of action. Of note, the efficacy and potency of Eta was similar to morphine in this test. Although the acetic acid test is good for screening studies, it can be subject to false-positive results (Franklin and Abbott, 1989). Thus, we confirmed our results by using the tail-flick test. In this test, it was observed that both Eta and CrdL produced an antinociceptive

effect with the same duration of action. The tail-flick test is insensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs, but is sensitive to centrally acting analgesics, such as opiates (Franklin and Abbott, 1989).

Thus, we first investigated the role of the opioid system on the antinociceptive effect of the Eta. Pre-treatment with naloxone did not reverse the antinociceptive effect induced by Eta in conditions where it greatly prevented the antinociceptive effect of morphine. This result suggests that the opioid system did not participate in the antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa*. Besides the opioid system, the cholinergic system, especially through muscarinic receptors, is an important modulator of pain in the central nervous system (Wess et al., 2007). Our present study has shown that pre-treatment with atropine completely prevented the antinociceptive effect of Eta, demonstrating a critical role of the cholinergic muscarinic system in Eta antinociception. Cholinesterase inhibitors have been shown to have an antinociceptive effect, which is mediated through spinal cord cholinergic receptors, mainly muscarinic (Yoon et al., 2003). However, we have found that Eta did not alter acetylcholinesterase activity in the blood or spinal cord of treated mice. This result suggests that the antinociceptive action of the Eta from *Mirabilis jalapa* did not involve acetylcholinesterase inhibition. Thus, other targets of the cholinergic system could be altered by *Mirabilis jalapa*, such as a direct receptor interaction or a stimulation of acetylcholine release. However, further studies must be carried out to elucidate this point.

Although it demonstrated involvement in the cholinergic muscarinic system to induce antinociception, Eta did not modify the gastrointestinal motility in mice. It has been demonstrated that non-selective muscarinic agonists produced increases in mice gastrointestinal transit, while M1, M2 or M3 selective agonist receptors failed to produce any significant changes (Williams et al., 1992). On the other hand, CrdL increased gastrointestinal transit. This last result agrees with the popular use of *Mirabilis jalapa* as a laxative. Furthermore, the fraction of the crude extract from leaves with ethyl acetate seems to reduce the amount of active substances responsible for gastrointestinal motility interference.

A major concern in experiments designed to evaluate the analgesic action of new agents is whether pharmacological treatment causes other behavioral alterations, such as altering motor coordination, causing sedation or producing hypothermia, which could be misinterpreted as analgesia (Negus et al., 2006). Treatment with the Eta did not cause any alteration in the rotarod and open field tests, nor in rectal temperature. Different from non-steroidal anti-inflammatory drugs, neither the Eta nor the CrdL produced ulcerogenic activity. This result reinforces the idea that the leaf Eta induces antinociception without significant side effects.

Furthermore, we have found that the acute treatment of mice with the Eta and CrdL from *Mirabilis jalapa* (up to 3000 mg/kg, p.o.) did not cause death of any animal. On the other hand, Rocha (2006) found that high doses of the hexanic fraction from *Mirabilis jalapa* leaf methanolic extract (1000–3000 mg/kg) administered by intraperitoneal route induced acute toxicity in female mice with a LD<sub>50</sub> of 2009 mg/kg. Several differences between our study and that of Rocha (2006) may explain these discrepant findings, including the kind of fraction used (ethyl acetate vs. hexanic), the route of administration (oral vs. intraperitoneal) and the gender of mice (male vs. female). However, more studies must be carried out to further assess the toxicity of *Mirabilis jalapa*.

## 5. Conclusion

Taken together, the results presented in the current study show that the CrdL or Eta from *Mirabilis jalapa* administered orally to

mice, produces antinociceptive action. Thus, the present study confirms the efficacy of this plant used in traditional folk medicine.

## Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil). The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

## References

- Aoki, K., Cortés, A.R., Ramírez, M.C., Gómez-Hernández, M., López-Muñoz, F.J., 2008. Pharmacological study of antispasmodic activity of *Mirabilis jalapa* Linn. flowers. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 96–101.
- Bruce, R.D., 1985. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental and Applied Toxicology* 5, 151–157.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14, 401–418.
- Corrêa, M.P., 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pp. 134–135.
- Cortés, A.R., Lara, C.B., Aoki, M.K., 2004. Screening and selection of plants by positive pharmacologic effect on jejunum muscular contractility. *Pharmaceutical Biology* 42, 24–29.
- D'Amour, F.E., Smith, D.L., 1941. A method for determining loss of pain sensation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 72, 74–79.
- Dimayuga, R.E., Virgem, M., Ochoa, N., 1998. Antimicrobial activity of medicinal plants of Baja California Sur/México. *Pharmaceutical Biology* 36, 33–43.
- Ferreira, J., Floriani, A.E., Filho, V.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R., 2000. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosonii* stems (Orchidaceae). *Life Science* 66, 791–802.
- Franklin, K.B.J., Abbott, F.V., 1989. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: Boulton, A.A., Baker, G.B., Greenshaw, A.J. (Eds.), *Neuro-methods: Psychopharmacology*. Humana Press, Clifton, pp. 145–216.
- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Bighetti, E.J., Germosén Robineou, L., Souza Brito, A.R., 2000. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 267–274.
- Kataoba, J., Habuqa, N., Furuno, M., Miyano, M., Takunami, Y., Koiwai, A., 1991. DNA sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP), a ribosome-inactivating protein with an antiviral property from *Mirabilis jalapa* L. and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 8426–8430.
- Kusamba, C., Byamana, K., Mbuyi, W.M., 1991. Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa* seed powder. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 197–199.
- Linter, K., 2002. Cosmetic or dermo-pharmaceutical compositions containing four o'clock (*Mirabilis jalapa*) plant extracts. Patent, Pub. No. WO/2002/047653.
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1999. *Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras*. Nova Odessa, São Paulo, p. 808.
- Magistretti, M.J., Conti, M., Cristoni, A., 1988. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. *Arzneimittelforschung* 38, 686–690.
- Malairajan, P., Gopalakrishnan, G., Narasimhan, S., Veni, K.J.K., 2006. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 425–428.
- Milano, J., Oliveira, S.M., Rossato, M.F., Sauzem, P.D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A., Mello, C.F., Rubim, M.A., Ferreira, J., Bonacorso, H.G., 2008. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *European Journal of Pharmacology* 26, 86–96.
- Negus, S.S., Vanderah, T.W., Brandt, M.R., Bilsky, E.J., Becerra, L., Borsook, D., 2006. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319, 507–514.
- Otuki, M.F., Lima, F.V., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleimii*. *Life Science* 69, 2225–2236.
- Pereira, M.E., Adams, A.I., Silva, N.S., 2004. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters* 146, 269–274.
- Quer, P.F., 1962. *Plantas Medicinales—El Dioscórides Renovado*. Editorial Labor, Barcelona, pp. 161–162.
- Rocha, L.T., 2006. *Importância da investigação farmacológica de Mirabilis jalapa* Linn. Validação de sua investigação. Master in Sciences thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Sheardown, M.J., Shannon, H.E., Swedberg, M.D., Suzdak, P.D., Bymaster, F.P., Olesen, P.H., Mitch, C.H., Ward, J.S., Sauerberg, P., 1997. M<sub>1</sub> receptor agonist activity is not a requirement for muscarinic antinociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281, 868–875.

- Siddiqui, B.S., Adil, Q., Begum, S., Siddiqui, S., 1994. Terpenoids and steroids of the aerial parts of *Mirabilis jalapa* Linn. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 37, 108–110.
- Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Adil, Q., Begum, S., 1990. Constituents of *Mirabilis jalapa*. Fitoterapia 61, 471.
- Somavilla, N., Canto-Dorow, T.S., 1996. Levantamento das plantas medicinais utilizadas em bairros de Santa Maria-RS. Ciência e Natura 18, 131–148.
- Wess, J., Eglén, R.M., Gautam, D., 2007. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. Nature Reviews Drug Discovery 6, 721–733.
- Williams, P.D., Colbert, W.E., Shetler, T.J., Turk, J.A., 1992. Comparative pharmacological profile of muscarinic agonists in the isolated ileum the pithed rat, and the mouse charcoal meal transit test. General Pharmacology 23, 177–185.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clinical and Chimica Acta 288, 73–90.
- Yoon, M.H., Choi, J.I., Jeong, S.W., 2003. Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. Acta Anaesthesiologica Scandinavica 47, 1079–1084.
- Yue, C.Q., Ye, J., Li, C.L., Li, R.T., Sun, Q., 2007. Antinociceptive effects of the novel spirocyclopiperazinium salt compound LXM-10 in mice. Pharmacology Biochemistry and Behaviour 86, 643–650.

## 5.2 MANUSCRITO

### **Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* on acute and chronic pain models in mice**

Cristiani I.B. Walker<sup>a</sup>, Gabriela Trevisan<sup>a</sup>, Mateus F. Rossato<sup>a</sup>, Cássia R. Silva<sup>a</sup>,  
Franciele V. Pinheiro<sup>b</sup>, Gerusa D. Dalmolin<sup>a</sup>, Carina Franciscato<sup>a</sup>, Maria B.  
Moretto<sup>c</sup>, Melânia P. Manfron<sup>c</sup>, Maria E. Pereira<sup>a</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, <sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*\*Corresponding author: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: + 55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8031.*

*E-mail: ferreira99@gmail.com*

## **ABSTRACT**

**Aim of the study:** The infusion or decoction of *Mirabilis jalapa* leaves is used in traditional medicine in Southern Brazil to treat painful diseases. Thus, the present study was designed to investigate whether the leaf ethyl acetate (Eta) fraction from *M. jalapa* exhibits antinociceptive effect in clinically relevant pain models in mice. Furthermore, we have investigated the role of cholinergic system in the antinociceptive action produced by Eta.

**Materials and methods:** The effect of Eta administered orally (10 mg/kg, p.o.) in mice was verified on the painful hypersensitivity (mechanical allodynia) in models of arthritic (subcutaneous injection of complete Freund's Adjuvant-CFA in the plantar surface of the right hindpaw), postoperative (paw surgical incision) and neuropathic (partial sciatic nerve ligation) pain. In the arthritis model, we further verified the effect of Eta treatment on paw edema and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) levels. We also investigated the role of muscarinic and nicotinic receptors in the anti-allodynic action produced by Eta as well as the possible action of Eta on *in vitro* and *ex vivo* acetylcholinesterase activity

**Results:** Eta produced marked antinociception in allodynia caused by CFA, surgical incision and partial sciatic nerve ligation. However, Eta did not alter the paw edema or the increase of IL-1 $\beta$  levels produced by CFA. The antinociceptive effect of Eta was reversed by the pre-treatment of animals with the antagonists of muscarinic (atropine, 5 mg/kg, s.c) or nicotinic (mecamylamine, 0.001 mg/kg, s.c.) receptors. Eta did not alter *in vitro* acetylcholinesterase activity in blood or spinal cord samples, but it reversed the increase in the acetylcholinesterase activity observed in the spinal cord samples from mice injected with CFA.

**Conclusions:** Based on its use in traditional medicine, the results of the present study confirmed the antinociceptive properties of Eta in clinically relevant pain models, an effect that seems to be dependent of the cholinergic system.

**Keywords:** Nyctaginaceae, pain, muscarinic, nicotinic, antinociceptive, ethyl acetate fraction.

## 1. INTRODUCTION

The therapeutic treatments available today to treat painful diseases usually have limited effectiveness and safety, particularly to treat chronic pain. In fact, the repeated use of the non-steroid anti-inflammatory drugs by arthritic patients may induce several adverse effects, such as gastrointestinal lesions or renal and liver failure (Rao and Knaus, 2008, Lam and Ng, 2010). Furthermore, some painful conditions, such as neuropathic pain, are refractory to the current analgesic drugs, including opioids (Portenoy and Hagen, 1990; Ferreira et al., 2005, Trevisan et al., 2009). It is therefore very important the search for new products that may be used in the treatment of such illnesses. Over the years, natural products have showed to be an unparalleled source of molecular diversity to drug discovery and currently have been used in modern medicine, especially in the treatment of pain (Shu, 1998).

*Mirabilis jalapa* belongs to the family Nyctaginaceae and is known as 'maravilha' or 'bonina' in Brazil and 'four o'clock' in different countries. Its leaves are used as decoction in folk medicine in Southern Brazil to treat inflammatory and painful diseases (Corrêa, 1984; Siddiqui et al., 1990; Somavilla and Cantodorow, 1996; Lorenzi and Souza, 1999). Recently, we reported that *Mirabilis jalapa* extract (Eta) presented antinociceptive effect in acetic acid-induced writhing and tail-flick tests in mice, an effect that was dependent of muscarinic, but not opioid receptors (Walker et al., 2008). We also observed that single oral treatment with Eta did not alter locomotor activity, body temperature or gastrointestinal transit and did not produce gastric lesions (Walker et al., 2008). Thus, Eta presents an attractive pharmacological profile (efficacious antinociceptive properties and reduced side effects), which suggests its use in

pathological painful conditions. However, the antinociceptive effect of *M. jalapa* was only verified in acute and non-clinically relevant models of pain.

