

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

***MIRABILIS JALAPA L.*
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E CITOTÓXICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiani Isabel Banderó Walker

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

MIRABILIS JALAPA L.
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E CITOTÓXICA

por

Cristiani Isabel Banderó Walker

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil
2007

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

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

***MIRABILIS JALAPA L.*
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E CITOTÓXICA**

elaborada por
Cristiani Isabel Banderó Walker

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Melânia Palermo Manfron, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Juliano Ferreira, Dr. (UFSM)

Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 7 de dezembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou e deu força ao longo dessa jornada, e em todos os momentos da minha vida.

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

À Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron pela orientação, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Juliano Ferreira do Departamento de Bioquímica Toxicológica pela orientação nos experimentos com animais e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e a sua aluna, Patrícia Pozzatti do laboratório de Pesquisas Micológicas pela realização dos testes de atividade antimicrobiana.

À Prof^a Dr^a Margareth Linde Atháide pela amizade e pela ajuda concedida em muitos momentos.

À Vera Pereira Pagliarin e Gilberto Zanetti pela amizade, carinho e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia Ana Christ, Ana Savian, Vanessa Janovick, Vanessa Kunz. Obrigada por estarem sempre ao meu lado tanto nas horas de trabalho com nos momentos de descontração. Em especial, gostaria de agradecer a Carla Ceron e Camila Zanotto, pelo apoio que vocês sempre me deram!

Aos colegas do Laboratório da Bioquímica Toxicológica, em especial Gabriela Trevisan e Mateus Rossato. A amizade de vocês foi uma das minhas maiores conquistas.

Aos meus colegas obrigada pela força nos momentos mais difíceis, especialmente, a Janaína Mahlke pelos conselhos, pelas dúvidas esclarecidas, pelo material emprestado enfim, por toda ajuda que tu me deste. Sem a tua ajuda, este caminho teria sido mais difícil de ser alcançado!

Ao Rodrigo, Medi, Rui e família pelo amor, carinho e compreensão!

A minha mãe, que mesmo distante sempre foi importante para a superação das dificuldades, ao meu pai e minhas irmãs obrigada por tudo! Vocês são tudo para mim.

Deus não escolhe os preparados, prepara os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança.

Albert Stein

RESUMO

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

MIRABILIS JALAPA L. **Atividade Farmacológica e Citotóxica**

AUTORA: CRISTIANI ISABEL BANDERÓ WALKER
ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MELÂNIA PALERMO MANFRON
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 7 de dezembro de 2007.

A família Nyctaginaceae compreende aproximadamente 30 gêneros e 400 espécies. No Brasil são encontrados 10 gêneros e 70 espécies. O gênero *Mirabilis* está inserido nesta família e encontra-se amplamente distribuído por todo o mundo. Conhecida popularmente como bonina ou maravilha, é utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções, inflamações e dores. A planta foi coletada em março de 2006 no município de Santa Maria (RS). O extrato bruto em etanol (70%) foi preparado por maceração e fracionado com solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Através da análise química qualitativa foram encontrados em maior quantidade heterosídeos antociânicos, alcalóides, amino-grupos, ácidos voláteis, esteróides e/ou triterpenos, hidroxiantraquinonas, e fenóis. Quanto à atividade antimicrobiana, as melhores respostas obtidas foram para a fração diclorometano do caule e folhas frente a *S. aureus* e a fração acetato de etila do caule e das folhas frente a *S. cerevisiae*. A maior concentração de compostos fenólicos foi encontrada na fração acetato de etila das folhas (7,45 mg/g de droga). Através do método do DPPH, todas as amostras mostraram atividade antioxidante por CCD e pelo método espectrofotométrico, sendo que as frações acetato de etila e butanólica das folhas demonstraram excelente atividade antioxidante com CI_{50} de 20,40 $\mu\text{g/ml}$ e 25,41 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. O maior teor de quercetina foi encontrado no extrato das folhas (0,19%). A fração acetato de etila apresentou a maior atividade analgésica (I% = 82,8) no teste de contorções abdominais. A fração hexânica das folhas expressou a melhor toxicidade frente a *Artemia salina* ($CL_{50}=1,27 \mu\text{g/ml}$).

Palavras-chaves: *Mirabilis jalapa*; analgésica; antioxidante e citotóxica.

ABSTRACT

Mastership Dissertation
Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

MIRABILIS JALAPA L. **PHARMACOLOGICAL ACTIVITY AND CITOTOXICITY**

AUTHOR: CRISTIANI ISABEL BANDERÓ WALKER

ADVISER: Prof^a. Dr^a. MELÂNIA PALERMO MANFRON

Date and local of defense: Santa Maria, December 7th 2007.

The family Nyctaginaceae consist of approximately 30 genus and 14 species. In Brazil, 10 genus and 70 species are found. The genus *Mirabilis* belongs this family and can be found spread worldwide. This plant popularly known as maravilha or bonina and it is used in folk medicine to treat infection, inflammation and pain. The plant was collected in March 2006 in Santa Maria (RS). Ethanolic extract (70%) was made by maceration and fractionated using organic solvents with increasing polarity (hexanic, dichloromethane, ethyl acetate and butanolic). Through qualitative chemical analysis it was found in greater quantity alkaloids, amino groups, sterols and/or triterpenoids, hidroxiantraquinones, anthocyanic pigments, volatile acids and phenols. In relation to the antimicrobial activity, the best response was obtained for the fraction dichloromethane from stem and the ethyl acetate from leaves for *S. aureus* and the fraction ethyl acetate from stem and leaves for *S. cerevisiae*. The higher concentration of phenolic compounds was found in the ethyl acetate fraction from leaves (7,45 mg/g drug). Through the method of DPPH, all samples showed antioxidant activity by TLC and by spectrophotometry. Ethyl acetate and butanolic fractions from leaves showed excellent antioxidant activity with IC₅₀ of 20,40 µg/ml and 25,41 µg/ml, respectively. The highest content of quercetin was found in the leaves extract (0,19%). The ethyl acetate fraction produced analgesic activity reaching 82.8±7.9% inhibition in the writhing test. The hexanic fraction from leaves expressed the best toxicity front of *Artemia* (LC₅₀ = 1.27 µg/ml)

Key words: *Mirabilis jalapa*; analgesic; antioxidant and citotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Mirabilis jalapa</i> L.....	20
FIGURA 2 – Estruturas químicas isoladas das flores da <i>Mirabilis jalapa</i> : A : indicaxantina; B : vulgaxantina-I; C : miraxantina I; D : miraxantina II; E : miraxantina III; F : miraxantina IV.....	23
FIGURA 3 – Estruturas químicas das partes aéreas da <i>Mirabilis jalapa</i> : β -sitosterol; B – brassicasterol; C – estigmasterol; D – ácido oleanólico; E – ácido ursólico.....	24
FIGURA 4 – Rotenóides obtidos da fração acetato de etila das raízes da <i>Mirabilis jalapa</i>	25
FIGURA 5 – Ácido 8-hidroxiocetadeca-cis-11,14- dienólico.....	26
FIGURA 6 – Núcleo fundamental dos flavonóides.....	28
FIGURA 7 – Estrutura molecular da quercetina.....	29
FIGURA 8 – Protocolo experimental do fracionamento do extrato bruto.....	45
FIGURA 9 – Curva padrão do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorvâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.....	57
FIGURA 10 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH de caule (A) e folhas (B) de <i>Mirabilis jalapa</i> em cromatoplasmas. Fase móvel: clorofórmio: metanol (8,5: 3,5).....	59
FIGURA 11 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e dos extratos do caule e frações de <i>Mirabilis jalapa</i> nas diferentes concentrações de DPPH.....	63
FIGURA 12 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e dos extratos das folhas e frações de <i>Mirabilis jalapa</i> nas diferentes concentrações de DPPH.....	63

FIGURA 13 – Curva padrão da quercetina.....	65
FIGURA 14 – Cromatograma obtido do extrato do caule. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,1% (45:55).....	66
FIGURA 15 – Cromatograma obtido do extrato das folhas. Fase móvel: metanol: ácido fosfórico 0,1% (45:55).....	66
FIGURA 16 – Atividade analgésica dos extratos das folhas (A), caule (B) e da morfina sobre o número de contorções abdominais.....	68
FIGURA 17 – Decurso temporal da atividade analgésica da Fr. AcOEt no teste de contorções abdominais.....	69
FIGURA 18 – Efeito das doses da Fr. AcOEt e comparação entre os efeitos dos extratos e da morfina sobre o número de contorções abdominais.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Microorganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana de <i>Mirabilis jalapa</i>	43
TABELA 2 – Rendimento obtido em percentagem para os extratos brutos e frações do caule e folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	52
TABELA 3 – Resultado da análise química qualitativa dos extratos de folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	53
TABELA 4 – Perfil de suscetibilidade de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> ao extrato bruto e frações do caule de <i>Mirabilis jalapa</i> , valores expressos em mg/ml.....	54
TABELA 5 – Perfil de suscetibilidade de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> ao extrato bruto e frações das folhas de <i>Mirabilis jalapa</i> , valores expressos em mg/ml.....	54
TABELA 6 – Perfil de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. zopfii</i> ao extrato bruto e frações do caule de <i>Mirabilis jalapa</i> , valores expressos em mg/ml.....	55
TABELA 7 – Perfil de suscetibilidade de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. zopfii</i> ao extrato bruto e frações das folhas de <i>Mirabilis jalapa</i> , valores expressos em mg/ml.....	55
TABELA 8 – Leituras das absorvâncias para o ácido pirogálico.....	56
TABELA 9 – Teor de fenóis totais para as frações do caule de <i>Mirabilis jalapa</i>	57
TABELA 10 – Teor de fenóis totais para as frações das folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	57
TABELA 11 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e frações do caule de <i>Mirabilis jalapa</i>	60
TABELA 12 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e frações das folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	61

TABELA 13 – Concentração inibitória de 50 % para o ácido ascórbico, extrato bruto e frações do caule e folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	64
TABELA 14 – Inibição (I%) para o EB e frações do caule e folhas de <i>Mirabilis jalapa</i>	67
TABELA 15 – Valores de CL ₅₀ calculados para o extrato bruto e frações do caule e folhas de <i>Mirabilis jalapa</i> , expressos em µg/ml.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – micrograma

µl – microlitro

Ác. Ásc. – Ácido Ascórbico

ATCC – American Type Culture Collection

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCNE – Centro de Ciências Naturais e Exatas

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CH₂Cl₂ – diclorometano

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CI₅₀ – Concentração inibitória 50%

CL₅₀ – Concentração letal 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil,1-picrilhidrazila

EA – Extrato Aquoso

EB – Extrato Bruto

Fr. AcOEt – Fração Acetato de Etila

Fr. ButOH – Fração Butanólica

Fr. CH₂Cl₂ – Fração Diclorometano

Fr. Hex – Fração Hexânica

GF₂₄₅ – gel de sílica G com indicador de fluorescência para λ 245 nm

MeOH – metanol

ml – mililitros

mg – miligrama

n-BuOH – *n*-butanol

NCCLS – National Comitee for Clinical Laboratory Standards

nm – nanômetro

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UI – Unidades Internacionais

USP – United States Pharmacopeia

UV – Luz Ultravioleta

v.i. – Via Intraperitoneal

v.o. – Via Oral

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Aspectos gerais	19
2.2 Aspectos botânicos	20
2.3 Constituintes químicos da <i>Mirabilis jalapa</i>	21
2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante	26
2.5 Atividades farmacológicas	32
2.6 Teste de letalidade	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Obtenção do material vegetal	41
3.2 Equipamentos e acessórios	41
3.3 Solventes e reagentes	42
3.4 Substâncias de referência	42
3.5 Microrganismos	43
3.6 Animais	43
3.7 Preparação do material vegetal	44
3.8 Análise química qualitativa	46
3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana	46
3.10 Determinação de fenólicos totais	47
3.11 Determinação da atividade antioxidante	48
3.11.1 Atividade antioxidante por CCD.....	48

3.11.2 Atividade antioxidante por espectrofotometria.....	48
3.12 Determinação do teor de quercetina por CLAE.....	49
3.13 Determinação da atividade analgésica.....	50
3.14 Teste de letalidade.....	50
3.15 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Rendimento dos extratos brutos e suas frações.....	52
4.2 Análise química qualitativa.....	52
4.3 Atividade antimicrobiana.....	54
4.4 Teor de fenólicos totais.....	56
4.5 Atividade antioxidante.....	58
4.5.1 Atividade antioxidante por CCD.....	58
4.5.2 Atividade antioxidante por espectrofotometria.....	60
4.6 Determinação do teor de quercetina por CLAE.....	65
4.7 Atividade analgésica.....	67
4.8 Teste de letalidade.....	70
5 CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e 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).

Os sumérios, um povo que habitou a área em torno dos rios Tigre e Eufrates por volta dos 4000 a.C., através da escrita cuneiforme, em placas de barro, mostram que os remédios que já usavam na época incluíam plantas como o tomilho, o ópio, o alcaçuz e a mostarda (BALBACH, 1960).

Da civilização egípcia vêm os primeiros textos médicos. Um desses textos é o Papiro de Ébers, assim denominado em homenagem ao egiptólogo alemão Georg Ébers, que em 1872 comprou o papiro de um árabe que alegava tê-lo encontrado próximo ao Tebas. Acredita-se que o papiro tenha sido escrito no século 1700 a.C. Nele são encontradas cerca de oitocentas receitas e referências a setecentas drogas, incluindo a babosa, o absinto, a hortelã, entre outras (ALMEIDA, 1993).

Séculos se passaram entre o primeiro registro com o uso de plantas medicinais e o seu isolamento. Somente em 1805, Friederich Seturner isolou do *Papaver somniferum* L. (ópio) a morfina. Em breve, a sua técnica estava sendo utilizada para isolar as substâncias ativas de outras plantas; surgindo uma indústria farmacêutica que não apenas podia isolar os constituintes básicos das drogas naturais, mas ser capaz de sintetizar novas substâncias em laboratórios e fornecê-las aos médicos em doses estáveis e padronizadas (GRAÇA e AIRES, 1994).

A biodiversidade das florestas tropicais constitui-se na principal fonte de biomoléculas para a produção industrial de medicamentos, cujas vendas chegam, em nível mundial, a 30 bilhões de dólares anuais, mercado este em ampla expansão (SEARS, 1995 apud SIMÕES et al., 2004).

Estes dados justificam o crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive em países de clima tropical, como o Brasil, que apresentam grande biodiversidade. Entre os países da

América Latina, somente o Brasil detêm cerca de 20-22% das plantas e micro-organismos do planeta (CALIXTO, 2005).

Atualmente, os esforços para a descoberta de novas drogas 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 feita por empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995 apud SIMÕES et al., 2004).

Mirabilis jalapa L é uma planta com diversos usos etnofarmacêuticos, tais como no tratamento de dores, processos inflamatórios, digestivos e nas hemorróidas (SOMAVILLA e DOROW, 1996).

