

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMPORTÂNCIA DA INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE *Mirabilis jalapa* Linn
VALIDAÇÃO DE SUA UTILIZAÇÃO**

LAURIMAR THOMÉ ROCHA

**RECIFE-PE
Agosto, 2006**

Rocha, Laurimar Thomé da

Importância da investigação farmacológica de *Mirabilis jalapa* Linn validação de sua utilização / Laurimar Thomé da Rocha. – Recife: O Autor, 2006.

vi, 115 folhas : il., fig., gráf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2006.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Farmacologia - *Mirabilis jalapa* Linn. 2. *Mirabilis jalapa* Linn – Atividades farmacológicas . 3. *Mirabilis jalapa* Linn - Toxicidade. I. Título.

615.11
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.) ;

UFPE
CCS2007-26

Laurimar Thomé Rocha

**IMPORTÂNCIA DA INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE Mirabilis jalapa Linn
VALIDAÇÃO DE SUA UTILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Bioativos

Orientadora: Profª. Dra. Ivone Antônia de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Dalci José Brondani

RECIFE-PE
Agosto, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM PRODUTOS NATURAIS E BIOATIVOS

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA
E PÓS-GRADUAÇÃO**

Celso Pinto de Melo

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jane Sheila Higinio

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Samuel Daniel de Sousa

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Miracy Muniz de Albuquerque

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Pedro Rolim Neto



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 28 de Agosto de 2006.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de Agosto de 2006 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (**Departamento de Antibióticoss da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: Ivone Antônia de Souza

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**).

Assinatura: Haroudo Sátiro Xavier

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Dalci José Brondani (**Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**)

Assinatura: Dalci José Brondani

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli (**Universidade de São Paulo**).

Assinatura: Maria Lúcia Zaidan Dagli

“O mal dos que estudam as superstições é não acreditarem nelas . Isso os torna tão suspeitos para tratar do assunto como um biologista que não acreditasse em micróbios.”

(Mário Quintana)

AGRADEÇO E DEDICO AOS MEUS PAIS
E AO MEU FILHO, ÀS CONSTANTES
DEMONSTRAÇÕES DE PACIÊNCIA,
COMPREENSÃO, CARINHO E AMOR



AGRADECIMENTOS



Ao **Pai Celestial**, o qual devemos toda graça e benção da oportunidade, chamada **Vida**, e que, se não tivesse me enviado ‘sem bolsa, fardo ou sandálias’, eu não teria aprendido: “**aquele que trabalha merece ser sustentado.**” (S. Matheus, Cap. X, vv. 9-15);

Aos **Pais**, e em especial à minha **mãe**, pelo exercício dos verdadeiros valores do ser, exemplificados na convivência diária e compreensão mútua; e, a Pedro, **meu filho**, pelo entendimento ‘sacrificado’ devido à ausência nas horas diárias. “**Não prometo mais, agora vamos sair pra brincar...!**”

À **Orientadora e Mestra**, na arte do carinho e paciência, Prof^a Ivone, por todo exemplo de compreensão e sacrifícios, além dos conhecimentos sábios da vida que pude aprender e compartilhar ao seu lado;

Ao Prof. Haroudo, **exemplo** de ser humano, por seu reconhecimento, paciência e **dedicação** como ‘**guia**’ nos caminhos da Farmacognosia e da Vida, minha gratidão e respeito;

Ao Prof. Dalci e à Prof^a Ana Cristina, pelo **início de tudo**, agradeço a oportunidade de crescimento profissional; e ao **prestimoso amigo** Diogo, pelas ‘dúvidas’ compartilhadas.

À Prof^a M^a Lúcia, ‘tia Malú’ para os íntimos, meu **eterno respeito** e admiração por sua conduta exemplar e carinhosa ao compartilhar seus ensinamentos e sabedoria. Sem esquecer os **eternos amigos** da ‘Pato/USP’: Kátia, Lú, Ana, Emerson, João, Silvinha e todos que tive oportunidade de conhecer e ‘nomeá-los’ com alegria no coração;

Aos meus amigos e **irmãos** de Farmácia, começando por meus ‘**colaboradores diretos**’, Aldo e Elis, por toda **paciência e ‘luz’** e, a turma de ‘**Fé**’ e jornada de ‘Gnosia’: Janaína, Luciana, Jovita, Késia, Kris, Clécio, Guedes e todos que fizeram parte da construção desse aprendizado. Sem esquecer o **empenho** de Iguacy e Conceição, minha gratidão.

Aos meus **mestres da ‘Rural’**, Prof^a Márcia e Prof. Fernando, meu eterno respeito e carinho, e os amigos Clécio e Verônica, essenciais por seu auxílio em momento oportuno.

Ao meu **irmão** monstro: Adri e, à ‘tia Rose’, que escolhi para serem os **representantes de todos** que contribuíram com seus laços de **amizade, carinho e respeito**, os quais não pude nomear, devido à ‘quantidade’ **infinita**; aos amigos **espirituais**, Rosa e Zaroni, representantes dos que significaram sustentação, rocha e consolo nos momentos difíceis; E, a Zarella e dona Jandira, por seus exemplos de **amor e responsabilidade** à Natureza humana e animal.

À prof^a Ingrid, a qual sem a ajuda **prestimoso e sábia**, não teria conseguido revisar todos os meus textos e trabalhos, além do seu **lindo dom de ensinar**, meu reconhecimento, admiração e respeito_ gratidão eterna.

E a um anjinho chamado Mirian, que foi **amiga e companheira**, ao compartilhar todos os últimos minutos de stress e sacrifícios diários, sem os quais, o caminho teria sido mais árido e sofrido, meu carinho, respeito e gratidão eternos.

E a todos que contribuíram para a realização do presente trabalho e que não foram citados, peço que recebam meu eterno reconhecimento e apreço e que **DEUS nos abençoe** em mais uma jornada.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE GRÁFICOS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Estudos sobre a <i>Mirabilis jalapa</i> Linn.	6
2.1.1. Botânico	6
2.1.2. Fitoquímico	7
2.1.3. Farmacológico	8
2.1.4. Toxicológico	11
2.2. Estudos toxicológicos pré-clínicos de plantas medicinais	11
2.2.1. Toxicidade aguda	12
2.3. Inflamação	13
2.3.1. Agentes Antiinflamatórios	16
2.3.2. Testes Antiinflamatórios	17
2.4. Câncer	18
2.4.1. Carcinoma	20
2.4.2. Sarcoma	21
2.4.3. Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer	21
3. OBJETIVO	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. Artigo I - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ E DA DL₅₀ DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>Mirabilis jalapa</i> Linn. (Nyctaginaceae)	
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. Introdução	27
2. Metodologia	28
2.1. Animais	28
2.2. Material Botânico	29
2.3. Obtenção do extrato	29
2.5. Avaliação da Toxicidade Aguda e Determinação da DL ₅₀	30
2.6. Estudo Histológico	30
2.7. Análise Estatística	31
2.8. Resultados	31
2.9. Determinação da CL ₅₀	31
3.0. Toxicidade Aguda e Determinação da DL ₅₀	32
3.1. Discussão e Conclusão	33

Referências bibliográficas	37
----------------------------	----

5. Artigo II - ESTUDOS PRELIMINARES DA PROPRIEDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae)

RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. Introdução	46
2. Materiais e Métodos	47
2.1. Animais	47
2.2. Material Botânico	48
2.3. Obtenção do extrato	48
2.4. Edema de pata induzido por carragenina	48
2.5. Análise Estatística	49
2.6. Resultados	50
2.7. Discussão	50
Referências bibliográficas	52

6. Artigo III – EFEITOS DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) SOBRE O CRESCIMENTO DE S-180 EM CAMUNDONGOS

RESUMO	57
ABSTRACT	58
1. Introdução	58
2. Metodologia	60
2.1. Animais	60
2.2. Material Botânico	60
2.3. Obtenção do extrato	60
2.4. Transplante dos tumores	60
2.5. Tratamento dos animais	61
2.6. Estudo histológico	61
2.7. Análise estatística	62
2.8. Resultados	62
2.9. Discussão e Conclusão	63
Referências bibliográficas	66

7. Artigo IV - EFEITOS DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) SOBRE O CRESCIMENTO DE CARCINOMA DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS

RESUMO	75
ABSTRACT	76
1. Introdução	76
2. Metodologia	78
2.1. Animais	78
2.2. Material Botânico	79
2.3. Obtenção do extrato	79
2.4. Transplante dos tumores	79
2.5. Tratamento dos animais	80

2.6. Estudo histológico	80
2.7. Análise estatística	81
2.8. Resultados	81
2.9. Discussão e Conclusão	82
Referências bibliográficas	84
8. Referências bibliográficas	92
APÊNDICE	102
PERFIL FITOQUÍMICO DA FOLHA DE <i>Mirabilis jalapa</i> Linn.	
1. Introdução	103
2. Materiais e Métodos	104
2.1. Local de trabalho	104
2.2. Identificação de material botânico	104
2.3. Obtenção de material botânico	105
2.4. Resultados	106
2.5. Discussão e Conclusão	118
Referências bibliográficas	110

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
a.C.	antes de Cristo
AA	Ácido Araquidônico
ANOVA	Análise de Variância
CE	Carcinoma de Ehrlich
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CCDA	Cromatografia de Camada Delgada
CL ₅₀	Concentração Letal Média
cm	Centímetro
COX-2	Ciclooxigenases tipo 2 ou indutivas
d.C.	Depois de Cristo
D1	Dose mínima
D2	Dose máxima
DL ₅₀	Dose Letal Média
DNA	Ácido Desoxirribonuclêico
EH	Resíduo do Extrato Bruto Hexânico
Epm (e.p.m.)	Erro padrão da média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
JAr	Célula coriocarcinoma
L	Linn
LABSINFA	Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos
LIPOX	Lipoxigenases
LT	Leucotrienos
M	<i>Mirabilis</i>
MAP	Mirabilis Antiviral Protein
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NCI	Instituto Nacional do Câncer (USA)
NO	Óxido Nítrico
NY	New York
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Fosfolipase
RIP's	Ribosome Inactivating Protein
RNA	Ácido Ribonuclêico
REHM	Resíduo aquoso de Extrato Hexânico de <i>Mirabilis jalapa</i>
S-180	Sarcoma 180
SVS-MS	Secretária Nacional de Vigilância Sanitária /Ministério da Saúde
T	Teste T de Student
tRNA	Ácido ribonuclêico de Transferência
TXA	Tromboxanos
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
V.I.P.	Via Intraperitoneal

V.O.
viralRNA
µg
µg/mL

Via Oral
Àcido ribonucleico Viral
Micrograma
Micrograma por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1	Característica botânica de <i>M. jalapa</i> : herbácea tipo arbusto perene medindo de 50 a 100cm de altura.....	07
Figura 2	Característica da folhas e flores de <i>M. jalapa</i> : folhas simples, alternadas, com base aguda e borda lisa. Flores tubulares, de cálice apical e inflorescência do tipo cacho e 5 sépalas.....	07
Artigo I		
Figura 1	Baço apresentando atrofia dos folículos linfóides e congestão esplênica. Animal tratado com dose de 3,0 g/kg. Corado com HE e objetiva 25x.....	42
Figura 2	Rins apresentando intensa congestão renal (intersticial e glomerular), tumefação do epitélio tubular e atrofia glomerular. Animal tratado com dose de 3,0 g/kg. Corado com HE e objetiva de 40.....	42
Figura 3	Fígado apresentando intensa congestão sinusoidal e inúmeros hepatócitos binucleados. Animal tratado com dose de 1,0 g/kg. Corado com HE; objetiva de 40x	43
Figura 4	Pulmão apresentando intensa congestão, áreas hemorrágicas e enfisema. Animal tratado com dose de 1,0 g/kg. Corado com HE; objetiva de 25x	43
Artigo III		
Figura 1	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> na dose de 100mg/kg, (tratado 1), com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão,(ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg).	71
Figura 2	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 125 mg/kg (tratado 2), com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg).	71
Figura 3	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 225 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg).	72
Figura 4	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 250 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg).	72
Figura 5	Fotomicrografia do rim de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Presença de cilindros e congestão renal. (b) Metástase renal. Corado com HE; objetiva de 25x.....	72
Figura 6	Fotomicrografia do fígado de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Metástase perivascular, congestão sinusoidal. (b) Figuras de necrose, presença de hepatócitos binucleados. Corado com HE; objetiva de 25 e 40x, respectivamente.....	72
Figura 7	Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Presença de congestão esplênica. (b) Depleção de células linfóides. Corado com HE; objetiva de 25 e 40x, respectivamente.....	73
Figura 8	Fotomicrografia do pulmão de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Metástase pulmonar. (b) Área de enfisema e hemorragia pulmonar. Corado com HE; objetiva de 40 e 25x, respectivamente.....	73

Artigo IV

Figura 1	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> na dose de 100mg/kg, (tratado 1), com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (metotrexato na dose de 5,0 mg/kg).....	89
Figura 2	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 125 mg/kg (tratado 2) com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (metotrexato na dose de 5,0 mg/kg).....	89
Figura 3	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 225 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (metotrexato na dose de 5,0 mg/kg).....	89
Figura 4	Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich: grupo tratado com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 250 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão (metotrexato na dose de 5,0 mg/kg).....	90
Figura 5	Fotomicrografia do rim de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Metástase infiltrativa renal. (b) Tumefação do epitélio tubular e metástase renal. Corado com HE; objetiva de 25x.....	90
Figura 6	Fotomicrografia do fígado de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Congestão hepática. (b) Presença de inúmeros hepatócitos binucleados e metástase infiltrativa hepatocelular. Corado com HE; objetiva de 25 e 40x, respectivamente.....	90
Figura 7	Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Presença de congestão esplênica (b) Metástase esplênica. Corado com HE; objetiva de 40 e 25x, respectivamente.....	91
Figura 8	Fotomicrografia do pulmão de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de <i>M.jalapa</i> . (a) Metástase pulmonar infiltrativa em alvéolos. (b) Áreas de hemorragia e enfisema pulmonar. Corado com HE; objetiva de 40x	91

Apêndice

Figura 1	Estrutura química de β -Sitosterol	104
Figura 2	Estrutura química de Pinitol	104
Figura 3	Estrutura química de Flavonóides	104
Figura 4	Cromatograma de caracterização de açúcares redutores – HE de <i>M. jalapa</i> ; P - Padrões de glicose e ramnose.....	108
Figura 5	Cromatograma de flavonóides (polifenóis) – HE de <i>M. jalapa</i>	108
Figura 6	Cromatograma de triterpenóides e esteróides – HE de <i>M. jalapa</i> ; P – Padrões de β -sitosterol, β -amirina e ácido ursólico.....	108

LISTA DE TABELAS

Artigo_I

Tabela 1	Sinais clínicos da toxicidade observada em camundongos albinos Swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EH da <i>M.jalapa</i> por via intraperitoneal.	39
Tabela 2	Classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL50.	40

Apêndice

Tabela 1	Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a investigação fitoquímica de <i>Mirabilis jalapa</i> Linn	106
Tabela 2	Metabólitos encontrados no HE da folha de <i>M. jalapa</i> Linn	107

LISTA DE GRÁFICOS

Artigo I

Gráfico 1	Concentração Letal (CL50) do EH de <i>Mirabilis jalapa</i> Linn.....	40
Gráfico 2	Curva Dose-Resposta da toxicidade do EH de <i>Mirabilis jalapa</i> Linn	41

Artigo II

Gráfico 1	Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratas tratadas por VIP, com o extrato hexânico de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 62,5 mg/kg (▲), 250 mg/kg (●), indometacina 10 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (◆). Os valores representam a média do volume da pata (ml) + EPM.....	54
Gráfico 2	Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratas tratadas por VIP, com o extrato hexânico de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 125 mg/kg (▲), 225mg/kg (●), indometacina 10 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (◆). Os valores representam a média do volume da pata (ml) + EPM.....	54
Gráfico 3	Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratas tratadas, por VIP, com o extrato hexânico de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 125 mg/kg (▲), 225 mg/kg (●), 250 mg/kg (•), indometacina 10 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (◆). Os valores representam a média do volume da pata (ml) + EPM.....	55

Artigo III

Gráfico 1	Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> na dose de 100mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo-controle (Teste T de Student).	69
Gráfico 2	Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 125mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo-controle (Teste t de Student).	69
Gráfico 3	Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 225 mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo-controle (Teste T de Student).....	70
Gráfico 4	Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o EH de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 250mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo-controle (Teste T de Student).....	70

controle (Teste T de Student).....	70
------------------------------------	----

Artigo IV

Gráfico 1	Peso dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 100mg/kg (▲) padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores+ EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle (Teste t de Student).....	87
Gráfico 2	Peso dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> na dose de 125mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle (Teste t de Student).	87
Gráfico 3	Peso dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 225 mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) e solução salina 0,0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + .EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle (Teste t de Student).....	88
Gráfico 4	Peso dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de <i>Mirabilis jalapa</i> nas doses de 225mg/ kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores + EPM.Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle (Teste t de Student).	88

RESUMO

Mirabilis jalapa Linné, família das Nictagináceas, é uma planta herbácea ereta, profundamente ramificada, de folhas simples ovais, caule tipo haste, com flores pequenas, cálices apicais e pétalas que podem ser brancas, vermelhas, róseas, rôxas ou com tons multicoloridos. Nativa da América Tropical, sendo amplamente cultivada com fins decorativos no Brasil, onde é conhecida como bonina ou maravilha e encontrada da Bahia ao Paraná. Seu uso é difundido na medicina tradicional de muitos países para o tratamento de infecções, inflamação, edemas, conjuntivite, sendo também empregada como diurética, purgativa, tônica, antiespasmódica, vermífuga e antifúngica. Em sua composição fitoquímica relata-se a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e esteróides. Devido à diversidade do seu uso popular, buscou-se validar essas informações etnobotânicas, procurando dar suporte científico ao verificado na medicina tradicional. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e farmacológica (antiinflamatória e anti-tumoral em roedores) do extrato das folhas de *Mirabilis jalapa* em sua fração hexânica. Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados por via intraperitoneal, com observações das respectivas alterações comportamentais para cada dose administrada. As doses utilizadas foram 1,0 a 3,0 g/kg, onde foram observados efeitos estimulantes nos primeiros 20 minutos após a administração do extrato hexânico e, em seguida, observados efeitos depressores. Efeitos como aumento da diurese e excreção fecal, foram relatados durante todo ensaio. A DL₅₀ encontrada foi de 2009,167 mg/kg enquanto que a Concentração Letal (CL₅₀) foi de 788,987 µg/ml, avaliada através de ensaio com *Artemia salina* Leach, o que permite sua classificação quanto à toxicidade em moderadamente tóxico. Em sua avaliação histopatológica, foram encontradas alterações como: congestão com áreas de necrose focal em fígado, congestão renal tubular, congestão e enfisema pulmonar. Para a atividade antiinflamatória utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina, com a administração do extrato hexânico por via oral (125; 225 e 250 mg/kg) e por via intraperitoneal (62,5; 125; 225 e 250 mg/kg), em ratas fêmeas. Nos ensaios antiinflamatórios, por via oral, não houve diminuição considerável dos volumes do edema da pata dos ratos, enquanto por via intraperitoneal, ocorreram inibições significativas somente na fase final da inflamação. A avaliação anti-tumoral do extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* Linn frente ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich por via intraperitoneal (100; 125; 225 e 250 mg/kg) apresentou significativa redução do peso médio dos tumores dos grupos tratados, com índices relevantes de inibição tumoral. Os estudos histopatológicos revelaram foram as seguintes alterações: congestão hepática, atrofia da polpa branca no baço, enfisema pulmonar e atrofia glomerular nos rins, além da presença de metástases principalmente, nos grupos controle e nas doses menos concentradas.

Palavras-chaves: *Mirabilis jalapa* L., Nyctaginaceae, toxicidade aguda, atividade antiinflamatória, atividade anti-tumoral e avaliação histopatológica.

ABSTRACT

Mirabilis jalapa Linné (Nyctaginaceae), a straight herbaceous plant, whose small calyx-like scented flowers may be present white, red, pink, purple or multicolored petals, is native of Tropical America. It is widely cultivated in Brazil due to its decorative feature, specially from Bahia to Paraná States. Furthermore, *M.jalapa* L. has been used empirically to treated cutaneous infection, edema, inflammation, conjunctivitis, besides for its diuretic, purgative, antispasmodic, vermifugal, fungicidal activities. The phytochemical composition of this species comprise certain alkaloid, triterpenoid and steroid compounds. Considering its diversified medicinal use, the author intended to compare the results attained in several pharmacological *in vivo* tests, with the ethnobotanical data, that might eventually validate the possible curative employ of *Mirabilis jalapa*. This scientific approach is in accordance to WHO resolutions (1977/1978), on the study of tradicional medicinal plants and agents, so as to establish standard preparations, doses/indicated uses, besides the needed data achieved through toxicological tests. The assays related to acute toxicity and to the pharmacological activity antiinflammatory and antitumoral effects were performed on rodents using the hexanic fraction of *M. jalapa* leaf extracts. The acute toxicity assays were performed by intraperitoneal injections and histopathological findings related to the different doses were commented. The doses comprised 1.0 to 3.0 g/kg and, after the first 20 minutes, they elicited a stimulating effect, followed by a depressed state. Diuretic effect and higher fecal excretion were observed. The letal dose (LD₅₀) was 2009, 167 mg/kg and the lethal concentration (CL₅₀) attained 788, 987 µg/ml, evaluated on *Artemia salina* Leach, suggesting its classification as moderately toxic. Histopathological studies showed some alterations: liver congestion with focal necrosis, renal tubular congestion, lung congestion e enfisema. The anti-inflammatory effect of *M.jalapa* named extract was assayed using a rodent experimental model, where by subcutaneous injection of carrageenan induced a paw edema. The rats were treated per os with 125, 225 and 250 mg/kg, besides other groups received intraperitoneal 62.5; 125; 225 and 250 mg/kg. The per oral treatment did not show noticeable reduction of the edema volumes whereas the IP injections of the extracts, caused significant reduction of the edema in the final phase of inflammation. The antitumoral evaluation of the hexanic extract of *M. jalapa* against Sarcoma 180 and Ehrlich's Carcinoma, resulted in significant reduction of the average tumor weight, after treating different groups of rodents with intraperitoneal injections of 100, 125, 225 and 250 mg/kg, showing a relevant index related to tumoral inhibition. The histopathological alterations included the described hepatic congestion, atrophy of the spleen's white pulp; lung enfisema, renal glomerular atrophy, besides of presence of metastasis, specially in the control groups and those treated with lower doses of the assayed extract.

Key Words: *Mirabilis jalapa* L., Nyctaginaceae, acute toxicity, antiinflammatory activity, anti-tumoral activity and histopathological evaluation.

1. Introdução



1. INTRODUÇÃO



A Perspectiva de se obter novos fármacos nos reporta ao imenso potencial que os produtos naturais de origem vegetal possuem frente aos sintéticos, indo desde sua diversidade de compostos químicos, similar aos que produzem os microrganismos, até a sua múltipla função biológica (SIMÕES, 2004).

O uso de certos metabólitos de vegetais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido relatado ao longo do tempo (GUERRA, 2004). Os produtos naturais compreendem uma variedade de compostos superior aos produtos sintéticos, além de exibirem também propriedades adicionais às antimicrobianas a eles associadas (NISBET; MOORE, 1997).

A pesquisa farmacológica de plantas medicinais tem propiciado não só avanços importantes para a terapêutica de várias patologias, como também tem fornecido ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico de fisiologia e farmacologia (DOHADWALLA, 1985).

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana. O homem tem buscado na Natureza o suprimento para suas necessidades básicas, retirando dela alimentos, abrigo, vestuário, meios de transporte, temperos e perfumes e, finalmente, remédios (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Apesar dos milhares de anos, o número de plantas medicinais estudadas sob a óptica da farmacologia e toxicologia com o intuito de comprovar o seu uso popular e segurança, respectivamente, ainda é muito pequeno. Estima-se que das 250 a 500 mil espécies de plantas existentes no planeta, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente, da mesma forma, pouco foi estudado em termos de propriedades

farmacológicas; em muitos casos apenas o “screening” farmacológico foi realizado (PAYNE *et al.*, 1991).