Therefore, the present study was designed to investigate whether Eta exhibits antinociceptive effects in three models of pain, arthritic pain caused by complete Freund's Adjuvant (CFA), postoperative pain caused by surgical incision and neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in mice. Furthermore, we have investigated the role of cholinergic system in the antinociceptive action produced by Eta.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Plant Material**

The plant material was collected in March 2006, in Santa Maria, in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. A voucher specimen number SMDB 10.077 was deposited at the Herbarium of the Botany Department, Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil.

### **2.2. Extraction and Fractionation**

Fresh leaves were dried under ventilation (45°C). Previously powdered dried leaves were macerated with ethanol/water (70:30) at room temperature. The crude hydroethanolic extracts was concentrated until dryness in a rotary evaporator. The dry hydroethanolic extract was dissolved in methanol/water (10:90) and partitioned with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate or n-butanol, respectively. All the fractions were tested in a previous study and the ethyl acetate fraction was more efficacious and potent to induce antinociception. Moreover, the ethyl acetate fraction did not present toxicity (Walker et al., 2008). For this reason, the ethyl acetate fraction was chosen in the current study and termed Eta.

### **2.3. Animals**

Adult male albino Swiss mice (25-35 g) bred in our animal house were used. Animals were housed at controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12h-light/dark cycle, standard lab chow and tap water *ad libitum*. Animals were

habituated to the experimental room for at least 2 h before the experiments and used only once. All protocols employed have been approved by the Local Ethic's Committee (process number: 23081.010134/2007-66) and are in accordance the US guidelines for the care and use of Laboratory animals (NIH publication #85-23, revised in 1985). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

#### ***2.4. Drug administration***

A previous study carried out in our laboratory showed that the dose of 10 mg/kg of Eta was more efficacious and potent to induce antinociception (Walker et al., 2008). Thus, we have used this dose to investigate the antinociceptive effect of this plant in several pain models.

#### ***2.5. Nociception measurement***

The nociception was measured by the intensity of mechanical allodynia, a painful hypersensitivity produced by previously innocuous mechanical stimuli, which is characteristic of pathological chronic pain. Mechanical allodynia was assessed using the up-down paradigm as described previously (Souza et al., 2008). Mice were placed in clear plastic chambers (7×9×11 cm) on an elevated surface and allowed to acclimatize to their environment for 2 hours before testing. Von Frey filaments of increasing stiffness (0.02-10 g) were applied to the mice hind paw plantar surface with a pressure causing the filament to bend. Absence of a paw lifting after 5 seconds led to the use of the next filament with increasing weight, and paw lifting indicated a positive response and led to the

use of next weaker filament. This paradigm continued until a total of six measurements. The 50% mechanical paw withdraw threshold response was then calculated from the resulting scores as described previously (Dixon, 1980). The frequency of mechanical paw withdrawal was determined before (baseline) and after nociception induction.

### **2.6. Arthritis model: CFA-induced nociception, edema and IL-1 $\beta$ increment**

The investigation of antinociceptive property of Eta was first evaluated in the CFA-induced paw inflammation, a model of chronic arthritic pain. Before CFA injection, baseline measurement of mechanical paw withdrawal (described above) and paw thickness (assessed with a caliper- Mytutoio, Japan) were carried out. After baseline measurements, animals were anesthetized with halothane and 20  $\mu$ L of CFA (suspension of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* in oil) was injected subcutaneously in the plantar surface of the right hind paw of the animal (Ferreira et al., 2001). Forty eight hours after, the development of mechanical allodynia (reduction in the paw withdraw threshold) and paw edema (increase in the paw thickness as compared with baseline values) was assessed as previously described (Milano et al., 2008).

To evaluate the acute effect of Eta, animals received a single administration of Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (5% tween 80, 20% polyethilenoglycol and 75% saline, p.o.) orally. The mechanical allodynia and the paw edema were measured from 30 min to 24 h after treatment. To investigate the effects of the repeated treatment, mice received one injection of Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle daily for 7 days. On days 1 to 7, mechanical allodynia and the paw edema were evaluated before and 1 h after treatments

(day 1 corresponds to the first day of the treatment, 48 h after CFA injection). The measurements taken before the daily injection of the drugs were used to verify the cumulative effect of the treatment and those taken 1 h after treatments were used to identify the development of tolerance.

Two hours after the end of the treatment, the animals were euthanized by pentobarbital overdose (10 mg/kg, i.p.) and the tissue of paw was immediately collected and stored in liquid nitrogen. In the day of analysis, the tissue was defrosted and placed in an 80 mM PBS (pH 7.4) solution containing: 0.5 % Tween 20, 0.1 mM PMSF, 2 mM EDTA, 0.01 µg/ml antitrypsin, 0.1% bacitracin and 0.1% BSA. The tissue was homogenized, centrifuged at 16000 x g for 10 min and the supernatant obtained was used to determine the IL-1 $\beta$  levels with a two site enzyme-linked immunoassay (DuoSet ELISA Development System, mice IL-1 $\beta$ , R&D Systems Inc., MN, USA). Using a curve plotted from standard solutions, cytokine level was calculated as pg IL-1 $\beta$  / mg tissue.

### ***2.8. Postoperative model: Surgical incision-induced nociception***

The postoperative pain model was carried out according to the procedure described to mice (Pogatzki and Raja, 2003, Milano et al., 2008). Before surgery, baseline measurement of mechanical paw withdrawal was carried out. Later, mice were anesthetized with 2% halothane via a nose cone. After anti-septic preparation of the right hind paw, a 5-mm longitudinal incision was made with a number 11 blade through the skin and fascia of the plantar foot. The incision was started 2 mm from the proximal edge of the heel and extended toward the toes. The underlying muscle was elevated with a curved forceps, leaving the muscle origin and insertion intact. The skin was apposed with a

single mattress suture of 6.0 nylon. Control mice underwent a sham procedure that consisted of anesthesia and antiseptic preparation without an incision.

Mechanical allodynia was measured as described above. The preventive effects of the orally administered drugs were evaluated in mice receiving either Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 mg/mL, p.o.), 0.5 h before the incisional procedure. To evaluate the curative effect of the drugs, the animals received Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 mg/mL, p.o.), 1 h after the incisional procedure. Either in preventive or curative treatment, mechanical allodynia was recorded 1, 2 and 4 h after administration.

### ***2.9. Neuropathy model: Partial sciatic nerve ligation-induced nociception***

Neuropathy was induced by a partial ligation of the sciatic nerve under deep anesthesia (Ferreira et al., 2005; Souza et al., 2008, Trevisan et al, 2009). Briefly, mice were anesthetized intraperitoneally using a mixture of 90 mg/Kg of ketamine plus 3 mg/Kg of xylazine. A partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one half of the dorsal portion of the sciatic nerve (Malmberg and Basbaum, 1998). In sham-operated mice, the nerve was exposed without ligation. Seven days after surgical procedure, the mechanical allodynia was evaluated at different intervals (0.5, 1, 2 and 4 h) after Eta (10 mg/mkg, p.o) or vehicle (10 mg/mL, p.o) treatment. Before trauma, baseline measurement of mechanical paw withdrawal was carried out.

### ***2.10. Assessment of cholinergic system involvement in the antinociceptive activity of Eta***

Once we previously described the participation of muscarinic receptor over the nociception induced by Eta (Walker et al., 2008), we investigated the participation of cholinergic receptors on the antinociceptive effect of Eta in the CFA-induced nociception, as described above. Baseline measurement of mechanical paw withdrawal was carried out and then mice were injected with CFA. Forty-eight hours later, mechanical allodynia was measured and mice were pre-treated with atropine (5 mg/kg, subcutaneous route, s.c.; a muscarinic receptor antagonist), mecamylamine (0.001 mg/kg, s.c.; a nicotinic receptor antagonist) or saline. Fifty minutes after, mice were treated with Eta (10 mg/kg, p.o) or vehicle and 75 min after, mechanical allodynia was measured again.

The *ex vivo* activity of acetylcholinesterase was assessed after the behavioral assessment in the CFA model. Animals were euthanized by pentobarbital overdose (10 mg/kg, i.p.) and tissues were collected to detect the enzyme activity. Blood was immediately collected from the hepatic vein, using a heparinized syringe, and diluted 1:100 in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) with 0.03% Triton X-100. Lumbar portion of the spinal cord was also collected by mechanical extrusion using cold saline. Spinal cord samples were homogenized in 1 mL of potassium phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4) and diluted 1:5 in the same buffer. After preparation, both samples were frozen until analysis of the acetylcholinesterase activity.

The reaction was started adding 500  $\mu$ L of blood sample, 1 mL of phosphate buffer and 50  $\mu$ L of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, 10 mM). After pre-incubation in a water bath at 37°C during 3 min, the reaction was initiated by adding acetylthiocholine (ATC, 28.4 mM). To evaluate the effect of Eta on lumbar spinal cord or brain, 25  $\mu$ L of sample, 1 mL of potassium

phosphate buffer and 50  $\mu\text{L}$  of DTNB (23 mM) were mixed. After pre-incubation in a water bath at 30°C during 2 min, the reaction was initiated by adding ATC (36 mM). The development of color was measured at 436 nm for blood (Worek et al., 1999) and 412 nm for spinal cord (Pereira et al., 2004). Results were expressed in  $\mu\text{M}$  ATC hydrolysed/hour/mg protein.

For the *in vitro* acetylcholinesterase activity, blood of naïve mice was collected from the hepatic vein, using a heparinized syringe. The sample was diluted 1:100 in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) with 0.03% Triton X-100. Lumbar spinal cord samples were also collected from the same animals by mechanical extrusion using cold saline. These samples were homogenized in 1mL of potassium phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4) and diluted 1:5 in the same buffer. After preparation, both samples were frozen until analysis.

The reaction was started adding 25  $\mu\text{L}$  of Eta (1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to 500  $\mu\text{L}$  of blood sample, 1 mL of phosphate buffer, 50  $\mu\text{L}$  of DTNB 10 mM and 10  $\mu\text{L}$  of ethopropazine (3 mM). After pre-incubation in a water bath at 37°C during 5 min, the reaction was initiated by adding acetylthiocholine (ATC; 28.4 mM). To evaluate the effect of Eta over spinal cord acetylcholinesterase, 25  $\mu\text{L}$  of Eta (1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added to 25  $\mu\text{L}$  of spinal cord sample, 1 mL of potassium phosphate buffer and 50  $\mu\text{L}$  of DTNB 23 mM. After pre-incubation in a water bath at 30°C during 5 min, the reaction was initiated by adding ATC (36 mM). The color development was measured at 436 nm for blood (Worek et al., 1999) and 412 nm for spinal cord (Pereira et al., 2004). Results were expressed in  $\Delta\text{extinction}/\text{minute}$ .

### **2.11. Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Data were analyzed by Student's *t*-test, one or two-way analysis of variance (ANOVA). Post-hoc tests (Student-Newman-Keuls test-SNK) were carried out when appropriate.

### 3. RESULTS

#### ***3.1. Effects of Eta on mechanical allodynia and paw edema induced by intraplantar injection of CFA***

It was possible to observe that intraplantar injection of CFA produced marked mechanical allodynia and paw edema 48 h after injection. The single oral administration of Eta (10 mg/kg, p.o.) reduced mechanical allodynia induced by CFA from 1 to 2 h after its administration (Figure 1A). The maximal effect was observed 1 h after administration with an inhibition of  $65\pm 12\%$ . However, the single treatment with Eta (10 mg/kg, p.o.) failed to reduce the paw edema produced by intraplantar injection of CFA in the same time points where anti-allodynic effect was observed (Figure 2A).

To investigate the effects of the repeated treatment, mice received one injection of Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle daily for 7 days. From days 1 to 7, mechanical allodynia and the paw edema were evaluated before and after 1 h. In Figures 1B and Figure 2B, the threshold responses and paw edema of the animals 1 h after treatment from days 1 to 6 are shown. The results obtained demonstrated no decrease in the effectiveness of the Eta anti-allodynic effect during the observation period (Figure 1B). However, different from single treatment, repeated treatment with Eta was capable of reducing paw edema on days 5, 6 and 7 (Figure 2B). The Figures 1C and 2C showed the cumulative effect (24 h after each administration) of repeated treatment with Eta (10 mg/kg, p.o.) or vehicle daily on CFA-induced allodynia and edema, respectively. The values for days 1 to 6 represent the thresholds 24 h after drug administration onwards. It is possible to note, in Figure 1C, that Eta showed antinociceptive

action from day 2 up to the last day of observation. Eta treatment also reduced paw edema from day 4 to day 6 (Figure 2C).

### **3.2. Effects of Eta on the IL-1 $\beta$ levels in the CFA model**

We were not capable of detecting IL-1 $\beta$  in paw tissue of animals 9 days after intraplantar saline injection. However, intraplantar CFA injection caused a detectable increase in IL-1 $\beta$  level in inflamed tissue 9 days after CFA injection (Figure 3). The repeated treatment with Eta for 7 days was not able to significantly alter the increase of the IL-1 $\beta$  levels in CFA-injected mice (Figure 3).