Devido a esses diversos usos, neste trabalho objetivou-se estabelecer os constituintes químicos e avaliar as atividades biológicas de extratos de caule e folhas e suas frações nessa espécie.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi realizar a análise química e biológica dos extratos do caule, das folhas e frações de *Mirabilis jalapa* L.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise química qualitativa;
- Avaliar a toxicidade;
- Determinar a atividade antioxidante;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e de quercetina;
- Determinar a atividade antimicrobiana;
- Verificar o potencial antinociceptivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

A *Mirabilis jalapa* (Figura 1) é nativa da América tropical (LORENZI e SOUZA, 1999) e foi introduzida na Europa no começo do século XVII. Esta planta era utilizada como um eficaz drástico-catártico. Seu emprego já foi muito intenso, tendo decaído pelo aparecimento de outros medicamentos eficazes e mais agradáveis ao uso, pois ela 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 subseqüentes (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>

2.2 Aspectos botânicos

A família Nyctaginaceae possui distribuição pantropical, incluindo cerca de 30 gêneros e 400 espécies. No Brasil ocorrem 10 gêneros e cerca de 70 espécies. Algumas espécies de Nyctaginaceae são ornamentais, destacando-se a *Bougainvillea* spp., muito apreciada por suas brácteas vistosas de coloração rósea, alaranjada ou branca; a *Mirabilis jalapa* e a *Boerhavia diffusa*, espécie invasora de culturas. Entre os gêneros nativos, destaca-se *Guapira opposita*, comum em diversas formações florestais. Na Amazônia são mais freqüentes espécies do gênero *Neea*. As espécies arbóreas de Nyctaginaceae recebem o nome vulgar de maria-mole, referencia a baixa qualidade de sua madeira (LORENZI e SOUZA, 2005).

As plantas desta família são em geral herbáceas, arbustivas ou arbóreas, com folhas alternas ou opostas, simples, sem estípulas, reunidas em inflorescência cimosas. As flores são vistosas ou não, bissexuadas ou unissexuadas e actinomorfas. O fruto é do tipo aquênio ou noz (LORENZI e SOUZA, 2005).

Mirabilis jalapa é um arbusto de estrutura herbácea ereta e muito ramificado, perene, de 60-80 cm de altura com caule cilíndrico e um pouco acanalado, bastante ramificado, geralmente de forma dicotômica, desde a base, liso e geralmente glabro, de

coloração verde, freqüentemente com pigmentação vermelho-violácea nas partes expostas ao sol. As folhas são simples, lisas e glabras, opostas de coloração verde, pouco mais claras na face dorsal, atingem 14 cm de comprimento por 10 cm de largura. O limbo é simples de forma ovalada ou deltóide, com base arredondada ou subcordada e ápice acuminado (KISSMANN e GROTH, 1995).

As flores de *Mirabilis* são muito vistosas, de cores variadas, brancas, amarelas, vermelhas, roxas, róseas, não raro listradas, formadas principalmente na primavera e verão. Na sua base há um involúcro formado por cinco brácteas ovuladas e agudas, soldadas na base com cerca de 5 mm de comprimento, de coloração verde; esse involúcro recobre um pseudo-ovário e persiste até a maturação dos frutos, desenvolvendo-se um pouco nesse período, dobrando seu tamanho. Não existe uma verdadeira corola, mas um perigônio com duas seções distintas: na parte inferior uma estrutura globosa, assemelhada a um ovário e na parte superior, acima do estreitamento, segue um tubo com cerca de 3-4 cm de comprimento, que se abre com cinco lobos membranáceos; tubo e lobos podem ser de coloração branca, rósea, purpúrea ou amarela. O gineceu é formado por ovário globoso, encerrado na parte inferior do perigônio; estilete filiforme com estigma capitado. O androceu é formado por cinco estames cujos filetes partem de sobre o ovário, são filiformes e tem anteras bitecas, escuras (KISSMANN e GROTH, 1995).

A abertura das flores ocorre a partir das 17 horas da tarde e o fechamento entre 4h30min até as 6 horas da manhã, o que originou a sua denominação popular como flor-das-quatro-horas (LEAL et al., 2001).

O fruto assemelha-se a uma pimenta do reino, porém maior de pericarpo rugoso e tem em baixo uma película que envolve um perisperma amiláceo e seco (CÔRREA, 1984). Multiplica-se por sementes que germinam espontaneamente e por raízes tuberosas que enraízam com facilidade (LORENZI e SOUZA, 1999).

2.3 Constituintes químicos da *Mirabilis jalapa*

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças, apresenta fundamentalmente, influência da cultura indígena, africana e europeia. Observações

populares sobre a utilização e eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Estes são utilizados com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de muitos não terem seus constituintes químicos e suas propriedades tóxicas conhecidas (MACIEL et al., 2002).

Piattelli, Minale e Nicolaus (1965), do extrato metanólico das flores amarelas de *Mirabilis jalapa*, isolaram as betaxantinas, indicaxantina, vulgaxantina-I, miraxantinas I a V (Figura 2) e miraxantinas IV e VI as quais não foram totalmente caracterizadas.

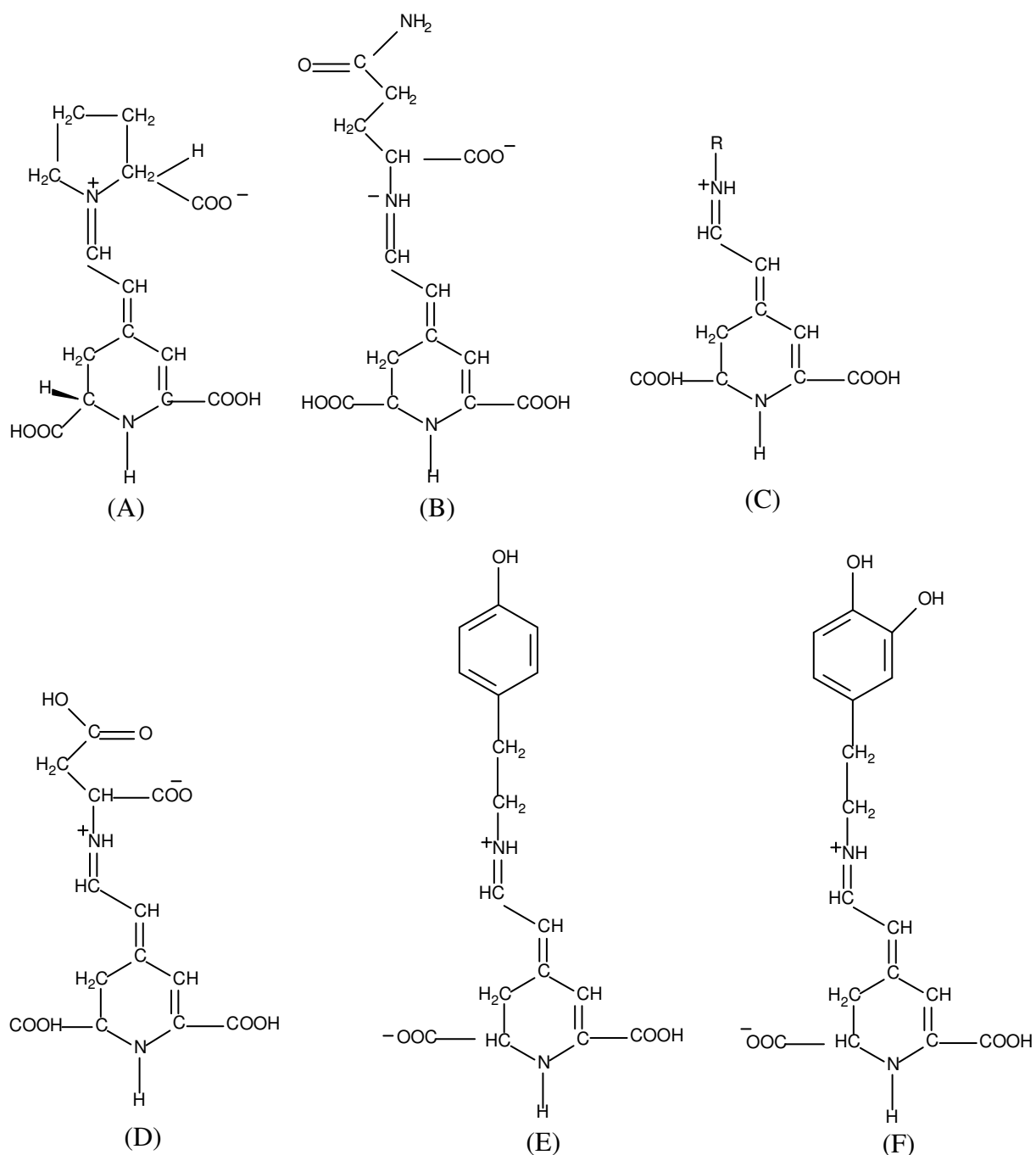


Figura 2 - Estruturas químicas isoladas das flores da *Mirabilis jalapa*: **A**: indicaxantina; **B**: vulgaxantina-I; **C**: miraxantina I; **D**: miraxantina II; **E**: miraxantina III; **F**: miraxantina IV. Fonte: Piattelli, Minale e Nicolaus (1965).

Do extrato metanólico das partes aéreas, Siddiqui et al. (1990, 1994), isolaram β -sitosterol, brassicasterol, estigmasterol, ácido oleanólico e ácido ursólico (Figura 3).

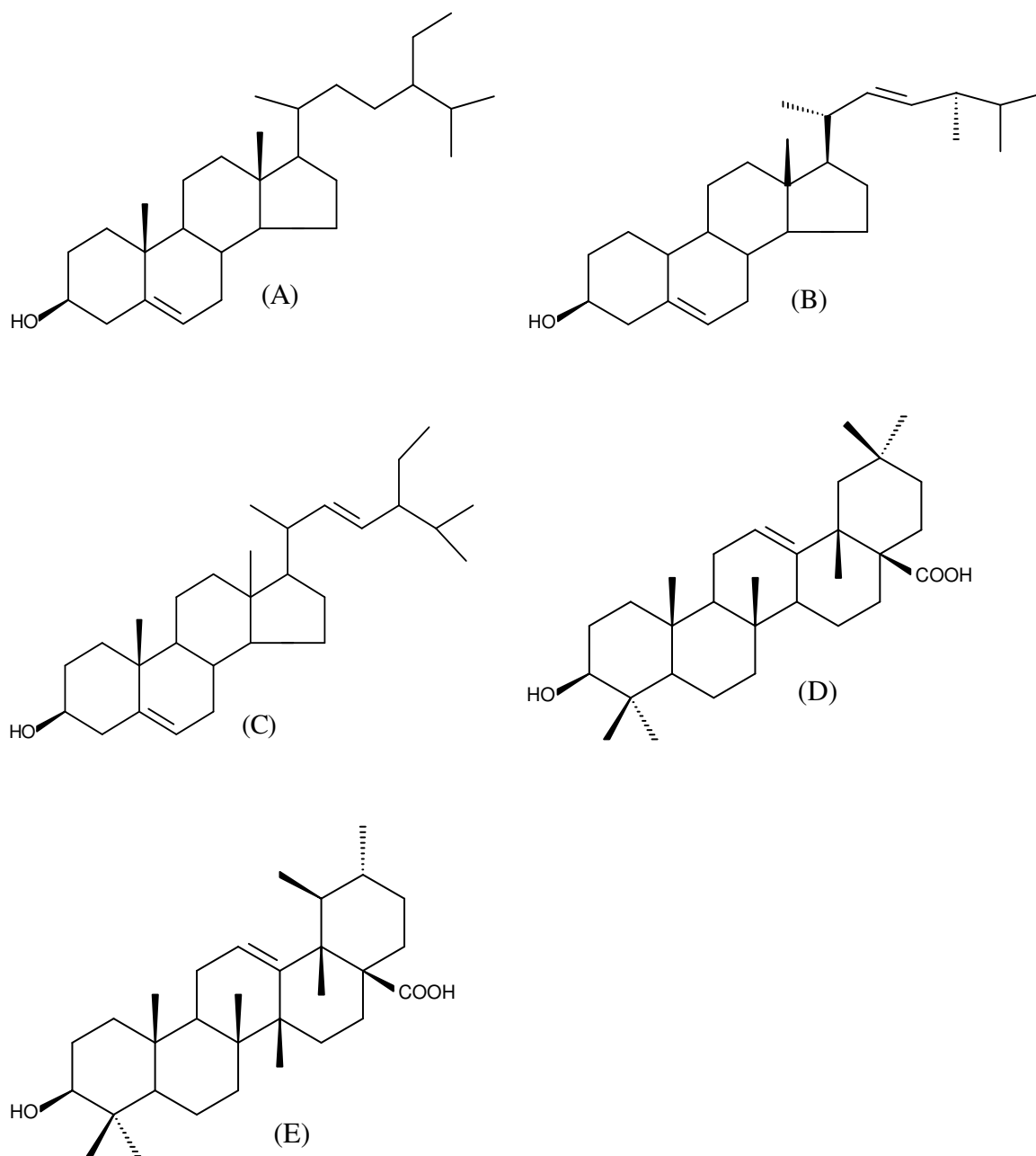


Figura 3 - Estruturas químicas das partes aéreas da *Mirabilis jalapa*: A - β - sitosterol; B - brassicasterol; C - estigmasterol; D - ácido oleanólico; E - ácido ursólico.

Do fracionamento do extrato etanólico das raízes, Wang et al. (2002) obtiveram da fração acetato de etila os rotenóides, Mirabijalona A, B, C e D, 9-O-metil-4-hidroxi-boeravinona B, boeravinona C, boeravinona F e isoquinolina-diol (Figura 4). A

atividade inibitória da transcriptase reversa de HIV-1 foi realizada pelo teste de Elisa com essas substâncias, sendo que a isoquinolina-diol apresentou a maior atividade.

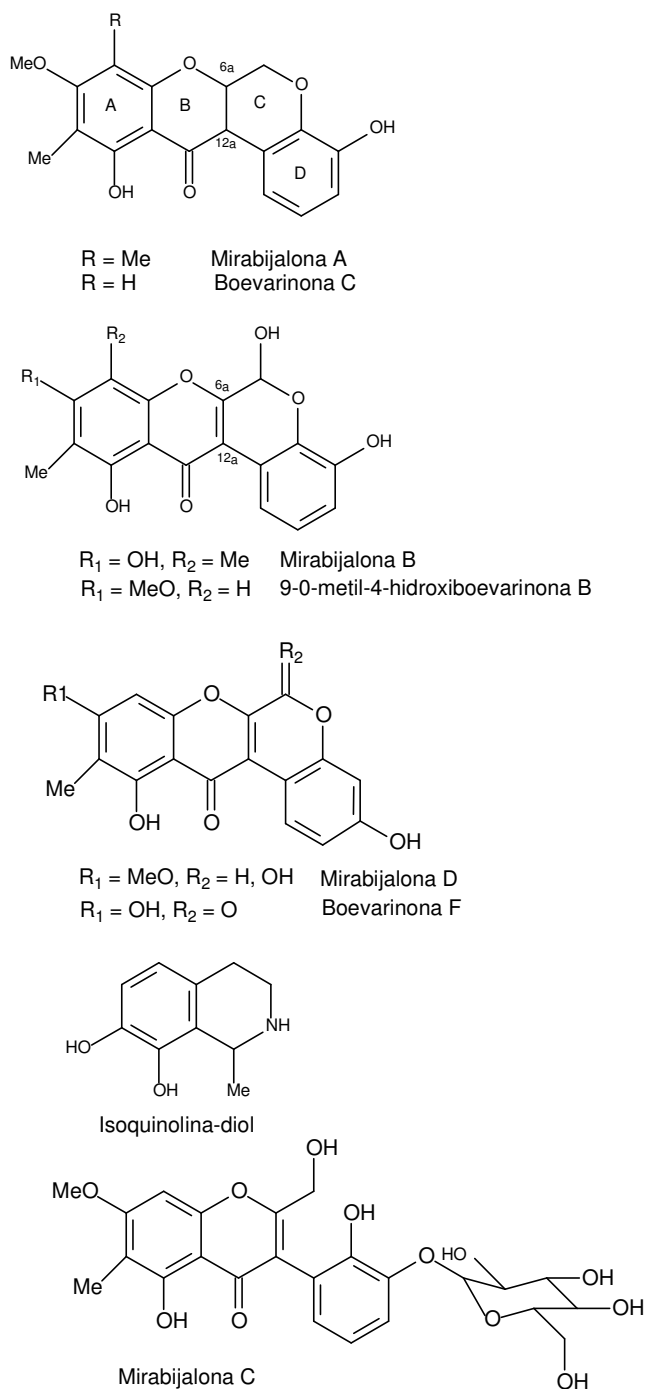


Figura 4: Rotenóides obtidos da fração acetato de etila das raízes da *Mirabilis jalapa*. Fonte: Wang et al. (2002).