Atualmente, os esforços para a descoberta de novas drogas são dirigidos no sentido de se 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 multinacionais (SIMÕES, 2004). No Brasil, os medicamentos fitoterápicos movimentaram R\$ 270 milhões em 2001, cerca de 5,9% do mercado brasileiro de medicamentos, maior do que a comercialização de medicamentos genéricos, que foi de R\$ 226 milhões, no mesmo ano (CALIXTO, 2003).

O uso das plantas medicinais no âmbito popular nos remonta desde nossos povos indígenas, continuando no Brasil colônia até o presente, o que nos leva hoje à procura de medicamentos com maior eficácia, de custos menores e alta qualidade (SIMÕES, 2004).

De uso quase exclusivo na terapêutica medicamentosa até a década de 1950, os remédios vegetais foram gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos contendo as substâncias ativas dele extraídas ou seus derivados sintéticos. Devido ao seu difícil controle de qualidade_ químico, físico-químico, farmacológico ou toxicológico_ dos extratos vegetais utilizados, poucas foram as plantas medicinais estudadas segundo o nosso atual estágio do conhecimento científico (GUERRA, 2004).

As oportunidades para identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies. Nos reportamos, então, à magnitude da biodiversidade brasileira, pouco conhecida, tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (SOEJARTO, 1996; GUERRA, 2004).

Atualmente a estimativa é de que cerca de 40% dos fármacos empregados na terapêutica, são provenientes de fontes naturais, sendo 25% de plantas. Este percentual aumenta ainda mais se nos restringirmos apenas aos fármacos anticâncer e antibióticos (SHU, 1998). Das 252 drogas, consideradas básicas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem natural e um número significativo destes são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Estima-se, ainda, que 80% da população mundial (dados da OMS) façam uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças (CRAGG; NEWMAN, 1999). Atualmente, as maiores indústrias farmacêuticas mundiais possuem programas de pesquisa na área de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Com isso, houve um crescente interesse pelas terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, especialmente naqueles derivados de vegetais (GOLDFRANK *et al.*, 1982; MENTZ; SCHENKEL, 1989; VULTO; SMET, 1988).

No entanto, há poucos estudos que possibilitam uma visão ampla da grande diversidade das espécies de plantas utilizadas com fins terapêuticos. Muitos desses conhecimentos tradicionais sobre as plantas, especialmente as plantas medicinais, estão se perdendo com o passar do tempo, por causa da falta de estudos ou pelo uso inadequado dos recursos vegetais (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005).

Apesar de ser uma tarefa complexa, desenvolver, a partir de plantas medicinais, fármacos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis, o potencial de tais extratos está longe de ser esgotado. Soluções para novas necessidades, como novos conhecimentos poderão ser encontrados no reino vegetal, através de, descobertas de novas moléculas com atividade terapêutica e desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (CRAGG *et al.* 1997, GUERRA, 2004).

Nesse contexto, a avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das plantas medicinais e de seus metabólitos secundários, mostra-se de fundamental importância para obtenção de novos fármacos fitoterápicos eficazes e seguros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estudos sobre a *Mirabilis jalapa* Linn.

2.1.1. Botânico

A família Nyctaginaceae compreende cerca de 30 gêneros de distribuição nativa da América Tropical, possui representantes arbóreos ou arbustivos (herbáceos), às vezes são plantas lenhosas que crescem apoiadas, têm folhas opostas ou alternadas, inteiras, sem estípulas, podendo alcançar de 50 a 100 cm de altura (JOLY, 1998; WATSON, 1992). *Mirabilis jalapa* Linn. é uma espécie típica da família Nyctaginaceae, de distribuição predominantemente tropical, originária da América do Sul (JOLY, 1998; LE DUC, 1986; LORENZI, 1991; RORIZ & CUNHA, 2000), integrando a biodiversidade de países como a Bolívia, Peru, Equador e Brasil, onde é encontrada da Bahia ao Paraná (CORRÊA, 1984).

Descrita como uma planta ornamental selvagem, de inflorescência em geral do tipo cacho, seus cálices são apicais, de flores pequenas e pétalas em número de 5 que podem variar desde tons avermelhados, amarelos, brancos até matizados. Suas folhas são simples, alternadas, com ápice agudo, base aguda e borda lisa. Seu caule tipo haste, de conformação pequena, se constitui de pouca resistência na base e suas raízes são tuberosas (JOLY, 1998; MODESTO, 1981). Seus frutos se assemelham a uma pimenta-do-reino, porém maior, de pericarpo rugoso, com uma película que envolve seu perisperma amiláceo e seco (ALMEIDA, 1993).

Conhecida popularmente como: ‘quatro horas’, bonina, maravilha, boa-noite, bela-da-noite, jalapa falsa (ALMEIDA, 1993), entre outras denominações, que variam com as localidades; sua denominação popular se deve ao fato de que, suas flores se abrem a partir das 16h00 da tarde e, se fecham entre 4h30 e 6h00 da manhã (LEAL *et al.*, 2001). Suas flores tubulares apresentam ânteses crepusculares, odor adocicado forte,

com presença de pólen na superfície do estigma, facilitando sua auto-polinização. Esse processo, muitas vezes resguarda sua reprodutividade biológica e floral (FAEGRI & PILL, 1976; LEAL *et. al.*, 2001). Sua forma de auto-polinização lhe garante uniformidade genética adequada para procedimentos industriais de extração de componentes medicinais. Sua reprodutividade biológica e floral tem sido amplamente estudada por toda América (LEAL *et. al.*, 2001). Atualmente serve de material para diferentes estudos, além de ter sido utilizada como modelo de pesquisa para as leis genéticas de Mendel (LORENZI, 1991).



Figura 1 – Característica botânica de *M. jalapa*: herbácea tipo arbusto perene medindo de 50 a 100cm de altura.



Figura 2 – Característica da folhas e flores de *M. jalapa*: folhas simples, alternadas, com base aguda e borda lisa. Flores tubulares, de cálice apical e inflorescência do tipo cacho e 5 sépalas.



2.1.2. Fitoquímico

Estudos desenvolvidos para determinar seus componentes fitoquímicos ativos mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenóides, esteróides, arabinose, alanina, beta-amirinas, resina e dopamina (ANSARI *et al.* 2000; SIDDIQUI *et al.* 1990; YANG *et al.* 2001; WATSON, 1992).

Em suas partes aéreas já foram descritos: alcalóides, triterpenóides, esteróides e alcoóis. Além da presença de leucina, valina, triptofan, alanina, glicina, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ursólico e oleanólico, também foram identificados polissacarídeos, e novos componentes fenólicos não descritos anteriormente (2'-*O*-Metilabronisoflavona; 9-*O*-Metil-4-hidroxi-boeravinona B; 6-Metoxiboeravinona C) (BEHARI, 1976; SIDDIQUI, 1990; BEGUM, 1994; BIELESKI, 1994; PLOUVIER, 1963; YANG, 2001).

Nas sementes, já foram identificados polissacarídeos e ácidos graxos, além de serem encontradas as maiores concentrações de peptídeos tóxicos e MAP's (AHMAD *et al.*, 1984; CAMUE *et al.*, 1992; GHOSH *et al.*, 1981).

Em suas raízes, podemos encontrar proteínas, esteróides e polissacarídeos (MYIANO, 1992; STANIC *et al.*, 1988; RAY *et al.*, 1988). YANG *et al.*(2003), em extrato etanólico das mesmas, isolaram um componente novo, (2,5-dioximidazolidin-4-yl)-urea e o monoecossato de glicerina.

2.1.3. Farmacológico

Difundida amplamente na medicina tradicional da América do Sul e, particularmente no Brasil, suas raízes, caule, folhas e frutos são descritas para o tratamento de infecções, inflamação, edemas, conjuntivite, sendo também empregada como diurética, purgativa, tônica, antiespasmódica, vermífuga, antifúngica e como

pesticida (ALMEIDA, 1993; KATAOKA, 1991; LE DUC, 1986; LORENZI, 1991; LORENZI & SOUZA, 1995).

Conhecida por suas flores de extrema fragância, e cultivada pela antiga medicina Azteca, antes da conquista do México pelos espanhóis (LE DUC, 1986), suas propriedades medicinais se originaram do conhecimento dos povos indígenas, que a utilizavam para a cura de resfriados, dores de cabeça, hepatites, ferimentos de pele, vermícidas, laxantes, purgantes, diuréticas e, em infecções fúngicas, além do suco de suas folhas para dores de ouvido e herpes (CASTELUCCI, 2004).

Diversos estudos apontam o uso da *Mirabilis jalapa* como antiviral, através de extratos principalmente das suas raízes, contra o vírus da batata e outras leguminosas, nos países andinos, o que se destaca devido ao papel econômico na agricultura local (VIVANCO, 1997). Hoje vem sendo utilizada tanto como bactericida, fungicida e pesticida, como no emprego contra diversos tipos de infecção (*Escherichia coli*) (BOLOGNESI, 2002; CACERES, 1995; DE BOLLE, 1993; HABUKA, 1989; HABUKA *et al.*, 1996; KATAOKA, 1991; KUSAMBA, 1991; PORTO, 1995; REES, 1995).

A inibição viral é atribuída a uma proteína isolada chamada Proteína Antiviral de *Mirabilis jalapa* (MAP), mais encontrada no caule, raiz e folhas, que contém as Proteínas de Inativação Ribossômica (RIPs) (IKEDA, 1988; KATAOKA, 1991; KATAOKA, 1992; MYIANO, 1992; VIVANCO, 1999).

As RIPs compreendem uma classe de proteínas que são amplamente distribuídas nas plantas, podendo estar presentes nas algas, fungos e bactérias, tendo recentemente sido descritas em tecido mamífero (GIRBES, 2004).

São proteínas com potente atividade inibitória na síntese proteica eucariótica, devido à sua atividade N-glicosidase, com capacidade para atuar em diversos substratos

e outros ribossomos, como os tRNA, mRNA, viralRNA e DNA. (BARBIERI, 1992; GIRBES, 2004; VIVANCO, 2004).

Essas proteínas podem ser classificadas em três tipos: tipo I, composta por uma cadeia simples polipeptídica (A); tipo II, com dois tipos de cadeia (A-B), a qual equivale ao tipo I (A) e uma cadeia (B) com atividade de lectina; e uma cadeia do tipo III, simples contendo uma carboxila terminal, de função ainda desconhecida (VIVANCO, 2004).

As RIP's possuem outras atividades biológicas e enzimáticas de amplo espectro, como: atividade antiviral contra RNA e DNA de vírus de plantas e animais (BARBIERI, 1982; BOLOGNESI, 2002; KATAOKA, 1991; PARIKH, 2004; VIVANCO, 1999), atividade citotóxica, abortiva, além de estudos sobre sua ação como anti-HIV, imunotoxina e mais recentemente seu possível desempenho na morte celular por apoptose (BARBIERI, 1993; BATELLI, 2004; BOLOGNESI, 2002; NARAYANAN, 2005; NARAYANAN *et al.*, 2004; VIVANCO, 2004).

No entanto, a despeito de todas as investigações já feitas sobre seus efeitos como toxinas, o papel e função das RIP's nas plantas continua ainda enigmático. O principal objetivo dos estudos nos próximos anos será de elucidar o possível mecanismo de ação das mesmas, estabelecendo um papel fundamental em suas aplicações medicinais como marcadores tumorais (imunotoxinas) e em doenças hematológicas. (VIVANCO, 2004).

Existem também estudos relatando os efeitos das sementes de *Mirabilis jalapa* como contraceptiva (MOATTAR, 1978), citotoxicidade em larvas de *Aedes Egypti* e *Artemia Salina* e como antitumoral em linhagem de fibroblastos de ratos (L929) (LEELAMANIT, 2002). Sua capacidade abortiva em ratas prenhes, como inibidor de síntese protéica e de efeito antiproliferativo tumoral em células de coriocarcinoma (JAR) foram demonstradas em suas raízes por WONG *et al.* 1992. CASTELUCCI *et al.* 2004,

relata inibição tumoral *in vivo* frente ao Sarcoma 180, do extrato metanólico de suas folhas. Existem também relatos de sua atividade tanto em doenças reumáticas (KONG, 1977) quanto em doenças sexualmente transmissíveis, como a gonorréia (CACERES, 1995).

2.1.4. Toxicológico

2.2. Estudos toxicológicos pré-clínicos de plantas medicinais

A toxicidade de uma substância pode ser definida como a capacidade de causar dano grave ou morte a um dado organismo (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944). Para que o dano ocorra é necessário, em primeiro lugar, que o organismo seja exposto, em segundo, que este interaja com o agente intoxicante (PEÑA; CARTER; AYALA-FIERRO, 2001).

De fato, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, esta condição irá depender das condições nas quais ocorrerá a interação do agente químico com o organismo, como tempo e frequência de exposição, dose administrada ou absorvida, e via pela qual se deu a administração (CASTRO, 1993).

Como discutido anteriormente, a idéia de inocuidade dos fitoterápicos é amplamente difundida: esta concepção tem resultado numa série de acidentes por intoxicação ocasionados pela ingestão de plantas como alimento ou como terapia para alguma doença. Nestes casos, a toxicidade pode ser resultante de altas doses ingeridas ou do estado de conservação das plantas e formas de uso (RATES, 2001). Deve-se ter em mente que uma planta medicinal ou fitoterápico não tem somente efeitos imediatos relacionados à sua ingestão, mas que estes podem se instalar em longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos (HIRONO *et al.*, 1978).

Os testes toxicológicos são realizados para se ter dados sobre as condições em que as entidades químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (LOOMIS; HAYES, 1996).

Devido a questões legais e éticas, os dados toxicológicos obtidos na espécie humana são muito limitados (WHO, 1993). Dessa forma, os testes que visam indicar o grau de segurança relativo a um medicamento, devem ser efetuados em uma etapa pré-clínica, onde são utilizadas três espécies de mamíferos, sendo uma delas não-roedora (LAPA *et al.*, 2004).

No Brasil, as plantas medicinais são utilizadas em ambas as áreas, rural e urbana. Muitas são utilizadas de acordo com a tradição popular, na forma de chás, decoctos, tinturas, etc. e, menos freqüentemente, como cápsulas e pílulas (MATOS, 1997; MENTZ; SCHENKEL, 1989). Por considerar crítica a situação do mercado de fitoterápicos no Brasil, a Secretária Nacional de Vigilância Sanitária, em 1995, estabeleceu uma série de regras para o registro dos fitomedicamentos (Portaria n° 6 de 24.01.95, SVS-MS, Brasil, 1995a) e para regulamentar a avaliação da toxicidade destes produtos (Portaria n° 116 de 08.08.96, SVS-MS, Brasil, 1996).

Atualmente as regras, que norteiam os registros e alguns ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, com medicamentos fitoterápicos, estão descritos na Resolução n° 90, de 16/03/2004 (BRASIL, 2004).

2.2.1. Toxicidade aguda

Toxicidade aguda é definida como o conjunto de efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto, após a administração de uma dose única, ou doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas, tendo como objetivo determinar a sintomatologia a curto prazo após a administração de um composto, bem como o

binômio dose-efeito letal, que é estimada por um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida como DL₅₀ (BARROS ; DAVINO, 2003).

O teste da DL₅₀ foi introduzido por J.W. TREVAN em 1927, atendendo a finalidade de estimar o potencial tóxico de substâncias para uso humano, tais como digitalis e insulina. Ele sugeriu que se considerasse como dose letal aquela que matasse 50% dos animais injetados. Isto porque os valores em torno da DL₅₀ variam menos que aqueles ao redor da DL₁ ou da DL₉₉.

Este valor é um parâmetro estatístico onde o cálculo da dose letal média seria obtido através de um gráfico, no qual se encontram nas ordenadas a percentagem de animais mortos e nas abscissas as doses empregadas, obtendo-se uma curva dose-resposta, representada, teoricamente, por uma curva Gaussiana (BARROS; DAVINO, 2003; BOTHAM, 2004; SCHLEDE *et al*, 2005).

Os ensaios de toxicidade aguda são comumente realizados em camundongos e ratos, embora em certos casos também sejam utilizados animais maiores, como coelhos e cães. Recomenda-se a mesma via de administração utilizada no homem, sendo a via oral a mais comum (KLAASSEN; AMDUR; DOULL, 1996).

2.3. Inflamação

O termo inflamação deriva do latim *eflamare* que significa “atear fogo” Os egípcios, há cerca de 3500 anos a.C. a simbolizaram com um curioso símbolo hieroglífico em um papiro, representado por um braseiro. Os gregos, por volta de 2000 anos atrás, utilizaram o termo *phlogosis* enquanto os Romanos usaram a palavra *inflammation*, todos com o mesmo propósito, descrever o fenômeno atualmente conhecido como inflamação (SIQUEIRA; DANTAS, 2000; ALMEIDA; MENEZES, 2002).

Não obstante, foi um escritor romano do século I d.C., Aulus Cornelius Celsus, o primeiro a citar os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor, calor, tumor e dor*. Desde então, esse processo tem sido descrito de diversas maneiras. *Functio laesa*, ou perda de função, foi o quinto sinal acrescentado posteriormente por VIRCHOW (MONTENEGRO; FRANCO, 1995).

A inflamação, a partir do século XIX, passou a ser vista como sendo precedida por uma injúria celular ou tecidual, e que este processo envolvia modificações no leito vascular, incluindo migração de leucócitos como evento secundário (BOGLIOLO, 1976; COLLINS, 2000; MOVAT, 1971).

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das conseqüências dessa lesão (COLLINS, 2000). Consistindo na primeira linha de defesa do organismo, seu objetivo é localizar a região afetada, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a região acometida para a reparação. Entretanto, em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória torna-se exagerada, persistindo sem qualquer benefício aparente (SILVA; CARVALHO, 2004; SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

Os eventos inflamatórios envolvem mudanças microvasculares com aumento da permeabilidade vascular, fluxo exsudativo, que inclui proteínas plasmáticas, e amplificação de mediadores químicos endógenos (CIRINO, 1998).

Thomas LEWIS definiu o conceito de que metabólitos, como a histamina, são mediadores das alterações vasculares da inflamação. Estes mediadores químicos são responsáveis pelo controle da intensidade da resposta inflamatória, assim como por seu desencadeamento. Podem ser detectados no plasma sob forma de pré-enzimas estocados

no interior de células ou ser sintetizados durante o processo inflamatório (COLLINS, 2000; MONTENEGRO; FRANCO, 1995).

As duas aminas, histamina e serotonina (5-HT), são especialmente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas; estão entre os primeiros mediadores a serem liberados. Estas liberações ocorrem através da degranulação de mastócitos, basófilos e plaquetas. A histamina induz rapidamente a liberação de selectina-P (TONNEL *et al.*, 1996) que vai determinar o surgimento de leucócitos, dando início ao processo de migração. Diversos fenômenos da resposta inflamatória são mediados por três fatores derivados do plasma e inter-relacionados: os sistemas do complemento, da coagulação e das cininas. Este último gera peptídeos vasoativos, resultando na liberação final do nonapeptídeo bradicinina, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na inflamação aguda, e conseqüente migração de células (polimorfonucleares) (COLLINS, 2000; DUGALD; FRANCIS; WILLIAM, 1994).

De modo semelhante, quando as células são ativadas por diferentes estímulos, os lipídeos das suas membranas são rapidamente remodelados para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos, que servem como sinais intra e extracelulares. Estímulos mecânicos, químicos, físicos e outros, são capazes de mobilizar fosfolipídeos das membranas celulares, através da atuação de lipases do tipo fosfolipase A₂ (PLA₂), liberando um ácido graxo de 20 carbonos denominado ácido araquidônico (AA). Duas classes principais de enzimas: ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LIPOX) atuam sobre o AA, produzindo as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXA), e os leucotrienos (LT) e lipoxinas, respectivamente. (FOEGH, RAMWELL, 2003; COLLINS, 2000).

As prostaglandinas, tais como as prostaciclina provocam vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e dor. Os tromboxanos (A₂) promovem a agregação

plaquetária e vasoconstrição. Os leucotrienos, gerados a partir da LIPOX são potentes agentes quimiotáticos, ativam as respostas funcionais dos neutrófilos, como agregação e aderência dos leucócitos ao endotélio venular, também são potentes vasoconstrictores, promovendo broncoespasmos e aumento da permeabilidade vascular (BRIGHMAN, 1989; PHILIPS, MURRAY, CROCKER, 1995; STEWART, 1989).

A inflamação divide-se em padrões agudo e crônico. A resposta em sua fase aguda, que ocorre no máximo em 72 horas, implica em eventos exsudativos ou supurativos, bem como eventos microvasculares e celulares. A fase crônica inclui eventos proliferativos e alterações histológicas e, diferentemente da fase aguda, é caracterizada por migração celular e mitose intensa, também se nota a presença de fibroblastos, angioblastos e a necrose sendo tecidual. Seu tempo de duração é mais longo e decorrente da persistência do agente agressor, que não é eliminado pelos mecanismos da inflamação aguda (SOSA *et al.*, 1997; MONTENEGRO; FRANCO, 1995).

O processo flogístico pode ser fisiológico ou patológico, por vezes, apresenta-se de maneira exacerbada e constante, quando se torna deletério para o tecido onde está atuando. É o caso das doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, em que a inflamação crônica produz dor e resulta em destruição do osso e da cartilagem, podendo causar grave incapacidade. De acordo com ALMEIDA e MENEZES (2002), a inflamação pode ser apontada como um importante agente causador de morbidade e mortalidade humana.

2.3.1. Agentes Antiinflamatórios

Atuando em algumas das fases da resposta inflamatória, inibindo a ação dos mediadores químicos, ou inativando os componentes do sistema complemento, assim

como, impedindo a ação e a resposta celular; os fármacos portadores dessas ações consistem, atualmente, em armas mais ou menos eficientes para controlar os múltiplos sinais e sintomas desencadeados pela resposta inflamatória (MOTA, 1982).

O mecanismo de ação das drogas antiflogísticas foi definido como sendo dependente da inibição das enzimas produtora do ácido araquidônico, fosfolipase A₂ (PLA₂), caso dos antiinflamatórios esteroidais, ou impedindo a liberação de seus metabólitos, como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e outros, devido à inativação da enzima ciclooxigenase (COX) (MYGIND, 1993; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Além das diversas atividades terapêuticas em comum, os agentes antiinflamatórios podem apresentar vários efeitos colaterais. Vários estudos estão sendo realizados na tentativa de descobrir novos medicamentos contra a inflamação, mais eficazes e com menos efeitos colaterais (SILVA; CARVALHO, 2004).

Ao descrever os derivados dos glicosídeos, como a salina, uma das primeiras substâncias antiinflamatórias, desenvolvidas a partir de várias espécies de *Salix* e *Populus*, origem de múltiplos compostos como os salicilatos, (CLAUSS; TYLER, 1970), destaca-se o ácido salicílico que, por acetilação, resulta no ácido acetilsalicílico ou aspirina. Este fármaco exerce efeito inibidor não-seletivo das duas isoformas da COX, de inibição irreversível, devido à transferência do grupo acetil para a proteína (FURST; MUNSTER, 2003).

Os metabólitos secundários advindos dos vegetais têm sido investigados por sua capacidade de inibir o processo inflamatório. Os taninos têm sido repetidamente descritos por sua atividade antiflogística: alguns deles foram ativos em testes *in vitro* envolvendo a COX. Outros atuam por intervirem no mecanismo de reação imunológica, é o caso dos triterpenos, sesquiterpenos e esteróides.

Os flavonóides, assim como o ácido salicílico, foram introduzidos na terapêutica antes de serem testados sobre a atividade metabólica das prostaglandinas (CARVALHO, 2004). Esta classe de compostos apresenta ampla margem de segurança, não produzindo efeitos colaterais tal como ulcerogenicidade (ALCARAZ; CARVALHO, 2004).

2.3.2. Testes Antiinflamatórios

Existe acentuado interesse quanto à descoberta de fármacos antiflogísticos. Assim os screening tests referentes a essa classe terapêutica têm sido intensamente realizados, baseados no modelo de edema de pata de rato, causado por injeção de um agente flogístico (HENRIQUES *et al.*, 1987).