### **3.3. Effects of Eta on mechanical allodynia induced by paw surgical incision**

Once we observed Eta effect over CFA chronic inflammation model, we next investigated its preventive and curative effect over acute nociception induced by paw incision. The plantar incision produced a marked mechanical allodynia in the incised paw. Preventive treatment with Eta (10 mg/kg, p.o., 0.5 h before incision) significantly decreased mechanical allodynia 2 h after treatment with an inhibition of  $44\pm 9\%$  (Figure 4A). The curative treatment with Eta (10 mg/kg, p.o., 1 h after incision) also reduced mechanical allodynia 1 and 2 h after treatment (Figure 4B). In this case, the inhibition obtained 2 h after drug administration was  $85\pm 7\%$ .

### **3.4. Effects of Eta on the mechanical allodynia induced by partial nerve ligation**

We next investigated the Eta effect in an animal model of neuropathic pain. The partial ligation of mice sciatic nerve produced a decrease of mechanical threshold, measured 7 days after nerve injury, compared to the sham-operated group (Figure 5A). Eta (10 mg/kg, p.o.) was markedly effective in reducing the mechanical allodynia 1 to 2 h after treatment (Figure 4A), with an inhibition of  $66\pm 12\%$ . Moreover, Eta did not alter the detection of normal mechanical stimuli assessed in sham-operated mice (Figure 5B).

### **3.5. Effect of cholinergic system on Eta antinociceptive effect**

We next investigated the participation of muscarinic and nicotinic receptors in Eta anti-allodynic effect on the chronic inflammatory pain model induced by CFA. The treatment of mice either with the muscarinic receptor antagonist atropine (5 mg/kg, s.c.) or with the nicotinic receptor antagonist mecamylamine (0.001 mg/kg, s.c.) prevented the antinociceptive effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) in the CFA model (Figure 6A and B).

As an alteration on AChE activity may lead to an increase in acetylcholine levels, resulting in antinociception through cholinergic receptor stimulation, we investigated the possible action of Eta on AChE activity. We observed that the incubation of Eta (1 and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) *in vitro* did not alter AChE activity in blood or spinal cord samples (Table 1). However, we observed an increase in the *ex vivo* AChE activity in lumbar spinal cord, but not in blood, of animals treated with CFA when compared with intraplantar saline (Figure 7A and B). We also observed that Eta treatment prevented the increase in AChE activity produced by the CFA injection in lumbar spinal cord, however, it did not alter the enzyme activity in saline injected mice (Figure 7A).

#### 4. DISCUSSION

The infusion or decoction of *Mirabilis jalapa* leaves is used in traditional medicine in Brazil to treat inflammatory and painful diseases. In the present study, we demonstrated that Eta produces antinociception in animal models of arthritis, postoperative and neuropathic pain. Moreover, the cholinergic system seems to be involved in the antinociceptive action of Eta.

Arthritis represents one of the most prevalent chronic health problems that cause functional disability, significant pain and joint destruction, leading to premature mortality (Kvien, 2004). Conventional medicine, including treatment with steroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs as well as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) antagonists, has shown only limited success against all forms of arthritis. Along with these therapies, folk medicine has been an alternative to treat arthritis and several plants have shown effective results in the treatment of painful diseases, such as arthritis (Zhanga et al., 2009). In this study we used the model of intraplantar injection of CFA as a model of chronic arthritis, since it is effective in mimicking some characteristics of human arthritis, such as the development of allodynia, edema and induction of pro-inflammatory cytokines (Joe and Wilder, 1999). In the current study, we demonstrated that a single oral administration of Eta produced antinociceptive, but not anti-edematogenic action, in CFA-induced inflammation in mice. On the other hand, the repeated treatment with Eta was capable of reducing both nociception and edema produced by CFA, without altering the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in the inflamed tissue. Since the treatments started 2 days after CFA injection, both single and repeated treatments with Eta were

effective in reversing an established painful hypersensitivity, which is similar to the curative effect produced by drugs clinically used to treat arthritis (Attal et al., 1988, Ferreira et al., 2001, Rossato et al., 2010). Furthermore, Eta had a cumulative effect after the second day of treatment because its effects began to appear 24 h after the second administration. Taken together, these findings are certainly relevant, considering that chronic pain is difficult to treat since it is quite resistant to most of the analgesic drugs currently available on the market (Ashburn and Staats, 1999).

Non-steroidal or steroidal anti-inflammatory drugs have been reported to reduce the development of allodynia and paw swelling in inflammation induced by injection of adjuvant arthritis in rodents, while opiates produce anti-allodynic, but not anti-edematogenic effects (Li and Zhao, 2003, Nagakura et al., 2003). Moreover, steroidal, but not non-steroidal anti-inflammatory drugs, reduced the levels of pro-inflammatory cytokines in CFA-injected tissue (Safieh-Garabedian et al., 2005). Thus, the profile of the effect exerted by Eta in CFA-induced inflammation is similar to non-steroidal anti-inflammatory drugs and different from opiates. Accordingly, we detected that the anti-allodynic effects of Eta were not susceptible to tolerance (as occurs with opioids), once the effect remains unaltered during the treatment and the antinociception of Eta in an acute pain model was not reversed by naloxone (Walker et al., 2008).

In several painful processes, it is well known the participation of cholinergic system. Some works described the anti-inflammatory and antinociceptive effect of cholinergic activation (Schechtmann et al., 2008; Rosas-Ballina and Tracey, 2009). Recently, we reported that the treatment with muscarinic antagonist completely prevented the antinociceptive effect of Eta in

an acute model of pain (Walker et al., 2008). Here, we investigated whether or not cholinergic receptors could be involved in antinociception induced by Eta in a chronic model of pain. Similar to that observed in the acute model, muscarinic receptors are involved in the antinociceptive action induced by Eta in CFA-induced inflammation. Extending our previous findings, we have shown here that the nicotinic receptor stimulation is also responsible for the antinociceptive action of Eta. As the antagonists of nicotinic and muscarinic receptors produced a complete prevention of the Eta-induced antinociception, we suggest a sequential mechanism of receptor activation, as previously described (Zarrindast and Farzin, 1996).

Once the inhibition of AChE, the enzyme that degraded ACh, could increase the levels of ACh and ACh activates the muscarinic and nicotinic receptor (Yoon et al., 2003), we investigated its activity in the Eta-induced effects in CFA model. We observed an increase in the *ex vivo* AChE activity in the spinal cord, but not in blood, of animals injected with CFA. Thus, the decrease in the cholinergic tonus at the spinal cord may be associated with the sensitization process that occurs at the spinal cord in chronic painful processes. In fact, our findings are in accordance with studies showing that the major site of action for cholinomimetics in analgesia is the spinal cord (Jones and Dunlop, 2007) and that painful stimuli are known to increase acetylcholine levels in the spinal cord (Eisenach et al., 1997).

We have also found that the repeated treatment with Eta was able to completely prevent the increase in AChE activity in CFA-injected animals, however, the *in vitro* incubation of Eta did not alter the AChE activity. This result suggests that the reduction of AChE activity promoted by Eta *ex vivo* is not due

to a direct mechanism, since the incubation of Eta *in vitro* did not alter the AChE activity. Of note, AChE is anchored to the plasma membrane and there lipid peroxidation seems to induce AChE activation (Kaizer et al., 2005). Moreover, we previously demonstrated that CFA-related nociception is mediated by an increase of lipid peroxidation in the spinal cord of mice (Rossato et al., 2010) and that Eta possesses antioxidant activity (Walker et al., 2009). Thus, Eta exerting its antioxidant effect could prevent lipid peroxidation and, indirectly, reverse the increase in AChE activity, what could explain its antinociceptive action. However, more studies must be carried out to elucidate this point.

Another important chronic painful condition is the neuropathy. Neuropathic pain is one of the most difficult conditions to treat in clinical practice (Ibrahim et al., 2003). The analgesic drugs available often have limited therapeutic value in the management of neuropathic pain and they may, in fact represent a risk to the patient because of their common side effects (Joe and Wilder, 1999). For this reason, it is extremely important to develop drugs to safely and effectively treat chronic pain. In our experiments, oral administration of Eta, markedly produced a decrease in mechanical allodynia induced by partial nerve ligation, a model of neuropathic pain (Kassuya et al., 2003). Thus, the Eta seems to exert antinociceptive effect in pathological pain of different etiologies.

Besides chronic pain, some forms of acute pain remain a problem in many patients, such as postoperative pain. The treatment with high doses of opiates required to control postoperative pain is often associated with adverse side effects (Brennan et al., 1997; Benowitz, 2008). Thus, we examined the possible preventive and curative effect anti-allodynic effect of Eta in a model of

postoperative pain that displays similarities to the human postoperative pain syndrome, where surgical incision causes mechanical allodynia (Brennan et al., 1997; Pogatzki and Raja, 2003). In our experiments, oral administration of the Eta, both in pre- and postoperative periods markedly decreased in mechanical allodynia induced by skin paw incision. Eta was more effective to prevent than to reverse the installed pain. This result is not unexpected since the treatment of pain before surgery prevents the plastic changes in the central nervous system thus avoiding the amplification of pain long after the initial stimulus (Brennan et al., 1997).

In conclusion, the present findings indicate that the Eta produces antinociceptive in clinically relevant models of pain, namely arthritis, postoperative and neuropathic, an action that seems to be dependent of the cholinergic system. Thus, the present findings confirm the ethnopharmacological indication of *Mirabilis jalapa* preparations to treat different painful diseases.

## 5. REFERENCES

- Ashburn, M. A.; Staats, P.S., 1999. Management of chronic pain. *Lancet*. 353, 1865–1869.
- Attal, N., Kayser, V., Eschalier, A., Benoist, J.M., Guilbaud, G., 1988. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal antiinflammatory agent sodium diclofenac. *Pain* 35, 341-348.
- Brennan, T.J., Umali, E.F., Zahn, P.K., 1997. Comparison of pre- versus post-incision administration of intrathecal bupivacaine and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. 87, 1517-1528.
- Benowitz, N.L., 2008. Nicotine and postoperative management of pain. *Anesthesia & Analgesia*. 107, 739-741.
- Corrêa, M.P., 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, p. 134-135.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 20, 441-462.
- Eisenach, J.C., Hood, D.D., Curry, R., 1997. Phase I human safety assessment of intrathecal neostigmine containing methyl- and propylparabens. *Anesthesia & Analgesia*. 85, 842-846.
- Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Utzmann, R., Schnitzler, C., 1995. Antiinflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflammation Research*. 44, 423-433.

- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araújo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 41, 1006-1012.
- Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M.A., Araújo, R.C., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2005. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice, *Journal of Neuroscience*. 25, 2405-2412.
- Ibrahim, M.M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D.A., Kwan, J., Mata, H.P., Vanderah, T.W., Lai, J., Porreca, F., Makriyannis, A., Malan Jr., T.P., 2003. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 18, 10529–10533.
- Jage, J., 2005. Opioid tolerance and dependence. Do they matter? *European Journal of Pain*. 9, 157- 162.
- Joe, B., Wilder, R.L., 1999. Animal models of rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine Today*. 5, 367-369.
- Jones, P.G., Dunlop, J., 2007. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology*. 53, 197-206.
- Kaizer, R.R., Maisa C. Corrêa, M.C., Spanevello, R.M., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R.C., 2005. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1865–1870.

- Kassuya, C.A.L., Silvestre, A.A., Rehder, V.L.G., Calixto, J.B., 2003. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 478, 145–153.
- Kvien, T.K., 2004. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics*. 22, 1-12.
- Lam, F.F., Ng, E.S., 2010. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *British Journal of Pharmacology* 159, 4, 958-969.
- Li, S., Zhao, Z., 2003. Morphine-induced decrease in mechanical allodynia is mediated by central, but not peripheral, opioid receptors in rats with inflammation. *European Journal of Pharmacology* 481 203-206.
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1999. *Plantas Ornamentais no Brasil: Arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa, São Paulo, Brasil, p. 808.
- Maciel, M.A.M, Pinto A.C., Veiga Jr., V.F., 2002. *Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares*. *Química Nova*. 25, 429-438.
- Malmberg, A.B., Basbaum, A.I., 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 76, 215–222.
- Milano, J., Rossato, M.F., Oliveira, S.M., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J. Bonacorso, H.G., 2008. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sciences* 83, 739–746.

- Nagakura, Y., Okada, M., Kohara, A., Klso, T., Toya, T., Iwai, A., Wanibuchi, F., Yamaguchi, T., 2003. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306, 490-497.
- Pereira, M.E., Adams, A.I.H., Silva, N.S., 2004. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters*. 146, 269–274.
- Pogatzki, E.M., Raja, S.N., 2003. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology*. 99, 1023-1027.
- Portenoy, R.K., Hagen, N.A., 1990. Breakthrough pain: definition, prevalence and characteristics. *Pain*. 41, 3, 273-281.
- Rosas-Ballina, M., Tracey, K.J., 2009. Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine*. 265, 663-679.
- Rossato, M.F., Trevisan, G., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., de Oliveira, A.P. Villarinho, J.G., Zanon, R.B., Royes, L.F.F., Athayde, M.L., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2010. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochemical Pharmacology*, Article In Press.
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J., Woolf, C.J., 1995. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 115, 7, 1265–1275.