O ácido 8-hidroxiocetadeca-cis-11,14-dienóico (Figura 5) foi obtido do óleo das sementes de *Mirabilis jalapa* (AHMAD et al., 1984).

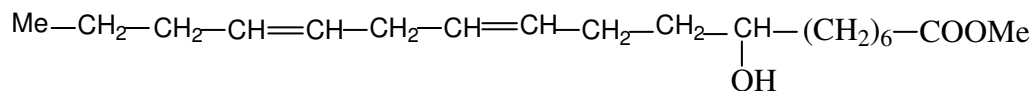


Figura 5: Ácido 8-hidroxiocetadeca-cis-11,14-dienóico.

Fonte: Ahmad e colaboradores (1984).

Yang e colaboradores (2001) isolaram de uma cultura de células das sementes e folhas de *M. jalapa* três compostos fenólicos, isoflavona, diidrorotenóides e rotenóides. A isoflavona e o diidrorotenóide foram identificados como substâncias antifúngicas em ensaios *in vitro* contra *Candida albicans*.

Peptídeos foram isolados das sementes designados por Mj-AMP₁ e Mj-AMP₂, exibindo atividade contra treze fungos e contra as bactérias *Bacillus megaterium*, *Erwinia carotouora*, *Escherichia coli* e *Sarcina lutea*. Esses peptídeos têm semelhança na seqüência de aminoácidos do peptídeo μ-agatoxina, isolado do veneno de aranhas (CAMMUE et al., 1992).

2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os fenólicos pertencem a uma classe de substâncias que abrange uma diversidade de estruturas, simples e/ou complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um agrupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de

transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (CHUN, 2005; SOARES, 2002).

A determinação de fenólicos totais utiliza como reagente o Folin-Ciocalteu, onde este se reduz pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por SWAIN e HILLIS (1956).

Cinco espécies medicinais do Piauí foram selecionadas por Souza e colaboradores (2007) para determinação da atividade antioxidante e fenólicos totais. Os extratos etanólicos de folhas, raízes e sementes de *Terminalia brasiliensis* Camb., *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc., *Copernicia cerifera* (Miller) H.E. Moore, *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire e *Qualea grandiflora* Mart. apresentaram altos teores de atividade antioxidante e de fenóis totais.

A atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos foram testados para os extratos metanólicos e frações aquosa, acetato de etila e butanólica de flores e folhas de *Erica arborea*, sendo que a fração acetato de etila demonstrou a mais alta atividade (MEHMET et al., 2007).

Segundo Zuanazzi e Montanha (2004), os flavonóides são substâncias naturais encontradas abundantemente na natureza e que fazem parte de nossa dieta. Os flavonóides são compostos fenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos abaixo (Figura 6).

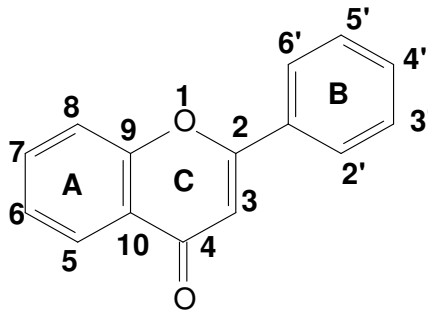


Figura 6: Núcleo fundamental dos flavonóides

Fonte: Simões et al. (2004).

Os flavonóides são capazes de inibir a peroxidação de lipídeos, a agregação de plaquetas, a ativação de sistemas de enzimas, incluindo ciclooxygenases e lipoxigenases; esses efeitos ocorrem devido a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions metálicos e divalentes. Inativam uma grande variedade de enzimas, possuem atividade antioxidante, afetam a fosforilação de proteínas celulares, apresentam efeito inibitório na agregação plaquetária e possuem efeito protetor sobre as células endoteliais, o que sugere que são substâncias de grande interesse nas interações entre o sangue e as paredes dos vasos, que estão intimamente relacionadas com o processo de trombose (BRODY, 1994; KATZUNG, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas das células, podem ser oxidados por peroxidação enzimática ou auto-oxidativa, mediante reações que envolvam radicais livres. Um excesso de radicais livres pode levar a um desequilíbrio na reação em cadeia e a peroxidação lipídica, resultando em patologias que incluem aterosclerose e câncer. A peroxidação lipídica ocorre em três estágios, iniciação, propagação e terminação. No estágio de iniciação, o ácido graxo interage com o oxigênio insaturado, formando um radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio molecular, formando radical peroxila, que pode atacar outra molécula de lipídeo, formando mais radicais livres. No estágio de terminação, os radicais livres reagem com antioxidantes, formando produtos inertes. A peroxidação lipídica pode ser suspensa por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou, aceleram o estágio de terminação (COOK e SAMMAN, 1996).

Experimentos realizados em ratos mostram que flavonóides extraídos de *Solanum melongena* (berinjela) apresentam efeito na redução dos níveis sanguíneos de colesterol total e triacilgliceróis. Este efeito pode ser explicado pelo aumento da atividade da enzima lecitina colesterol aciltransferase, enzima presente na superfície das lipoproteínas de alta densidade, que converte o colesterol presente em quilomícrons, lipoproteínas de baixa densidade e tecidos periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados. Já o aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica, remove os ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes em quilomícrons para o tecido adiposo, resultando numa redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis. Observou-se também neste experimento um aumento nos níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais, bem como esteróis neutros fecais, indicando uma alta taxa de degradação de colesterol e redução na reabsorção intestinal de ácidos biliares (SUDHEESH et al., 1997).

A quantificação de flavonóides através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é muito utilizada para dosagem destas substâncias em extratos de plantas medicinais. Werle (2004) dosou a quercetina no extrato das folhas de *Casearia sylvestris*, encontrando um teor de 0,75%.

O flavonóide mais amplamente distribuído no reino vegetal é a quercetina (Figura 7). Está presente em muitos vegetais como cebola, maçã, chá-preto, frutas cítricas, bem como em pequenas quantidades em folhas verdes e feijões.

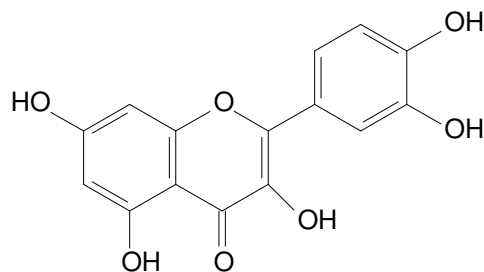


Figura 7: Estrutura molecular da quercetina

Fonte: Simões et al. (2004).

Espécies reativas de oxigênio podem estar diretamente envolvidas na gênese de vários estados patológicos tais como a isquemia, câncer e diabetes. A quercetina

possui efeito antioxidante, propriedade esta bastante difundida na literatura (KESSLER, UBEAUD, JUNG, 2003).

A quercetina tem efeito sobre o endotélio, liberação de prostaciclina e ativadores do plasminogênio em culturas de células endoteliais humanas (ZHAO et al., 1999).

A atividade plaquetária está aumentada em pacientes com fatores de riscos coronarianos, como elevados níveis de colesterol, hipertensão, diabetes e consumo de cigarros. As substâncias flavonoídicas quercetina e miricetina apresentaram forte efeito inibidor na agregação plaquetária humana, induzidas por ácido araquidônico e adenosina difosfato, mas não foram efetivos quando induzida por colágeno (HOMMAM et al., 2000).

O efeito antioxidante dos flavonóides parece estar relacionado com sua ação antitrombocítica. A ação antitrombocítica e vasoprotetora da quercetina e outros flavonóides tem sido atribuída à habilidade de ligar-se á membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Por sua ação antioxidante, os flavonóides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (GRYGLEWSKI et al., 1987).

O oxigênio atmosférico tem sido um desafio à sobrevivência dos organismos vivos. O oxigênio participa de reações de óxido-redução e é o acceptor final de hidrogênio no metabolismo normal de mamíferos. As oxidações biológicas geram radicais livres que podem provocar lesões celulares. O estresse oxidativo pode levar a danos em lipídeos, DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações da estrutura e função celulares, que podem levar ao desenvolvimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas (GOUVÊA, 2004).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena (superóxido dismutase) ou serem provenientes da dieta alimentar como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides, compostos fenólicos e polifenólicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A capacidade antioxidante é um mecanismo comum encontrado em chás, os quais apresentam uma atividade quimioprotetora e terapêutica. *Camelia sinensis* (chá

preto e verde), através das suas atividades antioxidantes, em ensaios de cultura de células, inibiu vários agentes mutagênicos. O extrato aquoso da *Ilex paraguariensis* (erva-mate) provoca a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma humano. (RIETVELD, 2003; BRACESCO et al., 2003).

Vários trabalhos têm sido realizados em plantas para a caracterização de flavonóides e compostos fenólicos, bem como a determinação da atividade antioxidante que pode ser avaliada pelos métodos β -caroteno-linolenato e DPPH (2,2-difenil,1-picrilhidrazila).

O método do β -caroteno-linolenato avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (MILLER, 1971).

O DPPH é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio etanólico, apresentando solução de coloração violeta. À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes na solução, observa-se mudança da coloração de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância com atividade antioxidante, em conformidade com as leis de Lambert e Beer, podendo ser medida espectrometricamente a 517 nm (BLOIS, 1958).

A capacidade seqüestrante de radicais DPPH no extrato hidroalcoólico e frações hexânica e acetato de etila de *Arctium lappa* L (bardana) apresentou maior porcentagem de inibição no extrato hidroalcoólico que nas suas frações (LIMA et al., 2006).

Em outro estudo, a atividade antioxidante no extrato etanólico e nas frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores de *Acacia podalyriifolia* apresentou uma melhor ação para a fração acetato de etila (ANDRADE et al., 2007).

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi avaliada por Kunz (2007) através de CCD e de espectrofotometria no extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das partes aéreas de *Glechon spathulata* Benth, sendo que as frações acetato de etila e butanólica exibiram as maiores atividades. Esta metodologia também foi realizada por Choi e colaboradores (2002), onde foram

testadas as atividades antioxidantes de plantas utilizadas na medicina coreana.

Extratos alcoólicos de folhas, flores e sementes de *Sambucus nigra* L. (sabugueiro), obtidos em diferentes temperaturas (20°C e 100°C) apresentaram maior atividade para as flores quando a temperatura era 100°C. Por esse estudo, sugere-se que a atividade antioxidante dos extratos possa ser dependente da temperatura, pois esse efeito é atribuído à hidrólise parcial dos glicosídeos derivados de flavonóides levando a formação de agliconas (DAWIDOWICZ, WIANOWSKA e BARANIAK, 2006).

2.5 Atividades farmacológicas

Mirabilis 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). Na Malásia, o seu uso é para atenuar as cólicas intestinais. 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. Suas raízes contêm oximetilanthaquinona (WATT e BREYER-BRANDWIJK, 1962 apud CHIFUNDERA, BYAMANA e MBUYI, 1991).

As folhas de *Mirabilis* quando novas, sendo cozidas são comestíveis; as raízes apresentam ação purgativa e tóxica, o fruto é utilizado para eliminar sardas e é rico em amido (CORRÊA, 1984).

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 DOROW, 1996).

Os extratos metanólicos de caules, folhas, sementes e flores (botões florais, cálices e pétalas) de *Mirabilis 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 β -sitosterol, obtido por purificação do extrato das flores, não mostrou nenhum efeito na contratibilidade do intestino (ARROYO, CHACÓN e MAKI, 2004).

Diversos estudos como os de Kataoka et al. (1991, 1992) e Wong et al. (1992) apontam *Mirabilis* 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.

Plantas com possíveis atividades antimicrobianas devem ser testadas por um modelo microbiológico adequado que confirme essa atividade (ERDOGRUL, 2002; ATES E ERDOGRUL, 2003). A importância de estudar a atividade antimicrobiana destas plantas está fundamentada na incessante busca por novos fármacos, aos rápidos mecanismos de resistência desenvolvidos por microrganismos patogênicos e o número de extratos, essências e princípios ativos isolados de plantas que possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana (GOODMAN et al., 1990; COWAN, 1999).

Dentre as metodologias que podem ser empregadas para avaliar a presença de atividade antimicrobiana, temos os ensaios por difusão em ágar, determinando-se a potência de uma determinada substância com relação a um padrão de referência, os ensaios por turbidimetria, a bioautografia, que é uma combinação de cromatografia em camada delgada (CCD) com bioensaio, através da qual pode-se monitorar um extrato e isolar constituintes com atividade biológica, permitindo a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da substância isolada e o método de microdiluição em caldo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; HAMBURGER e CORDELL, 1987).

A microdiluição em caldo é uma metodologia quantitativa para avaliar a sensibilidade / suscetibilidade microbiana o qual nos permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos bioativos testados frente aos microrganismos (NCCLS, 1997).

Sartoratto e colaboradores (2004) classificaram a atividade antimicrobiana como forte (até 0,5 mg/ml), moderada (entre 0,6 mg/ml e 1,5 mg/ml) e fraca (acima de 1,5 mg/ml).

Machado e colaboradores (2003) avaliaram, através da CIM, 14 extratos de plantas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, frente a microrganismos resistentes. Entre os extratos analisados, o de *Punica granatum* L. (romã) e *Tabebuia*

avellanadae apresentaram substâncias que inibiram linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), bactéria que se tornou bastante resistente a vários antibióticos, conhecida como superbactéria.

Michelin et al. (1995) testaram a atividade antimicrobiana por difusão em ágar de extratos etanólicos das folhas de *Artemisia absinthium* L. (losna), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Punica granatum* L. (romã), *Xanthosema violaceum* Schott (taioba) e *Syzygium cuminii* L. (jambolão) frente a 15 diferentes microrganismos. Realizaram a concentração inibitória mínima para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana. Sendo que os extratos que de *X. violaceum* e *S. cuminii* inibiram, *S. aureus* (ATCC 29213), e as bactérias isoladas em ambiente hospitalar resistentes a antibióticos: *E. coli* 6.2, *E. coli* 1.9c, *Proteus sp* 6.3 e *S. aureus* OX⁸.

Extratos hidroalcoólicos de 13 plantas utilizadas na medicina popular brasileira tiveram a sua atividade antimicrobiana avaliada por microdiluição em caldo. *Piper regnellii* apresentou atividade contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*. *Punica granatum* mostrou boa atividade contra *S. aureus*. *Eugenia uniflora* apresentou moderada atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. Extratos de *Psidium guajava*, *Tanacetum vulgare*, *Arctium lappa*, *Mikania glomerata*, *Sambucus canadensis*, *Plantago major* e *Erythrina speciosa* apresentaram uma pequena atividade antimicrobiana. *Spilanthes acmella*, *Lippia alba* e *Achillea millefolium* foram consideradas inativas (HOLETZ et al., 1992).