Este agente flogístico pode ser a carragenina, dextrana, kaolin, etc. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de uma alga marinha, *Chondrus crispus* (DAYRENS *et al.*, 1980). O edema induzido pela carragenina é capaz de demonstrar o papel dos leucócitos no desenvolvimento da reação inflamatória aguda (GARCIA LEME, 1977).

O método descrito por WINTER *et al.*, 1962, utilizando a carragenina como agente edematogênico, descreve a formação do edema como um evento bifásico, de vários mediadores atuando em seqüência ao produzirem uma a resposta inflamatória (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969). A fase inicial (0-1h) tem sido atribuída à liberação de histamina, serotonina e bradicinina, a fase seguinte (1-6h) tem sido correlacionada com a elevada produção de prostaglandinas (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971) e com a ativação da COX-2 (SEIBERT *et al.*, 1994). A ativação e infiltração local dos neutrófilos também contribuem para a formação da resposta inflamatória (BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993; VINEGAR; TRUAX; SELPH, 1973),

produzindo vários outros mediadores com radicais livres derivados do oxigênio e radicais hidroxilas (LIMA, 1996).

2.4. Câncer

Os primeiros relatos da ocorrência de câncer em seres humanos foram encontrados nos papiros do Egito antigo por volta de 1500 a.C., e são referentes à descrição de úlceras cutâneas resistentes a tratamentos (COWLDRY, 1955). O médico e filósofo grego, Hipócrates de Cós, 460 a 375 a.C., descreveu algumas das diversas manifestações clínicas do câncer (FLOREY, 1977). No ano 150 da nossa era, Galeno propôs um sistema de classificação para os tumores que os dividia em benignos e malignos, e estes como fenômenos “contrários à natureza” (COWLDRY, 1955). Além do sistema de classificação, Galeno foi o primeiro a empregar o termo câncer (do latim *karkinos* = caranguejo), ao descrever um tumor maligno de mama. O órgão apresentava as veias superficiais túrgidas e ramificadas, lembrando patas de caranguejo (FILHO, 2000).

Atualmente a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia maligna, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, aos quais se diferenciam pela capacidade de invasão dos tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Admitia-se, até o início do século XIX, que o câncer ocorria em seres humanos, entretanto a natureza desse processo ainda era uma incógnita, não se sabia se era de origem celular ou infecciosa (DUNN, 1962). Este questionamento só seria elucidado em 1838, quando Johannes MUELLER demonstrou que os tumores eram constituídos por

células, a partir de então, passou-se a estudá-los também sob o ponto de vista histológico (DAGLI, 1989).

Em 1858, o veterinário LEBLANC apresentou evidências da existência de neoplasias em animais, e que estes eram semelhantes as dos humanos (DAGLI, 1989). Quarenta e seis anos após, BASHFORD e MURAY (1904) estabeleceram que as neoplasias eram processos que se desenvolviam em animais selvagens e domésticos, provavelmente presentes em todos os vertebrados. Hoje se sabe que tais processos estão presentes não só em vertebrados mas, também, em cefalocordados, urocordados, hemicordados e em inúmeras espécies de invertebrados (DAGLI, 1989). Indo mais além, o câncer é um fenômeno onipresente em todos os organismos pluricelulares (EVAN, 1992) tanto de origem animal quanto vegetal.

As neoplasias, tanto benignas quanto malignas, são doenças genéticas cujas mutações que lhes dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas nos tecidos somáticos (ISSELBACHER, 1995). Resultam de uma mudança pleiotrópica do estado celular a partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que desorganizam os eventos celulares normais (JONES; LAIRD, 1999; KAWAMURA, 1999).

2.4.1. Carcinoma

As neoplasias malignas que se originam de células epiteliais, derivadas de qualquer uma das três camadas germinativas, são denominadas carcinomas (CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2000).

O tumor de Ehrlich, introduzido por Paul EHRLICH em 1896, e descrito em 1906. Trata-se de neoplasia originária de carcinoma mamário de camundongos fêmeas, transplantada inicialmente na forma sólida. Somente em 1932, com LOWENTHAL e

JAHN, foi convertido para forma ascítica, por meio da passagem seriada de fluido ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com células tumorais (DAGLI, 1989).

Pode-se dizer que o carcinoma de Ehrlich, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecido, é um dos mais extensamente utilizados para experimentação animal (DAGLI, 1989).

2.4.2. Sarcoma

Refere-se a neoplasias malignas do tecido mesenquimal, a palavra deriva do grego *sar* que significa carnosos, visto que possuem pouco estroma de tecido conjuntivo e, portanto, são carnosos (CONTRAN, KUMAR; COLLINS, 2000).

O sarcoma 180, é uma neoplasia pouco diferenciada, descoberta em 1914 no Godcer Laboratory (Columbia University, NY). Foi encontrado inicialmente como uma massa sólida localizada na região axilar de um camundongo albino (SUGIURA, 1954).

No início foi classificado como carcinoma mamário, mas após vários transplantes subcutâneos, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram peculiares de um tumor sarcomatoso, passando, então a ser chamado Sarcoma 180 (1919), desde então sua nomenclatura não sofreu alterações (SUGIURA, 1994).

Suas células são de fácil obtenção, sendo utilizadas em vários centros de pesquisa e, após a inoculação o tumor desenvolve-se em 90 a 100% dos casos (BUCHI, 2002).

2.4.3. Produtos Naturais e a Terapia Anticâncer

Um grande número de produtos naturais tem sido estudado quanto à sua atividade antitumoral, em vários modelos experimentais. Isto resultou no surgimento de várias drogas anticâncer efetivas (RAMAKRISHNA *et al.*, 1984).

Paralelamente a isso, o campo de pesquisa terapêutica vem se desenvolvendo no sentido de testar novas formas de tratamento, bem como, novas substâncias potencialmente eficazes contra as neoplasias (SAAD-HOSSNE *et al.*, 2004). Por incluírem uma grande variedade de compostos atuando por vários mecanismos, os agentes quimioterápicos disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais, acarretando maior complicação ao seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco versus benefício quando se prescrevem estes agentes (SILVA, 2002).

Os agentes anticâncer atualmente em uso incluem drogas de origem microbiana como Doxorubicina, Dactomicina, Bleomicina (MUKHERJEE *et al.*, 2001), e um grande número de moléculas retiradas de vegetais, entre estas se encontram os alcalóides da vinca: vimblastina e vincristina, obtidos da *Catharanthus roseus*; o taxol (paclitaxel) diterpenóide retirado de *Taxus brevifolia*; o alcalóide camptotecina, da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, e muitos outros (MONGELLI; COUSSIO; CICCIA, 2005).

Desde 1955, o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, vem realizando triagens pré-clínicas de compostos e materiais, que incluem extratos de origem natural. Mais de 400.000 compostos, de origem sintética e natural foram testados para avaliar atividade anticâncer, incluindo 180.000 derivados de microrganismos e 114.000 extratos vegetais. Entre os anos de 1990 e 1996, aproximadamente, vinte agentes anticancêr, os quais incluem produtos naturais puros ou modificações semi-sintéticas de material natural, foram aprovados para o mercado.

Entre eles estão o Docetaxel/Taxotere (1995), Idarubicina (1990), Paclitaxel/Taxol (1993), Topotecan (1996), Formestano (1993), Fosfato de Fludarabina (1991), Porfimer sodium (1993), Raltitrexed (1996), muitos destes de origem vegetal (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

A fitoterapia tem desenvolvido, freqüentemente, importante papel na terapia anticâncer e os mecanismos de interação entre fitocompostos e células neoplásicas vem sendo extensivamente estudado (MUKHERJEE *et al.*, 2001). Atualmente uma grande quantidade de laboratórios internacionais se encontra engajados na tarefa de buscar novos agentes terapêuticos antineoplásicos, a partir de fontes naturais (BOYD; PAULL, 1995).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Efetuar o estudo farmacológico (antiinflamatório e antitumoral) e toxicológico do extrato das folhas da espécie *Mirabilis jalapa* Linn.

3.2 Objetivos específicos

- Classificação botânica do vegetal;
- Obtenção do extrato bruto da espécie *Mirabilis jalapa* utilizando solventes orgânicos e a fração desejada (extrato hexânico);
- Efetuar uma ratificação fitoquímica do extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa*, colocando em evidência os principais grupos de substâncias presentes;
- Verificar a toxicidade aguda do extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa* - determinação da dose letal para 50% da população (DL₅₀);
- Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa*;
- Avaliar os efeitos antitumorais do extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa* por uma análise quantitativa e histopatológica.

Artigo I



Artigo a ser submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ E DA DL₅₀ DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Mirabilis jalapa* Linn. (Nyctaginaceae)

*L.T. Rocha¹, E.C.B. Silva¹, A.C.P. Silva¹, Melo, A.F.M.², F. L. dos Santos³, M.F. Pereira³, D.J. Brondani⁴, I.A. Souza⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas _ UFPE, Recife-PE, Brasil

³Área de Patologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

⁴Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos (LABSINFA)_ Departamento de Ciências Farmacêuticas _ Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil

⁵Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

Resumo

O extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa* L., família Nyctaginaceae, foi avaliado quanto às suas propriedades tóxicas através de dois bioensaios. Inicialmente, avaliou-se a concentração letal 50% (CL₅₀) em larvas de *Artemia salina*, em seguida, determinou-se a dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos albinos Swiss fêmeas, utilizando a via de administração intraperitoneal (V.I.P.). A CL₅₀ encontrada foi de 788, 987 µg/mL. O estudo da toxicidade aguda apontou uma DL₅₀ de 2009,167mg/Kg. Dos resultados obtidos pode-se verificar que o extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* L. possui toxicidade moderada quando utilizada por via parenteral. Ao exame histopatológico, os animais apresentaram alterações em rins, fígado e pulmões.

Palavras-chave: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; toxicidade aguda, DL₅₀, CL₅₀, exame histopatológico.

*Contato com o autor: Rua prof. Arthur Sá, S/N, Cidade Universitária, Cep: 50.740-520, Recife-PE, Brasil/Tel: (55) 81- 2126-8511/fax:(55)81-2126-8510/ E-mail address: laura_tho@yahoo.com

Abstract

The hexanic extract of the *M.jalapa* L. leaves (Nyctaginaceae), was evaluated as to some toxicity features and histopathological findings. First, the LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) was conducted using *Artemia Salina* larvae as bioindicator; the LD₅₀ was performed on female swiss albino mice by means of intraperitoneal injections (IPV). The mean LC₅₀ related to *A.Salina* larvae attained 788,987µg/ml, whereas the acute toxicity assay resulted a LD₅₀ of 2009, 167 mg/kg. These data suggest that the hexanic leaf extract of *M.jalapa* showed moderate toxicity. The histopathological findings disclosed some kidney, lung and liver alterations of the treated animals.

Keywords: acute toxicity; LD₅₀, LC₅₀, histopathological findings.

1. Introdução

Apesar do uso popular amplamente difundido de produtos naturais, como substâncias ‘atóxicas’, sabe-se que muitas substâncias extraídas do reino vegetal apresentam elevada toxicidade, como a estricnina, brucina, digitoxina, tubocurarina, cocaína, entre outras. O medicamento fitoterápico é um corpo estranho ao organismo e, como todo xenobiótico, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até que se prove o contrário (LAPA *et.al*, 2000).

Por isso, os testes toxicológicos são realizados para obter dados sobre as condições em que as entidades químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (LOOMIS e HAYES, 1996).

A toxicologia experimental desenvolve estudos para elucidação dos mecanismos dos agentes tóxicos sobre os sistemas biológicos e para avaliação dos efeitos decorrentes desta ação. A avaliação da toxicidade de substâncias é feita, utilizando diferentes espécies de animais, seguindo as rigorosas normas preconizadas pelos órgãos reguladores do país (OGA, 1996).

Em ensaio preliminar, foi determinada a concentração letal 50% (CL₅₀), com o

objetivo de encontrar a toxicidade sobre a *Artemia salina*, destacando-se por ser um método que combina baixo custo, rapidez, confiabilidade e simplicidade (SIQUEIRA *et al.*, 2001).

A investigação da toxicidade aguda se dá pela observação dos efeitos adversos em um período curto, após a administração de uma dose única, ou múltiplas doses, dentro de um período de 24 horas (BARROS; DAVINO, 2003). A Dose Letal ou mais conhecida DL_{50} , é uma derivada estatística definida como a dose capaz de causar efeito letal em 50% dos animais após uma administração aguda da substância, em ratos ou camundongos, que significa um binômio dose-efeito letal (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

A determinação da DL_{50} para o estudo de novos medicamentos é um dos requisitos a ser atendido para avaliação tóxica de novos fármacos (MELO, 2004), pois, a partir dela, é que se pode verificar a propedêutica utilizada na forma farmacêutica acabada.

2. Metodologia

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss, *Mus musculus*, adultos fêmeas, pesando entre 20-25g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições controles (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, processo nº 23076.014522/2005-23.

2.2. Material Botânico

As folhas de *Mirabilis jalapa* L. foram coletadas de espécimes cultivados no jardim do Departamento de Turismo e Hotelaria, da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O material vegetal foi devidamente identificado pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, depositando-se uma exsicata no herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob número 41.766.

2.3. Obtenção do extrato

As folhas de *M. jalapa* foram secas em estufa com circulação de ar (45 °C), durante 24 horas, sendo então pulverizadas e submetidas à maceração com metanol durante 12h. Após eliminação do solvente a vácuo e à temperatura ambiente (25 °C), o resíduo resultante foi exaustivamente tratado com n-hexano. A fração n-hexânica após eliminação do solvente foi então submetida aos ensaios aqui descritos.

2.4. Obtenção da CL₅₀

Neste ensaio biológico foram utilizadas larvas de *Artemia salina* Leach, obtidas a partir da incubação de cerca de 20 mg de cistos de *A. salina*, sob luz artificial por 48 horas. Grupos de 10 a 13 metanúplios foram expostos a diferentes concentrações (50 µg/mL a 1000 µg/mL) de Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* e as percentagens de mortalidade determinadas após 24 horas de contato. Cada ensaio foi repetido três vezes. Os dados foram plotados em gráficos e com isto foi interpolada a CL₅₀.

2.5. Avaliação da Toxicidade Aguda e Determinação da DL₅₀

Grupos com seis animais (n=6/fêmeas) foram privados de ração, recebendo água *ad libitum* (25 ± 3°C) por 12 horas, em seguida receberam o EH de *Mirabilis jalapa* por via intraperitoneal, nas doses de 1000 a 3000 mg/Kg. Os camundongos foram observados durante 48 horas após administração do EH de *M. jalapa*. O número de óbitos durante o período de estudo foi anotado para cada grupo, subseqüentemente o valor da DL₅₀ foi calculado segundo o método proposto por KARBBER e BEHRENS (1964).

2.6. Estudo Histológico

Foi realizada a análise macroscópica e histopatológica dos órgãos de todos os animais submetidos à avaliação de toxicidade aguda. Fígado, rins e pulmão foram retirados, cortados em pequenos fragmentos e imersos em solução neutra de formol a 10%, no qual permaneceram em temperatura ambiente durante 24 horas. Após fixação, as peças foram lavadas e processadas para inclusão em parafina, em seguida cortadas com 7 µm de espessura, coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (MICHELANY, 1980), e observadas em microscopia de luz.

2.7. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm). As diferenças entre os grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste T de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $p \leq 0,05$.

2.8. Resultados

2.9. Determinação da CL₅₀

A análise comportamental da *Artemia salina* Leach revelou uma diminuição na sua movimentação em relação àquelas selecionadas no controle, demonstrando que o extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* tem influência sobre a movimentação do organismo estudado.

Após 24 horas de exposição de *A. salina* Leach., observou-se que houve moderado número de óbitos na maioria das concentrações utilizadas da amostra de *Mirabilis. jalapa* (Gráfico1).

Desta forma, através de todos os fatos observados foi comprovado experimentalmente que a amostra selecionada apresentou valores de CL₅₀ na faixa de 788,987 $\mu\text{g/mL}$.

3.0. Toxicidade Aguda e Determinação da DL₅₀

Como demonstrado na tabela 01, a administração do EH de *M.jalapa* por via intraperitoneal (VIP), apresentou inúmeros sinais clínicos de toxicidade e os mais pronunciados foram os de efeitos estimulantes e em seguida, efeitos depressores.

Inicialmente os animais apresentaram os seguintes efeitos: agitação, movimentos circulares, reação de fuga, piloereção, tremores finos, ereção de cauda, agressividade, e distúrbios de movimentação. Outras reações como perda da coordenação motora, marcha ebriosa, espasticidade, hemiplegia, espasmos musculares (doses de 1.000 mg/kg a 2.750 mg/kg) foram os mais freqüentes. Os mais tardios foram depressores como palidez, cianose, e sonolência (todas as demais doses). Ressalte-se que durante a realização do protocolo experimental, os animais apresentaram aspectos depressivos como isolamento e fotofobia. Em concentrações mais elevadas (2.925 mg/kg e 3.000 mg/kg), as reações se caracterizaram por ações estimulantes como: convulsão focal e generalizada.

Foram observadas reações do trato respiratório, como: dispnéia e, em seguida apnéia, nas doses mais elevadas. Dentre outros efeitos, o que mais chamou a atenção foi o intenso aumento da diurese e excreção fecal, além da presença de refluxo gastroesofágico, espasmos e contorções abdominais.

A taxa de mortalidade do EH de *M.jalapa* cresceu progressivamente com o aumento da dose. A DL₅₀ foi calculada entre 1.0 e 3.0 g/kg, isto é, 2.009,167 mg/kg de peso do animal (Gráfico 2).

Os achados histopatológicos foram: pulmões com áreas hemorrágicas de extravasamento fora dos vasos, enfisema, atelectasia e congestão de alvéolos, principalmente nas doses mais concentradas (2.925 mg/kg e 3000 mg/kg), além da

presença de macrófagos reativos. No fígado, observamos intensa congestão hepática, necrose de coagulação e presença de hepatócitos binucleados, ocorrendo de forma mais frequente nas doses mais elevadas (2.925 mg/kg e 3.000 mg/kg). Os rins apresentaram nefrite multifocal, congestão e dilatação tubular, atrofia de glomérulo e endotélio bem reativo, sempre de forma mais acentuada nas doses elevadas; além da presença de cilindrúria em todas as doses, variando de forma diretamente proporcional à concentração.

3.1. Discussão e Conclusão

A idéia de que as drogas vegetais são mais seguras e livres de efeitos colaterais é falsa (DIMECH, 2003). Apesar de alguns estudos clínicos controlados, relatarem a incidência de efeitos colaterais de menor intensidade com produtos fitoterápicos do que com drogas sintéticas (DREW & MYERS, 1997), tornam-se essenciais os testes toxicológicos, como a DL_{50} , nos casos em que os extratos são utilizados por humanos, para o estabelecimento de uma dose segura (BALLIGA, 2004). Na literatura consultada são encontrados somente ensaios de efeitos gerais nas frações metanólica (GRANGEIRO, A.R.S., 2005) e nas frações butanólica e hexânica (SOUZA *et al.*, 2004), porém não há indicação de estudos para avaliação de DL_{50} e CL_{50} .

Estudos realizados nas partes aéreas dos extratos de *Mirabilis jalapa* L. demonstraram a presença de alcalóides, triterpenóides, esteróides e alcoóis. Além da presença da leucina, valina, triptófano, alanina, glicina, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ursólico e oleanólico. Foram identificados também, polissacarídeos e outros novos componentes fenólicos, alcalóides e esteróides (BEHARI *et al.*, 1976; SIDDIQUI *et al.*, 1989; BEGUM *et al.*, 1994; BIELESKI *et al.*, 1994; PLOUVIER *et al.*, 1963;

YANG *et al.*, 2001). No presente estudo de prospecção fitoquímica da folha de *Mirabilis jalapa* foi verificada principalmente, a presença de flavonóides triterpenóides, esteróides e polissacarídeos, como a glicose e ramnose.

Os flavonóides, normalmente não são considerados substâncias tóxicas, no entanto, não existem atualmente na literatura científica dados para isentá-los. Em doses elevadas podem ocasionar dano ao DNA (TRUEBA & SANCHEZ, 2001; SIMÕES, 2004) e atuarem tanto como antioxidantes, como pró-oxidantes (LAUGHTON *et al.*, 1989).

Já os triterpenos esteróides são relatados por suas ações estimulantes sobre o aparelho digestivo (secretolítica) e o SNC. Sua toxicidade vai desde reações cutâneas, como fototoxicidade e alergias, como reações do SNC, com efeitos convulsivantes, com crises do tipo epiléptiformes ou tetaniformes em doses elevadas; distúrbios sensoriais e até psíquicos (SIMÕES, 2004), além de seus efeitos psicotrópicos, como excitação, alucinações visuais e distorções de cores, com sensações de fuga da realidade e despersonalização (FORREST & HEACOCK, 1972; PAYNE, 1963), corroborando as reações observadas nos ensaios toxicológicos descritos anteriormente

Os polissacarídeos são descritos por seus efeitos fisiológicos sobre o trato gastrointestinal, com alteração da velocidade do trânsito intestinal, aumento do volume fecal; no fígado, aumento da secreção de sais biliares e redução dos níveis de colesterol. Em seus efeitos adversos, relatam-se dores abdominais, flatulência e náuseas; além de elevada excreção fecal desses compostos (SIMÕES, 2004). De acordo com a literatura citada, verificamos em nossos ensaios, similaridade nos estudos toxicológicos desenvolvidos.

As alterações hepatocelulares encontradas nos presentes ensaios podem ser devidas a uma possível atividade pró-oxidante dos flavonóides (LAUGHTON *et al.*,

1989), já que em relação ao grupo controle, os achados microscópicos foram evidentes.

Os achados referentes aos pulmões, podem estar associados ao método de sacrifício dos animais (deslocamento cervical), tais como: enfisema, hemorragia extra-alveolar e atelectasia, já que houve achados semelhantes nos grupos controles. No entanto, a presença de macrófagos reativos, denota possível inflamação do parênquima que poderia decorrer da toxicidade da dose mais elevada aplicada (3.0 g/kg). Em relação aos rins, o grupo controle não apresentou alteração na morfologia aqui estudada. No entanto, nos grupos tratados, houve a presença de cilindúria, principalmente nas doses mais concentradas, junto a alterações como: dilatação tubular com infiltrado inflamatório peritubular, atrofia glomerular e congestão, sugerindo a possibilidade de lesão renal compatível com quadro de intoxicação (SANCHEZ *et al.*, 2000).

No baço, em relação ao grupo controle, houve a intensa presença de megacariócitos, o que nos roedores é um achado comum, no entanto a macroscopia, houve a presença de esplenomegalia e congestão intensa, principalmente nas doses mais elevadas (3.0 g/kg) O que em quadros de intoxicação poderia ser associado aos possíveis compostos tóxicos do extrato da planta.

Os efeitos estimulantes e inibitórios do extrato HE de *Mirabilis jalapa* sobre as atividades apresentadas, tanto em *Artemia salina* L. quanto nos camundongos, sugere sua ação sobre o Sistema Nervoso Central. A função dos nervos autônomos periféricos é de modular a atividade contínua de órgãos viscerais involuntários desencadeando respostas inibitórias e excitatórias (BRODY *et al.*, 1997). No que concerne aos efeitos farmacológicos encontrados nos protocolos experimentais, podem sugerir alterações neuronais direta, ou indiretamente, estimulantes. Enquanto os efeitos depressores podem estar relacionados à redução de impulsos nervosos como resposta pós-sináptica (GOODMAN & GILMAN, 2003)

Esses dados fornecem um parâmetro para o estabelecimento de uma margem terapêutica segura, sugerindo a continuidade da pesquisa, com estudos específicos de atividade farmacológica visando possíveis ações terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLIGA, S.M.; JAGETIA, C.G., ULLOOR, J.N.; *et. al.* The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of Saphthaparna (*Alstonia scholaris*) in mice and rats. *Toxicological Letters* 151, 317-326, 2004.