- Schechtmann, G., Song, Z., Ultenius, C., Meyerson, B.A., Linderoth, B., 2008. Cholinergic mechanisms involved in the pain relieving effect of spinal cord stimulation in a model of neuropathy. *Pain*. 139, 136–145.
- Shu, Y.Z., 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*. 61, 1053– 1071.
- Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Adil, Q., Begum, S., 1990. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*. 61, 471.
- Somavilla, N., Canto-Dorow, T.S., 1996. Levantamento das plantas medicinais utilizadas em bairros de Santa Maria-RS. *Ciência e Natura*. 18, 131-148.
- Souza, A.H., Ferreira, J., Cordeiro, M.N., Vieira, L.B., Castro, C.J., Trevisan, G., Reis, H., Souza, I.A., Richardson, M., Prado, M.A., Prado, V.F., Gomez, M.V., 2008. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*. 140, 115-126.
- Trevisan, G., Maldaner, G., Velloso, N.A., Sant'Anna, G.da S., Ilha, V., Velho Gewehr, C. de C., Rubin, M.A., Morel, A.F., Ferreira, J., 2009. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. *Journal of Natural Products*. 726, 08-12.
- Zarrindast, M.R., Farzin, D., 1996. Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behaviour in morphine-dependent mice. *European Journal of Pharmacology*. 298, 1-6.
- Zhanga, R., Fana, A.Y., Zhoua, A., Moudgilb, K.D., Mac, Z., Leec, D.Y., Fongd, H.H.S., Bermana, B.M., Laoa, L., 2009. Extract of the Chinese herbal

- formula Huo Luo Xiao Ling Dan inhibited adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 121, 366–371.
- Walker, C.I.B., Trevisan, G., Rossato, M.F., Franciscato, C., Pereira, M.E., Ferreira, J., Manfron, M.P., 2008. Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 120, 169-175.
- Walker, C.I.B., Zanotto, C.Z., Ceron, C.S., Pozzatti, P., Alves, S.H., Manfron, M.P., 2009. Atividade farmacológica e teor de quercetina de *Mirabilis jalapa* L. *Latin American Journal of Pharmacy* 28 (2), 241-246.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eye, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clinica Chimica Acta*. 288, 73–90.
- Yoon, M.H., Choi, J.I., Jeong, S.W., 2003. Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. *Acta Anaesthesiology Scandinavia*. 47, 1079-1084.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Effect of single (A) or repeated Eta (10 mg/kg, p.o.) administration (1 h after in B and 24 h after in C) on mechanical allodynia induced by CFA in mice. #P <0.05 denotes the significance level when compared with baseline (B) values; \* P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle-treated mice (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). The results represent the mean+S.E.M. of 6 animals.

**Figure 2.** Effect of single (A) or repeated Eta (10 mg/kg, p.o.) administration (1 h after in B and 24 h after in C) on paw edema induced by CFA in mice. #P <0.05 denotes the significance level when compared with baseline (B) values; \* P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle-treated mice (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Results represent the mean+S.E.M. of 6 animals.

**Figure 3.** Effect of the repeated treatment with Eta (10 mg/kg, p.o.) and vehicle (10 mg/mL, p.o.) on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) levels in paw samples of animals treated with CFA. Results are expressed as pg of IL-1 $\beta$ /mg of tissue. Results represent the mean+S.E.M. of 6 animals.

**Figure 4.** Time-courses for the preventive (A) or curative (B) effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) on mechanical allodynia caused by paw incision. #P<0.05 denotes the significance level when compared with baseline (B) values; \*P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle-treated mice (two-

way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Results represent the mean+S.E.M. of 6 animals.

**Figure 5.** Time-courses for Eta (10 mg/kg, p.o.) single treatment on mechanical allodynia in neuropathic mice (A) and in sham-operated mice (B). #P<0.05 denotes the significance level when compared with baseline (B) values; \*P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle-treated mice (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Results represent the mean+S.E.M. of 6-7 animals.

**Figure 6.** Prevention of Eta (10 mg/kg, p.o.) antinociceptive effect on CFA-induced mechanical allodynia by atropine (A) or mecamelamyne (B). Atropine (5 mg/kg, s.c.) or mecamlamine (0.001 mg/kg, s.c.) were administered 15 minutes before Eta injection. \*\*\*P<0.001 denotes the significance level when compared with vehicle plus vehicle-treated mice. #P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle plus Eta-treated mice (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test). Results represent the mean+S.E.M. of 6-7 animals.

**Figure 7.** Effect of Eta (10 mg/kg, p.o.) and vehicle (10 mg/mL, p.o.) treatment on acetylcholinesterase activity in samples of lumbar spinal cord (A) or blood (B) of saline or CFA-treated animals. #P<0.05 denotes the significance level when compared with saline plus vehicle-treated animals; \*P<0.05 denotes the significance level when compared with vehicle plus CFA-treated mice (one-way

ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). Results represent the mean+S.E.M. of 4-6 animals.