O extrato hidroalcoólico de caule e folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira-vermelha) apresentou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar e pela determinação da concentração inibitória mínima em meio sólido frente as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella sp.*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.* e *Salmonella sp.* Os dois extratos apresentaram atividade para todas as bactérias testadas, com exceção da *Klebsiella sp.* (CARVALHO et al., 2002)

Avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato aquoso, metanólico e da mistura desses da semente de *Mirabilis* pelo método de difusão em ágar. Constatou-se que as bactérias *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* e *Enterobacter sp.* isoladas de lesões infeccionadas e de fezes provenientes de diarreias, foram sensíveis aos extratos, com exceção do extrato

aquoso frente a *Enterobacter sp.* (KUSAMBA, BYAMANA e MBUYI, 1991).

A atividade antimicrobiana também foi determinada por Dimayuga, Virgen e Ochoa (1998), através da difusão em ágar do extrato etanólico das folhas e dos galhos de *M. jalapa* contra os seguintes microrganismos: *S. aureus*, *B. subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*. Os extratos apresentaram fraca atividade somente a *S. aureus* e a *B. subtilis*.

Nair, Kalariya e Chanda (2004), determinaram a atividade antimicrobiana por difusão em ágar do extrato aquoso e metanólico de *M. jalapa*. Os extratos não inibiram as bactérias testadas (*Pseudomonas testosteroni* NCIM 5098, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Proteus morgani* NCIM 2040, *B. subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 e *Klebsiella pneumoniae* NCIM 2719).

A dor é definida oficialmente pela Association for The Study of Pain, como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real, ou potencial; ou relatada como se existisse lesão” (MERSKEY e BOGDUK, 1994 apud CALIXTO et al., 2000).

A dor é originária da transformação dos estímulos ambientais (trauma) em potenciais de ação, que das fibras nervosas periféricas, são transferidas para o Sistema Nervoso Central. A capacidade de diagnosticar diferentes doenças depende, em grande extensão, do conhecimento sobre as diferentes qualidades de dor. A dor é, sobretudo um mecanismo de proteção do corpo; ocorre sempre que qualquer tecido estiver sendo lesado, e faz com que o indivíduo reaja para remover o estímulo doloroso (GUYTON e HALL, 1997).

Existem várias formas de classificar a dor, sendo a sua duração ao longo do tempo um dos critérios mais adotados. A dor pode ser classificada como aguda, subcrônica ou crônica. A dor aguda tem função de alerta, caracteriza-se por ser de curta duração (alguns segundos até poucas horas), desaparecendo com a resolução do processo que a originou. A dor subcrônica, por sua vez, tem duração variável (horas a dias), e é fundamental para que o indivíduo proteja o órgão lesado, e facilite a sua recuperação. Como exemplos de dor aguda e subcrônica, podemos citar o contato com uma chapa quente e a dor de uma lesão cutânea inflamada, respectivamente. A dor aguda e subcrônica são acompanhadas por alterações neurovegetativas como

taquicardia, hipertensão arterial, sudorese, palidez, expressões faciais de sofrimento, agitação psicomotora e ansiedade (BERNARD et al., 1996; LOESER e MELZACK, 1999).

A etiologia da dor aguda e subcrônica é evidente, o que torna o diagnóstico fácil. Além disso, elas são facilmente controláveis usando-se o arsenal de drogas 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 a etiologia da dor crônica é multifatorial, o que torna seu diagnóstico e tratamento mais complexo, envolvendo múltiplas abordagens e nem sempre alcançando pleno êxito na sua erradicação. As dores crônicas mais comuns incluem a fibromialgia, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (ASHBURN e STAATS, 1999; DRAY et al., 1994).

Durante essas síndromes, o processamento sensorial é anormal. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, podem produzir sensação de dor, denominada de alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor como na hiperalgesia e ainda, temos a dor descrita por sensação de queimação ou choque (BESSON, 1999; WOOLF e MANNION, 1999).

A dor afeta milhões de pessoas por todo o mundo, alterando as funções física e emocional, 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).

Segundo Jones (1992), os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Logo, os termos dor e analgesia são mais apropriados para o ser humano, enquanto nocicepção

e antinocicepção são mais adequados aos animais.

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 (DOUGLAS, 1999).

O teste de contorção abdominal em camundongos é um método muito utilizado para se avaliar a atividade analgésica de substâncias contra dor de origem inflamatória, onde o ácido acético na concentração de 0,6% induz lesão no abdômen do camundongo, o que é suficiente para provocar os espasmos traduzidos como contorções (KOSTER, ANDERSON e BEER, 1959).

A capacidade de aliviar a dor, através do uso de plantas foi provavelmente uma das grandes vitórias da medicina e precede em muito a capacidade de curar. Plantas como *Hyokymus albus* (meimendo) e *Papaver somniferum* (papoula), figuram nas primeiras farmacopéias da Babilônia e da Suméria. Um bom exemplo que destaca a importância das plantas neste aspecto é a Aspirina®, 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. Em 1838, foi sintetizado o ácido salicílico. O ácido salicílico foi a primeira substância usada como antipirético. Em 1859, a partir do ácido salicílico, o cientista Gilm, obteve o ácido acetilsalicílico, que é consumido em grande escala em todo o mundo, como analgésico e antitérmico (HASS, 1983 e WALKER, 1995).

Os metabólitos secundários originados de plantas têm contribuído em muito 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 (CALIXTO et al., 2000).

Atualmente as pesquisas científicas visam unir os analgésicos e antiinflamatórios tradicionais aos fitoterápicos que já tiveram seus efeitos comprovados cientificamente como a *Arnica montana* (arnica) com atividade analgésica e antiinflamatória, *Quercus* sp. (carvalho) com potente ação antiinflamatória proporcionada pela quercetina, *Aesculus hippocastanum* (castanha da Índia) com suas ações antiedematogênica, antiexudativa e venotrópica (BOTSARIS, MACHADO, 1999; TESKE, TRENTINI, 1999).

Hiruma-Lima e colaboradores (2000) testaram a atividade analgésica do extrato bruto de *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) obtido através de decocção e do sumo das folhas frescas e observaram uma inibição da dor em torno de 50%.

Os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das partes aéreas de *Miconia ligustroides*, apresentaram atividade analgésica significativa inibindo em torno de 60% a nocicepção (CUNHA et al., 2003).

Ferreira e colaboradores (2000) testaram a potência nociceptiva do extrato metanólico e dois triterpenos (folidotin e 24-metilencicloartenol) isolados do caule de *Epidendrum mosenii* e observaram uma inibição da dor de 80%.

2.6 Teste de letalidade

A utilização de bioensaios para o monitoramento da atividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido freqüentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre esses se encontra o ensaio com *Artemia salina*, que é considerado uma das mais úteis ferramentas para testes preliminares de toxicidade. Este teste pode mostrar uma boa correlação com atividade citotóxica contra vários tumores sólidos humanos e também com a atividade pesticida (McLAUGHLIN, CHANG, SMITH, 1991; LUNA et al., 2005).

Artemia salina é um microcrustáceo invertebrado, pertencente à classe Anostracea, que faz parte do ecossistema marinho. É uma importante fonte de alimento para peixes e outros crustáceos, tanto no ambiente onde vive como em aquários marinhos (PELKA et al., 2000).

O bioensaio envolvendo *Artemia* consiste em avaliar a sobrevivência desse microcrustáceo quando exposto a uma determinada substância. A análise é feita mediante o cálculo da CL_{50} , ou seja, a concentração que dizima metade da população (DOLABELA, 1997).

Dolabela (1997) em seus estudos estabeleceu critério de classificação de extratos hidroetanólicos com base nos níveis de CL_{50} em *Artemia salina*, sendo que extratos com CL_{50} menor que 80 $\mu\text{g/ml}$ eram considerados altamente tóxicos; CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/ml}$ e 250 $\mu\text{g/ml}$, moderadamente tóxicos e CL_{50} maior que 250 $\mu\text{g/ml}$, com baixa toxicidade ou não tóxicos. Neste mesmo estudo, foi também estabelecida uma correlação entre o limite da toxicidade para *Artemia salina* com ação anti-tripanosoma *cruzi*, onde a maioria dos extratos com esta ação exibem toxicidade moderada. Já Meyer et al. (1982) considera inativos os extratos onde todos os náuplios sobrevivem a uma concentração maior que 1000 $\mu\text{g/ml}$.

O primeiro trabalho relativo ao uso de *Artemia salina* em bioensaio foi em 1956, e a partir daí, inúmeros artigos têm sido reportados na literatura em estudos utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos e frações de plantas (CAVALCANTE et al., 2000 apud MICHAEL, 1956).

Os extratos etanólico, hexânico, diclorometano de várias partes de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa* não apresentaram toxicidade aos náuplios de *Artemia salina*, indicando que esta planta é bem tolerada nos sistemas biológicos (STEFANELLO et al., 2006).

No extrato metanólico da *Cynara scolymus* L. (alcachofra) e nas frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica, como nos compostos cinarósido e cinaropicrina, algumas frações, principalmente as apolares, causaram a mortalidade de uma porcentagem significativa de náuplios de *A. salina*, sendo que a fração hexânica apresentou a maior atividade (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Utilizando a mesma metodologia, Silva e colaboradores (2007) avaliaram os extratos metanólicos das partes aéreas, raízes e frutos das espécies *S. asperum* R., *S. capsicoides*, *S. palinacantum* D., *S. paludosum* M., *S. paniculatum* L., *S. paraibanum*, *S. sisymbriifolium*, *S. crinitum*, *S. diamantinense*, *S. megalonyx* S., *S. torvum*, *S. asterophorum* e *S. stipulaceum*. As partes aéreas de *S. asperum* R. e *S. megalonyx* S.,

as flores e raízes de *S. palinacanthum* D. e as raízes de *S. paludosum* M. foram inativas aos náuplios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal constitui-se de folhas e caule de *Mirabilis jalapa* L. coletadas no município de Santa Maria/RS, no mês de março de 2006.

A planta foi identificada pela Prof^a. Thais Scotti do Canto Dorow e um exemplar encontra-se registrado no Herbário do Departamento de Botânica da UFSM sob a exsicata SMDB 10.077.

3.2 Equipamentos e acessórios

- Aparelho de Clevenger
- Aquário
- Autoclave
- Balança eletrônica - ACCULAB® V-400 (capacidade 400 g, precisão 0,1g)
- Banho térmico Biomatic
- Banho ultra-sônico
- Cromatofolha de sílica gel GF₂₅₄
- Cromatógrafo líquido Shimadzu
- Espectrofotômetro Ultravioleta/ Visível
- Estufas microbiológicas
- Estufa de ar seco circulante
- Estufa de secagem e esterilização
- Evaporador rotatório acoplado a banho d'água
- Extrator tipo Soxhlet
- Funil de Büchner
- Lâmpada de ultravioleta $\lambda = 254$ nm e 366 nm
- Moinho de facas
- Vidrarias de laboratório

3.3 Solventes e reagentes

Foram empregados solventes, reagentes e substâncias de referência das marcas Vetec®, Sigma® e Merck®.

- 1,1 difenil-2-picrilhidrazila
- Acetato de etila PA
- Ácido acético glacial PA
- Ácido clorídrico PA
- Ácido fórmico PA
- Álcool etílico PA
- Álcool metílico PA
- Butanol PA
- Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio
- Clorofórmio PA
- Diclorometano PA
- Dicromato de potássio
- Dimetilsulfóxido
- Éter etílico PA
- Folin-Ciocalteu
- Hexano PA
- Sulfato de sódio anidro
- Peróxido de hidrogênio
- Polioxietileno sorbitan monopalmitato (Tween 80)
- Polietilenoglicol

3.4 Substâncias de referência

- Ácido Pirogálico
- Ácido Ascórbico
- Quercetina

- Sulfato de Morfina

3.5 Microrganismos

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas cepas de microrganismos originários de isolamento clínico e da American Type Culture Collection (ATCC) disponíveis no Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM (Tabela 1).

Tabela 1 – Microrganismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana de *Mirabilis jalapa*.

Microrganismos	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Escherichia coli</i>	254922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27850
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
<i>Candida albicans</i>	44373
<i>Candida glabrata</i>	10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601
<i>Prototheca zopfii</i>	*

*isolado clínico

3.6 Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UFSM e conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com os animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Para a determinação da atividade analgésica foram utilizados camundongos albinos (25-35g), machos e adultos, fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7 e 19 horas), em

temperatura de 22 ± 1 °C , com alimento e água *ad libitum*.

3.7 Preparação do material vegetal

O material coletado foi desidratado em estufa com circulação de ar ($\pm 45^\circ\text{C}$), pulverizado em moinho de facas e armazenado em frasco âmbar.

Os extratos foram obtidos por maceração a frio, em uma solução etanólica 70%, durante 14 dias com renovação de solvente no 7º dia. Após, o macerado foi concentrado em evaporador rotatório obtendo-se o resíduo seco, parte do resíduo foi retomado e submetido a fracionamento com solventes orgânicos de polaridades crescentes, hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo-se respectivamente as frações hexânica (Fr. Hex), diclorometano (Fr. CH_2Cl_2), acetato de etila (Fr. AcOEt) e butanólica (Fr. ButOH). Foram calculados os rendimentos dos extratos brutos (EBs) e frações.

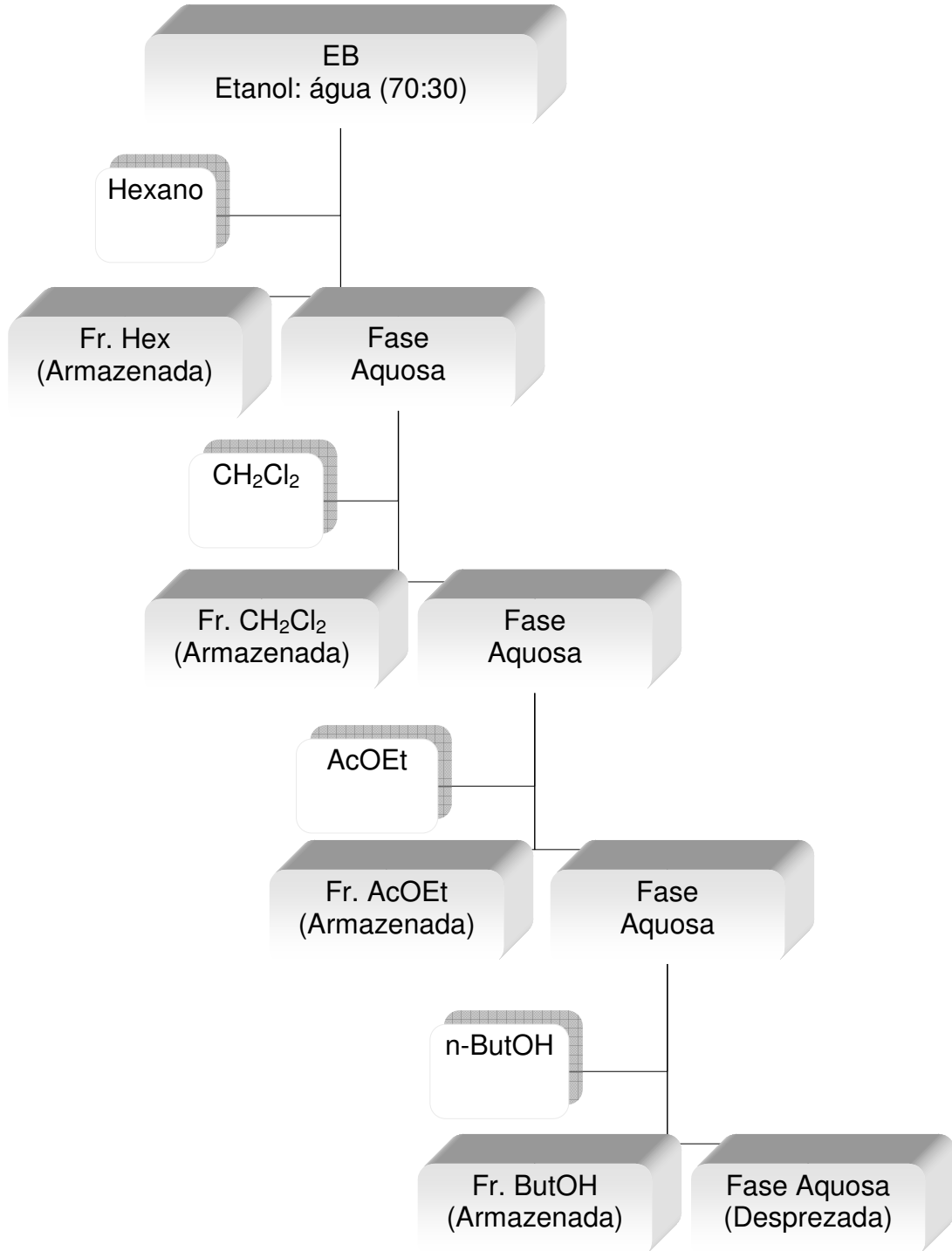


Figura 8 – Protocolo experimental do fracionamento do extrato bruto

3.8 Análise química qualitativa

A análise química qualitativa seguiu a metodologia apresentada por Moreira (1979), com os extratos, aquoso e etanólico (70%) obtidos por decocção. Eventualmente foram empregadas técnicas mais específicas descritas por Costa (1982).