BARROS, S.B.M.; DAVI, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: SEIZI, O. (org.) "Fundamentos da Toxicologia". 2º ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.59-67, 2003.

BIELESKI, R.L. Pinitol is a major carbohydrate in leaves of some coastal plants indigenous to New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. Vol.32: 73-78, 1994.

BEGUM, S.; ADIL, Q.; SIDDIQUI, B.S.; SIDDIQUI, S. Triterpenes from *Mirabilis Jalapa*, *Fitoterapia*, 55 (2), 177, 1994.

BEHARI, M., ANDHIWAL, C. K.; STREIBE, M. Some Chemical Constituents of the leaves of *Mirabilis jalapa* L. *Collec. Czech.Chem. Commun.*, 41 (1), 295-298, 1976.

BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. "Farmacologia Humana: Da Molecular à Clínica", 2º Ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 833 p., 1997.

CORRÊA, M. Pio. "Dicionário de Plantas Úteis do Brasil", Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Rio de Janeiro, vol. 5, 1984.

DIMECH, G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato bruto da *Mentha crispa*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Compostos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

DREW, A.; MYERS, S. P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. *Med. J. Australia*, v. 166, p. 538 – 541, 1997.

FORREST, J.E.; HEACOCK, R.A. Nutmeg and mace, the psychotropic spices from *Myristica fragans*. *Lloydia*, v.35, p.440-449, 1972.

GOODMAN & GILMAN, A.; HARDMER, J. G.; LIMBIRD, L.E."As Bases Farmacológicas da Terapêutica". 10 ed. McGraw Hill Interamericana do Brasil. 1671p. 2003.

GRANGEIRO, A.R.S. Estudo da toxicidade Aguda e Atividade Antitumoral da *Mirabilis jalapa* Linn.Monografia. In:Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

KARBENS G, BEHRENS, B. *Estatistical Methods in Biological Assays*. London: Ed. Griffin Ch. and C.1964.

LAPA, A. J. SOUCCAL, C.; LIMA – LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: Simões, C. M. O. (org).

“Farmacognosia da planta ao medicamento”. 2.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFCS, p. 181 – 196, 2000.

LAUGHTON, J.M.; HALLIWELLI, B.; EVANS, P.J.; HOUK, J.R. Anti-oxidant and pro-oxidant actions of plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hidroxil radical generation and bleomycin dependant DNA damage. *Biochemical Pharmacology*, v.38, p. 2859-2865, 1989.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, p.99-113, 1949.

LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. “Loomis’s essentials of toxicology”. 4° ed. California: Academic Press. 1996.

MELO, A.F.M. Estudo galênico de formas plásticas (gel e creme) do extrato bruto de *Anacardium occidentale* L. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco. 2004.

MICHALANY, J. “Técnica histológica em anatomia patológica”. Editora Pedagógica e Universitária Ltda., São Paulo, 277p. 1980.

OGA, S. “Fundamentos da Toxicologia”. 2° ed. São Paulo: Editora Atheneu. P-62-83, 1996.

PAYNE, R.B. Nutmeg intoxication. *New England Journal of Medicine*, v.269, p.36-38, 1963.

PLOUVIER, V. Sur la recherche des itols à chaine droite et des cyclitols chez les végétaux. Relations entre leur répartition et la classification systématique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 45: 1079-1117, 1963.

SANCHEZ, N. M.; MONTENEGRO, M. A.; PEREZ, G.; BURNA. A. N. Enfermedad de la isla_ estudo anatomohistopatologico de un caso. *Rev. Vet.* 10/11, 1 e 2, p. 30-33, 2000.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q. ; BEGUM, S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*. 615: 471, 1990.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Iunonopsis lingmanii* – Anonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova* 24 (2), 185-187, 2001.

TRUEBA, G.P.; SANCHEZ, G.M. Los Flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*, v.20, p.297-306, 2001.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*. *J.Nat. Product.* 64, 313-317, 2001.

TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 01 - Sinais clínicos da toxicidade aguda observada em camundongos albinos Swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EH da *M.jalapa* por via intraperitoneal.

Parâmetros	Dose (mg/kg)					
	1200(D1)	1500	2250	2500	2750	2925 (D2)
Estimulantes						
↑ Frequência respiratória	+	+	++	++	+++	+++
Agitação	++	++	++	++	++	+++
Piloereção	+	+	++	++	++	++
Movimentos estereotipados	+	+	+	++	++	++
Movimentos circulares	+	+	+	+	++	++
Movimentos de vibrissas	+	+	++	++	++	+++
Convulsão	-	-	-	-	-	+++
Convulsão clônica	+	-	-	-	+	+++
Tremores finos/ grosseiros	++	++	+++	+++	+++	+++
Ereção de cauda	+	+	++	++	++	++
Postura de ataque	+	+	+	+	++	++
Saltos	-	-	-	-	-	-
Irritabilidade	+	+	+	++	++	++
Levantamento de trem posterior	-	-	-	-	-	-
Arrastamento de trem posterior	+	++	++	+++	+++	+++
Depressores						
Abaixamento de trem posterior	+	+	+	+	+	-
Dispnéia	+	+	++	+++	+++	+++
Sonolência	+++	+++	+++	++	++	-
↓ Frequência respiratória	+	+	+	+	+	-
Prostração	++	++	++	++	++	-
Alteração de marcha	++	++	++	+++	+++	+++
Outros						
Excreção fecal	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Contorções abdominais	++	++	+++	+++	+++	+++
Reação de fuga	++	++	+	+	+	+++
Espasmos	+	++	+	+	+	-
Elevação de trem anterior	+	+	++	++	+	+
Diarréia	-	-	-	-	-	-
Refluxo	+	+	++	++	+++	+++
Palidez	+	+	+	++	++	+++
Distensão abdominal	-	-	-	-	-	-
Agressividade	+	+	+	++	++	++
Diurese	+++	+++	++	++	++	++
Irritação da conjuntiva	-	-	-	-	-	-
Espasticidade	+	+	+	+	+	+
Cianose	-	-	-	-	+	++
Exoftalmia	-	-	-	+	++	+++
Fotofobia	++	++	++	++	++	-

- = sem efeito + = efeito leve ++ = efeito moderado +++ = efeito acentuado

TABELA 02 – Classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL₅₀.

Grau de toxicidade	Categoria	DL ₅₀ em ratos
6	Supertóxico	< 5 mg/kg
5	Extremamente tóxico	5-50 mg/kg
4	Muito tóxico	50-500 mg/kg
3	Moderadamente tóxico	0,5-5 g/kg
2	Pouco tóxico	5-15 g/kg
1	Praticamente Atóxico	> 15 g/kg

Gráfico 1 - Concentração Letal (CL₅₀) do EH de *Mirabilis jalapa* Linn.

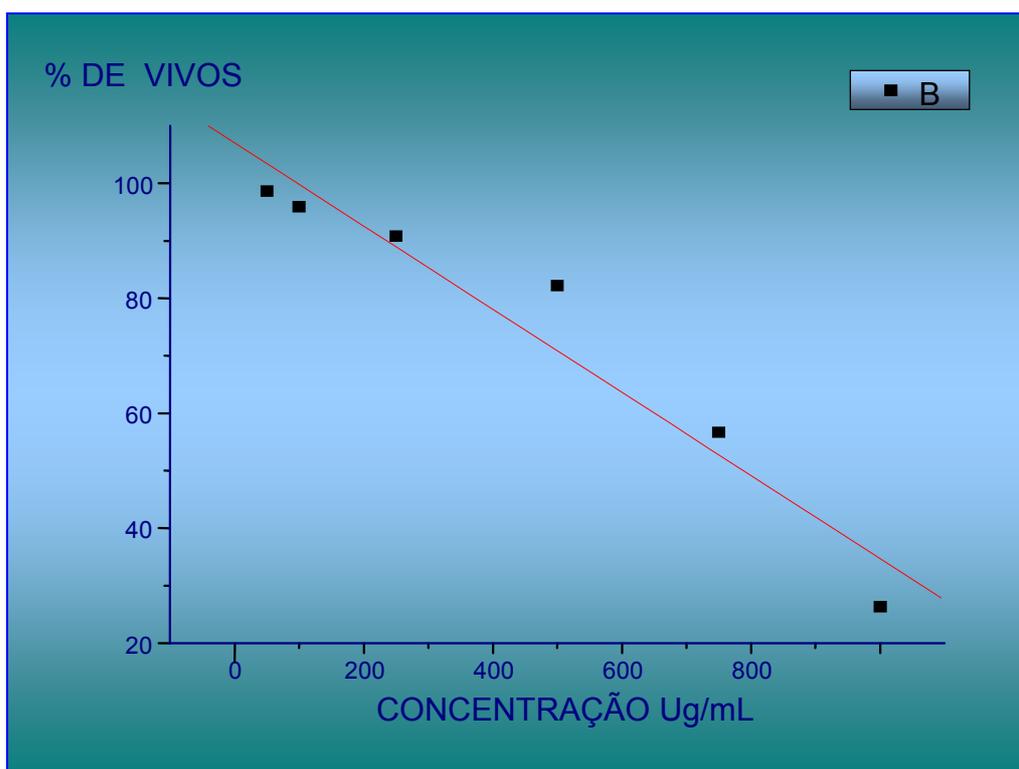
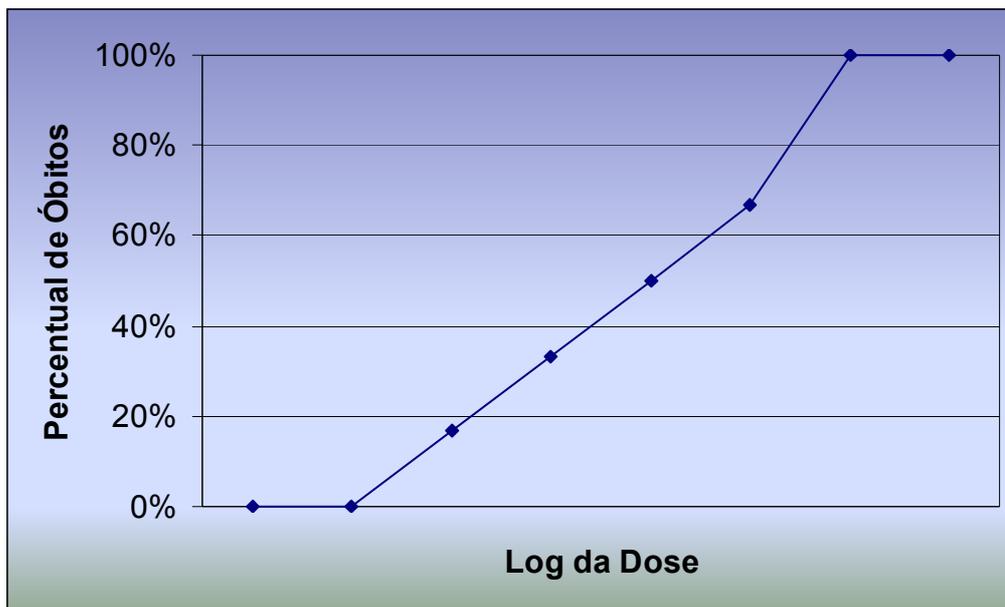


Gráfico 2- Curva Dose-Resposta da toxicidade do EH de *Mirabilis Jalapa* Linn.



FIGURAS

Figura 1 - Baço apresentando atrofia dos folículos linfóides e congestão esplênica. Animal tratado com dose de 3,0 g/kg. Corado com HE e objetiva de 25x.

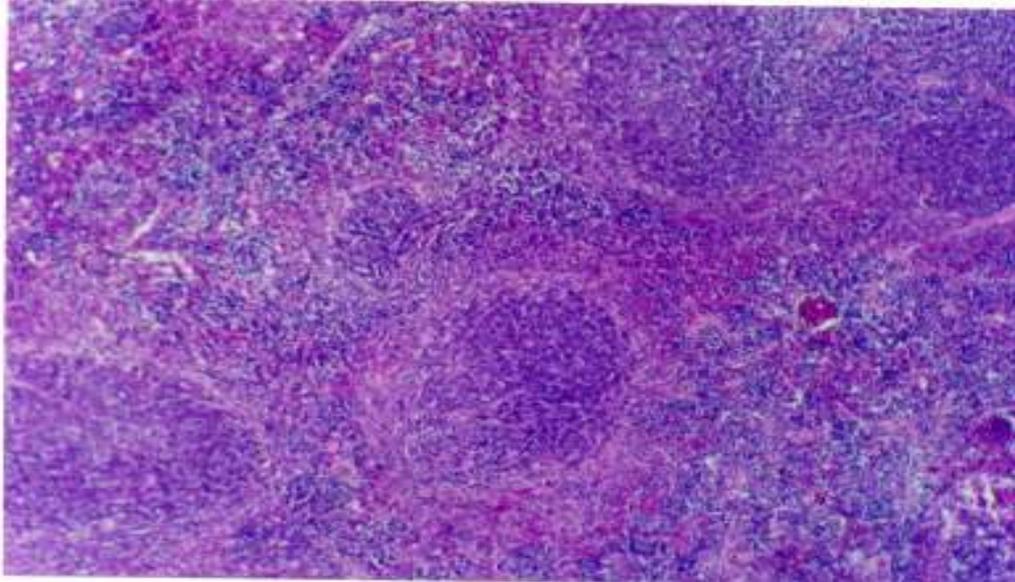


Figura 2 - Rins apresentando intensa congestão renal (intersticial e glomerular), tumefação do epitélio tubular e atrofia glomerular. Animal tratado com dose de 3,0 g/kg. Corado com HE e objetiva de 40x

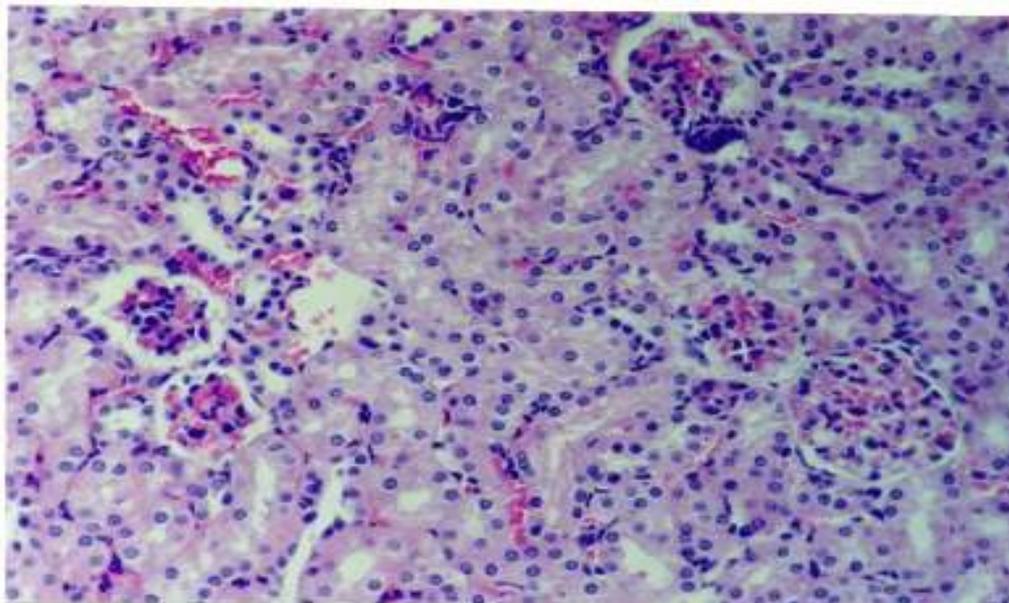


Figura 3 - Fígado apresentando intensa congestão sinusoidal. Animal tratado com dose de 1,0 g/kg. Corado com HE e objetiva de 25x.

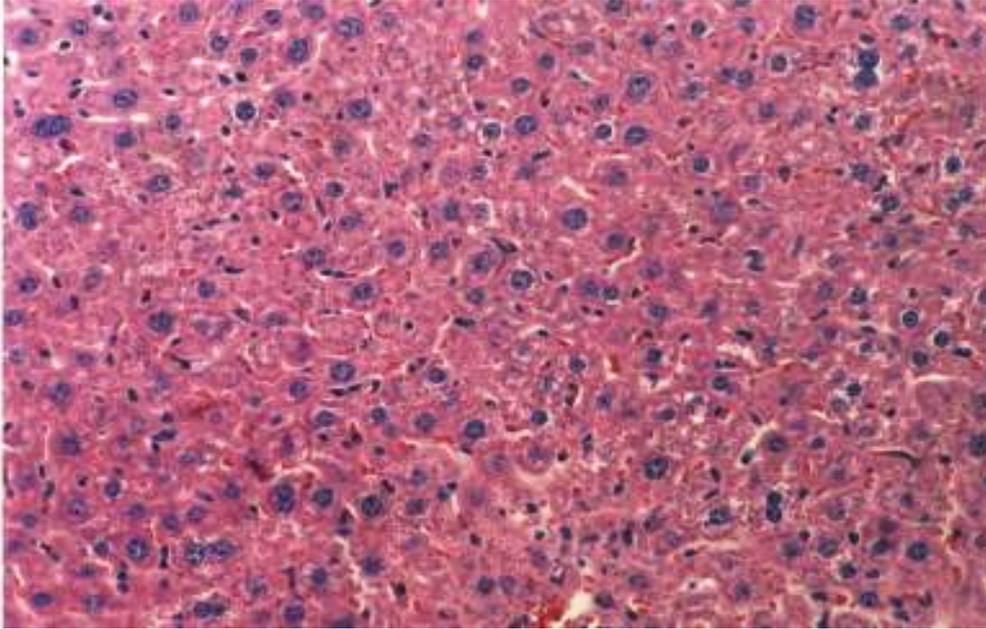
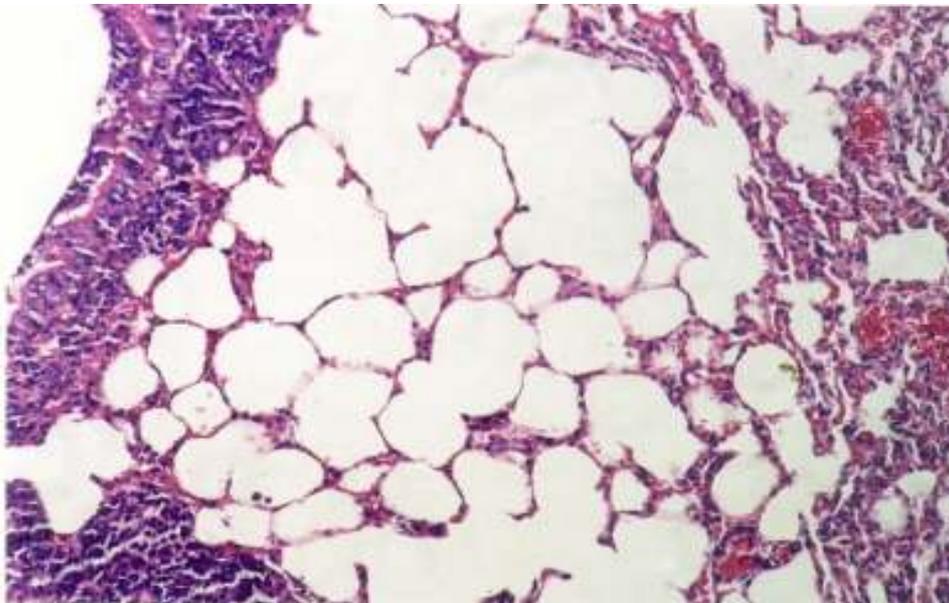
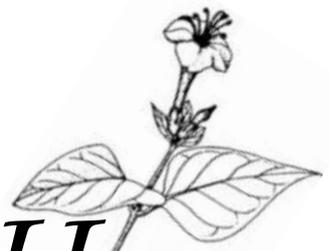


Figura 4 - Pulmão apresentando intensa congestão, áreas hemorrágicas e enfisema. Animal tratado com dose de 1,0 g/kg. Corado com HE e objetiva de 40x



5. Artigo II



Artigo enviado à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

ESTUDOS PRELIMINARES DAS PROPRIEDADES ANTIINFLAMATÓRIA DA *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae)

*L. T. Rocha¹, E. C. B. Silva¹, A. C. P. Silva¹, D. R. M. Moreira³, H. S. Xavier¹, D. J. Brondani³, J. A. Souza²

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife - PE, Brasil

²Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife - PE, Brasil.

³Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos (LABSINFA)_Departamento de Ciências Farmacêuticas_ Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife - PE, Brasil

Resumo

O extrato hexânico das folhas de *Mirabilis jalapa* foi investigado em seu potencial antiinflamatório, nas doses de 62,5 mg/kg, 125 mg/kg, 225 mg/kg e 250 mg/kg por via intraperitoneal, e nas doses de 125mg/kg, 225 mg/kg e 250 mg/kg, por via oral, respectivamente. O modelo experimental utilizado foi o edema de pata induzido pela carragenina, em ratas fêmeas, divididas em grupos de n=5. Por via oral não houve uma diminuição considerável dos volumes de edema de patas dos roedores, enquanto por via intraperitoneal, nas maiores doses, houve inibição significativa na fase final da inflamação.

Palavras-chave: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; Atividade antiinflamatória; ratos; edema de pata.

*Contato com o autor: Rua prof. Arthur Sá, S/N, Cidade Universitária, Cep: 50.740-520, Recife-PE, Brasil/Tel: (55) 81- 2126-8511/ fax:(55)81-2126-8510/ E-mail address: laura_tho@yahoo.com

Abstract

The hexanic extract of leaves of *Mirabilis jalapa* was investigated for anti-inflammatory activities at doses of 62, 5 mg/kg, 125 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg body weight by intraperitoneal administration and at doses of 125 mg/kg, 225 mg/kg and 250 mg/kg by oral form, respectively. The experimental model used carrageenan-induced hind paw edema in female rats. These were divided into groups, each comprised by five animals (n=5). The rodents treated *per os* did not show significant reduction of the edema, whereas the animals treated intraperitoneally _manifested significant inhibition of the edema, specially those receiving higher doses and at the final phase of the inflammatory state.

Key-words: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; anti-inflammatory activity; rats; paw edema.

1. Introdução

M. jalapa é uma herbácea ereta, profundamente ramificada, nativa da América Tropical, sendo amplamente cultivada com fins decorativos no Brasil _ onde se tornou espontânea e é conhecida como bonina ou maravilha (CÔRREA, 1984).

Seu uso é difundido na medicina tradicional de muitos países para o tratamento de infecções, inflamação, edemas, conjuntivite, sendo também empregada como diurética, purgativa, tônica, antiespasmódica, vermífuga e antifúngica (ALMEIDA, 1993). Estudos desenvolvidos para determinar seus componentes ativos mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e esteróides (YANG *et al.* 2001; ANSARI *et al.* 2000; SIDDIQUI *et al.* 1990)

Diversos relatos da literatura configuram o extrato das folhas e caule de *M. jalapa* como sendo capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas (*Escherichia coli*) e fúngicas (*Candida albicans*) (BOLOGNESI, 2002; YANG, 2001; DIMAYUGA, 1998; CAMMUE, 1992; KATAOKA, 1991; KUSAMBA, 1991; HABUKA, 1989). Estes pesquisadores atribuem a atividade antimicrobiana e antiviral desse vegetal à

presença de proteínas de inativação ribossômica do tipo I (RIP's), especificamente a MAP (Mirabilis Antiviral Protein). WONG *et al.* (1992) demonstraram que o extrato das raízes do vegetal é dotado de propriedade abortiva. As sementes e raízes, também são citadas por suas características laxantes e por seu efeito diurético (NAIR *et al.* 2005; DIMAYUGA *et. al.*, 1998).

Buscou-se avaliar o extrato das folhas de *Mirabilis jalapa* tendo em vista a diversidade do uso popular da mesma, de forma a validar em termos científicos a veracidade do constatado tradicionalmente.

2. Materiais e Métodos

As folhas de *Mirabilis jalapa* L. foram coletadas de espécimes cultivados no jardim Departamento de Turismo e Hotelaria da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O material vegetal foi devidamente identificado pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, depositando-se uma exsicata no herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob número 41.766.