Figure 1

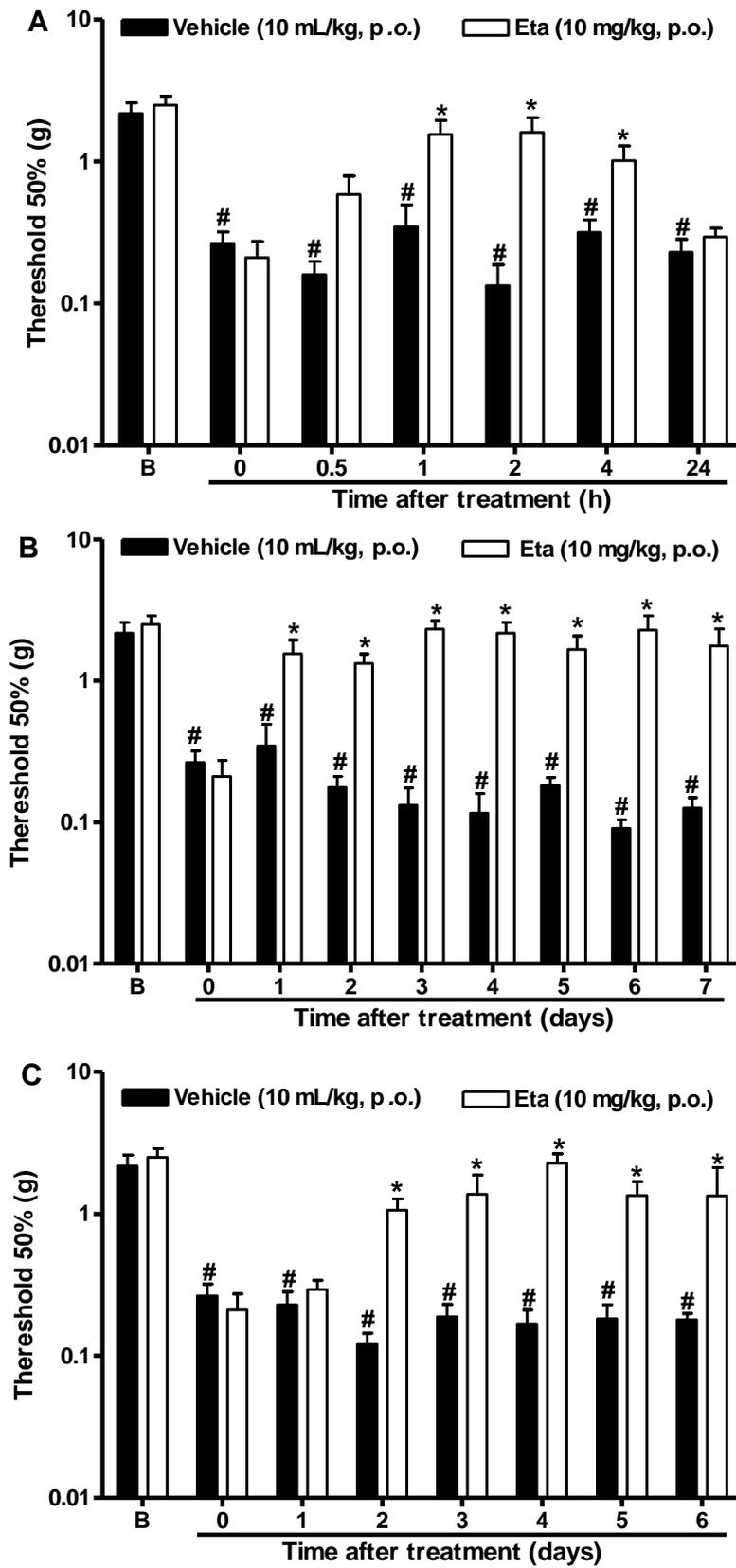


Figure 2

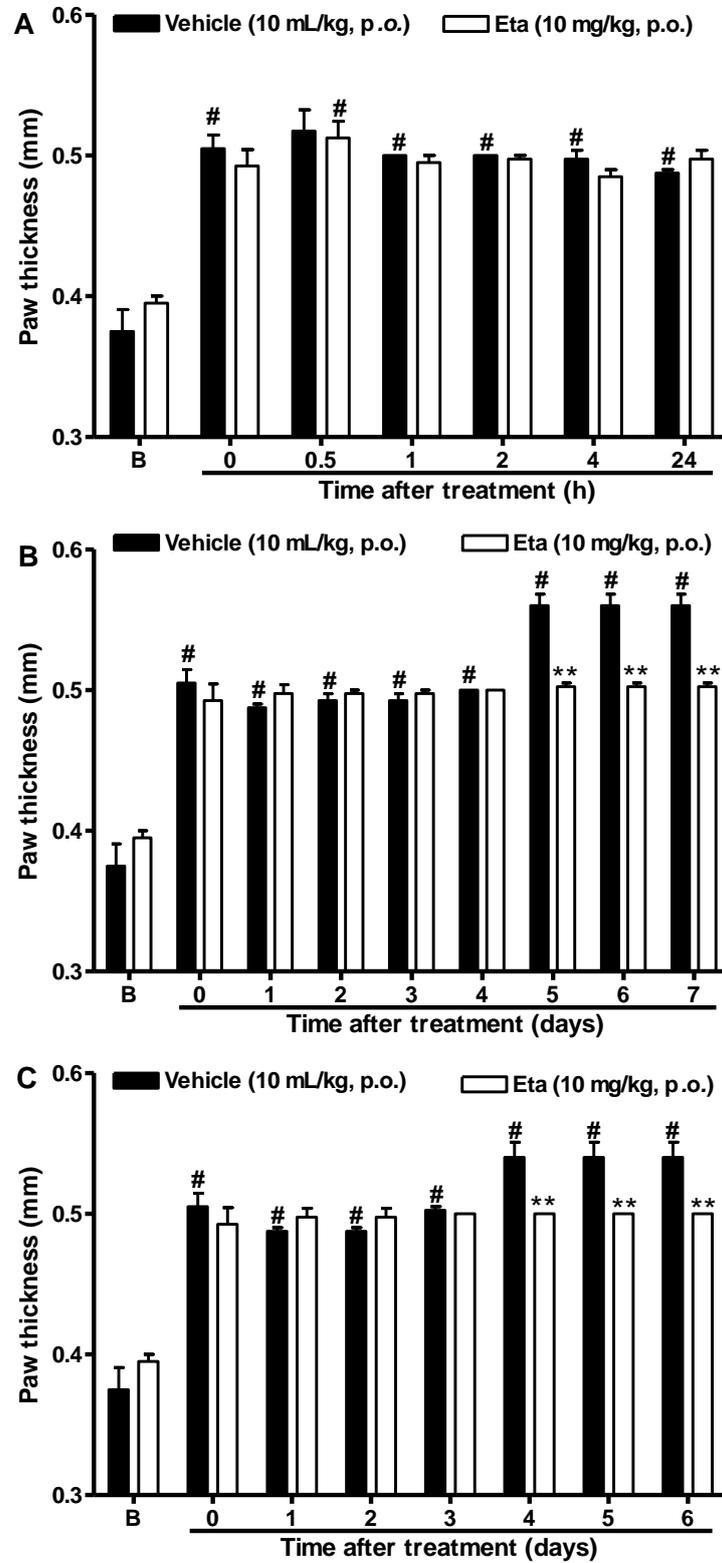


Figure 3

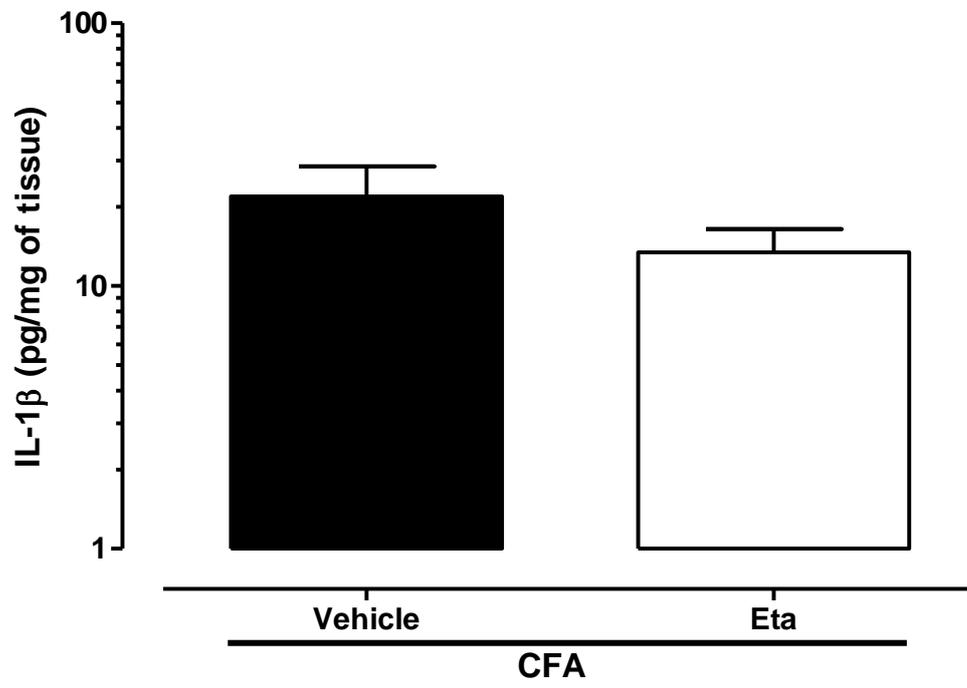


Figure 4

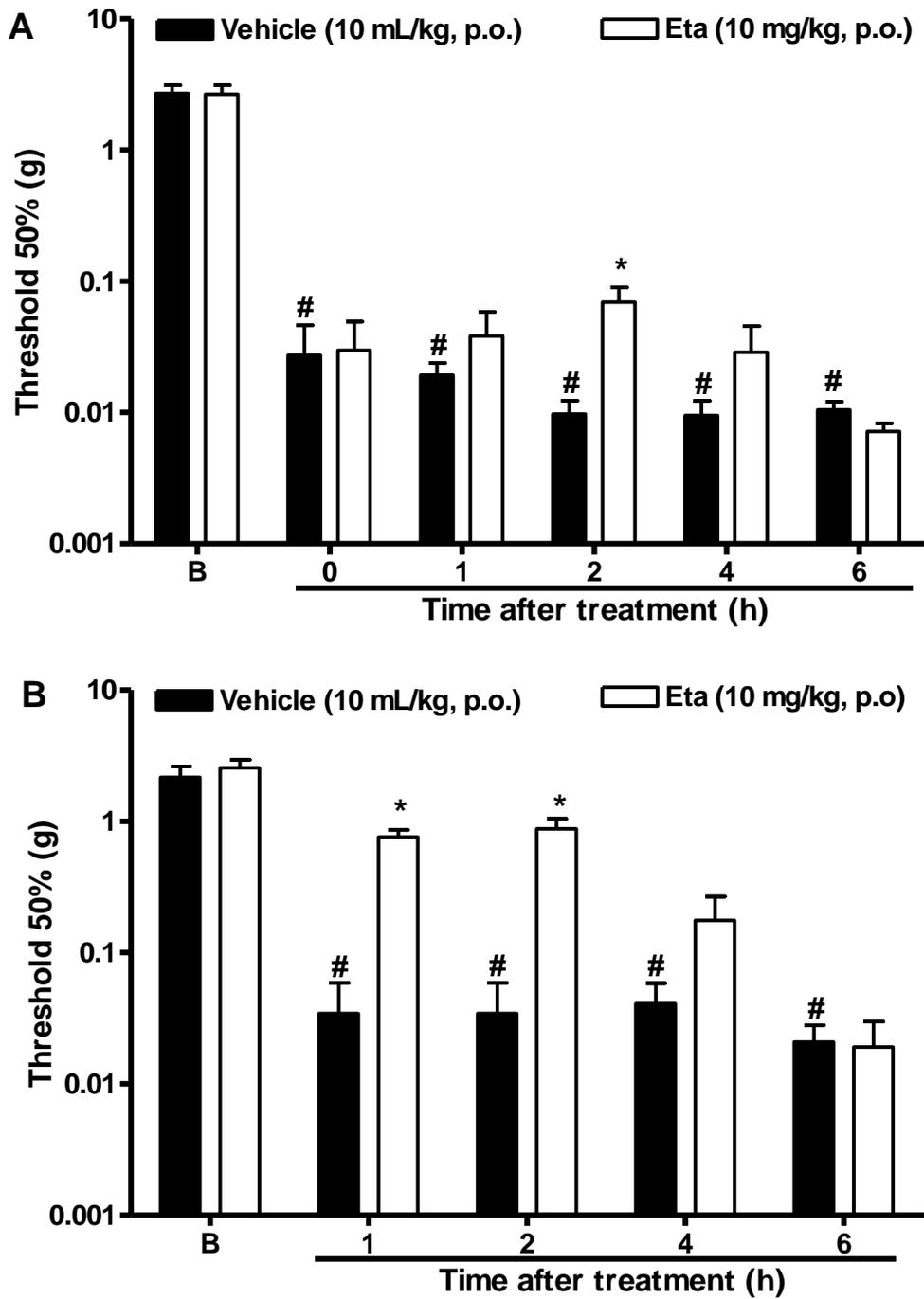


Figure 5

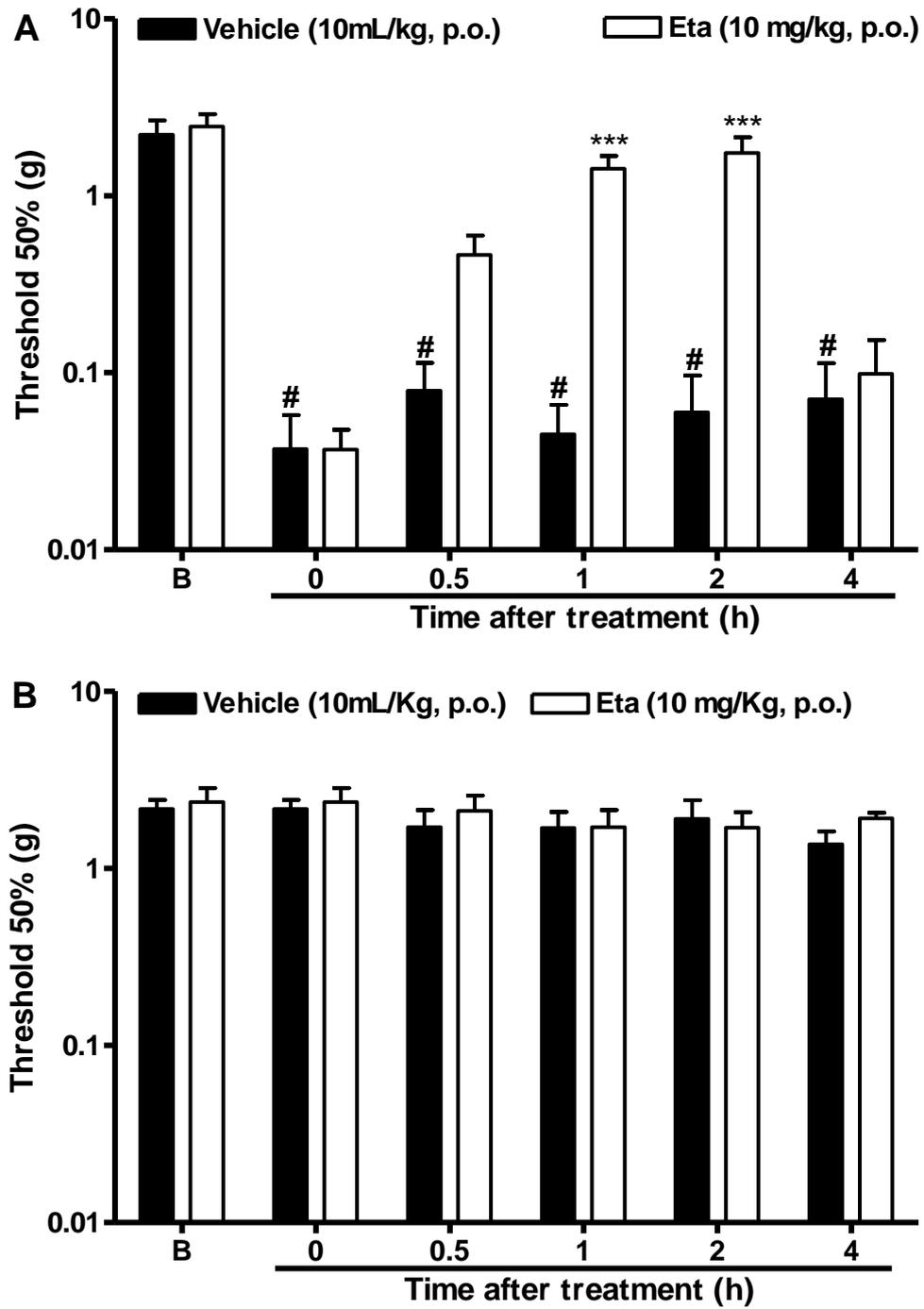


Figure 6

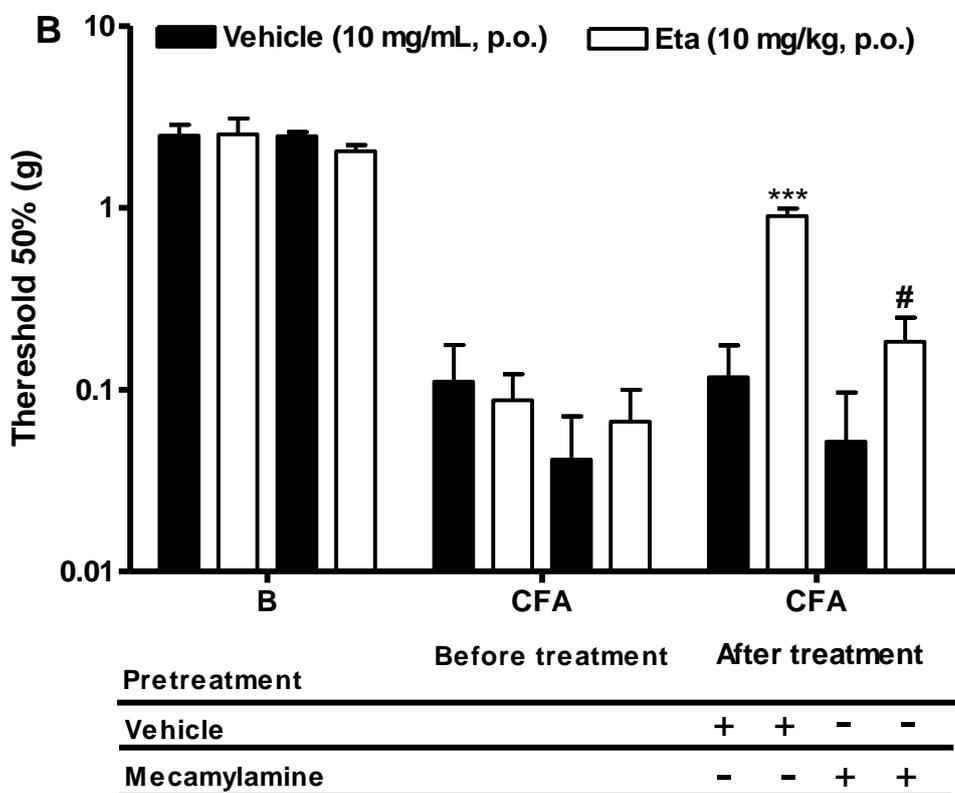
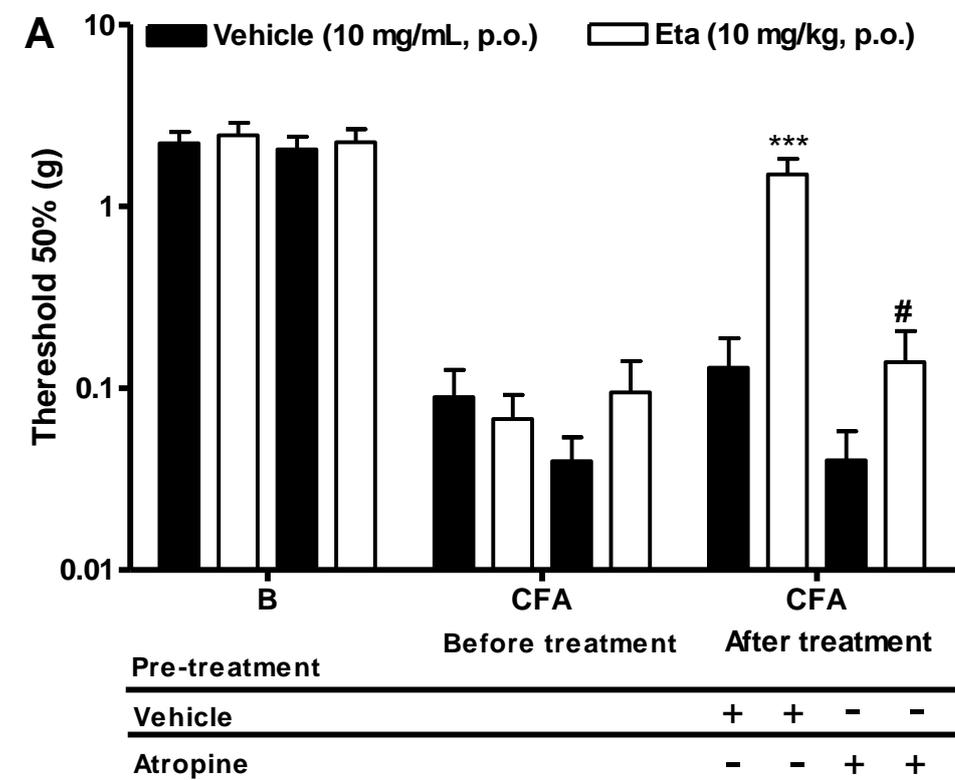
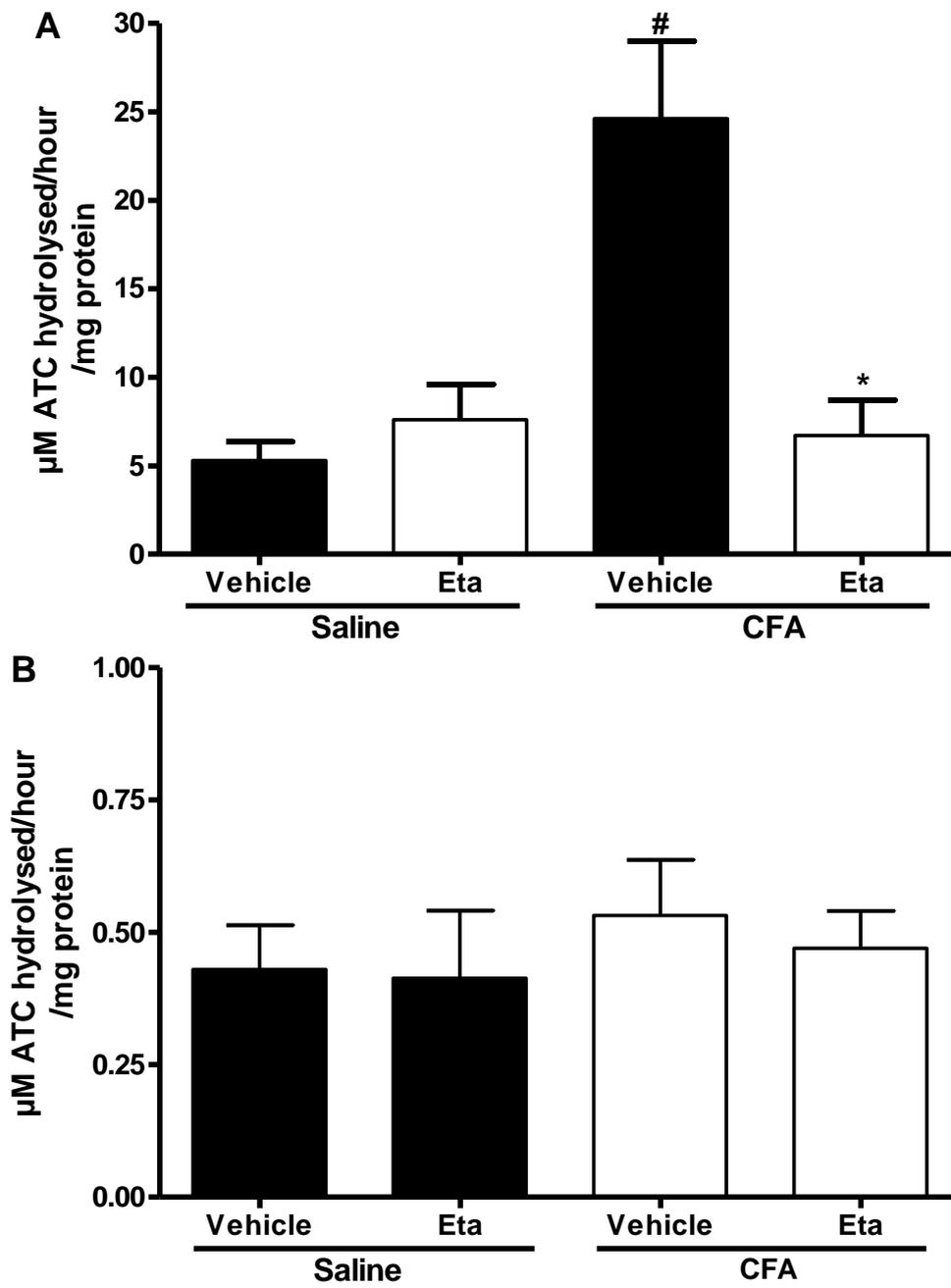