3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações do caule e folhas, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, de acordo com os documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias (NCCLS, 1997).

Os ensaios foram realizados em triplicata com séries de diluições para o EXTRATO BRUTO e frações do caule e das folhas em placas estéreis com 96 micropoços. O controle positivo é composto do inóculo sem a droga, já o negativo é apenas o caldo Mueller Hinton (MH) para bactérias e o caldo RPMI 1640 para fungos.

As amostras foram inicialmente solubilizadas em etanol, e adicionadas aos poços de modo que ficassem diluídas a diferentes concentrações (5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,05 e 0,025 mg/ml).

Previamente aos testes, os inóculos bacterianos foram preparados a partir de bactérias ativadas, as quais foram repicadas em ágar MH, durante 24 h a 35°C, enquanto que os fungos foram repicados para ágar Sabouraud dextrose, durante 48 h a 35°C.

Após a ativação das bactérias, padronizou-se o inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em salina, com turvação similar ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1×10^8 UFC/ml). A seguir, esta suspensão foi diluída a 1:100 (1×10^7 UFC/ml) em salina estéril, e volumes de 10 μ L foram então transferidos para as cavidades de uma placa de microtitulação, contendo 200 μ L do caldo Mueller Hinton crescido de diferentes concentrações das amostras, resultando num inóculo final de

2×10^5 a 5×10^5 UFC/ml. As placas com patógenos bacterianos foram incubadas a 37°C durante 24 h. A suspensão de microrganismos leveduriformes foi preparada de modo similar. Após a padronização da turvação, foram realizadas diluições sucessivas de 1:50 e 1:20 no caldo RPMI 1640 tamponado. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 h.

A leitura foi realizada após o período de incubação, mediante composição visual com o controle de crescimento positivo, determinando-se como CIM a menor concentração da substância testada onde não foi visualizado crescimento do microorganismo. Depois de realizada a leitura do CIM, efetua-se a CFM (Concentração Fungicida Mínima) e a CBM (Concentração Bactericida Mínima); onde é observado os poços onde não houve crescimento visível, fazendo-se o repique deste para placas de Petri contendo o meio específico durante o tempo de incubação adequado para cada microorganismo e então, fez-se a leitura. A menor concentração onde não foi observado crescimento no ágar para fungos é considerada a CFM e para bactéria é considerada a CBM.

3.10 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu segundo Chandra e Mejia (2004) modificado.

Para o ensaio foram preparadas soluções de 0,15 mg/ml de cada amostra, onde utilizou-se 10 ml de etanol para solubilizá-las e completou-se com água para um volume final de 100 ml. Dessa solução retirou-se uma alíquota de 1 ml no qual foi adicionado 1 ml do reagente Folin-Ciocalteu, após 5 min., foi acrescentado 2 ml de carbonato de sódio 20%. Decorridos 10 min., mediu-se a absorbância das amostras a 730 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV 1021, utilizando-se o etanol como branco, sendo as análises realizadas em triplicata.

A curva padrão do ácido pirogálico foi realizada nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,015; 0,025 e 0,03 mg/ml. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras com a curva de calibração do padrão e expressos como mg de equivalentes de ácido pirogálico por g de extrato.

3.11 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada qualitativamente (CCD) e quantitativamente (espectrofotométrico), *in vitro*, frente ao radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH).

3.11.1 Atividade antioxidante em CCD

Para avaliar qualitativamente a atividade antioxidante de *Mirabilis jalapa*, o extrato bruto e frações do caule e folhas foram aplicados em cromatoplasmas de alumínio (Silica gel GF₂₅₄) e eluídas em sistema de eluentes de acordo com as amostras. Como padrão de atividade antioxidante foi empregado a quercetina. Após a eluição e evaporação total do eluente, nebulizou-se a placa com uma solução de DPPH 0,004% diluída em metanol. A placa ficou exposta à temperatura ambiente por 30 min., quando se fez a leitura da atividade antioxidante, caracterizada pela formação de manchas amareladas comparáveis com as observadas para o padrão sobre a coloração violeta, característica do DPPH (CHOI et al., 2002).

3.11.2 Atividade antioxidante por espectrofotometria

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH seguiu a metodologia de Gao et al. (1999) e Choi et al. (2002). Foram utilizados o extrato bruto e frações do caule e folhas e como padrão o ácido ascórbico (Ác. Asc.). Como controle negativo usou-se uma solução de 1 ml de DPPH diluída em 2,5 ml de etanol.

Para a curva de calibração foram colocados 2,5 ml de ácido ascórbico em cada tubo de ensaio nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/ml, após colocou-se 1 ml de uma solução de DPPH 0,3 mM solubilizada em etanol (2,5 ml). Incubou-se no escuro por 30 min. e fez-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 518 nm, este ensaio foi realizado em triplicata para todas as concentrações do padrão e das amostras.

A atividade antioxidante foi calculada conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco})}{\text{Abs do controle}} \times 100$$

A CI_{50} (concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%) foi calculada para as amostras e para o padrão através de interpolação gráfica calculada por regressão não-linear.

3.12 Determinação do teor de quercetina por CLAE

A metodologia utilizada está de acordo com a Farmacopéia Americana (USP 24, 1999). As amostras e o padrão foram injetados no cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10Avp, com injetor manual Rheodyne e detector UV/Vis. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna Shimadzu LC – 18 Shim – pack (8 cm x 1,50 cm, 5 μ m).

O padrão foi preparado com 300 μ g de quercetina e completado em balão volumétrico de 50 ml com metanol. Dessa solução, retirou-se uma alíquota de 10 ml e completou-se com solução de metanol: água (30:70) para um balão volumétrico de 100 ml, com aquecimento sob refluxo por 90 min. A curva padrão foi realizada nas concentrações de 0,9375; 1,875; 3,75 e 7,5 μ g/ml.

As amostras foram preparadas com 1500 μ g das folhas e do caule, nas quais foi adicionado 40 ml de solução de HCl 20% em metanol, com aquecimento sob refluxo por 90 min. Após esse período, o extrato foi transferido para um balão volumétrico de 100 ml e completado o volume com uma solução de metanol : água (30:70).

A eluição em gradiente teve como fase móvel metanol: ácido fosfórico 0,1% (45:55) com vazão de 1,0 ml/min. O volume injetado foi de 20 μ l e o comprimento de onda utilizado foi de 370 nm.

3.13 Determinação da atividade analgésica

A atividade analgésica foi determinada pelo teste de contorções abdominais (KOSTER, ANDERSON e BEER, 1959). Os animais (n = 6) foram tratados com os extratos brutos e frações na dose de 10 mg/Kg (via oral), solução de Tween 80: polietilenoglicol: salina (veículo): e morfina (controle). Sessenta minutos após cada tratamento, foi administrado intraperitonealmente (i.p.) o ácido acético (0,6%, 10ml/Kg). A contorção abdominal é considerada quando há contração dos músculos abdominais, seguida de alongamento do corpo e estiramento das patas traseiras as quais foram observadas durante 30 min., logo após a administração do ácido acético.

Com a média aritmética do número de contorções de cada grupo tratado com as amostras e os controles foram determinados os percentuais de inibição (%). Com a amostra que apresentou a melhor atividade foi repetido o ensaio de modo a obter-se as curvas de dose e tempo.

3.14 Teste de letalidade

A letalidade foi determinada para o extrato bruto e frações do caule e folhas frente a *Artemia salina* Leach, conforme McLaughlin, Chang e Smith, (1991). Os ovos de artemia salina são colocados em um aquário adaptado contendo solução de sal marinho (35 g/l) com temperatura controlada, em torno de 25 °C, e aeração constante. Após um período de aproximadamente 48 horas, há a eclosão dos ovos dando origem a náuplios.

As amostras solubilizadas em água e/ou em dimetilsulfóxido (DMSO), são transferidas para tubos de ensaio contendo 10 náuplios cada. Como controle positivo foi utilizado o dicromato de potássio e como controle negativo foi utilizada uma solução de sal marinho, preparados nas mesmas concentrações das amostras (1, 10, 100 e 1000 µg/ml). Após 24 h. faz-se a leitura do número de sobreviventes e através do método de Finney (1971) determina-se a concentração necessária para matar 50% dos náuplios (CL₅₀).

3.15 Análise estatística

Os dados obtidos para a atividade antioxidante e compostos fenólicos correspondem à média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média.

Os dados obtidos para o método de contorções abdominais induzidas por ácido acético foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Student-Newman-Keuls quando apropriado. Valores de P menores que 0,05 ($p<0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos brutos e suas frações

Os rendimentos obtidos a partir de caule e folhas de *Mirabilis jalapa* podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento obtido em porcentagem para os extratos brutos e frações do caule e folhas de *Mirabilis jalapa*

CAULE					FOLHAS				
EB	Hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	ButOH	EB	Hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	ButOH
22,45	12,11	0,92	1,29	8,97	14,25	3,26	0,83	0,53	4,95

A fração hexânica foi a de maior rendimento no caule, é provável que esta fração seja constituída basicamente por substâncias altamente lipofílicas, lipídeos e óleos voláteis (SONAGLIO et al., 2004).

Já nas folhas, a fração butanólica obteve o maior rendimento, é provável que nesta fração se concentrem principalmente substâncias polifenólicas mais polares que na fração acetato de etila (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2004).

4.2 Análise química qualitativa

Os principais grupos constituintes químicos de folhas de *Mirabilis jalapa* L., foram caracterizados por análise química qualitativa (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado da análise química qualitativa dos extratos de folhas de *Mirabilis jalapa*

Ensaio	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
Ácidos fixos	++	#
Ácidos orgânicos	#	+
Ácidos voláteis	+++	#
Alcalóides	#	+++
Amino-grupos	+++	#
Cumarinas	#	-
Esteróides e/ou triterpenos	#	+++
Fenóis orto e meta livres	#	+++
Fenóis para livres	#	+
Fenóis em geral	#	++
Gomas, mucilagens, taninos	+	#
Heterosídeos Antociânicos	+++	#
Heterosídeos Cardiotônicos	#	-
Heterosídeos Cianogenéticos	-	#
Heterosídeos Flavônicos	#	++
Heterosídeos Saponínicos	-	#
Hidroxiانtraquinonas	#	+++
Taninos condensados	+	#
Taninos hidrolisáveis	++	#
pH	5,0	#
Cor	Marrom avermelhada	Verde escura
Odor	Sui generis	Sui generis

(-) resultados negativos, (+) traços, (++) resultados positivos, (+++) resultados fortemente positivos, (#) não realizado.

Com a finalidade de caracterizar os principais grupos constituintes da espécie em estudo, realizou-se uma abordagem química. No extrato etanólico caracterizou-se a presença de alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, fenóis orto e meta livres. No extrato aquoso ficou caracterizado a presença de ácidos voláteis, amino-grupos e heterosídeos antociânicos.

4.3 Atividade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto e das frações do caule e folhas foi avaliada frente aos microrganismos (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* ao extrato bruto e frações do caule de *Mirabilis jalapa*, valores expressos em mg/ml.

Microrganismos	EB		Fr. AcOEt		Fr. ButOH		Fr. CH ₂ Cl ₂		Fr. Hex.	
	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)
<i>S. aureus</i>	> 5	–	> 5	–	5	5	2,5	5	> 5	–
<i>E. coli</i>	> 5	–	5	5	> 5	–	5	5	> 5	–
<i>P. aeruginosa</i>	> 5	–	5	> 5	> 5	–	> 5	–	> 5	–
<i>K. pneumoniae</i>	> 5	–	5	5	> 5	–	> 5	–	> 5	–

Tabela 5 – Perfil de suscetibilidade de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* ao extrato bruto e frações das folhas de *Mirabilis jalapa*, valores expressos em mg/ml.

Microrganismos	EB		Fr. AcOEt		Fr. ButOH		Fr. CH ₂ Cl ₂		Fr. Hex.	
	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)	(CIM)	(CBM)
<i>S. aureus</i>	> 5	–	2,5	> 5	5	5	5	5	> 5	–
<i>E. coli</i>	> 5	–	5	5	> 5	–	5	> 5	> 5	–
<i>P. aeruginosa</i>	> 5	–	5	> 5	> 5	–	5	> 5	> 5	–
<i>K. pneumoniae</i>	> 5	–	> 5	–	> 5	–	5	5	> 5	–

De acordo com a classificação de Sartoratto e colaboradores (2004), os extratos de caules e folhas de *Mirabilis jalapa* tiveram uma fraca atividade frente as bactérias, embora tenham mostrado uma diferença para os diversos microrganismos.

A fração diclorometano do caule (Tabela 4) e a acetato de etila das folhas (Tabela 5) foram mais ativas para *S. aureus*, que vem de encontro com os resultados de Kusamba, Byamana e Mbuyi (1991).

Os extratos e frações tiveram uma fraca atividade contra *K. pneumoniae*. Já Nair, Kalariya e Chanda (2004) consideraram os extratos desta planta inativos contra a mesma bactéria.

Tabela 6 – Perfil de suscetibilidade de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* e *P. zopfii* ao extrato bruto e frações do caule de *Mirabilis jalapa*, valores expressos em mg/ml.

Microrganismos	EB		Fr. AcOEt		Fr. ButOH		Fr. CH ₂ Cl ₂		Fr. Hex.	
	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)
<i>C. albicans</i>	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–
<i>C. glabrata</i>	> 2,5	–	0,25	1,25	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–
<i>S. cerevisiae</i>	> 2,5	–	0,156	> 2,5	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–
<i>P. zopfii</i>	> 2,5	–	1,25	–	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–

Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade de *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* e *P. zopfii* ao extrato bruto e frações das folhas de *Mirabilis jalapa*, valores expressos em mg/ml.