2.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, *Rattus norvegicus* var. Albinus, com 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos e do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal Pernambuco, processo n° 23076.014522/2005-23.

2.2. Material Botânico

As folhas de *Mirabilis jalapa* L. foram coletadas de espécimes cultivados no jardim Departamento de Turismo e Hotelaria da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O material vegetal foi devidamente identificado pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, depositando-se uma exsicata no herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob número 41.766.

2.3. Obtenção do extrato

As folhas de *M. jalapa* foram secas em estufa com circulação de ar (45 °C) durante 24 horas, sendo então pulverizadas e submetidas à maceração com metanol durante 12h. Após eliminação do solvente a vácuo e a temperatura ambiente (25 °C), o resíduo resultante foi exaustivamente tratado com n-hexano. A fração n-hexânica após eliminação do solvente, foi então submetida aos ensaios aqui descritos.

2.4. Edema de pata induzido por carragenina

Foram utilizadas ratas adultas, pesando 230 g \pm 30, divididas aleatoriamente em grupos de cinco. Os animais foram privados de alimentação por um período de 18 horas antes do experimento, com água *ad libitum*. Utilizou-se o modelo de inflamação aguda, conhecido como edema de pata induzido por carragenina (WINTER *et al*, 1962) por ser um método rápido, estável e servir de *screening* para descoberta de novas drogas antiinflamatórias (MASCOLO *et al*, 1997; HENRIQUES *et al.*, 1987). Inicialmente, realizou-se a mensuração da pata traseira direita dos animais; para posterior indução do edema na respectiva pata de todos os animais por uma injeção subplantar de 0,1ml de carragenina (Sigma product) a 0,1%.

Trinta minutos após foi realizada uma nova mensuração das patas edemaciadas utilizando pletismômetro adaptado. Administrou-se por via oral e intraperitoneal solução salina nos grupos controles, e nos tratados, solução aquosa do resíduo do extrato hexânico das folhas de *M. jalapa* (REHM) nas doses de 62,5, 125, 225, 250 mg/kg (v.i.p) e 125, 225, 250 mg/kg (v.o.) de peso corpóreo, estipuladas a partir da DL₅₀.

Ao grupo padrão administrou-se * indometacina® (MERCK/SHARP) nas doses de 10 mg/kg (VIP) e 20 mg/kg (VO) de peso corpóreo, por ter propriedades antiinflamatórias, semelhantes às dos salicilatos (GILMAN *et al.*2003). Efetuou-se a mensuração da pata edemaciada, a cada 60 minutos, durante 6 horas. O percentual de inibição foi calculado através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição do edema} = (V_c - V_t / V_c) \times 100$$

Onde:

V_c = média do aumento do volume das patas dos animais do grupo controle;

V_t = média do aumento do volume das patas dos animais do grupo tratado.

*Indometacina®: (1-[p-chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid) inibidor da ciclooxigenase C₁₉H₁₆Cl NO₁₄/ P.M. 357.8_ Catálogo ICN/1999 (USA).

2.5. Análise Estatística

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m.) e testados com análise de variância (ANOVA) e teste “t” Student, para avaliar as diferenças entre os grupos tratados e controles, com nível de significância de p<0,05 nos testes antiinflamatórios.

2.6. Resultados

Os gráficos 1 e 3 referem-se à comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratas tratadas por via intraperitoneal com as soluções de REHM ensaiadas e o gráfico 2, por via oral, com a solução citada anteriormente.

Os animais tratados com o fármaco padrão (indometacina), apresentaram redução do volume do edema a partir da terceira hora, com 21% de inibição atingindo o máximo de 45,33%. Para as ratas tratadas com a solução REHM, na dose de 62,5 mg/kg, a redução variou entre 12,26% e 26,6%, a partir da terceira hora. Para a dose de 250 mg/kg, com valores de inibição significantes também a partir da terceira hora, a variação foi de 18% a 46,6% (Gráfico 1). Nas doses de 125mg/kg e 225 mg/kg, houve inibição significativa somente a partir da quarta hora, com valores de 12,6% e 24,36%, respectivamente, quando comparados com seu grupo controle.

No gráfico 2, para as ratas tratadas com a solução de REHM, na dose de 125, 225 e 250 mg/kg, respectivamente, não houve redução significativa dos volumes dos edemas quando comparados ao grupo controle.

2.7. Discussão

Desde que WINTER *et al.* (1962) introduziu a carragenina como agente flogístico para o modelo de edema da pata do rato, este se tornou o teste mais utilizado em todos os estudos que envolvem os processos para *screening* de compostos antiinflamatórios (HENRIQUES *et al.*, 1987). O edema de pata induzido pela injeção subplantar de carragenina em ratos é bifásico, o que na primeira fase (1h), há liberação de serotonina e histamina e, na segunda fase (após a primeira hora), é mediado pelas

prostaglandinas, produto da ativação das ciclooxigenases (COX-2) e de óxido nítrico (NO), na resposta inflamatória (VINEGAR *et al.*, 1969; SALVEMINI, 1996).

A atividade das soluções de REHM por via intraperitoneal na formação do edema, está provavelmente, envolvido com a inibição da síntese ou liberação de produtos na fase final da resposta inflamatória induzida por carragenina.

Houve inibição da segunda fase da resposta inflamatória do grupo tratado com indometacina por ser um potente inibidor das ciclooxigenases (GILMAN *et al.* 2003).

Já por via oral, não houve inibição significativa dos grupos tratados com a solução de REHM em qualquer das doses testadas: 125 mg/kg, 225 mg/kg e 250 mg/kg, o que pode estar relacionado à concentração dose-resposta, como a farmacocinética da absorção oral. Talvez também haja inativação dos compostos ativos da REHM por enzimas do trato digestivo, por sais / ácidos biliares. Ou, ainda, os compostos sejam excretados através dos rins ou do intestino, após a metabolização. Com isto, sugerimos continuidade dos testes sob outras formas de solução (gel/pomadas) e/ou maiores estudos sobre as vias de excreção destes metabólitos da solução aqui citada em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R. “Plantas Medicinais Brasileiras: Conhecimentos Populares e Científicos”. Hermus Editora, p.12-15, 1993.

ANSARI, S.H.; ALI, M. Phytochemical Investigation on *Mirabilis jalapa*. Fac Pharmacy Jamia Hamdard New Delhi, Índia. *Hamdard Méd*, 433: 65-67, 2000.

BOLOGNESI A.; POLITO, L.; LUBELLI, C.; BARBIERI, L.; PARENTE, A.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.16, p.13709-13716, 2002.

CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS, F.R.G.; DAME, J.V.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W. Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L. Seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, n.4, p. 2228-2233, 1992.

CORRÊA, M. Pio. “Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas”, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Vols III, 1984.

DIMAYUGA, RE. Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur/Mexico. *Pharmaceutical Biol* 36: 33-43, 1998.

GOODMAN & GILMAN.”As bases farmacológicas da terapêutica”. 10ª Ed., McGraw-Hill, 2003.

HABUKA, N.; KIYOTAKA, A.; HIDEAKI, T.; MIYANO, M.; MATSUMOTO, T.; NOMA, M. Expression and Secretion of *Mirabilis* Antiviral Protein in *Escherichia coli* and Its Inhibition of in Vitro Eukaryotic and Prokaryotic Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 265, n. 19, p. 10988-10992, 1990.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema. A new model for inflammation?. *Brazilian J Med Biol Res*. Vol. 20: 243-249, 1987.

KATOKA, J.; HABUKA, N.; FURUNO, M.; MIYANO, M.; TAKANAMI, Y.; KOIWAI, A. 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*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n.13, p. 8426-8430, 1991.

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

MASCOLO, N. ET AL. Biological screening of Italian Medicinal plants anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research*. 1, 28-32, 1997.

MASCOLO. L.; "Investigación Fitoquímica"; Fondo Editorial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima: Peru, 1994.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric Oxide: a key mediator in the early and the late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 1158, 829-898, 1996.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q. ; BEGUM, S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*. 615: 471, 1990.

WINTER, C. A.; RISHLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced edema en hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 3, p. 544-547, 1962.

WONG, R.N.; CHAN, S.H.; DONG, T.X.; YEUNG, H.W.Characterization of Mirabilis antiviral protein-a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa* L. *Biochem. Int.*, vol. 28, n.4, p. 585-593, 1992.

VINEGAR, R. *et al.* Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 166, 96-103, 1969.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa* .*J.Nat.Product* 64, 313-317, 2001.

GRÁFICOS

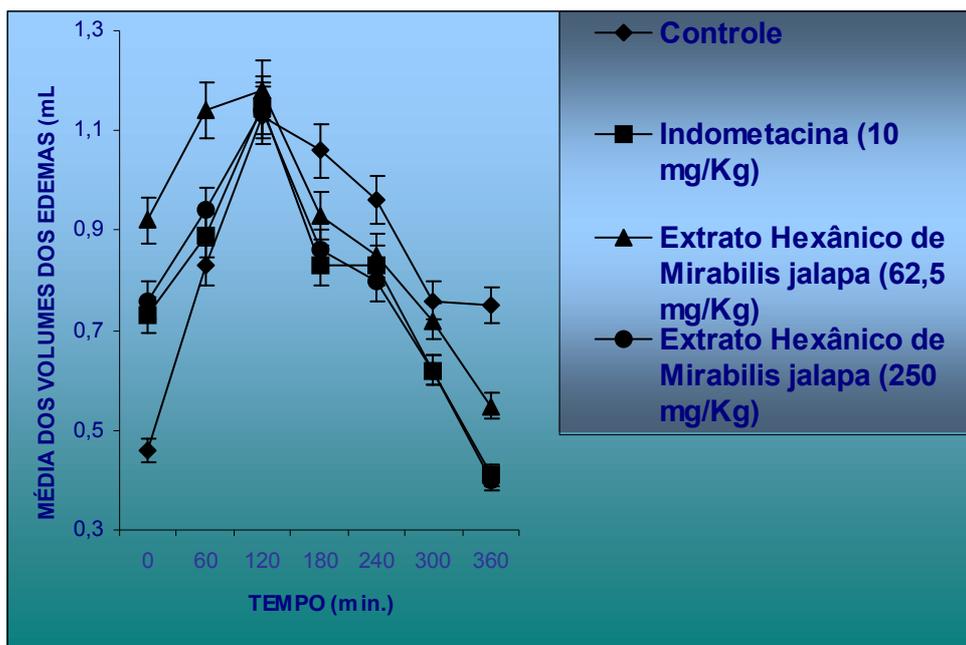


Gráfico 1 – Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratos tratados por VIP, com o extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* nas dose de 62,5 mg/kg (▲), 250 mg/kg (●), indometacina 10 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (◆). Os valores representam a média do volume da pata (ml) ± EPM.

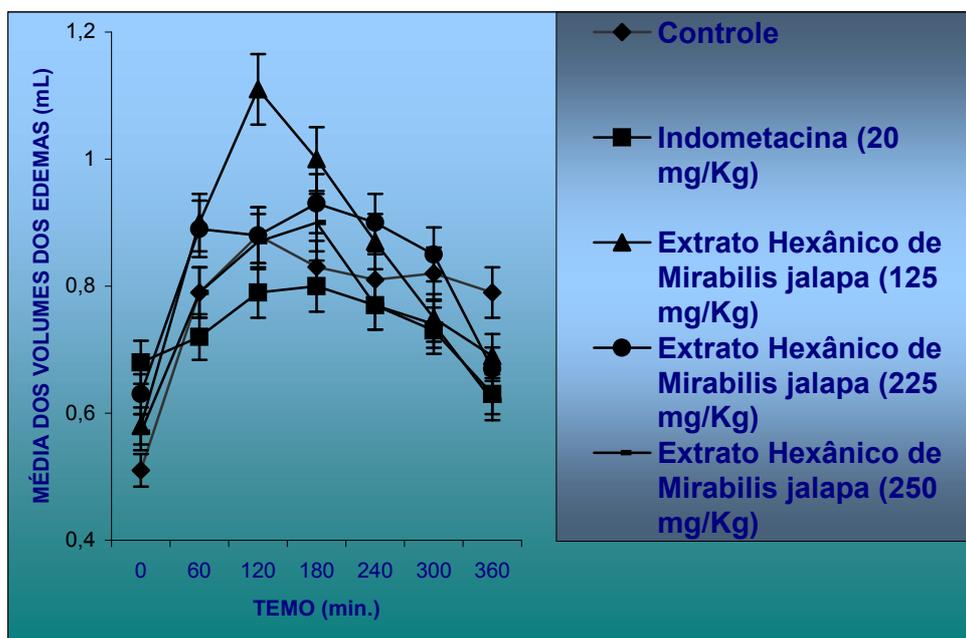


Gráfico 2 – Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratos tratados por VO, com o extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* nas dose de 125 mg/kg (▲), 225 mg/kg (●), indometacina 20 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (◆). Os valores representam a média do volume da pata (ml) ± EPM.

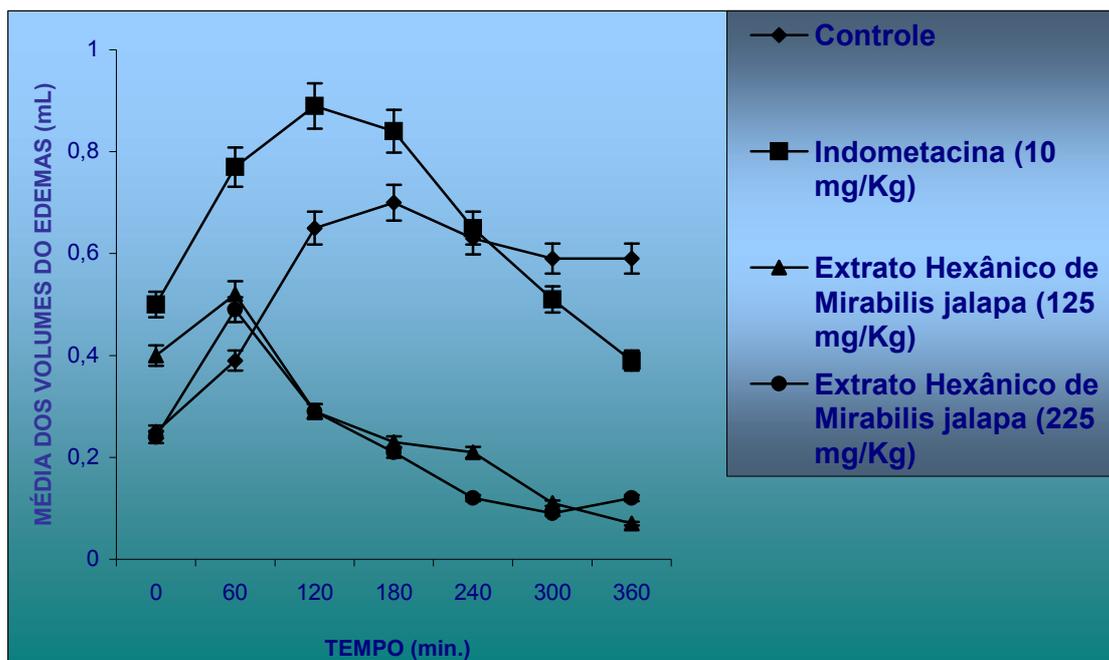


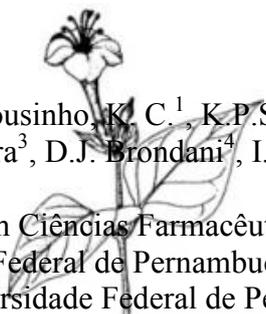
Gráfico 3 – Comparação do desenvolvimento do edema de pata por injeção subplantar de carragenina, em ratos tratados por VIP, com o extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* nas dose de 125 mg/kg (▲), 225 mg/kg (●), 250 mg/kg (◐), indometacina 10 mg/kg (■) e solução salina 0,9% (♦). Os valores representam à média do volume da pata (ml) \pm EPM.

6. Artigo III

Artigo a ser submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



**EFEITOS DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae)
SOBRE O CRESCIMENTO DE S-180 EM CAMUNDONGOS**



***L.T. Rocha**¹, E.C.B. Silva¹, Mousinho, K. C.¹, K.P.S. Cavalcanti², F. L. dos Santos³,
M.F. Pereira³, D.J. Brondani⁴, I.A. Souza⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, Brasil.

²Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife-PE, Brasil.

³Área de Patologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

⁴Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos (LABSINFA)_ Departamento de Ciências Farmacêuticas_ Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil

⁵Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

Resumo

A atividade antitumoral do extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae), foi investigada usando o tumor Sarcoma 180 (S-180). Os animais eram inoculados com o tumor e após 48h iniciavam-se os ensaios. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas tratados por via intraperitoneal nas doses de 100, 125, 225 e 250 mg/kg do extrato de *M. jalapa*. Após o 7º dia, os animais eram sacrificados, os tumores pesados e realizado o exame histopatológico dos órgãos. Os resultados indicaram uma inibição significativa de até 80,36% dos tumores sarcomatosos em relação ao grupo controle e padrão ($P < 0.05$). A avaliação histopatológica demonstrou alterações nos tecidos hepático, renal e pulmonar, quando comparados com os animais dos grupos controle e padrão.

Palavras chave: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; atividade antitumoral; camundongos; exame histopatológico.

*Contato com o autor: Rua prof. Arthur Sá, S/N, Cidade Universitária, Cep: 50.740-520, Recife-PE, Brasil/Tel: (55) 81- 2126-8511/ fax:(55)81-2126-8510/ E-mail address: laura_tho@yahoo.com

Abstract

The antitumoral activity of the residue of *Mirabilis jalapa* L. leaves hexanic extract was investigated using sarcoma 180 (S-180). The assays were conducted with female Swiss albino mice (*Mus musculus*), by implanting fragments of S-180. After 48 hours, the rodents were divided into 6 groups (n=5) and were treated daily by intraperitoneal injection, during 7 (seven) days, at doses 100; 125; 225 e 250 mg/kg body weight of the said *M. jalapa* extract. Seven days after beginning of the treatment, the rodents were sacrificed and submitted to necropsy. Their tumors were excised and afterwards weighted, measured and submitted to histopathological studies. The results indicated a significant inhibition up to 80,36% of the S-180 tumors, compared to the standard and control groups (P< 0,05). The histopathological evaluation showed alterations in liver, renal and pulmonary tissues of the rodents treated with *M.jalapa* extract compared to organs obtained from mice of the standard and control groups.

Keywords: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; antitumoral activity; mice; histopathological evaluation.

1. Introdução

Uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, o câncer, continua sendo responsável por cerca de seis milhões de óbitos por ano, além da segunda maior causa de morte por doença no Brasil (GUERRA *et al.*, 2005; INCA, 2003).

As plantas contêm princípios ativos capazes de nos curar das diversas doenças, no entanto, são poucos os estudos que possibilitam uma visão ampla da grande diversidade das espécies utilizadas com fins terapêuticos (SILVA *et al.*, 2005).

Um grande número de produtos naturais tem sido estudado por sua atividade antitumoral em vários modelos experimentais. Isto resultou no surgimento de várias drogas anticâncer efetivas (RAMAKRISHNA *et al.* 1984).

A *Mirabilis jalapa* (Nictaginaceae) é uma planta herbácea perene, de folhas simples e ovais, altamente ramificada, de flores variando de cores brancas a avermelhadas e matizadas, de involúcro parecendo cálice, cultivada e distribuída como planta ornamental nativa da América Tropical. No Brasil, encontra-se da Bahia até o Paraná, onde se tornou espontânea e conhecida como bonina ou maravilha (CÔRREA, 1984).

Estudos desenvolvidos para determinar seus componentes fitoquímicos ativos mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e esteróides (YANG *et al.* 2001; ANSARI *et al.* 2000; SIDDIQUI *et al.* 1990). Tanto os flavonóides quanto os alcalóides, triterpenos e esteróides, possuem significativas atividades biológicas, como hepatoprotetores, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, antivirais e antitumorais (MENDES, 2004; SIMÕES *et al.*, 2001; DI CARLO *et al.*, 1999).

Seus extratos mais utilizados provêm do caule, raízes e folhas, onde foi descoberta a proteína MAP (“Mirabilis Antiviral Protein”), encontrada em maior concentração em suas sementes e não utilizadas na medicina fitoterápica, por conterem peptídeos neurotóxicos similares a ricina (CAMUE *et al.*, 1992). As MAP’s pertencem a um grupo de proteínas tóxicas de plantas conhecidas como RIP’s (“Ribosome Inactivating Protein”) (BARBIERI *et al.*, 1982; WONG *et al.*, 1992; KATAOKA *et al.*, 1992). Recentes estudos, sugerem que as RIP’s são também capazes de causar morte celular por apoptose (NARAYANAN *et al.* 2005). Essas proteínas, no entanto, apresentaram propriedades medicinais antivirais, antibacterianas e antifúngicas (BOLOGNESI *et al.*, 2002; CAMUE *et al.*, 1992; HABUKA *et al.*, 1989; KATAOKA *et al.*, 1991; KUSAMBA *et al.*, 1991).

Nas sementes, além do seu potencial antimicrobiano, foi verificada sua ação antitumoral *in vitro*, em células de fibroblastos de ratos (L929); sua citotoxicidade em modelo de *Artemia salina* e da larva do mosquito *Aedes aegypti* (LEELAMANIT *et al.*, 2002).

Em suas raízes, foi relatado por WONG *et al.* (1992), a MAP com propriedades abortiva, com inibição da síntese proteica e efeito antitumoral em células de coriocarcinoma (JAR). CASTELUCCI *et al.* (2004) relata inibição tumoral *in vivo* do extrato metanólico das folhas de *M. jalapa* frente ao S-180, em ensaios preliminares.

O sarcoma-180 (S-180), também conhecido como tumor de Crocker, é um tipo de tumor transplantável de crescimento rápido (ZUCKERBERG, 1972), nos animais inoculados ($\geq 90\%$), com uma taxa de regressão espontânea entre 8-10% dos casos, podendo ser aumentada pelo tratamento com certos produtos químicos e biológicos (ASSEF *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004).

A partir dessas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral da fração hexânica do extrato de *Mirabilis jalapa* L, em animais portadores de S-180.

2. Metodologia

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss, *Mus Musculus*, adultos, fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal Pernambuco, processo nº 23076.014522/2005-23.

2.3. Material Botânico

As folhas de *Mirabilis jalapa* L. foram coletadas de espécimes cultivados no jardim Departamento de Turismo e Hotelaria da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O material vegetal foi devidamente identificado pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, depositando-se uma exsicata no herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob número 41.766.

2.4. Obtenção do extrato

As folhas de *M. jalapa* foram secas em estufa com circulação de ar (45°C), durante 24 horas, sendo então pulverizadas e submetidas à maceração com metanol durante 12h. Após eliminação do solvente a vácuo e a temperatura ambiente (25°C), o resíduo resultante foi exaustivamente tratado com n-hexano. A fração n-hexânica após eliminação do solvente foi então submetida aos ensaios aqui descritos.

2.4. Transplante dos Tumores

Nos experimentos foi utilizada uma linhagem de células tumorais do Sarcoma 180 em sua forma sólida. Um fragmento tumoral com cerca de 3mm de diâmetro foi introduzido por via subcutânea, na região axilar do animal receptor, segundo a técnica descrita por STOCK *et al.*(1965) e FUNAYAMA e KOMAIYAMA(1993).

2.5. Tratamento dos animais

Os camudongos inoculados com células de sarcoma 180 foram divididos em grupos (n=5) e subdivididos em grupo controle (solução salina a 0,9%), grupo padrão (ciclofosfamida, 2,5 mg/kg, Genuxal®, Asta Médica) e grupos tratados com o extrato de *M. jalapa*, nas doses de 100, 125, 225 e 250 mg/kg, respectivamente, durante 7 dias, por via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado 48 horas após o transplante dos tumores. Os animais foram sacrificados no oitavo dia e os tumores foram retirados, dissecados, pesados e em seguida calculada a diferença entre os grupos tratados e controle para o índice de inibição tumoral com a seguinte fórmula (MACHON *et al.*, 1981):

$$TWI\% = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI%= % de inibição tumoral

C= Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle

T= Média dos pesos dos animais do grupo teste.