Figure 7



**Table 1:** Acetylcholinesterase activity from blood and lumbar spinal cord samples in the presence or not of Eta (n=4-5). Results are expressed as  $\Delta$  extinction/minute.

	<i>Blood</i>	<i>Spinal cord</i>
<b>Vehicle</b>	11.032 $\pm$ 0.002	44.005 $\pm$ 0.002
<b>Eta (1 <math>\mu</math>g/mL)</b>	13.006 $\pm$ 0.001	53.010 $\pm$ 0.003
<b>Eta (10 <math>\mu</math>g/mL)</b>	12.040 $\pm$ 0.002	51.004 $\pm$ 0.003

## 6. DISCUSSÃO

Entre as inúmeras plantas medicinais utilizadas pela população destaca-se a *Mirabilis jalapa*, planta nativa da América tropical que atualmente, vem sendo cultivada em vários países e usada para a decoração de jardins (LORENZI e SOUZA, 1999). Em diversas regiões do mundo, tais como: América Latina, África, Índia e Paquistão, diversas partes da *M. jalapa* são usadas como laxante e no tratamento de infecções, inflamações, condições alérgicas e dolorosas (KUSAMBA, BYAMANA e MBUYI, 1991; SOMAVILLA e CANTO-DOROW, 1996; DIMAYUGA, VIRGEN e OCHOA, 1998; AOKI et al., 2008). Já em Madagascar esta planta é utilizada para tratar a dor proveniente de cólicas intestinais e no México para o tratamento de diversas condições dolorosas como a dor produzida por picadas de escorpião e de abelha (KUSAMBA, BYAMANA e MBUYI, 1991; DIMAYUGA, VIRGEN e OCHOA, 1998). Além disso, no estado do Rio Grande do Sul, as folhas da *M. jalapa* são utilizadas popularmente pelas suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SOMAVILLA e CANTO-DOROW, 1996).

No entanto, não existem descrições na literatura para a atividade antinociceptiva da *M. jalapa*. Porém, há estudos sobre algumas plantas da família Nyctaginaceae, tais como *Boerhaavia diffusa* e *Spectabilis Bougainvillea*, que confirmam a atividade antinociceptiva destas em ratos (HIRUMA-LIMA et al., 2000; MALAIRAJAN et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam e estendem os dados da literatura, além de mostrarem claramente que o extrato e as frações obtidas das folhas da *M. jalapa*, principalmente a fração acetato de etila, possuem atividade antinociceptiva.

Vários modelos de nocicepção podem ser utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de diferentes compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados obtidos, e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (BESSON, 1999; LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

Um dos testes mais utilizados para a triagem de possíveis compostos analgésicos é o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético diluído (NEGUS et al. 2006). O teste de contorção abdominal em camundongos

é um método muito utilizado para se avaliar a atividade analgésica de substâncias contra a dor aguda de origem inflamatória. A resposta nociceptiva foi induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%, i.p.) na cavidade abdominal dos animais, resultando na contração do músculo abdominal juntamente com o estiramento das patas traseiras (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001).

Os extratos brutos do caule e das folhas da *M. jalapa* apresentaram atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. No entanto, o extrato das folhas foi cerca de três vezes mais potente em produzir antinocicepção do que o extrato do caule. Entre todas as frações testadas a partir do extrato das folhas, a Eta foi a única que produziu antinocicepção em uma dose compatível com o seu rendimento no extrato bruto. Além disso, a Eta foi aproximadamente cinco vezes mais potente que o extrato bruto das folhas no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A eficácia e a potência da Eta foi semelhante à morfina. Devido a uma eficácia e uma potência maior que as outras frações, a Eta foi escolhida para a realização de experimentos posteriores. Embora o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético seja de fácil realização e sensível a várias classes de analgésicos (como AINEs e opióides), este pode estar sujeito a resultados falso-positivos (FRANKLIN e ABBOTT, 1989).

Devido a isso, esses resultados foram confirmados através do teste de imersão da cauda. Neste modelo, o comportamento nociceptivo é avaliado pela sensibilidade ao calor, determinada pela latência de retirada da cauda a um estímulo térmico. Este teste é insensível para AINEs, mas é sensível a analgésicos de ação central, como os opiáceos (FRANKLIN e ABBOTT, 1989). Observamos que tanto a Eta quanto o extrato bruto das folhas produziram um efeito antinociceptivo com a mesma duração em relação a sua ação.

Sabendo que o modelo da imersão de cauda é sensível a opióides, investigou-se o papel do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo da Eta. O pré-tratamento com o antagonista não-seletivo naloxona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo induzido por esta fração. No entanto, a naloxona reverteu completamente o efeito antinociceptivo da morfina. Este resultado sugere que não há participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da *M. jalapa*.

A artrite representa um dos mais prevalentes problemas de saúde pública que causa incapacidade funcional, dor intensa e destruição articular, podendo levar até a morte prematura dos pacientes (KVIEN, 2004). A medicina convencional, que faz uso de medicamentos a base de esteróides, não-esteróides e antagonistas do fator de necrose tumoral- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , mostrou um sucesso limitado contra todas as formas de artrite. Juntamente com estas terapias, a medicina popular tem associado o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças como à artrite (ZHANGA et al., 2009).

Em estudos pré-clínicos, a administração subcutânea de ACF (composto por *Mycobacterium tuberculosis* inativada pelo calor) na região plantar da pata traseira direita do camundongo é utilizada para estimular o desenvolvimento de artrite crônica. Este modelo é eficaz para simular algumas características da artrite humana (JOE e WILDER, 1999). A administração de ACF produz um intenso processo inflamatório local caracterizado por eritema, aumento da temperatura local, extravasamento plasmático, infiltração de células inflamatórias, associado com a produção de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos tais como citocinas, neurotrofinas e interleucinas (GANJU et al., 2001).

No presente estudo, avaliou-se o efeito da Eta no modelo de artrite induzido por ACF em camundongos. A ação desta fração sobre a alodínia mecânica e o edema induzidos por ACF foram avaliados após a administração aguda e após a administração de repetidas doses. A administração subcutânea de ACF na região plantar da pata traseira direita do camundongo produziu uma acentuada alodínia mecânica e edema na pata nesses animais, 48 horas após a sua administração, caracterizando o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico. A administração aguda da Eta produziu uma inibição da alodínia mecânica induzida por ACF em camundongos, mas não foi capaz de reduzir o edema. Por outro lado, a administração de doses repetidas da Eta foi capaz de reduzir tanto a alodínia mecânica como o edema provocados por ACF.

A maioria dos fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais possuem ação anti-alodínica e anti-edematogênica no modelo de artrite induzida por ACF. Já os opióides possuem somente uma ação anti-alodínica, não sendo capazes de reduzir o edema desenvolvido neste modelo (LI e

ZHAO, 2003, NAGAKURA et al., 2003). Devido a isso, o efeito produzido pela Eta no modelo de dor inflamatória induzida por ACF é similar aos fármacos anti-inflamatórios, diferindo dos opióides.

Outro dado que sugere uma ação distinta da Eta em relação aos fármacos opióides é que esta fração parece não produzir tolerância, visto que continua a apresentar um efeito após a administração de doses repetidas, sendo que no 7º dia ainda se observava um efeito antinociceptivo da fração no teste da sensibilidade mecânica. No caso deste protocolo de administração de doses repetidas, a Eta foi administrada oralmente a cada 24 horas. É interessante verificar que 24 horas após receber a primeira dose (dia 2 do protocolo experimental), os animais já apresentavam um aumento significativo em seu limiar de resposta ao estímulo mecânico, sugerindo um alívio da dor inflamatória.

Em algumas condições patológicas como na artrite reumatóide ocorre à liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , que está associada com o desenvolvimento de alodínia e hiperalgesia (SOMMMER e KRESS, 2004). No estudo realizado por Fukuoka e colaboradores (1994) foi comprovada a participação da IL-1 $\beta$  na manifestação da dor no modelo de artrite induzido por ACF em ratos, essa ação parece envolver a ativação das fibras nociceptivas. No presente trabalho, verificou-se que os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram na pata inflamada dos camundongos após a administração intraplantar de ACF. Porém, o tratamento de doses repetidas com a Eta não causou redução significativa desse parâmetro. Analisados em conjunto, estes resultados são certamente relevantes, considerando que a dor crônica, principalmente a dor associada a artrite, é de difícil tratamento e refratária à maioria dos analgésicos atualmente utilizados.

Além da dor crônica, algumas formas de dor aguda, como a dor pós-operatória ainda causam muito sofrimento aos pacientes. Na clínica, o controle da dor pós-operatória mostra-se ainda pouco eficaz, pois em torno de 41% dos casos, os pacientes pós-cirúrgicos sentem dor moderada a intensa (DOLIN et al., 2002). O modelo de dor induzida por incisão plantar em animais exhibe semelhanças com a síndrome da dor pós-operatória experimentada em humanos, onde a incisão cirúrgica provoca alodínia mecânica e outros

comportamentos de dor no período pós-operatório (POGATZKI e RAJA, 2003; BRENNAN, UMALI e ZAHN, 1997).