Microrganismos	EB		Fr. AcOEt		Fr. ButOH		Fr. CH ₂ Cl ₂		Fr. Hex.	
	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)
<i>C. albicans</i>	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–	1,25	2,5	> 2,5	–
<i>C. glabrata</i>	> 2,5	–	2,5	> 2,5	> 2,5	–	1,25	> 2,5	> 2,5	–
<i>S. cerevisiae</i>	> 2,5	–	0,3126	> 2,5	> 2,5	–	2,5	> 2,5	2,5	> 2,5
<i>P. zopfii</i>	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–	> 2,5	–

Ainda de acordo com a classificação de Sartoratto et al. (2004), o extrato bruto, as frações butanólica e hexânica do caule e folhas e a diclorometano do caule apresentaram fraca atividade contra os fungos testados (Tabelas 6 e 7). As frações acetato de etila do caule e das folhas tiveram uma alta atividade frente a *S. cerevisiae*.

A fração diclorometano das folhas apresentou-se moderadamente ativa frente *C. albicans* e *C. glabrata* e a acetato de etila do caule frente a *P. zopfii*.

Já Dimayuga, Virgen e Ochoa (1998), pelo método de difusão em ágar, constataram que os extratos etanólicos foram inativos frente a *C. albicans*, enquanto que neste experimento encontramos uma fraca atividade para o extrato bruto.

As frações acetato de etila e diclorometano demonstraram maior atividade frente as bactérias e fungos em relação as frações menos polares provavelmente por terem maior concentração de compostos com potencial antimicrobiano do que as demais frações. Conforme a análise química qualitativa, os extratos de *Mirabilis jalapa* apresentaram alcalóides, flavonóides, taninos e triterpenos e conforme Simões e colaboradores (2004) esses compostos possuem ação antimicrobiana.

4.4 Teor de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com as leituras das absorbâncias do ácido pirogálico nas diferentes concentrações (Tabelas 8) e das amostras (Tabela 9).

Tabela 8 – Leituras das absorbâncias para o ácido pirogálico.

Ácido pirogálico (g/ml)	Média das leituras	Desvio Padrão (±)	Coefficiente de Variação %
0,005	0,826	0,0022	2,66
0,010	0,2211	0,0177	8
0,015	0,4622	0,0125	2,7
0,025	0,7408	0,0697	9,4
0,030	0,9498	0,0014	0,14

O teor de compostos fenólicos é determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração com as diferentes concentrações de ácido pirogálico (Figura 9) e expresso como mg de equivalentes de ácido pirogálico por grama de droga (Tabelas 9 e 10).

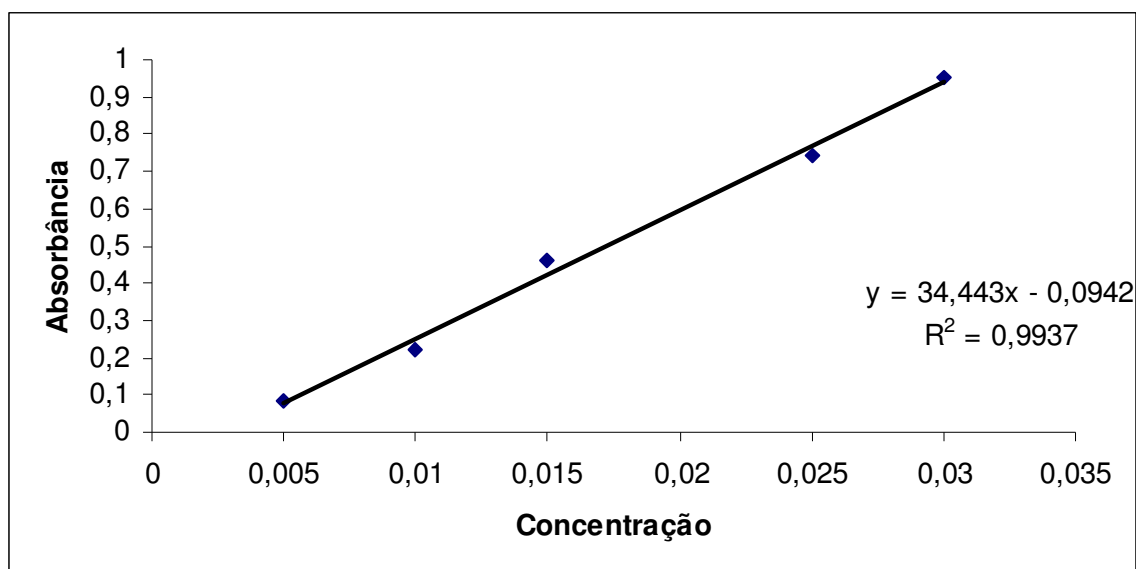


Figura 9 – Curva padrão do ácido pirogálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

Tabela 9 – Teor de fenóis totais para as frações do caule de *Mirabilis jalapa*.

Amostras	Média (Abs)	Desvio Padrão (±)	Coefficiente de Variação %	Teor de polifenóis (mg/g de droga)
Fr. Hex	0,36	0,009	2,5	0,41
Fr. AcOEt	3,17	0,029	4,57	2,41
Fr. ButOH	0,703	0,011	1,56	1,08
Total de compostos fenólicos em <i>Mirabilis jalapa</i>				3,9

Tabela 10 – Teor de fenóis totais para as frações das folhas de *Mirabilis jalapa*.

Amostras	Média (Abs)	Desvio Padrão (±)	Coefficiente de Variação %	Teor de polifenóis (mg/g de droga)
Fr. Hex	0,249	0,002	0,8	1,79
Fr. AcOEt	2,56	0,028	5,45	7,45
Fr. ButOH	0,915	0,063	6,9	3,94
Total de compostos fenólicos em <i>Mirabilis jalapa</i>				13,18

A avaliação de compostos fenólicos mostrou uma quantidade considerável deste tipo de substância, com valores de 3,9 mg/g de droga para o caule e 13,18 mg/g de droga para as folhas.

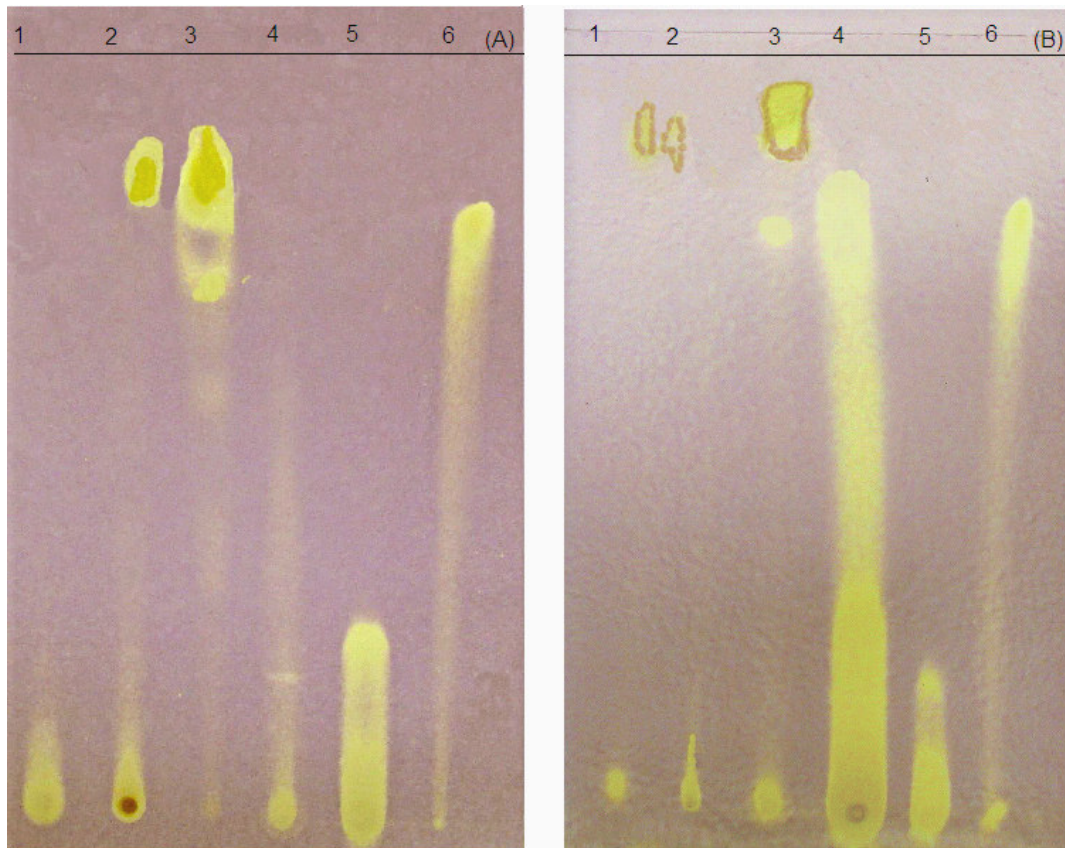
O teor de compostos fenólicos foi testado para os extratos metanólicos e frações aquosa, acetato de etila e butanólica de flores e folhas de *Erica arborea*, sendo que a fração acetato de etila demonstrou a mais alta atividade com um teor de 315,52 µg/mg (MEHMET et al., 2007).

As frações acetato de etila do caule e folhas apresentaram maior teor de fenóis, isso pode ser explicado pelo princípio da seletividade, onde as substâncias polares como os compostos polifenólicos possuem afinidade pelos solventes de mesma polaridade, concentrando-se mais nestas frações (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2004).

4.5 Atividade antioxidante

4.5.1 Atividade antioxidante por CCD

A análise das cromatoplacas sugere a presença de substâncias com atividade antioxidante que são caracterizadas por manchas amareladas resultantes da redução do radical DPPH (Figura 10).



1:EB; 2: Hex; 3: CH₂Cl₂; 4: AcOEt; 5: ButOH; 6: Quercetina.

Figura 10 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH de caule (A) e folhas (B) de *Mirabilis jalapa* em cromatoplasas. Fase móvel: clorofórmio: metanol (8,5: 3,5).

As cromatoplasas desenvolveram a coloração amarelada característica para presença de substâncias com a propriedade de seqüestrar o radical livre (DPPH). Com metodologia do DPPH em cromatoplasas, Kunz (2006), demonstrou atividade antioxidante para os extratos de *Glechon spathulata*, assim como Choi e colaboradores (2002) que avaliaram diferentes plantas. Os resultados apresentados por esses autores foi o desenvolvimento de manchas amareladas como preconizado pelo método sendo semelhantes aos nossos.

4.5.2 Atividade antioxidante por espectrofotometria

A atividade antioxidante avaliada por espectrofotometria UV/visível é expressa em percentual de inibição, o qual é calculado com a leitura das absorbâncias das amostras. O desvio padrão percentual e o coeficiente de variação indicam a uniformidade dos dados (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e frações do caule de *Mirabilis jalapa*.

Concentrações (µg/ml)	Média (Abs)	Desvio Padrão (±)	Coeficiente de Variação (CV%)	% Inibição (PI)
Ácido Ascórbico.				
200	0,057	0,0005	0,88	96,58
100	0,057	0,0006	1,01	96,45
50	0,061	0,0015	2,5	95,11
25	0,069	0,0050	7,29	94,38
12,5	0,12	0,0085	7,09	83,51
6,25	0,18	0,004	2,22	62,14
3,125	0,278	0,0195	7	37,48
1,5625	0,347	0,0336	9,68	14,52
Extrato Bruto				
200	0,139	0,005	3,59	92,19
100	0,415	0,006	1,44	53,78
50	0,646	0,006	0,93	23,18
25	0,749	0,0025	0,34	10
12,5	0,807	0,0096	1,19	2,56
6,25	0,815	0,0136	1,67	1,41
3,125	0,82	0,0158	1,93	0,128
1,5625	0,826	0,0036	0,44	0
Fração Hexânica				
200	0,28	0,0111	3,98	90,91
100	0,363	0,003	0,826	72,47
50	0,592	0,0090	1,52	36,23
25	0,693	0,0053	0,76	18,82
12,5	0,747	0,0276	3,69	11,91

6,25	0,805	0,0181	2,54	3,58
3,125	0,81	0,005	1,64	2,43
1,5625	0,82	0,02	2,43	0,89
Fração Acetato de Etila				
200	0,137	0,132	0,142	91,29
100	0,195	0,185	0,19	82,59
50	0,221	0,235	0,24	77,21
25	0,520	0,533	0,491	40,07
12,5	0,695	0,72	0,713	17,41
6,25	0,722	0,751	0,746	11,39
3,125	0,76	0,755	0,762	8,83
1,5625	0,807	0,007211	0,89	2,43
Fração Butanólica				
200	0,119	0,0017	1,45	91,8
100	0,131	0,003	2,29	90,14
50	0,265	0,003	1,13	72,34
25	0,543	0,0036	0,66	36,75
12,5	0,693	0,0036	0,52	16,77
6,25	0,759	0,004	0,512	8,58
3,125	0,778	0,0135	1,74	5,5
1,5625	0,799	0,0091	1,15	1,54

Tabela 12 – Atividade antioxidante do ácido ascórbico, extrato bruto e frações das folhas de *Mirabilis jalapa*.

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Média (Abs)	Desvio Padrão (\pm)	Coefficiente de Variação (CV%)	% Inibição (PI)
Ácido Ascórbico				
200	0,057	0,0005	0,88	96,58
100	0,057	0,0005	1,01	96,45
50	0,061	0,0015	2,5	95,11
25	0,069	0,005	7,29	94,38
12,5	0,12	0,0085	7,09	83,51
6,25	0,18	0,004	2,22	62,14
3,125	0,278	0,0195	7	37,48
1,5625	0,347	0,0336	9,68	14,52
Extrato Bruto				

200	0,225	0,003	1,33	95,36
100	0,281	0,0036	1,28	66,34
50	0,391	0,0072	1,84	41,59
25	0,475	0,007	1,47	19,92
12,5	0,537	0,0092	1,71	7,35
6,25	0,539	0,0036	0,67	6,4
3,125	0,545	0,0118	2,16	5,2
1,5625	0,55	0,0247	4,48	2,9

Fração Hexânica

200	0,383	0,0036	0,94	91,29
100	0,277	0,002	0,72	87,62
50	0,335	0,0134	4,02	57,45
25	0,425	0,0087	2,04	32,49
12,5	0,577	0,0180	3,12	11,8
6,25	0,584	0,0065	1,12	9,48
3,125	0,599	0,01	1,7	6,38
1,5625	0,609	0,0036	0,59	2,51

Fração Acetato de Etila

200	0,12	0,001	0,83	92,26
100	0,112	0,0025	2,25	90,52
50	0,196	0,0061	3,1	73,69
25	0,287	0,0026	0,92	55,51
12,5	0,377	0,0037	1	37,71
6,25	0,469	0,0162	3,45	19,34
3,125	0,516	0,0060	1,17	9,48
1,5625	0,523	0,0177	3,37	6,96

Fração Butanólica

200	0,102	0,0026	2,59	93,04
100	0,115	0,003	2,61	90,33
50	0,119	0,0047	3,97	87,81
25	0,34	0,007	2,06	43,91
12,5	0,499	0,0147	2,95	12,76
6,25	0,53	0,005	0,94	6,77
3,125	0,55	0,0247	4,48	2,32
1,5625	0,56	0,01	1,78	0,39

A representação gráfica da concentração das amostras em relação à percentagem de inibição permite o cálculo da CI_{50} (Figuras 11 e 12).