2.6. Estudo Histológico

Os tumores e os órgãos eram removidos e fixados em solução de formol a 10%. Os órgãos retirados para exame foram: fígado, rins, baço e pulmões, para avaliação macroscópica e posterior fixação em formaldeído a 10%, em solução neutra. Após 24h de fixação das amostras, as peças eram lavadas e processadas para inclusão em parafina, em seguida cortadas com 7µm de espessura, e coradas segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina, para serem posteriormente observadas em microscopia de luz.

2.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e testados com análise de variância (ANOVA) e teste “t” Student, para avaliar as diferenças entre os grupos tratados e controles com nível de significância de $p < 0,05$ nos testes antitumorais.

2.8. Resultados

O tratamento em camundongos fêmeas portadoras de sarcoma 180 apresentou índice de inibição significativa máxima de 80,36% na dose de 225 mg/kg, com resultados significativos em todas as doses testadas: 100mg/kg, 125 mg/g e 250 mg/kg (73,13%, 74,85% e 79,44%), respectivamente. (Gráficos 3, 1, 2 e 4).

O fármaco-padrão utilizado para tratar este tumor, a ciclofosfamida (Genuxal®), atingiu índices de inibição significativa máxima de 85,20%.

No estudo histopatológico, os camundongos portadores de sarcoma S-180 apresentaram as seguintes alterações: Nos rins, edema intersticial cortical, presença de cilindros hialinos, atrofia glomerular, espessamento de cápsula, tumefação celular e metástase na gordura perirenal e cápsula (figura 5). No grupo-padrão, a nefrite multifocal se apresentava mais severa (extensão), congestão glomerular com tumefação tubular e cortical, além da presença de hemorragia nas regiões citadas, sem a presença de metástases.

No fígado foi evidenciada congestão de sinusóides, cariomegalia, áreas de necrose focal isquêmica por coagulação, hiperplasia das células de Kupffer e presença de metástase, principalmente nos animais do grupo controle e tratado (figura 6). No grupo padrão houve presença de necrose multifocal, discreta congestão sinusoidal, no

entanto, não houve presença de metástase.

No baço, foi observada congestão, rarefação das células linfóides e metástase em cápsula esplênica no grupo-controle e tratado (figura 7). O grupo-padrão apresentou as mesmas alterações, sem a presença de metástase, no entanto, a congestão se mostrou mais severa.

Os pulmões apresentaram congestão pulmonar com espessamento de septo intraalveolar, áreas de enfisema, focos hemorrágicos e presença de metástases, tanto no grupo-controle, quanto nos grupos-tratado e padrão (figura 8).

Macroscopicamente, tanto os animais do grupo controle quanto do tratado apresentaram ascite purulenta, com aumento e congestão de todos os órgãos, sendo maior a quantidade de líquido no grupo controle. No grupo-padrão, ao exame clínico, os animais se apresentaram desidratados, com rarefação pilosa, apáticos e com palidez de mucosa mais acentuada, que quando comparado com os outros grupos-tratados.

2.9. Discussão e Conclusão

Com o crescente aumento da importância epidemiológica dos processos neoplásicos, inúmeras abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas. As categorias básicas para o tratamento são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Esta última apresenta aspecto desfavorável, devido à dificuldade em se estabelecer uma dose efetiva para destruir o máximo de células com o mínimo de efeitos colaterais para as células normais (SANTOS, 2003). Portanto, informações sobre a toxicidade das drogas são muito úteis aos clínicos quando da escolha para o tratamento do câncer (SILVA, 2002; FRANKS *et al.*, 1990).

Há relatos de fitoterápicos usados como drogas antineoplásicas. Nos últimos anos a descoberta de produtos naturais como agentes antiproliferativos tem proporcionado campos totalmente novos de investigação nesta área. A Vincristina e Vinblastina são exemplos de substâncias antineoplásicas derivadas de plantas como a *Vinca pervinca*, amplamente utilizada no tratamento quimioterápico, onde atuam durante a metáfase do ciclo celular (GOODMAN, 2003; SILVA, 2002).

A Ciclofosfamida é uma substância alquilante, derivada da síntese de análogos de mostarda nitrogenada usada no tratamento de diversos tipos de câncer. A droga é um potente imunodepressor, atuando em células com elevada atividade mitótica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto a celular (GILMAN *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004). A natureza eletrofílica desse agente alquilante, sua capacidade de reagir com outras moléculas, o seu mecanismo de oxidação no fígado por enzimas microsossomais produzindo a acroleína, associada à mielossupressão e cistite hemorrágica, resulta em efeitos tóxicos indesejáveis associados a este fármaco (THOMAS, 2003).

O extrato hexânico de *M. jalapa* foi avaliado contra a linhagem tumoral do Sarcoma 180, apresentando inibição significativa do crescimento tumoral. Os resultados obtidos de estudos morfológicos, revelaram que os animais tratados apresentaram resposta do tipo dose-dependente à ação lesiva dos tumores em comparação aos animais controle. A presença das metástases, como sugere DAGLI (1989), se deve possivelmente ao potencial das células utilizadas, sua diversidade e tipo histológico. As alterações histopatológicas em órgãos como os rins, baço, fígado e pulmões, podem estar relacionadas aos sinais de toxicidade da planta, tanto quanto à presença do tumor. Os animais do grupo-padrão, tratados com Genuxal® (Asta, Médica), não tiveram metástases em órgãos como os rins, baço e fígado, no entanto, suas alterações foram

muito mais severas, demonstrando sua toxicidade de acordo com a literatura consultada.

Os animais do grupo tratado com a maior dose (250 mg/kg) apresentaram os mesmos resultados anatomopatológicos observados no grupo tratado com o fármaco padrão (Gráfico 4). No entanto, sua inibição significativa em relação ao grupo (225 mg/kg) não teve aumento considerável em relação aos pesos, o que sugeriu a possibilidade da equivalência em relação à dose terapêutica, implicando em uma diminuição de toxicidade (Gráfico 3).

Sendo assim, pode-se sugerir que o extrato hexânico de *M. jalapa*, obteve uma inibição tumoral significativa em relação aos animais portadores de Sarcoma 180. Ao verificar em seus componentes fitoquímicos e protéicos, moléculas com propriedades antineoplásicas, conclui-se quanto à necessidade de novos estudos e pesquisas para um melhor conhecimento de seu mecanismo de ação e potencialidades farmacológicas aqui investigadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARI, S.H.; ALI, M. Phytochemical Investigation on *Mirabilis jalapa*. Fac Pharmacy Jamia Hamdard New Delhi, Índia. *Hamdard Med*, 433: 65-67, 2000.

ASSEF, M.L.M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; MORETÃO, M.P.; AZAMBUJA, A.P.; IACOMINI, M.; BARBIERI, L.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. *Cancer Surv* 1: 489-520, 1982.

BOLOGNESI A.; POLITO, L.; LUBELLI, C.; BARBIERI, L.; PARENTE, A.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.16, p.13709-13716, 2002.

BUCHI, D.F. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an α -D- Glucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Braz. J. morphol. Sci.*, 19 (2), 49-54, 2002.

CAMMUE, B.P. A.; DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS, F.R.G.; PROOST, P.; DAMME, J.V.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L. Seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.267, n.4, pp. 2228-2233, 1992.

CASTELUCCI, E.; PORTO, I.; MACIEL, J.; RAYANE, K. Avaliação da atividade antitumoral de extrato metanólico de folha de *Mirabilis jalapa* (bonina) contra o Sarcoma 180. Monografia. In: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

CORRÊA, M. Pio. "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas", Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Vols III, 1984.

DAGLI, M.L. Z. Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental. Dissertação de mestrado. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil, pp. 32-46, 1989.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65 (4): p. 337-353, 1999.

FRANKS, L. M., TEICH, N.M. "Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer". São Paulo: Roca. P. 349-361, 1990.

FUNAYAMA, S. and KUMAYAMA. Antitumor Agents, In: "Search of Bioactive Compounds from Microorganisms". Satoshi Omura (edt.), Springer-Verlag, New York. 5, 79-97, 1993.

GARCIA, M., SERTÓRIO, S.P., ALVES, S.C.C., CARNEIRO, R.; LALLO, M.A. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (3): 115-119, 2004.

GOODMAN and GILMAN. “As bases farmacológicas da terapêutica”. 10ª Edição, McGraw-Hill. 1035- 1113 p, 2003.

GUERRA MR, MOURA GALLO CV, MENDONÇA GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 51(3): 227-234, 2005.

HABUKA, N.; KIYOTAKA, A.; HIDEAKI, T.; MIYANO, M.; MATSUMOTO, T.; NOMA, M. Expression and Secretion of Mirabilis Antiviral Protein in *Escherichia coli* and Its Inhibition of in Vitro Eukaryotic and Prokaryotic Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 265, n. 19, p. 10988-10992, 1990.

INCA_Instituto Nacional do Câncer. “Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer”. Rio de Janeiro. 2003.

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

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

MACHON, S.; KUOZYNSKI, L.; CIELDAOWSAKI, Y.; WEICZSEK.; ZIMECKI, M.; BLASCZY, B.; MORDANKI, M.; WICZORSK; FIOZERRALISZEWASKA, L. Chemical and Biological properties of 2 pyridielbenzil- carbinol. *Achiv in Immunologiae it Therapie Experimentalis*, 29, v. 2, 217-233 p, 1981.

MENDES, C. L. A. “Triterpenóides e sua atividade antinflamatória”. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova Lisboa, Portugal. 2004.

NARAYANAN, S.; SURENDRANATH, K.; BORA, N.; SUROLIA, A.; KARANDE, A. A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS letters* 579, vol. 6: p. 1324 – 1331, 2005.

RAMAKRISHNA, Y.; MAHONOR, A.I.; MAMATA, P.; SHREEKANT, K.G. Plants and novel antitumour agents: A review. *Indian Drugs*, 21: 173-185, 1984.

SATO, D. ; WAL, R.; OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. *Homeopathy*, 94, 26-32, 2004.

SANTOS, N. P. Nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* com potencial antitumoral. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. 124 p, 2003.

SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q. ; BEGUM, S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*. 615: 471, 1990.

SILVA, A.C.O.; ALBUQUERQUE, U.P. Woody medicinal plants of caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasílica*, 19: 2738, 2005.

SILVA, P. "Farmacologia". 6ed. Ed. Guanabara Koogan.: Rio de Janeiro, p.241. 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ,L.A.; PETROVICK,P.R. "Farmacognosia da planta ao medicamento". 4 ed., Porto Alegre:Ed. da Universidade Federal do rio Grande do Sul. 2001.

STOCK, K.TUMOR TRANSPLANTATION. Gay, W.I.; Methods of animal Experimentation. V.2. Cap. 3, *Academic Press*, New York and London. p 171-221, 1965.

SUGIURA K, STOCK CC. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Research*, v.2, pp, 1954.

THOMAS, G. "Química Medicinal_ uma introdução". Edt. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. P 320-322, 2003.

WONG, R.N.; CHAN, S.H.; DONG, T.X.; YEUNG, H.W.Characterization of Mirabilis antiviral protein-a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa* L. *Biochem. Int.*, vol. 28, n.4, p. 585-593, 1992.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*. *J. Nat. Prod.* 64: (3) 313-317, 2001.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. *Cancer Research*, Philadelphia, v.33, p.2278-2282,1973.

GRÁFICOS E FIGURAS

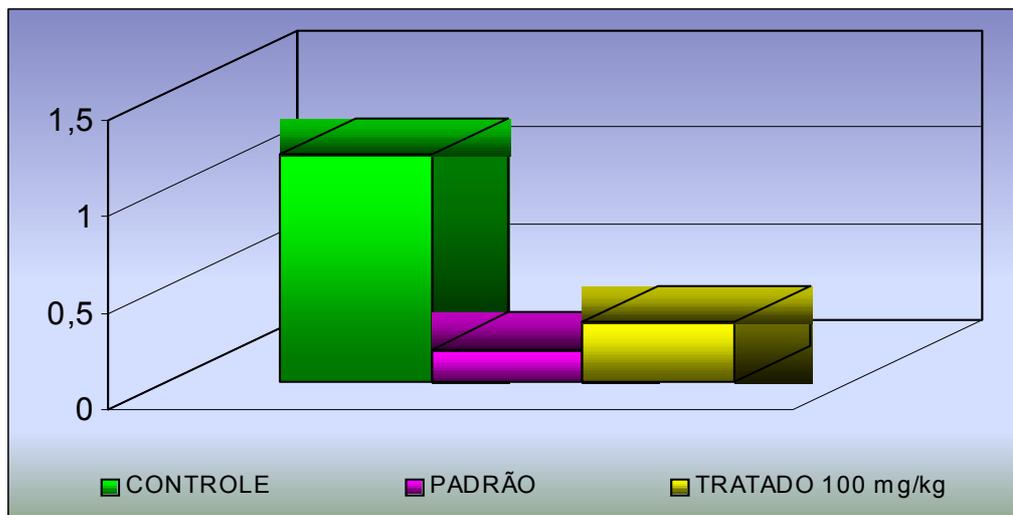


Gráfico 1 – Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* na dose de 100mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

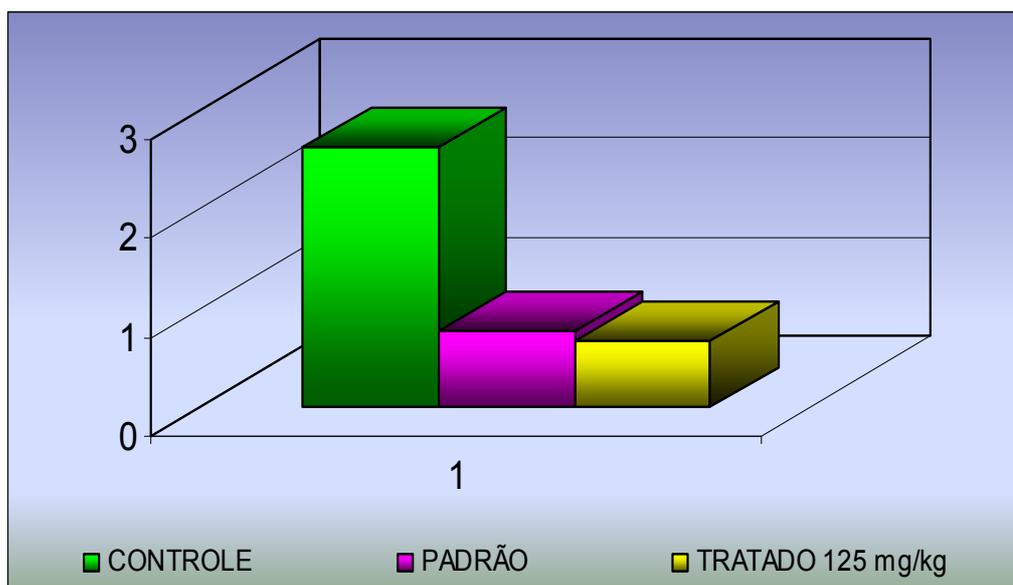


Gráfico 2 – Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* na dose de 125mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

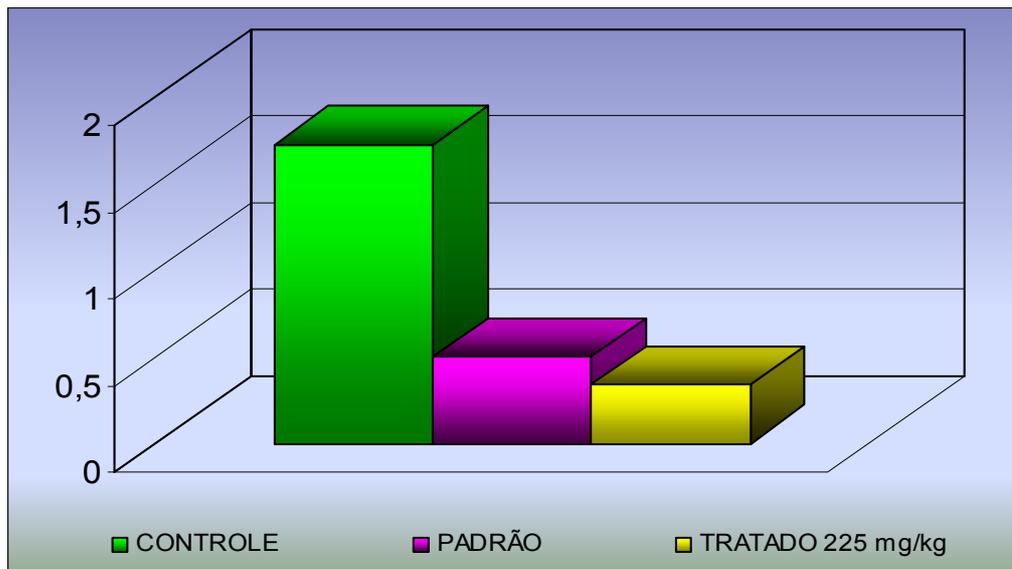


Gráfico 3 – Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o EH de *Mirabilis jalapa* nas dose de 225mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

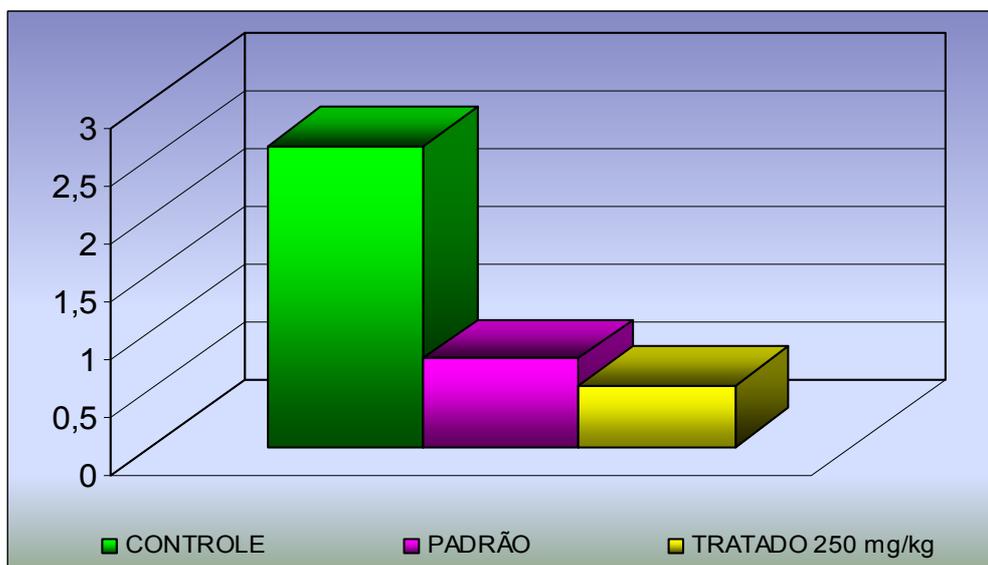


Gráfico 4 – Peso dos tumores (Sarcoma 180) em camundongos fêmeas, tratados por VIP com o EH de *Mirabilis jalapa* na dose de 250mg/kg (▲), padrão (ciclofosfamida: 2,5 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).



Figura 1- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180 grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* na dose de 100mg/kg, (tratado 1), com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão, (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg.).



Figura 2- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180 grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 125 mg/kg (tratado 2) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão, (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg.).



Figura 3- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180 grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 225 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão, (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg.).



Figura 4- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com Sarcoma 180 grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 250 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão, (ciclofosfamida na dose de 2,5 mg/kg.).



Figura 5- Fotomicrografia do rim de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) presença de cilindros e congestão renal. (b) Metástase renal. Corado com HE em objetiva de 25x.

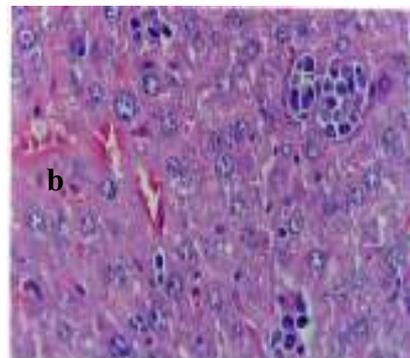
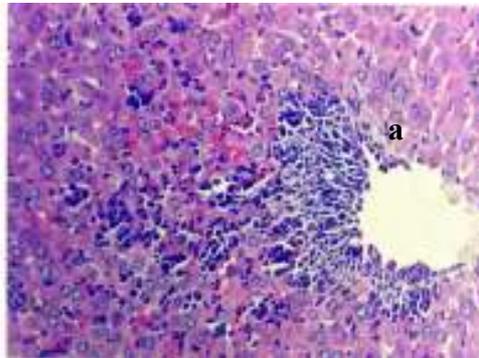


Figura 6- Fotomicrografia do fígado de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) metástase perivascular, congestão sinusoidal. (b) figuras de necrose, presença de hepatócitos binucleados. Corado com HE em objetiva de 25 e 40x, respectivamente.

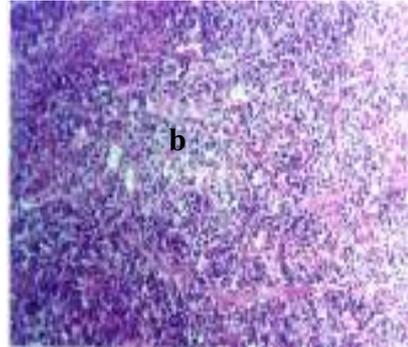
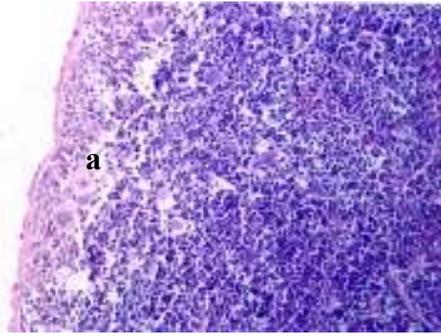


Figura 7- Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) Presença de congestão esplênica. (b) Depleção de células linfóides. Corado com HE em objetiva de 25 e 40x, respectivamente.

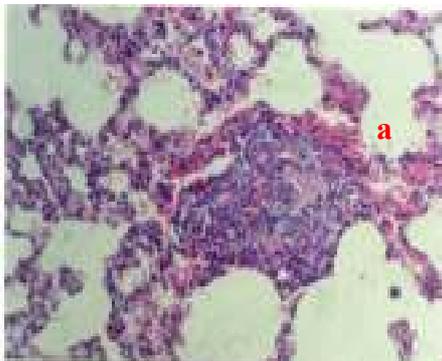
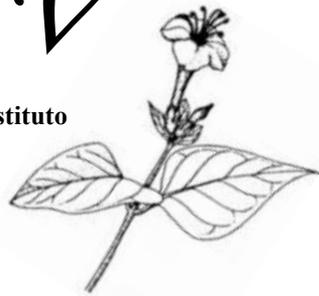


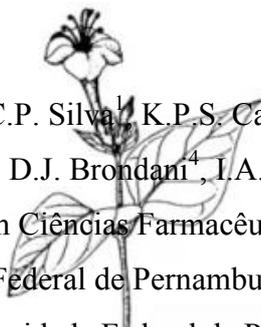
Figura 8- Fotomicrografia do pulmão de camundongo fêmea, portador de Sarcoma 180, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) Metástase pulmonar. (b) Área de enfisema e hemorragia pulmonar. Corado com HE em objetiva de 40 e 25x, respectivamente.

7. Artigo IV

**Artigo a ser submetido à Revista Memórias do Instituto
Oswaldo Cruz**



**EFEITOS DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae)
SOBRE O CRESCIMENTO DO CARCINOMA DE EHRlich EM
CAMUNDONGOS.**



***L.T. Rocha**¹, E.C.B. Silva¹, A.C.P. Silva¹, K.P.S. Cavalcanti², F. L. dos Santos³, M.F. Pereira³, D.J. Brondani⁴, I.A. Souza⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife-PE, Brasil.

²Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife-PE, Brasil.

³Área de Patologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

⁴Laboratório de Planejamento, Avaliação e Síntese de Fármacos (LABSINFA)_Departamento de Ciências Farmacêuticas_ Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife-PE, Brasil

⁵Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE. Recife-PE, Brasil.