Uma vez que a administração de analgésicos antes de uma cirurgia pode prevenir ou ao menos diminuir a dor pós-operatória, verificou-se o efeito anti-alodínico da Eta tanto na prevenção como na reversão da nocicepção incisional. A administração oral da Eta, produziu efeito antinociceptivo profilático (quando administrada antes do procedimento incisional) e efeito antinociceptivo terapêutico (quando administrada após o procedimento incisional). Porém, esta fração foi mais efetiva quando administrada previamente, do que após a incisão cirúrgica, quando a dor já está instalada. Este resultado é esperado, pois o tratamento da dor antes do início da cirurgia pode impedir a sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal e com isso, impedir a excitabilidade da rota nociceptiva central, evitando assim a amplificação da dor após o estímulo inicial (BRENNAN, UMALI e ZAHN, 1997).

Assim como na artrite e na dor pós-cirúrgica, o arsenal farmacológico disponível para o tratamento da neuropatia apresenta algumas limitações. Em humanos, a lesão de um nervo periférico resulta muitas vezes em uma condição de dor neuropática persistente, que se caracteriza por dor espontânea ou por hipersensibilidade da área afetada, levando à hiperalgesia ou alodínia (MALMBERG e BASBAUM, 1998). As sensações dolorosas estão normalmente relacionadas à ativação de neurônios aferentes primários não-mielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras A $\delta$ ). Entretanto, após a lesão no nervo periférico, estes neurônios tornam-se sensíveis e desenvolvem uma atividade espontânea patológica (BARON, 2006).

A alodínia mecânica é um dos sintomas mais comuns observados em pacientes com dor neuropática decorrente da lesão de nervos periféricos. Os episódios de dor podem ser desencadeados pelo simples ato de ficar em pé ou de executar qualquer tipo de movimento como caminhar (MENDELL e SAHENK, 2003). A maioria dos fármacos analgésicos como os AINEs e os opióides tem efeito limitado no tratamento da dor neuropática e representam um risco para o paciente devido aos seus diversos efeitos colaterais (FERREIRA et al., 2005).

Por esta razão, é extremamente importante o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros para o tratamento da dor neuropática. Para o presente trabalho, o modelo de dor neuropática utilizado foi o da ligação parcial do nervo ciático. Observou-se que os animais submetidos a esse modelo de dor apresentaram uma diminuição significativa do limiar mecânico sete dias após a cirurgia, a qual foi revertida pela administração oral da Eta. Assim, diferente de vários fármacos analgésicos utilizados atualmente, a Eta foi capaz de reduzir a nocicepção de diferentes etiologias com boa eficácia.

Outro objetivo deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos pelos quais a *M. jalapa* poderia estar promovendo o seu efeito antinociceptivo. Como descrito previamente, a estimulação do sistema opióide pareceu não ser importante para a antinocicepção induzida pela Eta. Além do sistema opióide, o sistema colinérgico é um importante modulador da dor no sistema nervoso central (JONES e DUNLOP, 2007; WESS, GLEN, GAUTAM, 2007; SCHECHTMANN et al., 2008; ROSAS-BALLINA e TRACEY, 2009).

A partir desses dados, investigou-se o envolvimento do sistema colinérgico na antinocicepção induzida pela Eta em modelos de nocicepção. Assim como observado no modelo agudo do ácido acético, onde verificamos que os receptores muscarínicos estão envolvidos na ação antinociceptiva induzida pela Eta, esta classe de receptor também participou do efeito antinociceptivo da Eta no modelo crônico do ACF. Além disto, estendemos o estudo anterior mostrando que o receptor nicotínico é também responsável por essa ação no modelo do ACF, demonstrando o envolvimento de ambos os receptores colinérgicos no efeito antinociceptivo causado pela Eta. Estes dados sugerem que a Eta poderia estar aumentando o tônus colinérgico para exercer sua ação antinociceptiva.

Um dos mecanismos do aumento do tônus colinérgico poderia ser a inibição da AChE. De fato, alguns inibidores da AChE demonstraram ter um efeito antinociceptivo, que é mediado através dos receptores colinérgicos na medula espinhal. Uma vez que a inibição da AChE, a enzima que degrada a acetilcolina, poderia aumentar os níveis de acetilcolina e isso ativar os receptores muscarínicos e nicotínicos, o efeito da Eta foi investigado sobre a sua atividade (YOON, CHOI, JEONG, 2003).

No entanto, constatou-se que a Eta não alterou a atividade *in vitro* da acetilcolinesterase no sangue e na medula espinhal de camundongos tratados com esta fração. Este resultado sugere que a ação antinociceptiva da Eta parece não envolver a inibição direta da acetilcolinesterase. Entretanto, observou-se um aumento na atividade *ex vivo* da AChE na medula espinhal, mas não no sangue, de animais injetados com ACF. Este fato pode conduzir a uma diminuição do tônus colinérgico na medula espinhal. Estes resultados estão de acordo com um estudo demonstrando que o principal sítio de ação para colinomiméticos em analgesia é a medula espinhal (JONES e DUNLOP, 2007). Este aumento na atividade da AChE pode ser relevante e estar associado com o processo de sensibilização que ocorre na medula espinhal em processos dolorosos crônicos.

Além disso, verificou-se que o tratamento com doses repetidas da Eta foi capaz de prevenir completamente o aumento da atividade da acetilcolinesterase em animais que receberam a injeção intraplantar de ACF, porém a Eta não alterou a atividade *in vitro* desta enzima. Estes resultados sugerem que a redução da atividade *ex vivo* da AChE promovida pela Eta não envolve um mecanismo direto, visto que a Eta não altera a atividade *in vitro* da AChE.

A ocorrência do estresse oxidativo tem sido descrita em muitos modelos animais de dor, estando este envolvido no mecanismo de indução e de manutenção da dor (KIM et al., 2004). Rossato e colaboradores (2010) demonstraram que a nocicepção induzida pela administração intraplantar de ACF é mediada por um aumento da peroxidação lipídica na medula espinhal de camundongos. Além disso, a peroxidação lipídica parece induzir a atividade da AChE, a qual encontra-se ancorada na membrana plasmática (KAIZER et al., 2005). Produtos naturais com comprovada ação antioxidante apresentam efeito antinociceptivo tanto na alodínia mecânica como na hiperalgesia térmica (ROSSATO et al., 2010). Um estudo realizado por Walker e colaboradores (2009) confirmou a atividade antioxidante do extrato bruto e das frações do caule e das folhas da *Mirabilis jalapa*. Portanto, esta fração ao exercer o seu efeito antioxidante pode estar prevenindo a peroxidação lipídica e com isso, revertendo um aumento da atividade da AChE, o que pode elucidar a sua ação antinociceptiva.

Devido à possibilidade do envolvimento do mecanismo colinérgico na antinocicepção produzida pela Eta, julgou-se oportuno, verificar se esta fração compartilha de alguns efeitos adversos comumente apresentados pelos colinomiméticos, tais como o aumento da motilidade gastrointestinal e a hipotermia.

Um dos métodos mais utilizados para determinar o trânsito gastrointestinal em animais é através da administração oral de uma suspensão aquosa de carvão vegetal, onde a distância percorrida pelo carvão vegetal no intestino do animal representa a medida da motilidade gástrica (MITTELSTRADT, 2005). Embora tenha sido demonstrado o envolvimento do sistema colinérgico muscarínico em induzir a antinocicepção, a Eta não alterou a motilidade gastrointestinal em camundongos. Tem sido demonstrado que agonistas muscarínicos não-seletivos produzem alteração do trânsito gastrointestinal em camundongos, enquanto que agonistas seletivos dos receptores M1, M2 ou M3 não apresentam alterações significativas (WILLIAMS et al., 1992). Por outro lado, o extrato bruto das folhas aumentou o trânsito gastrointestinal, o que está de acordo com o uso popular da *M. jalapa* como laxante. Além disso, a Eta parece reduzir a quantidade de substâncias ativas responsáveis pelo aumento da motilidade gastrointestinal induzida pelo extrato bruto.

Uma das principais preocupações na investigação de novos compostos analgésicos é verificar se o tratamento farmacológico produz alterações comportamentais, tais como incoordenação motora e sedação, os quais podem produzir uma resposta antinociceptiva falso-positiva (TABARELLI et al, 2004; NEGUS et al., 2006).

A fim de eliminar a possibilidade da *M. jalapa* provocar alterações no comportamento dos animais, confundindo efeitos músculos-relaxantes e/ou sedativos com antinocicepção, avaliou-se o comportamento motor e exploratório dos animais. O tratamento com a Eta não causou qualquer alteração na locomoção forçada pelo teste do cilindro giratório (rotarod) ou na locomoção espontânea no teste do campo aberto (open-field), nem na temperatura corporal. Outro dado interessante observado no presente estudo é que, ao contrário do AINE tradicional indometacina (usado como controle positivo), nem a Eta, nem o extrato bruto das folhas produziram atividade

ulcerogênica. Esses resultados reforçam a idéia de que a Eta induz antinocicepção sem produção de efeitos colaterais significativos.

É sabido que um dos fatores limitantes das drogas usadas para tratar a dor é o desenvolvimento de toxicidade. O tratamento agudo de camundongos com a fração acetato de etila e o extrato bruto das folhas (até 3000 mg/kg, v.o.) não causou a morte de nenhum animal nem produziu sinais comportamentais de toxicidade (por exemplo, convulsões, apatia ou dificuldades locomotoras) que justificassem a eutanásia dos mesmos e a interrupção dos tratamentos. Portanto, a  $DL_{50}$  não pode ser calculada, pois não foi possível a solubilização dos extratos numa dose maior de 3000 mg/kg.

Por outro lado, Rocha (2006) observou que altas doses da fração hexânica do extrato metanólico de folhas da *M. jalapa* (1000-3000 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal (i.p.), induziu toxicidade aguda em camundongos fêmeas com uma  $DL_{50}$  de 2.009 mg/kg. No entanto, há muitas diferenças entre este estudo e o de Rocha (2006) que podem explicar esses resultados discrepantes, incluindo o tipo de fração utilizada (acetato de etila versus hexânica), a rota de administração (oral versus intraperitoneal) e o gênero dos animais (macho versus fêmea).

Como já foi relatado, a infusão das folhas da *Mirabilis jalapa* é utilizada na medicina popular para o tratamento de processos dolorosos. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o uso etnofarmacológico desta planta.

Assim, a fração acetato de etila desta planta parece ser promissora para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades analgésicas. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados a fim de verificar o exato mecanismo de ação, características farmacocinéticas e possíveis efeitos tóxicos produzidos por esta fração.

## 7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Os extratos brutos e as frações do caule e das folhas da *M. jalapa* apresentaram um efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulo químico (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético) e por estímulo térmico (teste da retirada de cauda) em camundongos.
- ✓ A fração acetato de etila possui efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção inflamatória crônica causada por ACF e pela ligação parcial do nervo ciático e no modelo de nocicepção inflamatória aguda induzida por incisão na pata em camundongos.
- ✓ O sistema colinérgico muscarínico e nicotínico, mas não opióide, parecem estar envolvidos na atividade antinociceptiva da Eta. O tratamento com esta fração reverteu o aumento da atividade *in vivo* da acetilcolinesterase na medula espinhal de camundongos tratados com ACF.
- ✓ A administração oral da fração acetato de etila não produziu efeitos adversos detectáveis nos animais nas doses testadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, K. et al. Pharmacological study of antispasmodic activity of *Mirabilis jalapa* Linn. flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n° 1, p. 96-101, 2008.

ARROYO, C. A. R.; CHACÓN, B.L; MAKI, K. A. Screening and selection of plants by positive pharmacologic effect on jejunum muscular contractility. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n° 1, p. 24-29, 2004.

ASHBURN, M. A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v. 353, p. 1865–1869, 1999.

BARON, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain - a clinical perspective. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, p. 95-106, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanism of pain. **Cell**, v. 139, n° 2, p. 267–284, 2009.

BEIGNEUX, A. P. ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9557-9564, 2004.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BOELSTERLI, U. A. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 307–322, 2003.

BRENNAN, T. J.; UMALI, E. F; ZAHN, P. K. Comparison of pre- versus post-incision administration of intrathecal bupivacaine and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 87, p. 1517-1528, 1997.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytoterapy Research**, nº 14, p. 401-418, 2000.

\_\_\_\_\_ Medicamentos fitoterápicos In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. In YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. Chapecó: Editora Argos. p. 297- 315, 2001.

\_\_\_\_\_ Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMU, R. & VANLERSBERGUE, C. Pharmacology of systemic analgesics. **Best Practice Research of Clinical Anaesthesiology**, v. 16, nº 4, p. 475-488, 2002.

CHAPMAN, C.R., GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, v. 353, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, S. R.; WESS, J.; PAN, H. L. Functional activity of the M2 and M4 receptor subtypes in the spinal cord studied with muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 313, nº 2, p. 765-770, 2005.

CHIFUNDERA, K.; KIZUNGU, B.; WA, M. M. Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa* seed power. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 197-199, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Volume IV, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978, p. 420 e 423.

\_\_\_\_\_. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Volume V, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, p. 134 e 135.