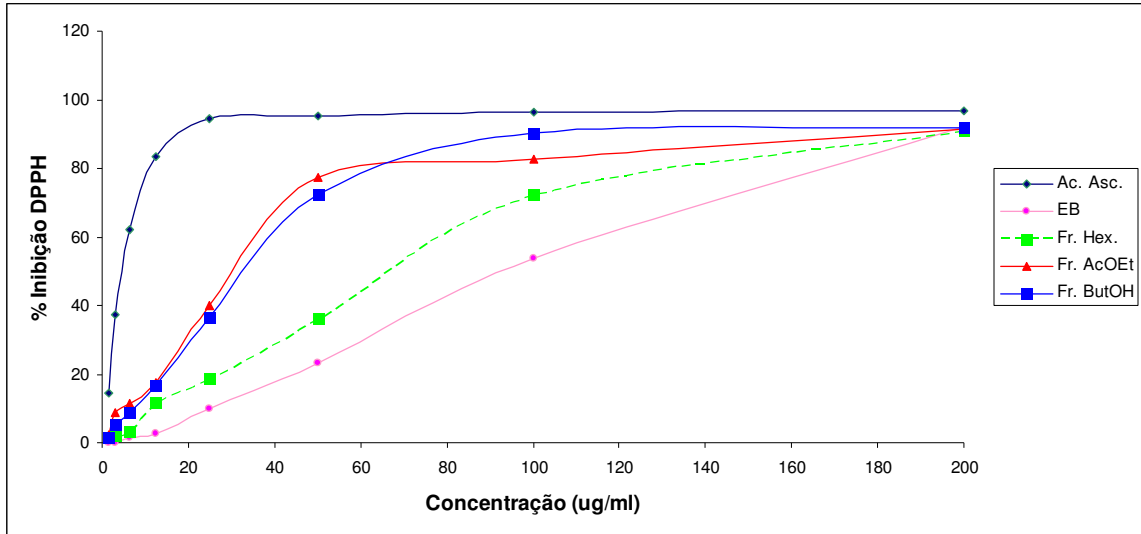


Figura 11 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e dos extratos do caule e frações de *Mirabilis jalapa* nas diferentes concentrações de DPPH.

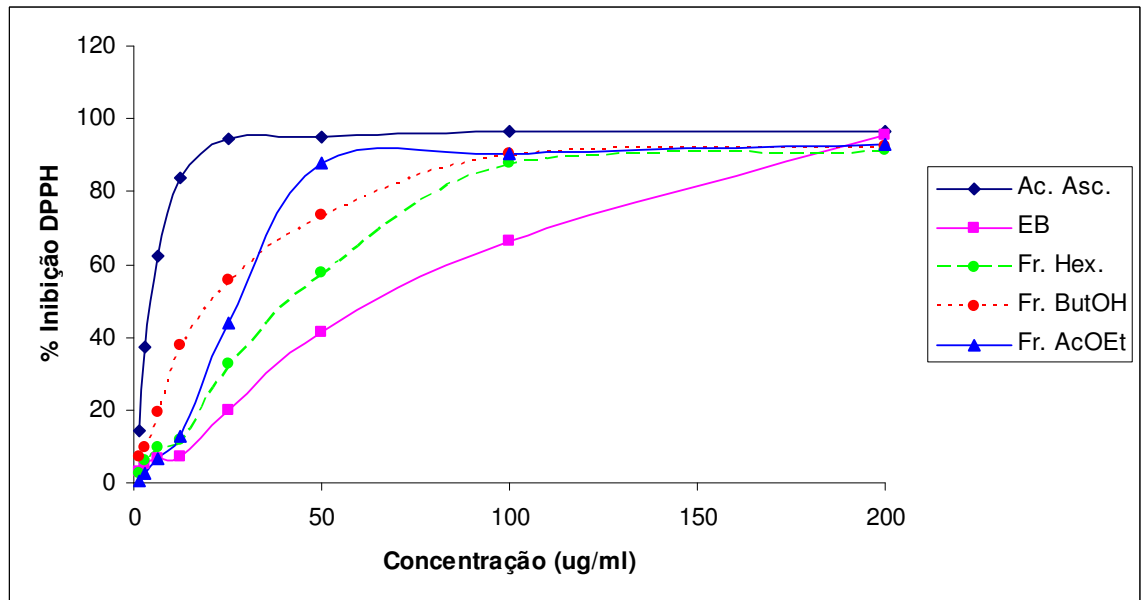


Figura 12 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e dos extratos das folhas e frações de *Mirabilis jalapa* nas diferentes concentrações de DPPH.

A partir das curvas de percentagens de inibição do extrato bruto e frações do caule e folhas foi calculada a CI_{50} (Tabela 13).

Tabela 13 – Concentração inibitória de 50% para o ácido ascórbico, extrato bruto e frações do caule e folhas de *Mirabilis jalapa*.

Amostras	Cl ₅₀ *	
	Caule	Folhas
Ác. Asc.	4,15	4,15
EB	147,5	93,18
Fr. Hex.	71,98	39,7
Fr. AcOEt	27,59	20,40
Fr. ButOH	30,50	25,41

* µg/ml

Na maior concentração (200 µg/ml), as frações acetato de etila, butanólica e extrato bruto do caule apresentaram o percentual de inibição do DPPH de 91,29, 91,8 e 92,9 %, já o ácido ascórbico inibiu o radical livre em 96,58%. Os extratos apresentaram uma atividade semelhante ao ácido ascórbico na maior concentração.

As frações acetato de etila, butanólica e extrato bruto das folhas na concentração de 200 µg/ml apresentaram uma atividade semelhante ao do ácido ascórbico, que inibiu o radical livre DPPH em 96,58%, enquanto que as frações inibiram em 92,26; 93,04 e 95,36% respectivamente.

Na avaliação da atividade antioxidante, determina-se a Cl₅₀ que é a concentração que inibe em 50% a capacidade oxidante de uma substância. Quanto menor a Cl₅₀ mais eficaz é a sua atividade antioxidante. Pela análise dos resultados a fração acetato de etila das folhas foi a mais eficaz (Tabela 13).

Estas frações exibiram a maior atividade antioxidante, coincidindo com os resultados apresentados por Kunz (2007) em seu estudo com *Glechon spathulata* Benth.

Outros estudos têm mostrado uma maior potência para a fração acetato de etila em testes de atividade antioxidante, como o de Andrade e colaboradores (2007) onde foi avaliado o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila das flores de *Acacia podalyriifolia*, sendo a fração acetato de etila a mais ativa com Cl₅₀ de 3,22 µg/ml.

Segundo Zuanazzi e Montanha (2004) a atividade antioxidante pode ser atribuída

à presença de compostos fenólicos nas amostras como os flavonóides. Estes são mais solúveis em solventes de maior polaridade, concentrando-se nas frações mais polares como a acetato e butanólica.

4.6 Determinação do teor de quercetina por CLAE

No extrato de *Mirabilis jalapa* foi caracterizado flavonóides através da análise química qualitativa, estes são relacionados com a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos. O teor de flavonóides nos extratos do caule e folhas de *M. jalapa* foi calculado como quercetina (USP, 1999). Para o cálculo da concentração das amostras foi realizada a curva de calibração da quercetina (Figura 13).

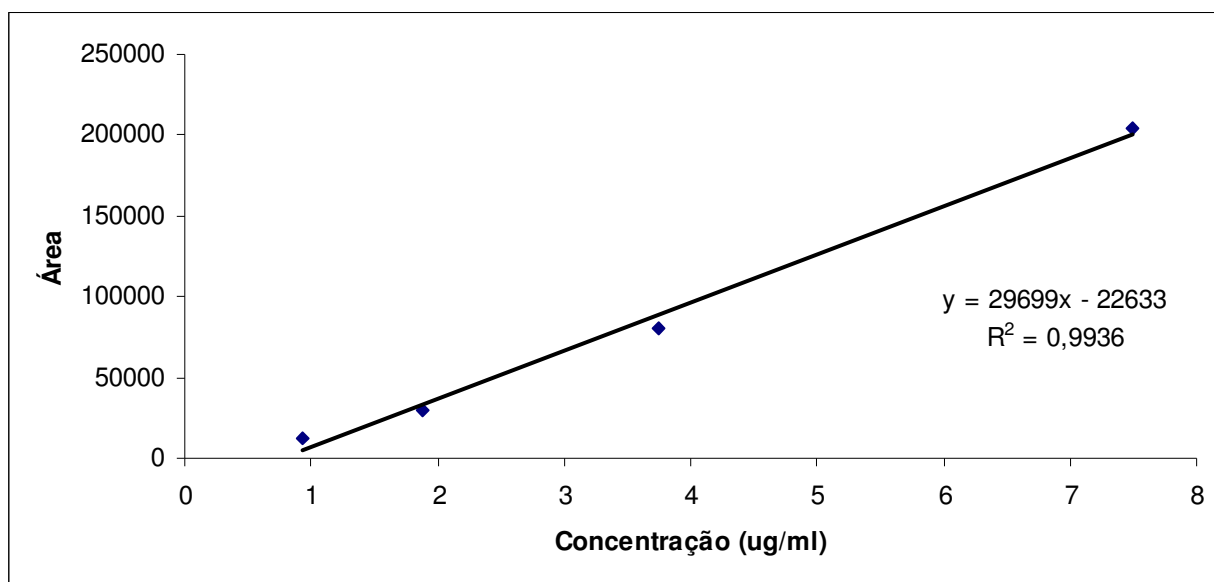


Figura 13 – Curva padrão da quercetina

Os extratos foram analisados por CLAE pra verificar a presença de quercetina (Figuras 14 e 15).

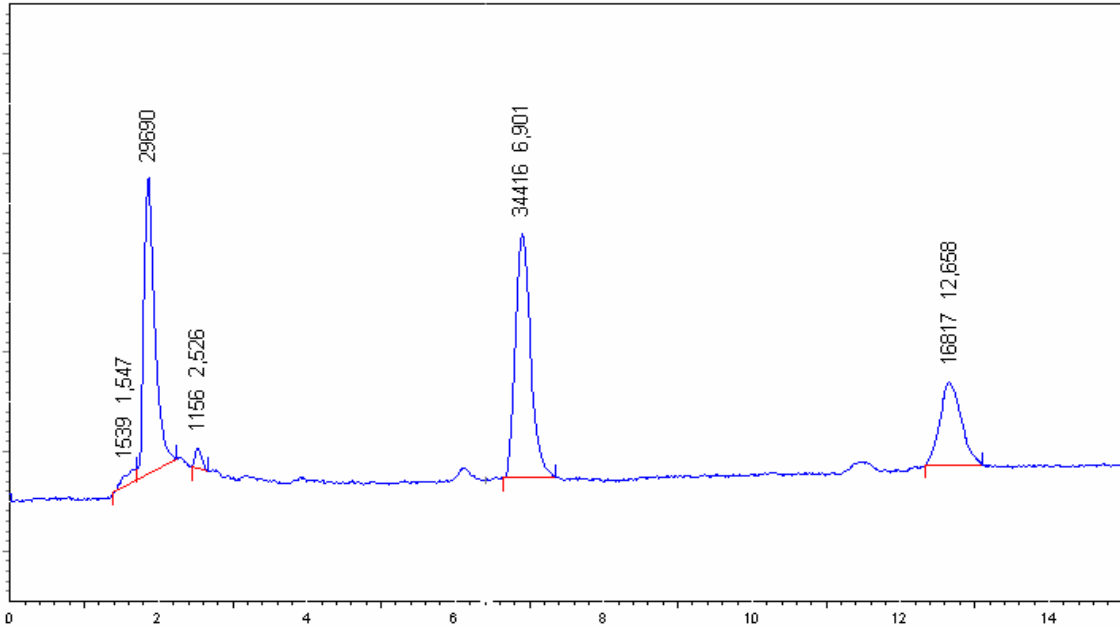


Figura 14 - Cromatograma obtido do extrato do caule. Fase móvel: metanol:
ácido fosfórico 0,1% (45:55).

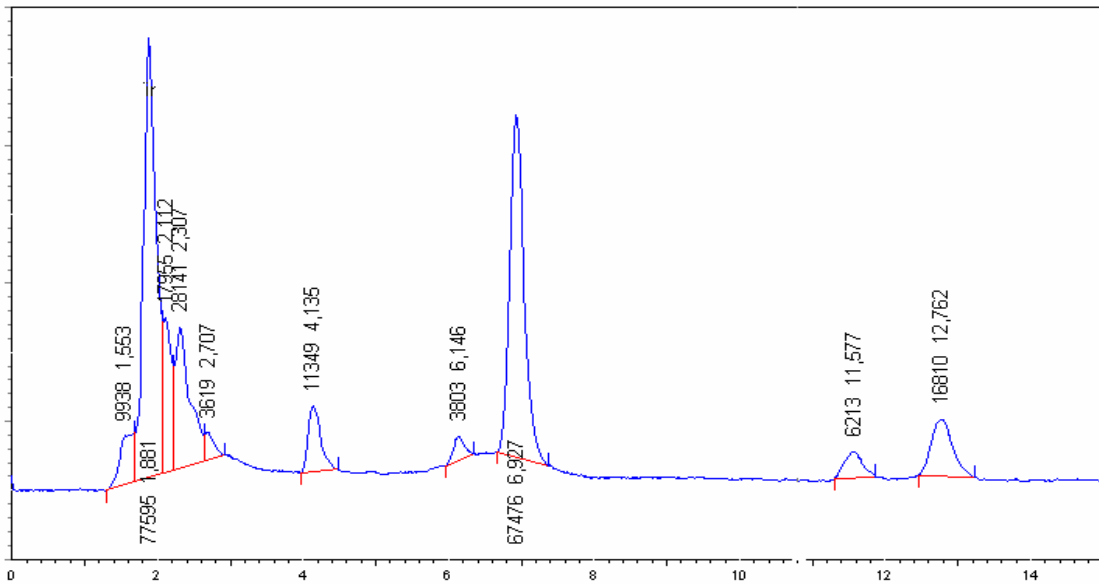


Figura 15 - Cromatograma obtido do extrato das folhas. Fase móvel: metanol:
ácido fosfórico 0,1% (45:55).

A quercetina (Figuras 14 e 15) apresentou-se com tempo de detecção aproximado (6,901 e 6,927 min) em relação ao descrito na USP (6,59 min.).

Para o caule a concentração de quercetina foi de 1,466 µg/ml (0,098%) enquanto que para as folhas foi de 2,852 µg/ml (0,19%).

Através de CLAE, a quercetina foi quantificada no extrato das folhas de *Casearia sylvestris*, encontrando-se um teor de 0,75%, sendo este valor mais elevado quando comparado com o encontrado para os extratos de *M.jalapa*. (WERLE, 2004).

4.7 Atividade analgésica

O efeito antinociceptivo de *Mirabilis jalapa* foi avaliado através do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. O percentual de inibição foi calculado de acordo com o número de contorções resultantes após a injeção de ácido acético nos animais tratados previamente com as amostras, veículo e controle (Tabela 14).

Tabela 14 – Inibição (I%) para o extrato bruto e frações do caule e folhas de *Mirabilis jalapa*.

Caule				Controle	Folhas			
EB	AcOEt	Hex	ButOH	Morfina	EB	AcOEt	Hex	ButOH
42.7±17.2	61.5±7.1	26.2±10.31	57.7±15.9	85.8±2.7	59.6±9.9	82.8±8.2	66.3±6.2	58.3 ± 8.8

No estudo de Hiruma-Lima et al. (2000) com *Boerhaavia diffusa* L. da família Nyctaginaceae, a atividade analgésica observada foi em torno de 50%, já no referido estudo esta atividade foi mais potente para a fração acetato de etila das folhas.

O número de contorções abdominais de acordo com as doses nos indica a atividade antinociceptiva para os extratos das folhas e caule (Figura 16 A e B).