Resumo

A atividade antitumoral do extrato hexânico de *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae), foi investigada usando o tumor de Ehrlich. Os animais eram inoculados com o tumor e após 48h iniciavam-se os ensaios. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*) fêmeas tratados por via intraperitoneal nas doses de 100, 125, 225 e 250 mg/kg do extrato de *M. jalapa*. Após o 7º dia, os animais eram sacrificados, os tumores pesados e realizado o exame histopatológico dos órgãos. Os resultados indicaram uma inibição significativa de até 84,78% dos tumores carcinomatosos em relação ao grupo controle e padrão ($P < 0.05$). A avaliação histopatológica demonstrou alterações nos tecidos hepático, renal e pulmonar, quando comparados com os animais dos grupos controle e padrão.

Palavras chave: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; tumor de Ehrlich; camundongos; exame histopatológico.

*Contato com o autor: Rua prof. Arthur Sá, S/N, Cidade Universitária, Cep: 50.740-520, Recife-PE, Brasil/Tel: (55) 81- 2126-8511/fax:(55)81-2126-8510/ E-mail address: laura_tho@yahoo.com

Abstract

The antitumoral activity of the residue of *Mirabilis jalapa* L. leaves hexanic extract was investigated using the Ehrlich tumor. The assays were conducted with female Swiss albino mice (*Mus musculus*), by implanting fragments of Ehrlich tumor. After 48 hours, the rodents were divided into 6 groups (n=5) and were treated daily by intraperitoneal injection, during 7 (seven) days, at doses 100; 125; 225 e 250 mg/kg body weight of the said *M. jalapa* extract. Seven days after beginning of the treatment, the rodents were sacrificed and submitted to necropsy. Their tumors were excised and afterwards weighted, measured and submitted to histopathological studies. The results indicated a significant inhibition up to 84,78% of the carcinomatous tumors, compared to the standard and control groups (P< 0,05). The histopathological evaluation showed alterations in liver, renal and pulmonary tissues of the rodents treated with *M.jalapa* extract compared to organs obtained from mice of the standard and control groups.

Keywords: *Mirabilis jalapa*; Nyctaginaceae; Ehrlich tumor; mice; histopathological evaluation.

1. Introdução

O objetivo da quimioterapia antineoplásica é erradicar todas as células malignas sem afetar as células normais (KOROLKOVAS *et al.*, 1982). Por incluírem uma grande variedade de compostos atuando por vários mecanismos, os agentes antineoplásicos disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais com uma maior complicação do seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco versus benefício quando se usam estes agentes (SILVA, 2002).

Paralelamente a isso, o campo de pesquisa terapêutica vem se desenvolvendo no sentido de testar novas formas de tratamento, bem como, novas substâncias potencialmente eficazes contra as neoplasias (SAAD-HOSSNE *et al.*, 2004).

Apesar de as plantas possuírem princípios capazes de nos curar de diversas doenças, ainda são poucos os estudos que possibilitem, uma visão ampla da grande diversidade das espécies, utilizadas com fins terapêuticos (SILVA *et al.*, 2005). Um grande número de produtos naturais tem sido estudado por sua atividade antitumoral em

vários modelos experimentais, o que já resultou no surgimento de várias drogas anticâncer efetivas (RAMAKRISHNA *et al.* 1984).

Mirabilis jalapa (Nictaginaceae) é uma planta herbácea perene, de folhas simples e ovais, altamente ramificada, de flores variando de cores brancas a avermelhadas e matizadas, de involúcro parecendo cálice. Amplamente cultivada e distribuída como planta ornamental, nativa da América Tropical, encontra-se no Brasil, da Bahia até o Paraná, onde se tornou espontânea e conhecida como bonina ou maravilha (CÔRREA, 1984).

Estudos desenvolvidos para determinar seus componentes fitoquímicos ativos mostraram a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e esteróides (YANG *et al.* 2001; NARAYANAN *et al.* 2000; SIDDIQUI *et al.* 1990). Tanto os flavonóides quanto os alcalóides, triterpenos e esteróides, possuem significativas atividades biológicas, como hepatoprotetores, antiinflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, antivirais e antitumorais (MENDES, 2004; SIMÕES *et al.*, 2001; DI CARLO *et al.*, 1999).

Os extratos mais utilizados são obtidos do caule, raízes e folhas, onde foi descoberta a proteína MAP (“*Mirabilis Antiviral Protein*”), encontrada em maior concentração em suas sementes e não utilizada na medicina fitoterápica, por conter peptídeos neurotóxicos similares a ricina (CAMUE *et al.*, 1992). As MAP’s pertencem a um grupo de proteínas tóxicas de plantas conhecidas como RIP’s (“*Ribosome Inactivating protein*”) (BARBIERI *et al.*, 1982; WONG *et al.*, 1992; KATAOKA *et al.*, 1992). Recentes estudos sugerem que as RIP’s são também capazes de causar morte celular por apoptose (NARAYANAN *et al.* 2005). Essas proteínas apresentaram propriedades medicinais, antivirais, antibacterianas e antifúngicas (BOLOGNESI *et al.*, 2002; CAMUE *et al.*, 1992; HABUKA *et al.*, 1989; KATAOKA *et al.*, 1991;

KUSAMBA *et al.*, 1991). Nas sementes, além do seu potencial antimicrobiano, foi verificada sua ação antitumoral *in vitro* em células de fibroblastos de ratos (L929), sua citotoxicidade em modelo de *Artemia salina* e da larva do mosquito *Aedes aegypti* (Leelamanit *et al.*, 2002). Em suas raízes, foi relatado por WONG *et al.* (1992), a MAP com propriedades abortiva, de inibição de síntese protéica e efeito antitumoral em células de coriocarcinoma (JAR).

Um dos modelos experimentais mais empregado na investigação de novas drogas antineoplásicas é o tumor de Ehrlich em camundongos. Tumor descrito como carcinoma mamário de camundongos fêmeas, tem capacidade de crescimento em suspensão de líquido ascítico e em tecido subcutâneo (EHRlich *et al.*, 1905; LOEWENTHAL *et al.*, 1932; KLEIN *et al.*, 1951).

A partir dessas informações, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral da fração hexânica do extrato de *Mirabilis jalapa* L em animais portadores de carcinoma de Ehrlich.

2. Metodologia

2.3. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss, *Mus musculus*, adultos, fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições controles (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal Pernambuco, processo nº 23076.014522/2005-23.

2.5. Material Botânico

As folhas de *Mirabilis jalapa* L. foram coletadas de espécimes cultivados no jardim Departamento de Turismo e Hotelaria da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O material vegetal foi devidamente identificado pela botânica Dr^a. Marlene Barbosa, depositando-se uma exsicata no herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob número 41.766.

2.6. Obtenção do extrato

As folhas de *M. jalapa* foram secas em estufa com circulação de ar (45 °C) durante 24 horas, sendo então pulverizadas e submetidas à maceração com metanol durante 12h. Após eliminação do solvente a vácuo e à temperatura ambiente (25 °C), o resíduo resultante foi exaustivamente tratado com n-hexano. A fração n-hexânica após eliminação do solvente foi então submetida aos ensaios aqui descritos.

2.4. Transplante dos Tumores

A indução experimental dessa neoplasia em camundongos foi efetuada por intermédio do transplante de células tumorais de um animal portador, inoculando-se 0,5 ml de suspensão de líquido ascítico por via subcutânea em região axilar do receptor, segundo a técnica descrita por STOCK *et al.*(1965) e FUNAYAMA e KOMAIYAMA (1993).

2.5. Tratamento dos animais

Os camudongos inoculados com células de carcinoma de Ehrlich eram divididos em grupos (n=5) e subdivididos em grupo controle (solução salina a 0,9%), grupo padrão (metotrexato, 5 mg/kg) e grupos tratados com o extrato de *M. jalapa* nas doses de 100, 125, 225 e 250 mg/kg, respectivamente, durante 7 dias, por via intraperitoneal. A quimioterapia experimental foi iniciada 48 horas após o transplante dos tumores. Os animais foram sacrificados no oitavo dia e os tumores eram retirados, dissecados, pesados e em seguida calculada a diferença entre os grupos tratados e controle para o índice de inibição tumoral com a seguinte fórmula (MACHON *et al.*, 1981):

$$\text{TWI\%} = \frac{\text{C}-\text{T}}{\text{C}} \times 100$$

Onde:

TWI%= % de inibição tumoral

C= Média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle

T= Média dos pesos dos animais do grupo teste.

2.6. Estudo Histológico

Os tumores e os órgãos eram removidos e fixados em solução de formol a 10%. Os órgãos retirados para exame histopatológico foram: fígado, rins, baço e pulmões, para avaliação macropscópica e posterior fixação em formaldeído a 10% em solução neutra. Após 24h de fixação das amostras as peças eram lavadas e processadas para inclusão em parafina, em seguida cortadas com 7µm de espessura, e coradas segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina, visando posterior observação em microscopia de luz

2.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e testados com análise de variância (ANOVA) e teste “t” Student para avaliar as diferenças entre os grupos tratados e controles com nível de significância de $p < 0,05$ nos testes antitumorais.

2.8. Resultados

Os camundongos portadores do tumor de Ehrlich apresentaram como resultado em relação ao peso dos tumores, índice de inibição significativa máxima de 84,78%, na maior dose (250 mg/kg); com resultados significativos nas doses testadas de 100mg/kg e 125 mg/g (72,88% e 81,45%), respectivamente (Gráficos 4, 1 e 2). O grupo tratado com a dose de 225 mg/kg, apesar de o resultado ter sido de 80,51%, não foi considerado de significância estatística ($p \leq 0,05$), (Gráfico 3).

O fármaco utilizado como padrão foi o metrotexato, o qual atingiu índice máximo de inibição significativa (100%), no entanto, as lesões histológicas se apresentaram mais severas neste grupo.

Nos grupos controle e tratados houve a presença de metástases em todos os órgãos examinados (pulmões, rins, baço e fígado). Os rins apresentaram congestão renal, atrofia glomerular, nefrite focal intensa, tumefação tubular e metástase infiltrativa (Figura 5). No fígado se evidenciou congestão e vacuolização de hepatócitos, algumas figuras de necrose focal, cariorexia e metástase hepatocelular (Figura 6). No grupo-padrão houve presença de necrose isquêmica por coagulação e congestão sinusoidal, no entanto, não houve presença de metástase. No baço, foi observado: congestão esplênica,

rarefação de células linfóides e metástase (Figura 7). O grupo-padrão apresentou as mesmas alterações, sem a presença de metástase. Os pulmões apresentaram congestão pulmonar, áreas de enfisema, hemorragia, além da presença de metástases (Figura 8).

Macroscopicamente, tanto os animais do grupo-controle quanto do tratado tiveram a presença de líquido ascítico purulento com aumento e congestão de todos os órgãos, sendo maior a quantidade de líquido no grupo controle. No grupo-padrão, os animais não apresentaram ascite, no entanto, apresentaram alopecia, palidez de mucosas e emagrecimento progressivo, ao exame clínico. A caracterização histológica do tumor de Ehrlich se deu pela intensa atipia, presença de células anaplásicas de estroma escasso, com alto índice mitótico e grau de invasibilidade.

2.9. Discussão e Conclusão

Segundo DAGLI (1989), questões específicas de cancerologia só podem ser respondidas com a utilização de modelos experimentais adequados.

A pesquisa para testes de novas drogas é um procedimento oneroso e demorado. Como toda investigação com drogas ou medicamentos, antes de se iniciar e realizar as fases de farmacologia clínica impõe-se a execução de estudos pré-clínicos em laboratório (SAAD-HUSSER *et al.* 2004). Verifica-se pelos dados da literatura, que a maior parte das drogas antineoplásicas atualmente em teste têm como objetivo a destruição das células tumorais através de alterações em síntese protéica (LERIN *et al.*, 1989). Portanto, informações sobre a toxicidade das drogas são muito úteis aos clínicos quando da escolha para o tratamento do câncer (SILVA, 2002; FRANKS *et al.*, 1990).

Os fitoterápicos utilizados como drogas antineoplásicas, como a vincristina e vinblastina são exemplos de substância antineoplásicas derivadas de plantas utilizadas

no tratamento quimioterápico, onde atuam durante a metáfase do ciclo celular (GOODMAN, 2003; SILVA, 2002).

O extrato hexânico de *M. jalapa* foi avaliado contra a linhagem tumoral carcinoma de Ehrlich, apresentando inibição significativa do crescimento tumoral. Os resultados morfológicos obtidos revelaram que os animais tratados apresentaram resposta do tipo dose-dependente à concentração do extrato e droga padrão.

A presença das metástases, como sugere DAGLI (1989), se deve possivelmente ao potencial das células utilizadas, sua diversidade e tipo histológico. As alterações histopatológicas e macroscópicas dos órgãos, rins, baço, fígado e pulmões, podem estar relacionadas aos sinais de toxicidade da planta, tanto quanto à presença do tumor. Os animais do grupo padrão, tratados com Metotrexato, tiveram lesões compatíveis com os relatos de literatura, no que concerne às alterações hepáticas e renais, apesar de não terem apresentado metástases, o que nos confirma sua toxicidade (SEIDEL *et al.*, 1998; RELLING *et al.*, 1994).

Devido aos seus compostos fitoquímicos, comprovados quanto ao efeito antitumoral como os flavonóides e esteróides, e apesar de muitos de seus constituintes ainda não terem sido elucidados em seu mecanismo de ação, como as RIP's e MAP's, pode-se sugerir que o extrato hexânico de *M. jalapa*, possivelmente aja interferindo no mecanismo de ação das neoplasias, associados aos elementos intrínsecos celulares, inibindo a atividade tumoral nos animais tratados. Tais considerações discutidas anteriormente constituíam motivos de novas pesquisas que venham esclarecer o verdadeiro fundamento do mecanismo de ação expresso por *M.jalapa*, e minimizar os possíveis efeitos tóxicos, vinculados à planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, S.H.; ALI, M. Phytochemical Investigation on *Mirabilis jalapa*. Fac Pharmacy Jamia Hamdard New Delhi, Índia. *Hamdard Méd*, 433: 65-67, 2000.
- BARBIERI, L.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. *Cancer Surv* 1: 489-520, 1982.
- BOLOGNESI A.; POLITO, L.; LUBELLI, C.; BARBIERI, L.; PARENTE, A.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.16, p.13709-13716, 2002.
- CAMUE, B.P. A.; DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS, F.R.G.; PROOST, P.; DAMME, J.V.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L. Seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.267, n.4, pp. 2228-2233, 1992.
- CORRÊA, M. Pio. “Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas”, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Vols III, 1984.
- DAGLI, M.L. Z. Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental. Dissertação de mestrado. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil, pp. 32-46, 1989.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65 (4): p. 337-353, 1999.
- EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mauseumoren. *Berl Klin Wschr*, 28: p.871-874, 1905.
- FRANKS, L. M., TEICH, N.M. “Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer”. São Paulo: Roca. p. 349-361, 1990.
- FUNAYAMA, S.; KUMAIYAMA. Antitumor Agents, in: “Search of Bioactive Compounds from Microorganisms”. Ed. Satoshi Omura, Spriger-Verlag, New York, vol.5, p.79-97, 1993.
- GOODMAN & GILMAN. “As bases farmacológicas da terapêutica”. 10ª Ed., McGraw-Hill, p.1035 –1113, 2003.
- HABUKA, N.; KIYOTAKA, A.; HIDEAKI, T.; MIYANO, M.; MATSUMOTO, T.; NOMA, M. Expression and Secretion of *Mirabilis* Antiviral Protein in *Escherichia coli* and Its Inhibition of in Vitro Eukaryotic and Prokaryotic Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, n. 19, p. 10988-10992, 1990.

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

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. "Química Farmacêutica", p. 618-648, 1982.

KLEIN, G.; KLEIN, E. The Transformation of a Solid Transplantable Mouse carcinoma into a "ascite tumor". *Cancer Research*, 11: p. 466-469, 1951.

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

LEELAMANIT, W.; LERTKUNAKOM, P.; PRAPATRKUL, S.; WATTHANACHAIYNGCHARSON, R.; LUARANT, O.; RUANGWIFES, N.; SUPPAKPATANA, P. Biochemical Properties of Proteins Isolated from *M. jalapa*, vol.29, 1-2, 2002.

LERIN, E.; CHERNAVSKYA, A. Effect of Antineoplastic drugs on Ehrlich Tumors Cells. *Biomed Pharmacother*, 43: p.215-217, 1989.

LOEWENTHAL H.; JAHA, G. Ubertragungsversuche mit carcinomatosis mouse-ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. *Z. Krebsforsch*, 37, p. 439-447, 1932.

MACHON, S.; KUOZYNSKI, L.; CIELDAOWSAKI, Y.; WEICZSEK.; ZIMECKI, M.; BLASCZY, B.; MENDES, C. L. A. 2004. "Triterpenóides e sua atividade anti-inflamatória". Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova Lisboa, Portugal.

MORDANKI, M.; WICZORSK; FIOZERRALISZEWASKA, L. Chemical and Biological properties of 2 pyridielbenzil- carbinol. *Archiv in Immunologiae It Therapie Experimentalis*, 29, v. 2, p. 217-233, 1981.

NARAYANAN, S.; SURENDRANATH, K.; BORA, N.; SUROLIA, A.; KARANDE, A. A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS letters* 579, vol. 6: p. 1324 – 1331, 2005.

RAMAKRISHNA, Y.; MAHONOR, A.I.; MAMATA, P.; SHREEKANT, K.G. Plants and novel antitumour agents: A review. *Indian Drugs*, 21: p.173-185, 1984.

RELLING, M.V.; FAIRCLOUGH, D.; AYERS, D. Patient characteristics with high-risk methotrexate concentrations and toxicity. 1994. *J Clin Oncol*, vol.12, p. 1667-1672, 1994.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE W.; PRADO, R. G. Efeito da Solução Aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich. Estudo Experimental *in vitro*. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 19 (1), p. 56-58, 2004.

SEIDEL, H.; MOE, P. J.; NYGAARD R. Evaluation of serious adverse events in patients treated with protocols including methotrexate infusions. *Pediatric Hematol Oncol*, 11: p. 165 – 172, 1994.

SIDDIQUI S.; SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q. ; BEGUM, S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*. 615: 471, 1990.

SILVA, A.C.O.; ALBUQUERQUE, U.P. Woody medicinal plants of caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica*, 19: p.2738, 2005.

SILVA, P. “Farmacologia”.6ed. Ed. Guanabara Koogan.: Rio de Janeiro, p.241, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ,L.A.; PETROVICK,,P.R. “Farmacognosia da planta ao medicamento”. 4 ed., Porto Alegre:Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do SuL, 2001.

STOCK, K. Tumor Transplantation. Gay, W.I.; “Methods of animal Experimentation”. Academic Press, New York and London, vol..2, cap. 3, p.171-221, 1965.

WONG, R.N.; CHAN, S.H.; DONG, T.X.; YEUNG, H.W.Characterization of *Mirabilis* antiviral protein-a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa* L. *Biochem. Int.*, vol. 28, n.4, p. 585-593, 1992.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*.*J.Nat. Product*.64: (3) 313-317, 2001.

GRÁFICOS E FIGURAS

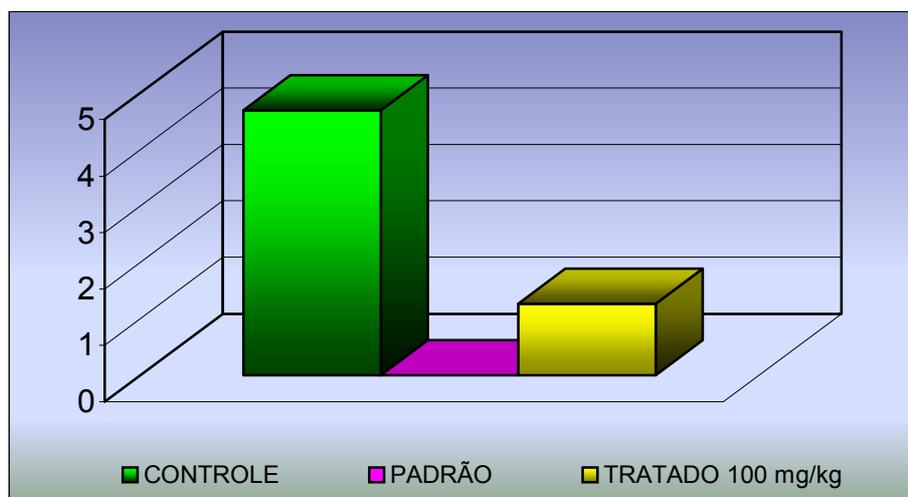


Gráfico 1 – Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* na dose de 100mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores \pm EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

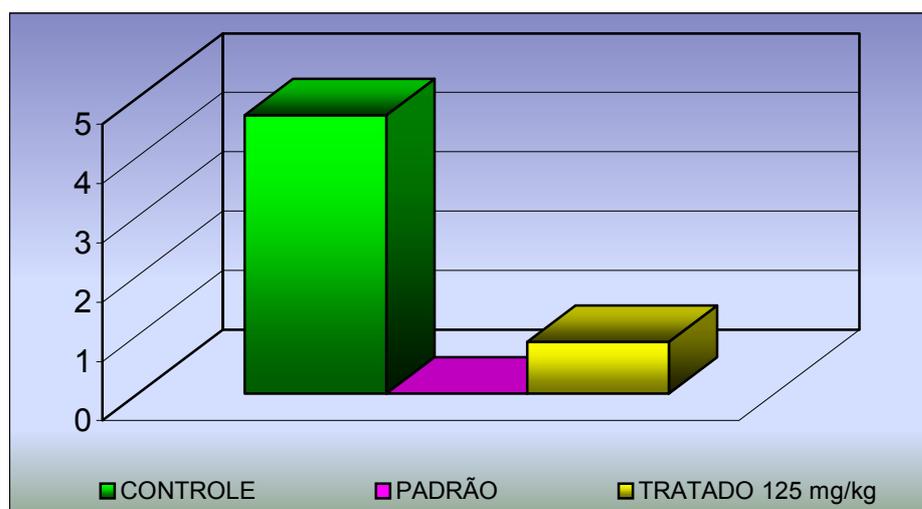


Gráfico 2 – Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* na dose de 125mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores \pm EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

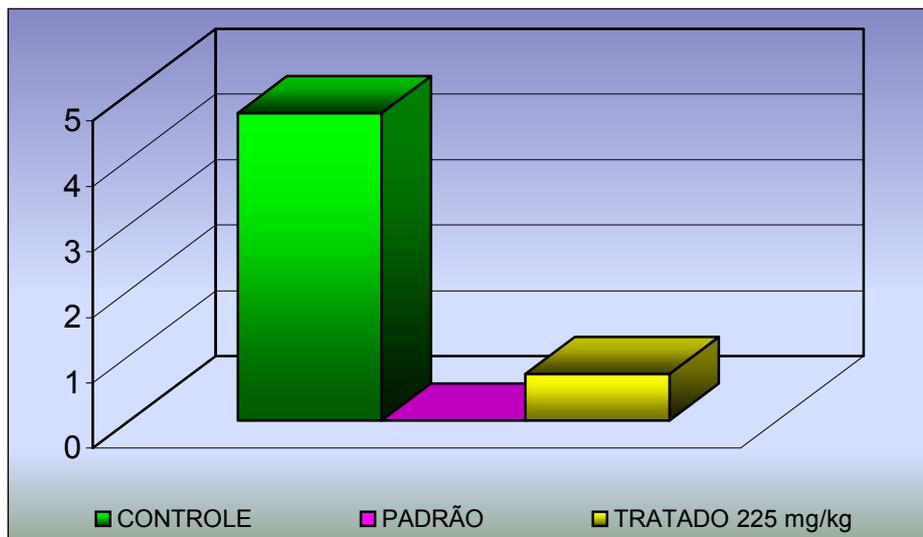


Gráfico 3 – Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* nas dose de 225mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

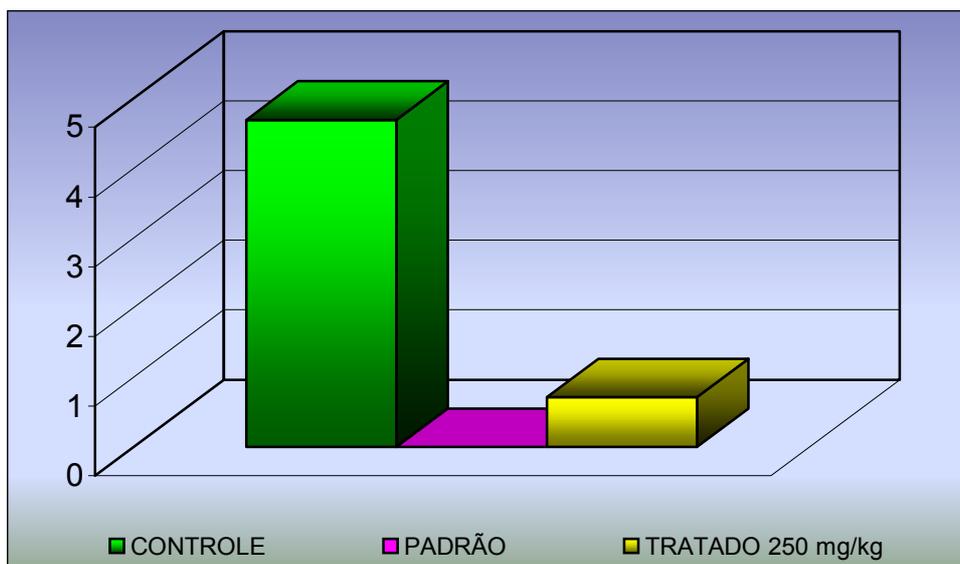


Gráfico 4 – Peso dos tumores (carcinoma de Ehrlich) em camundongos fêmeas, tratados por VIP, com o Extrato Hexânico (EH) de *Mirabilis jalapa* na dose de 250mg/kg (▲), padrão (metotrexato: 5,0 mg/kg) (◆) e solução salina 0,9% (-x-). Os valores representam a média de peso dos tumores ± EPM. Resultados significativos para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (Teste t de Student).