CORUZZI, G.; VENTURI, N.; SPAGGIARI, S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. **Acta Biomedica**, v. 78, n. 2, p. 96-110, 2007.

CRAIG, A. D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, p. 500-505, 2003.

DAJAS-BAILADOR, F; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n° 6, 2004.

DICKESON, A.H.; KIEFFER, B. **Opiates: basic mechanism**. In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzack's. Textbook of pain. 5a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 27, p. 427-457, 2006.

DIMAYUGA, R. E.; VIRGEN, M.; OCHOA, N. Antimicrobial activity of medicinal plants of Baja California Sur/México. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n° 1, p. 33-43, 1998.

DOLIN, S. J. et al. Effectiveness of acute postoperative pain management. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n° 3, p. 409-423, 2002.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacology Science**, v. 15, p. 190-197, 1994.

EISENACH, J.C.; HOOD, D. D.; CURRY, R. Phase I human safety assessment of intrathecal neostigmine containing methyl- and propylparabens. **Anesthesia & Analgesia**, v. 85, p.842-846, 1997.

FERREIRA, J. et al. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 1006-1012, 2001.

\_\_\_\_\_Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin

B1 receptor knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n° 9, p. 2405-2412, 2005.

FRANKLIN, K. B. J., ABBOTT, F. V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: Boulton, A.A., Baker, G.B., Greenshaw, A.J. (Eds.), *Neuromethods: Psychopharmacology*. Humana Press, Clifton, pp. 145–216, 1989.

FRIES, D. S. **Analgesics**. In: Foye, WO; Lemke, TL; Williams, DA. Eds. *Medicinal Chemistry*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 247-269, 1995.

FUKUOKA, H. et al. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1  $\beta$  in the rat. **Brain Research**, v. 657, p. 133–140, 1994.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 129–141, 1999.

GANJU, P. et al. p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B1 receptor-mediated component of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 191-199, 2001.

HASS, H. History of antipyretic analgesic therapy. **The American Journal of Medicine**, v. 75, p. 1-3, 1983.

HIRUMA-LIMA, C. A et al. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 267–274, 2000.

HOOD, D. D. et al. Enhancement of analgesia from systemic opioid in humans by spinal cholinesterase inhibition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 86–92, 1997.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Review Neuroscience**, v. 2, p. 83-91, 2001.

JOE, B.; WILDER, R. L. Animal models of rheumatoid arthritis. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 367-36, 1999.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St. Louis: Mosby – Year Book, 1992.

JONES, P. G.; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197-206, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAIZER, R. R., et al. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1865–1870, 2005.

KATAOKA, J. A. et al. DNA sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP), a ribosome-inactivating protein with an Antiviral Property, from *Mirabilis jalapa* L. and its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 8426-8430, 1991.

\_\_\_\_\_ Adenine depurination and inactivation of plant ribosomes by an antiviral protein of *Mirabilis jalapa* (MAP). **Plant Molecular Biology**, v. 20, p.1111-1119, 1992.

KIM, H. K. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, p. 116-124, 2004.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**, São Paulo: Basf, Tomo III, 1995, p. 192-195.

KUSAMBA, C.; BYAMANA, K.; MBUYI, W. M. Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa* seed powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 197-199, 1991.

KVIEN, T.K. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. **Pharmacoeconomics**, v. 22, p. 1-12, 2004.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais in SIMÕES, C.M.O. et al.: In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 229-245.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n<sup>o</sup> 4, p. 597–652, 2001.

LI, S., ZHAO, Z. Morphine-induced decrease in mechanical allodynia is mediated by central, but not peripheral, opioid receptors in rats with inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 481, p. 203-206, 2003.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER J. D., TREEDE J. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, 473–477, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, O. J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002, p. 360.

LORENZI H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2<sup>a</sup> ed., Ed. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 1999, p. 808.

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

MALAIRAJAN, P. et al. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 425–428, 2006.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v.76, p. 215–222, 1998.

MASSOULIÈ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v.41, p. 31-91, 1993.

MENDELL, J. R. E; SAHENK, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n.13, p.1243-55, 2003.

MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MITTELSTARDT, S. W. et al. Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 52, p. 154-158, 2005.

NAGAKURA, Y. et al. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 490-497, 2003.

NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p. 507-514, 2006.

NUKI, G. Nonsteroid analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal**, v. 287, p. 39-42, 1983.

POGATZKI, E. M., RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, p. 1023-1027, 2003.

POGATZKI-ZAHN, E. M., ZAHN, P. K., BRENNAN, T. J., Postoperative pain-clinical implications of basic research. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n<sup>o</sup> 1, p. 3-13, 2007.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary mdescending facilitation. **Trends in Neuroscience**, v. 25, p. 319-324, 2002.

PORTENOY, R. K.; LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet**, v. 353, p.1695-1700, 1999.

PRADO, M. A. M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291–299, 2002.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymozan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RAO, N.P.; KNAUS, E. E. Evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.11, n<sup>o</sup> 2, p. 81s-110s, 2008.

ROCHA, L.T., 2006. Importância da investigação farmacológica de *Mirabilis jalapa* Linn. Validação de sua investigação. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. **Journal of International Medicine**, v. 265, p. 663-679, 2009.

ROSSATO, M. F. et al. Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. **Journal of Pain**, v. 11, n<sup>o</sup> 6, p. 545-554, 2010.

RUSSO, C. M., BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.123-133, 1998.

SCHECHTMANN, G. et al. Cholinergic mechanisms involved in the pain relieving effect of spinal cord stimulation in a model of neuropathy. **Pain**, v. 139, p. 136–145, 2008.

SIDDIQUI, B. S. et al. Constituents of *Mirabilis jalapa*. **Fitoterapia**, v. 61, n<sup>o</sup> 5, p. 471, 1990.

\_\_\_\_\_ Terpenoids and steroids of the aerial parts of *Mirabilis jalapa* Linn. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 37, p. 108-110, 1994.

SOMAVILLA, N.; CANTO-DOROW, T. S. C. Levantamento das plantas medicinais utilizadas em bairros de Santa Maria-RS. **Ciência e Natura**, v. 18, p. 131-148, 1996.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184–187, 2004.

SOREQ, H. SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p.509-547, 2004.

TABARELLI, Z. et al. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p.1531-1540, 2004.

TOMASZEWICZ, M. Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. **Journal of**

**Neurochemistry**, v. 87, p. 318-324, 2003.

TOP TROPICALS. Flórida, 2003. Disponível em: <  
[http://www.toptropicals.com/cgi-bin/garden\\_catalog/cat.cgi](http://www.toptropicals.com/cgi-bin/garden_catalog/cat.cgi)> Acesso em: 15  
abril 2010.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, p. 232-235, 1971.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C., Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, nº 3, p. 519-528, 2005.

WALKER, C. I. B. *Mirabilis jalapa* L.: atividade farmacológica e citotóxica, 2007, 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

WALKER, C. I. B. et al. Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 169-175, 2008.

WALKER, C. I. B. et al. Atividade farmacológica e teor de quercetina de *Mirabilis jalapa* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, nº 2, p. 241-246, 2009.

WALKER, J. S. NSAID: an update on their analgesic effects. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 22, p.855-860, 1995.

WALKER, K.; FOX, A. J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Molecular Medicine Today**, .v. 5, p. 319-321, 1999.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The Faseb Journal**, v. 18, p. 790-804, 2004.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and

glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 981–1011, 2002.

WEIR, M. R. et al. Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: a review of the rofecoxib development program **American Heart Journal.**, v. 146, n° 4, p. 591-604, 2003.

WESS, J., EGLIN, R.M., GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 721–733, 2007.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J.; RACKÉ, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. **Pharmacology Therapy**, v. 77, n° 1, p. 59-79, 1998.

WILLIAMS, P. D., et al. Comparative pharmacological profile of muscarinic agonists in the isolated ileum the pithead rat, and the mouse charcoal meal transit test. **General Pharmacology**, v. 23, 177–185, 1992.

WOLFE, M. M.; LICHTENSTEIN D. R.; SINGH G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n° 24, p.1888-1899, 1999

WONG, R. N. et al. Characterization of Mirabilis antiviral protein – a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 28, p. 585-593, 1992.

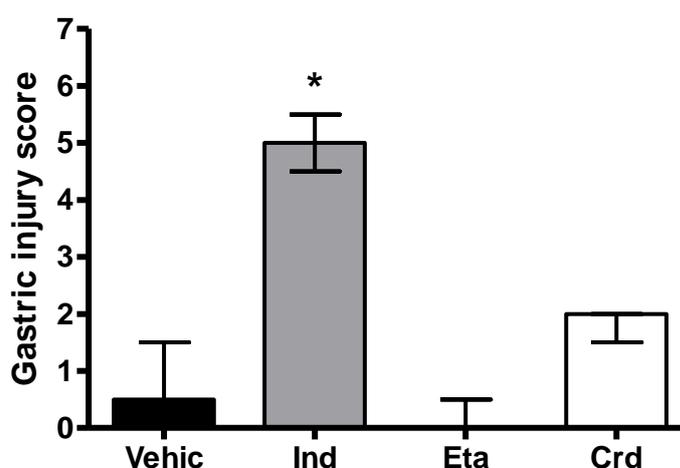
ZEISEL, S. H. Dietary Choline - Biochemistry, Physiology, and Pharmacology. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 95-121, 1981.

ZHANGA, R. et al. Extract of the Chinese herbal formula Huo Luo Xiao Ling Dan inhibited adjuvant arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 366–371, 2009.

YOON, M. H.; CHOI, J. I.; JEONG, S. W. Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats. **Acta Anaesthesiology Scandinavica**, v. 47 p. 1079-1084, 2003.

## 9. ANEXO

**Figure 1** - Effect of indomethacin (100 mg/kg, p.o.), leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) from *Mirabilis jalapa* in the ulcerogenic activity in mice. Data are expressed as median. Non-parametric Kruskal-Wallis followed by Dunn's test.



**Table 1** - Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* on the rotatod test in mice (n=7-8). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA following by Bonferroni's post hoc test.

Time (h)	N° Fall			First Fall		
	Vehicle	Eta	Crd	Vehicle	Eta	Crd
0.5	1.87 $\pm$ 0.66	2.62 $\pm$ 0.64	1.37 $\pm$ 0.41	30.71 $\pm$ 9.70	39.38 $\pm$ 15.39	22.86 $\pm$ 7.38
1	2.37 $\pm$ 0.67	1.75 $\pm$ 0.64	1.50 $\pm$ 0.46	23.63 $\pm$ 8.45	48.88 $\pm$ 17.88	14.60 $\pm$ 7.57
2	0.75 $\pm$ 0.49	0.25 $\pm$ 0.16	0.37 $\pm$ 0.26	19.17 $\pm$ 9.12	39.00 $\pm$ 25.20	26.50 $\pm$ 11.50
4	0.37 $\pm$ 0.18	0.12 $\pm$ 0.12		29.88 $\pm$ 23.89	5.83 $\pm$ 5.83	

**Table 2** - Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* on the spontaneous locomotor activity in mice (n=7-8). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA following by Bonferroni's post hoc test.

Time (h)	Crossing			Rearing		
	Vehicle	Eta	Crd	Vehicle	Eta	Crd
0.5	47.00 $\pm$ 4.89	48.50 $\pm$ 4.78	50.17 $\pm$ 5.06	21.17 $\pm$ 2.93	21.00 $\pm$ 3.23	18.50 $\pm$ 2.51
1	29.83 $\pm$ 8.89	26.67 $\pm$ 6.53	22.33 $\pm$ 2.99	12.50 $\pm$ 2.30	8.83 $\pm$ 2.00	7.00 $\pm$ 2.33
2	12.67 $\pm$ 3.55	13.83 $\pm$ 2.83	8.00 $\pm$ 1.96	5.66 $\pm$ 0.71	6.33 $\pm$ 1.58	3.66 $\pm$ 1.18
4	19.67 $\pm$ 5.18	9.83 $\pm$ 1.74	13.00 $\pm$ 4.53	6.66 $\pm$ 1.11	4.16 $\pm$ 1.35	2.66 $\pm$ 1.25

**Table 3** - Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction and dry hydroethanolic (Crd) extract (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* on the rectal temperature in mice (n=7-8). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA following by Bonferroni's post hoc test.

Time (h)	Rectal Temperature ( $\Delta t^{\circ}\text{C}$ )		
	Vehicle	Eta	Crd
0.5	-0.80 $\pm$ 0.16	0.45 $\pm$ 0.17	0.13 $\pm$ 0.22
1	0.60 $\pm$ 0.10	0.57 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.27
2	0.16 $\pm$ 0.20	0.70 $\pm$ 0.17	0.15 $\pm$ 0.29
4	0.35 $\pm$ 0.22	0.78 $\pm$ 0.15	0.41 $\pm$ 0.37

**Table 4:** Effect of leaf ethyl acetate (Eta) fraction (10 mg/kg, p.o.) of *Mirabilis jalapa* over the acetylcholinesterase activity in mice (n=7-8). Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

<b>Treatment (10 mg/kg, p.o.)</b>	<b>Vehicle</b>	<b>Eta</b>
<b>Blood</b>	21.74 $\pm$ 5.57	17.93 $\pm$ 5.93
<b>Spinal Cord</b>	0.30 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.04