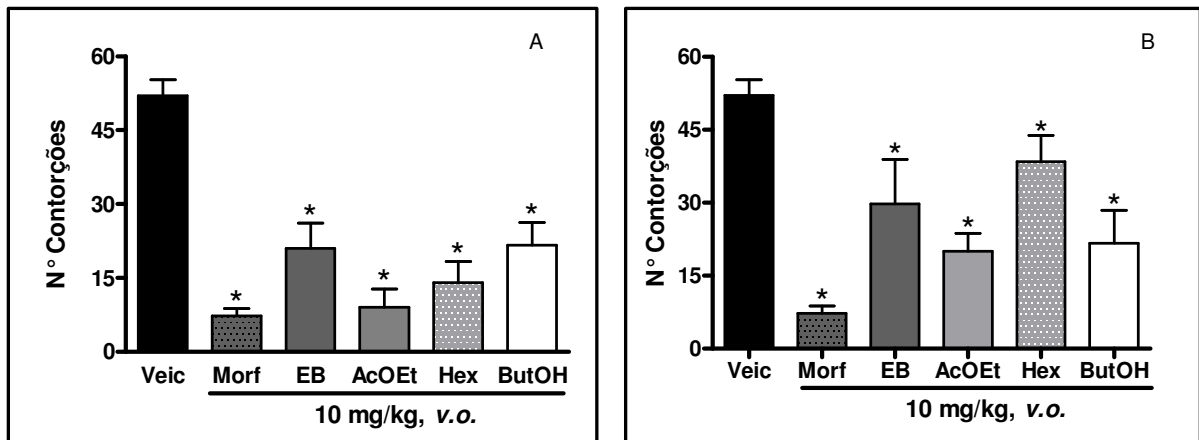


Figura 16 – Atividade analgésica dos extratos de folhas (A), caule (B) e da morfina sobre o número de contorções abdominais. Sendo $*P < 0,05$.

O extrato do caule e folhas, quando administrados por via oral na dose de 10 mg/Kg, foram capazes de reduzir o número de contorções abdominais, sendo que a fração acetato de etila foi a que apresentou melhor atividade analgésica (Figura 16 A e B).

A fim de verificar a duração do efeito antinociceptivo da fração acetato de etila no modelo de contorções abdominais e para determinar a dose ideal de tratamento para a realização de experimentos subseqüentes, grupos distintos de camundongos receberam a fração acetato de etila na dose de 10 mg/Kg (Figuras 17 e 18).

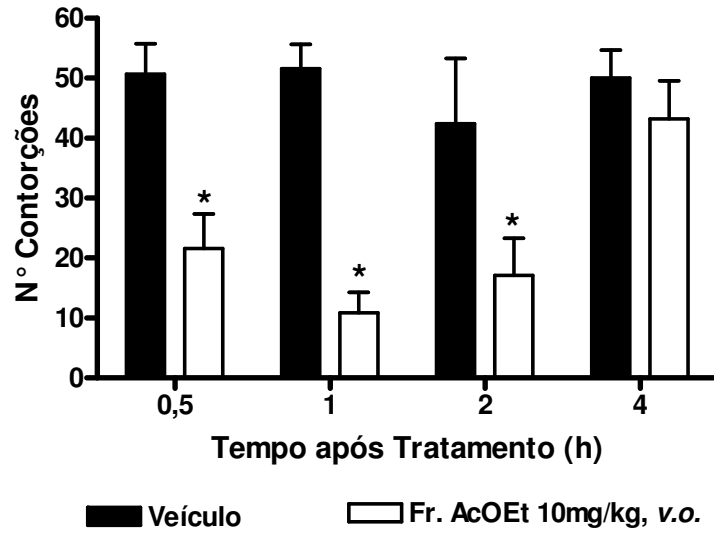


Figura 17 – Decurso temporal da atividade analgésica da fração acetato de etila no teste de contorções abdominais. Sendo *P < 0,05.

Os resultados apresentados na Figura 17 demonstraram que a resposta antinociceptiva se inicia 30 min. após a administração da fração acetato de etila e persiste por um período de até 2 h., sendo que o melhor efeito observado foi após 1 h. de tratamento.

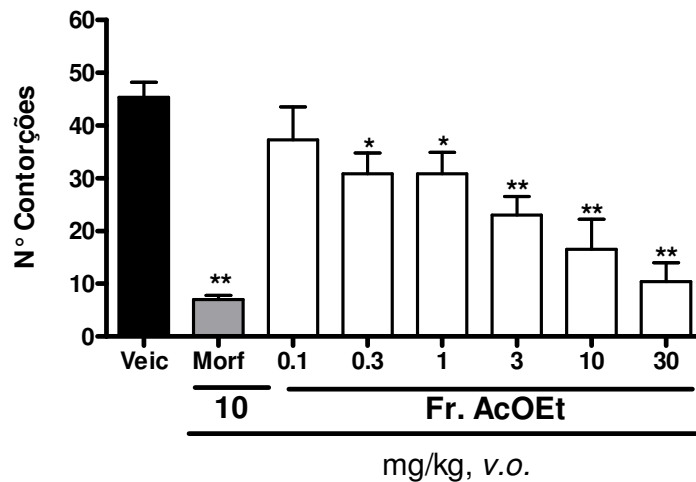


Figura 18 – Efeito das doses da fração acetato de etila e comparação entre os efeitos dos extratos e da morfina sobre o número de contorções abdominais. Sendo *P < 0,05, **P < 0,01.

As diferentes doses da fração acetato de etila, administradas por via oral, reduziram o número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. A fração acetato de etila nas doses de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mg/Kg apresentaram ação analgésica, enquanto que a dose de 0,1 mg/kg não se mostrou significativa quando comparada ao veículo (Figura 18). O valor de DE₅₀ para a fração acetato de etila foi de 1.1 (0.6 – 2.1) mg/kg.

Apesar da fração acetato de etila apresentar efeito analgésico significativo, os compostos responsáveis por essa ação deverão ser identificados através de isolamento e elucidação estrutural.

4.8 Teste de letalidade

Extratos vegetais são amplamente utilizados pela população, portanto, o estudo da letalidade destes extratos sobre bioindicadores como *Artemia salina* são necessários.

Artemia salina apresentou-se como excelente indicador da toxicidade, além de constituir um teste simples e de baixo custo. A CL₅₀ foi calculada pelo método de Finney (1971). Os resultados referentes ao teste de letalidade dos extratos brutos e frações do caule e folhas estão representados na tabela 15.

Tabela 15 – Valores de CL₅₀ calculados para o extrato bruto e frações do caule e folhas de *Mirabilis jalapa*, expressos em µg/ml.

Amostras	Caule	Folhas
EB	281,98	66,25
Fr. Hex.	-	1,27
Fr. CH ₂ Cl ₂	151,41	28,83
Fr. AcOEt	724,2	367,24
Fr. ButOH	-	-

- inativas

Considerando a classificação de Dolabela (1997), pode-se afirmar que o extrato bruto, as frações hexânica e diclorometano das folhas foram altamente tóxicos, a fração diclorometano do caule, moderadamente tóxica, enquanto que o extrato bruto do caule e as frações acetato de etila do caule e das folhas não apresentaram toxicidade.

As frações hexânica e butanólica do caule e a fração butanólica das folhas são consideradas inativas já que todos os náuplios sobreviveram a uma concentração maior que 1000 µg/ml (MEYER et al., 1982).

Com o controle positivo, dicromato de potássio, todos os náuplios morreram, já com o controle negativo, solução de sal marinho, todos os náuplios sobreviveram.

A fração que apresentou a maior atividade tóxica foi a hexânica das folhas, o que coincide com o estudo de Cechinel Filho et al. (2003), em que a fração hexânica de *Cynara scolymus* L apresentou a maior atividade.

5 CONCLUSÕES

Através dos estudos realizados com a espécie *Mirabilis jalapa* L.. pôde-se concluir:

- O rendimento foi maior no caule para a fração hexânica e para as folhas na fração butanólica;
- Nos extratos de *Mirabilis jalapa* ficou caracterizada a presença de ácidos voláteis, alcalóides, amino-grupos, heterosídeos antociânicos, esteróides e/ou triterpenos, fenóis e hidroxiantraquinonas;
- *Mirabilis jalapa* apresentou atividade antimicrobiana, sendo melhor para a fração diclorometano e a acetato de etila para caule e folhas;
- *Mirabilis jalapa* apresentou atividade antioxidante tanto pelo método em cromatoplasmas como pelo método espectrofotométrico. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antioxidante semelhante ao do ácido ascórbico;
- A presença de quercetina foi determinada nos extratos de *Mirabilis jalapa*;
- Os extratos de *Mirabilis jalapa* apresentaram atividade analgésica, sendo que a fração acetato de etila foi a mais ativa;
- Os extratos do caule e folhas de *Mirabilis jalapa* apresentaram toxicidade para as frações diclorometano e hexânica, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. S. et al. An 8-hydroxyoctadeca-cis-11,14-dienoic acid from *Mirabilis jalapa* seed oil. **Phytochemistry**, v. 23, n° 10, p. 2247-2249, 1984.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993, p. 12-15.

ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n° 2, p. 231-235, 2007.

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.

ATES, D. A.; ERDOGRUL, O. T. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. **Turk Journal Biology**, v. 27, p. 157-162, 2003.

BALBACH, A. **As plantas curam**. São Paulo: Missionária A Verdade Presente, 1960, 431p.

BERNARD, J. F.; BESTER, H.; BESSON, J. M. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hipothalamyc pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, v. 107, p. 243-255, 1996.

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

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P.V. **Memento terapêutico de fitoterapia**. Rio de Janeiro, Flora Medicinal, v.1, 98 p., 1999.

BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, p. 379-387, 2003.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. Academic Press, San Diego, 1994, 658 p.

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

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

CAMMUE, B.P. et al. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 2228-2233, 1992.

CARVALHO, A. A. T. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, nº 4, p. 255, 2002.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 520-535.

CECHINEL FILHO, V. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quimica Nova**, v. 26, nº 3, p. 331-334, 2003.

CHUN, S.S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 2, nº 40, p. 809, 2005.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, nº 11, p. 3583-3589, 2004.

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

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

COOK N.O. & SAMMAN S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources-review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

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.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2ª ed., Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, v. III, 1982, 1032 p.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, nº 4, p. 584-582, 1999.

CUNHA, W. R. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, nº 2, p. 47-49, 2003.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **Food Science and Technology**, v. 39, nº 3, p. 308-315, 2006.

DIMAYUGA, R. E.; VIRGEN, M.; OCHOA, N. Antimicrobial activity of medicinal plants of Baja Califórnia Sur/México. **Pharmaceutical Biology**, v.36, nº 1, p. 33-43, 1998.

DOLABELA, M.F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de Fisiologia Aplicado à Ciência da Saúde**. 7ª ed. São Paulo: Robe Editorial, 1999, 1338 p.

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

ERDOGRUL, O. T. Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 269-273, 2002.

FALKENBERG, M. B., SANTOS, R. I., SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 229-245.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. **Ensaio Microbiológico de Antibióticos**. São Paulo: Ateneu, 1988, v.5.2.1.

FERREIRA, J. et al. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). **Life Sciences**, v. 66, nº. 9, p. 791-802, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve**. University Press, Cambridge, 1971.

GAO, Z. et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochimica et Biophysica**. v. 1472, p. 643-650, 1999.

GOODMAN, L. (Org.) et al. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic**. 8^a ed., New York: Pergamon Press, 1990, 1018 p.
anti-inflamatórios

GOUVÊA, C.M.C.P. **Fitoterápicos**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas, Ribeirão Preto: Tecmed, 2004, p.101-124.

GRAÇA, J. B.; AIRES, L. F. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Lisboa: Seleções do Reader's Digest, 1994, 463p.

GRYGLEWSKI, J. R. et al. On mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 317-322, 1987.

GUYTON & HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S. A., 1997, p. 551-552.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL G. A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of natural products**. V. 50 (1), p. 19-22, 1987.

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.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n^o 7, p. 1027-1031, 2002.

HOMMAM et al. Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saibokuto, a herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes. **Planta Medica**, v. 66, p. 88-91, 2000.

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.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia**: básica e clinica. 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1998, 854p.

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.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, nº 1, p. 131-142, 2003.

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

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p. 412, 1959.

KUNZ, V. T. *Glechon spathulata* Benth.: estudo fitoquímico e biológico, 2007, 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

LEAL, A. A.; TERADA, Y.; MACHADO, M.F.P.S. Floral biology of a population of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) from Southern Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 23, p.587-591, 2001.

LIMA, A. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n° 4, p. 531-536, 2006.

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

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

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, V. C.; **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 2005, p. 227

LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACHADO, T. B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n° 3, p. 279-284, 2003.

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

McLAUGHLIN, J. L., CHANG, C.J., SMITH, D. L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. **Studies in Natural Product Chemistry**, v.9. Pergamon Press, London, p. 383-389, 1991.

MEHMET, A. Y. Antioxidant activity of *Erica arborea*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 571–573, 2007.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as Test Organism for Biassay. **Science**, v. 123, n° 3194, p. 464, 1956.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n° 4, p. 316-320, 2005.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 48, n° 2, p. 91, 1971.

MOREIRA, E. A. T., Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. Complanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n° 1, p. 13-39, 1979.

NAIR, R.; KALARIYA, S.; CHANDA, S. Antibacterial Activity of Some Selected Indian Medicinal Flora. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, p. 41-47, 2005.

NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard document NCCLS document M – 27A2. Pennsylvania: NCCLS 2002.

_____ Reference method for broth dilution for bacterias that grow aerobically. Approved standard document NCCLS M – 7A4. Pennsylvania: NCCLS 1997.

PELKA, M. et al. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v. 28, n° 5, p. 341-345, 2000.

PIATTELLI, M.; MINALE, L.; NICOLAUS, R. A. Pigments of centrospermae-V. Betaxantinas from *Mirabilis jalapa* L. **Phytochemistry**, v. 4, p. 817-823, 1965.

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

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3285S-3292S, 2003.

SARTORATTO et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SIDDIQUI, B. S. et al. Constituents of *Mirabilis jalapa*. **Fitoterapia**, v. 61, n° 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.

SILVA, T. M. S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n° 1, p. 35-38, 2007.

SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, 1102 p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n° 1, p. 71, 2002.

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

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed.rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 289-326.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n° 2, p. 351-355, 2007.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n° 4, p. 525-530, 2006.

SUDHEESH, S. et al. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melogena*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 321-330, 1997.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E.; The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de fitoterapia**. 4 ed. Curitiba: Herbarium, 317 p., 1999.

TOP TROPICALS. Flórida, 2003. Disponível em: < http://www.toptropicals.com/cgi-bin/garden_catalog/cat.cgi> Acesso em: 30 abril 2007.

USP 24. **The United States Pharmacopeial Conventions**. Inc. Twinbrook Parkway, Rockville, MD, 1999.

VEIGA, J. V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n^o 3, p. 519-528, 2005.

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

WERLE, A. L. C. **Avaliação Farmacológica do Extrato de *Casearia sylvestris* Swartz**. Santa Maria: Curso de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2004. Dissertação de Mestrado.

WANG, Y. et al. New rotenoids from roots of *Mirabilis jalapa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 85, n^o 8, p. 2342–2348, 2002.

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.

WOOLF, C. J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

YANG, S. W. et al. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture *Mirabilis jalapa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 313-317, 2001.

ZHAO, X. et al. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n^o 3, p. 279-285, 1999.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: Simões, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed.rev. e ampliada. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 578-614.