Figura 1- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* na dose de 100mg/kg, (tratado 1), com o grupo controle (solução salina 0,9) e o grupo padrão,(metotrexato 5,0 mg/kg.).



Figura 2- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 125 mg/kg (tratado 2) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão,(metotrexato na dose de 5,0 mg/kg.).



Figura 3- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 225 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão,(metotrexato na dose de 5,0 mg/kg.).



Figura 4- Comparação macroscópica dos tumores retirados dos camundongos fêmeas com carcinoma de Ehrlich grupo tratado com o EH de *Mirabilis jalapa* nas doses de 250 mg/kg (tratado 3) com o grupo controle (solução salina 0,9) o grupo padrão,(metotrexato na dose de 5,0 mg/kg.).

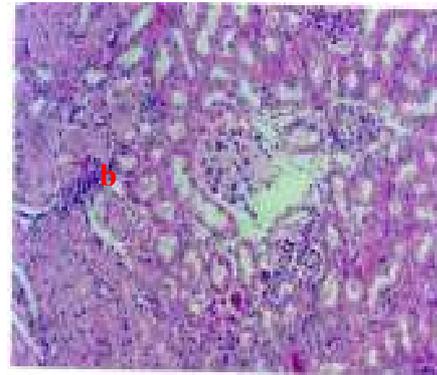
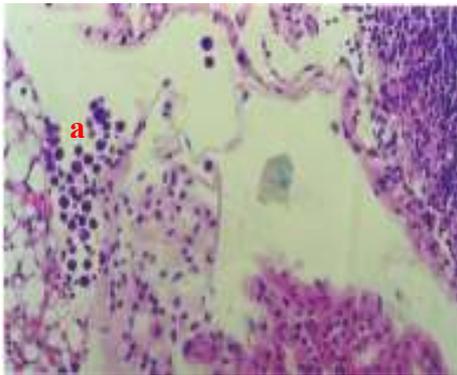


Figura 5- Fotomicrografia do rim de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) metástase infiltrativa renal.(b) tumefação do epitélio tubular e metástase renal. Corado com HE em objetiva de 25x.

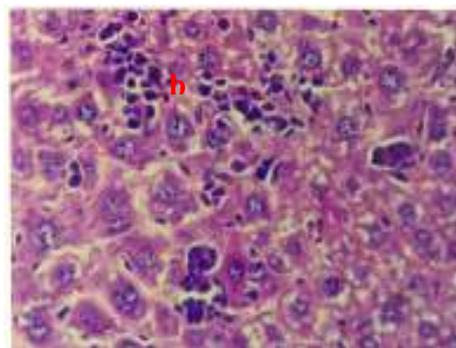
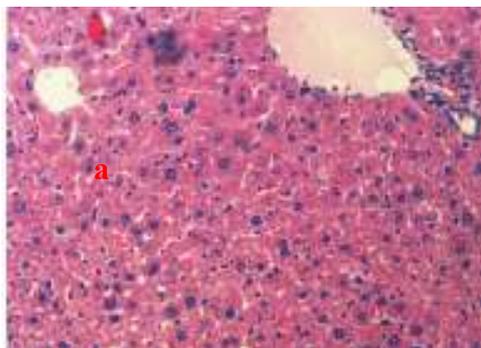


Figura 6- Fotomicrografia do fígado de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) Congestão hepática. (b) Presença de inúmeros hepatócitos binucleados e metástase infiltrativa hepatocelular. Corado com HE em objetiva de 25 e 40x, respectivamente.

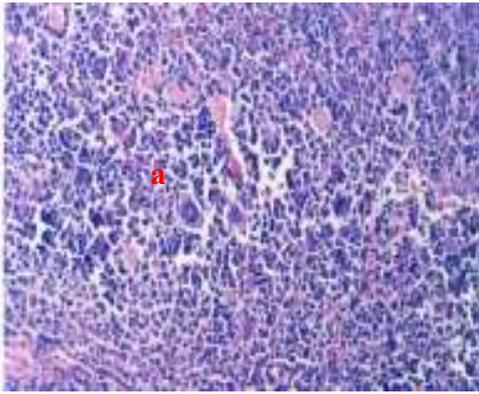


Figura 7- Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea, portador carcinoma de Erlich, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) Presença de congestão esplênica (b) Metástase esplênica. Corado com HE em objetiva de 40 e 25x, respectivamente.

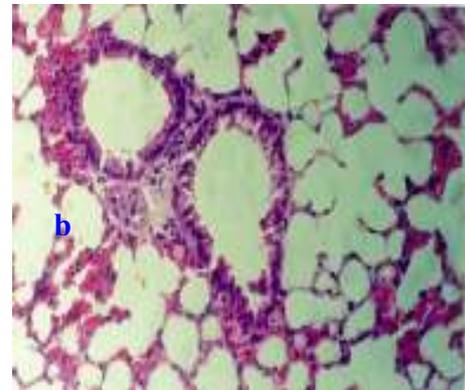
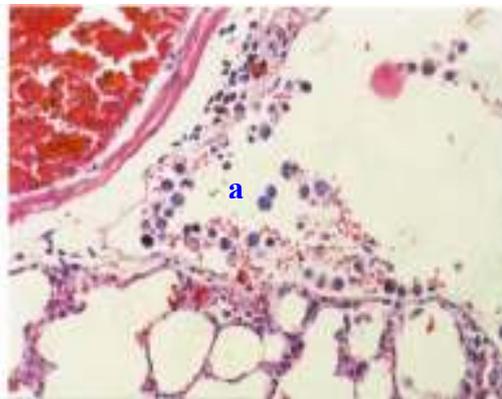


Figura 8- Fotomicrografia do pulmão de camundongo fêmea, portador de carcinoma de Ehrlich, tratado com EH de *M.jalapa*. (a) metástase pulmonar infiltrativa em alvéolos. (b) áreas de hemorragia e enfisema pulmonar. Corado com HE em objetiva de 40x.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.S.; RAUF, A.; MUSTAFA, J.; OSMAN, S.M. An 8-hydroxyoctadec-cis-11,14-dienoic acid from *Mirabilis jalapa* seed oil. *Phytochemistry*, 23 (10), 2247-9, 1984.
- ALCARAZ, M.J.; CARVALHO, J.C.T. Flavonóides como agentes antiinflamatórios. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Ed. Tecmed, 2004.
- ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J. Venom. Anim. Toxins*. v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002.
- BATELLI, M.G. Citotoxicity and Toxicity to Animals and Humans of Ribosome-Inactivating Proteins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.4 (5): 513-521, 2004
- BARBIERI, L.; FERRERAS, J.M.; BARRACO, A.; RICCI, P.; STIRPE, F. Some ribosome inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites. *Biochem J*, 286: 1-4, 1992.
- BARBIERI, L.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants: properties and possible uses. *Cancer Surv*, 1: 489-520, 1982.
- BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: SEIZI, O. (org.) *Fundamentos da Toxicologia*. 2º ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.59-67, 2003.
- BASHFORD, C.F.; MURRAY, J.A., 1904, *apud* STEWART, H.L.; SNELL, K.C.; DUNHAM, L.J.; SCHILYEN, S.M. Transplantable and transmissible tumors of animals. Washignton: Armed forces Inst. of Pathol., p. 12, 1959
- BEGUM, S.; ADIL, Q.; SIDDIQUI, B.S.; SIDDIQUI, S. Triterpenes from *Mirabilis Jalapa*, *Fitoterapia*, 55 (2), 177, 1994.
- BOGLIOLO, L. *Patologia*. 2º ed. São Paulo: Guanabara, 1097p, 1976.
- BOLOGNESI, A.; POLITO, L.; LUBELLI, C.; BARBIERI, L.; PARENTE, A. ; STIRPE, F. Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n.16, p.13709-13716, 2002.
- BOTHAM, P.A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*, v. 18, pp. 227–230, 2004.
- BOUGHTON-SMITH, N.K.; EVANS, S.M.; HAWKEY, C.J.; COLE, A.T. BALSITIS, M.; WHITTLE, B.R.J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn’s disease. *Lancet*, v. 341, pp. 338–340, 1993.

BOYD, M.; PAULL, K. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, v. 34, pp. 91-109, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 90, de 16/03/2004 Determina a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 18 de março de 2004.

BRIGHMAN, K.L. Mediators of the inflammation process: prostanoids. In: HENSON, P.M.; MURPHY, R.C. Mediators of the inflammation process. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-10, 1989.

BUCCHI, D.F. Efeitos do medicamento homeopático. Método Canova em camundongos normais e portadores do tumor sarcoma 180. Dissertação (Compilação de duas teses de mestrado), Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, n.3, 37-39, 2003.

CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS, F.R.G.; DAME, J.V.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W. Isolation and Characterization of a Novel Class of Plant Antimicrobial Peptides from *Mirabilis jalapa* L. Seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, n.4, p. 2228-2233, 1992.

CARVALHO, J.C.T. Constituintes de plantas com atividade antiinflamatória. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Ed. Tecmed, 2004.

CASTELUCCI, E.; PORTO, I.; MACIEL, J.; RAYANE, K. Avaliação da atividade antitumoral de extrato metanólico de folha de *Mirabilis jalapa* (bonina) contra o Sarcoma 180. Monografia. In: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

CASTRO J.A. Toxicologia básica mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta Bioq. Clin. Latinoamericana*, v.2, pp.197-206, 1993

CIRINO G. Multiple controls in inflammation: extracellular and intracellular phospholipase A2 inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, pp. 111-20, 1998.

CLAUSS, E.P.; TYLER, V.E. *Farmacognosia..* Ciencia y Técnica, Instituto del Libro. La Habana., 1970.

COLLINS, T. Inflamação Aguda e Crônica. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds). Robbins -Patologia Estrutural e Funcional. 6º ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp.44-77, 2000.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.) Robbins - Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 233-295, 2000.

CORRÊA, M.Pio. "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil". 3ed. Rio de Janeiro. Imprensa Universitária, 1984.

COWLDREY, E.V. Cancer Research. In: SAUNDERS, W.B. (org), *Cancer cells*. Philadelphia, p.546-574, 1955.

CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, vol. 60, pp. 52-60, 1997.

DAGLI, M.L.Z. Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental. Dissertação (Mestrado) em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1989, 148 p.

DAYRENS, P.; IVANOFF, B.; CUSSAC, M.; FONTAGES, R. Aspect actuel de l'inflammation. *Paris: Sem. Hop.*, v.56, n° 19-20, p. 995, 1980.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. V.28 (1), 118-119, 2005.

DE BOLLE, M.F.C; TERRAS, F.R.G.; CAMMUE, B.P.A.; REES, S.B.; BROEKAERT, W.F. Mirabilis jalapa antibacterial peptides and Raphanus sativus antifungal proteins: a comparative study of their structure and biological activities. *Dev. Plant Pathol*, 2, 433-6, 1993.

DE BOLLE, M.F.C.; OSBORN, R.W.; GODERIS, I.J.; NOE, L.; ACLAND, D.; HART, C.A.; TORREKENS, S.; VAN LEUEN, F.; BROEKAERT, W.F. Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant. Mol. Biol.*, 31 (5), 993-1008, 1996.

DI ROSA, M.; GIROUD, P.J.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpene. *J. Pathol.* 101:15-29, 1971.

DOHADWALLA, A.N. Natural Product Pharmacology: Strategies in search of leads for new drugs designs. *Trends Pharmacology Science*. v.6, 49-43, 1985.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 82, p. 337- 90, 1944.

DUGALD, T.S.; FRANCIS, Y.; WILLIAM, R.F. Acute joint inflammation – Mechanisms and mediators. *Gen. Pharmacol.*, v. 25, n. 7, p. 1285-1296, 1994.

FAEGRI, K.; PILL, L. "The Principles of pollination ecology". New York: Pergamon Press, 1976.

DUNN, T.B. The value of animal research and the men who do this research. *Cancer Research*, v. 22, p. 898-905, 1962.

EVAN, G.I. et al. Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein. *Cell*, v. 69(1), p. 119-28, 1992.

FILHO, G.B. Patologia. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 157-159, 2000.

FOEGH, M.L.; RAMWELL, P.W. Os eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 8º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

FRANKS, L.M.; TEICHS, N.M. "Introdução a Biologia Molecular do Câncer". Ed. Roca, p. 8; 13-15, 1990.

FURST, D.E.; MUNSTER, T. Antiinflamatórios Não-esteroidais, Agentes Anti-reumáticos Modificadores da Doença, Analgésicos Não-opioides & Drogas Utilizadas na Gota. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 8º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GARCIA LEME, J.; BECHARA, G.H.; SUDO, L. The proinflammatory function of lymphocytes in non-immune inflammation: Effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Br. J. Exp. Path.*, v. 58, p. 703, 1977.

GIRBES, T.; FERRERAS, J.M.; ARIAS, F.J.; STIRPE, F. Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome Inactivating Proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.4,n.5, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M.O.; GUERRA, M. P. *et al.* "Farmacognosia: da planta ao medicamento". 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC p. 14-20, 2004.

GOLDFRANK, L., et al., The Pernicious Panacea: Herbal Medicine. *Hospital Physician*, v. 10, p. 64-86, 1982.

GOSH, T. K.; RAO V.N., C.C. Some structural features of the D-glucan from the seed of *Mirabilis jalapa*. *Carbohydr. Res.*, 90 (2), 243-50, 1981.

HABUKA, N.; KIYOTAKA, A.; HIDEAKI, T.; MIYANO, M.; MATSUMOTO, T.; NOMA, M. Expression and Secretion of *Mirabilis* Antiviral Protein in *Escherichia coli* and Its Inhibition of *in Vitro* Eukaryotic and Prokaryotic Protein Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 265, n. 19, p. 10988-10992, 1990.

HABUKA, N.; MURAKAMI, Y.; NOMA, M.; KUDO, T.; HORIKOSHI, K. Amino Acid Sequence of *Mirabilis* Antiviral Protein, Total Synthesis of Its Gene and Expression in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, p. 6629-6637, 1989.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse Paw Edema. A new model for inflammation? *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20: 243-249, 1987.

HIRONO, I.; MORI, H.; HAGA, M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 61, p. 865 - 869, 1978.

IKEDA, T.; KATAOKA, J.; KONNO, Y.; IMAIZUMI, S.; KUWATA, S.; TAKANAMI, Y.; MATSUMOTO, T. Studies on the production of anti-plant-viral substances of higher plant cells in suspension culture. Part IV. Selection of cultured *Mirabilis jalapa* L. Cell strains producing high levels of anti-plants-viral protein. *Agric. Biol. Chem.* 52 (6), 1383-8, 1988

INCA_INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. “Estimativas da Incidência e mortalidade por Câncer”. Rio de Janeiro, 2003.

ISSELBACHER, K.J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J.D. “Medicina Interna“, 13° ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1995 (1): 391-409.

JOLY, A.B. “Botânica: introdução à taxonomia vegetal”. 12ª ed. São Paulo. Companhia Editora Nacional. p. 259-260, 1981.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet*, v.21, p.163-167, 1999.

KARBER G, BEHRENS B. “Estatistical Methods in Biological Assays”. London: Ed. Griffin Ch. and C., 1964

KATAOKA, J.; HABUKA, N.; FURUNO, M.; MIYANO, M.; TAKANAMI, Y.; KOIWAI, A. 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*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n.13, p. 8426-8430, 1991.

KAWAMURA M. DNA circulante em paciente com câncer. *Germinis - Boletim Informativo Conselho Federal de Biologia*, v.2, nº8, 1999.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.A.; DOULL, J. Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons, 5° ed. New York: McGraw Hill, 1996.

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

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. (org.) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2° ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 181-196, 2004.

LEAL, A.A.; TERADA, Y.; MACHADO, M.F.P.S. Floral Biology of *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) from Southern Brazil. *Acta Scientiarum*, v.23, n.2, 587-591, 2001.

LE DUC, A. A revision of *Mirabilis* section. *Mirabilis* (Nyctaginaceae). *Sida Contrib. Bot.*, Forth Worth, v.16, 613-648, 1986.

LEELAMANIT, W.; LERTKUNAKOM, P.; PRAPATRKUL, S.; WATTHANACHAIYNGCHARSON, R.; LUARANT, O.; RUANGWIFES, N.;

SUPPAKPATANA, P. Biochemical Properties of Proteins Isolated from *M. jalapa*, vol.29, 1-2, 2002.

LIMA, G.S., MARTINS, O.T. Screening farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente como antiinflamatória. *In: Resumo do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Florianópolis, p. F-035, 1996.

LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. Loomis's essentials of toxicology. 4° ed. California: Academic Press, 1996.

LORENZI, H. "Plantas Daninhas do Brasil". 2 ed. São Paulo: Nacional, 1991.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. "Plantas Ornamentais no Brasil". Nova Odessa: Plantarum, p.720., 1995.

MATOS, A.F.J. Living pharmacies. *Ciência e Cultura*. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v. 49, pp. 409 –412, 1997.

MENTZ, L.A., SCHENKEL, E.P. A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. *Caderno de Farmácia*, v. 5 (1/2), p. 93 –119, 1989.

MIYANO, M.; APPELT, K.; ARITA, M; HABUKA, N.; KATAOKA, J.; AGO, H.; TSUGE, H.; NOMA, M.; ASHFORD, V.; NGUYEN, H.X. Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of Mirabilis antiviral protein. *J. Mol. Biol.*, 226 (1): 281-3, 1992.

MOATTAR, F. Contraceptive effect of *Mirabilis jalapa* seeds. *Planta Med* 33 (3): 296, 1978.

MODESTO, Z. M. M.; SIQUEIRA, N. J. B. Botânica / Currículo de Estudos de Biologia (CEB). 5ª ed. São Paulo. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. p. 4-27, 1981.

MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Buscando nuevas sustancias naturales contra el cáncer. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinales.org/etno/1htm>>. Acesso em: 27 de Novembro de 2005.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Patologia: Processos Gerais. 3ªed., Ed. Atheneu, p. 122, 1995.

MOURA, R. R., *et al.* "Técnicas de Laboratório". 3ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.263, 1992.

MOVAT, H.Z. The acute inflammatory reaction. *In: MOVAT HZ. Inflammation, immunity and hipersensitivity*. New York: Harper & Row, p. 430 - 98, 1971.

MUKHERJEE, A.K.; *et al.* Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*, v.8, p. 1467-1486, 2001.

MYGIND N. Alergia. Um Texto Ilustrado. 1ª ed, Rio de Janeiro: Revinter, 1993. 483p.

NARAYANAN, S.; SURENDRANATH, K.; BORA, N.; SUROLIA, A.; KARANDE, A. A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS letters* 579, vol. 6: p. 1324 – 1331, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, v. 17, p. 215 – 234, 2000.

NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Current Opinion in Biotechnology*, n.8, p. 708-712, 1997.

PARIKH, B.A.; TUMER, N. E. Antiviral Activity of Ribosome Inactivating Proteins in Medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.4 (5): 513-521, 2004

PAYNE, G., BRINGI *et al.* The quest for commercial production of chemical from plant cell culture. In: PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M.L. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Oxford: Oxford University Press, 1991.

PEÑA, C.E.; CARTER, D.E.; AYALA-FIERRO, F. Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental, 2001. Distributed on the Internet via Southwest Hazardous Waste Program website at: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>. Acesso em 23 de abril de 2005.

PHILIPS, J.; MURRAY, P.; CROCKER, J. The biology of disease. Blackwell Science, v. 25, p. 22 - 43, 1995.

PLOUVIER, V. Sur la recherche des itols à chaine droite et des cyclitols chez les végétaux. Relations entre leur répartition et la classification systématique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 45: 1079-1117, 1963.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; IKUMO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; MARGATHO, L.F.F. Avaliação Biológica do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72 (4), 445-453, 2005.

RAMAKHRISNA, Y.; MAHONOR, A.I.; MAMATA, P.; SHREEKANT, K.G. Plants and novel antitumour agents: A review. *Indian Drugs*, 21: 173-185, 1984.

RATES, S. M.K., Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603 - 613, 2001.

REES, S.B.; OSBORN, R.W.; ACLAND, D.P.; FANT, F.; TERAS, F.R.G.; BROKEAERT, W.F. Plant antifungal proteins: novel crop protection agents. In: DIXON, G.K.; COPPING L.G.; HOLLIMON, D.W. "Antifungal Agents: Discovery Mode Action" (Pap.Conf. Discovery Mode Action Antifungal Agents). Bios Scientific Publishers: Oxford, UK, 193-200, 1995.

RORIZ, A.; CUNHA, A.P. "Enciclopédia 1001 plantas e flores". Especial ed. São Paulo: Europa, 2000.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSE, W.; PRADO, R. G.. Efeito da Solução Aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o Tumor Ascítico de Ehrlich. Estudo Experimental in vitro. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 19 (1) , p. 56-58, 2004.

SCHLEDE, E., et al. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 15 – 23, 2005.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natur. Acad. Scie.*, v. 91, pp.12013-12017, 1994.

SHU, Y.Z. Recent Natural Products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* V.61, n.8, p. 1053-1071, 1998.

SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, S. Terpenoids and Steroids of the aerial parts of *Mirabilis Jalapa* Linn. *Park J Sci Ind Res*, 37 (3), 108 – 110, 1994.

SIDDIQUI, .S.; ADIL, Q.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*, 61 (5), p.471, 1990.

SILVA,P. “Farmacologia”. 6ed. Ed. Guanabara Koogan.: Rio de Janeiro, p.241, 2002

SILVA, A.C.O.; ALBUQUERQUE, U.P. Woody medicinal plants of caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Botanica Brasilica*, 19: 2738, 2005.

SILVA, M.C.; CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Ed. Tecmed, 2004.

SIMÕES, C.M.º; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO,J.C.P.; MENTZ,L.ª; PETROVICK,P.R. “Farmacognosia da planta ao medicamento”. 5.ed., Porto Alegre: Ed. Da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. MEDSI, 225p., 2000.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *J. Ethnopharmacology*, vol. 51, p.1-15, 1996.

SOSA S., et al. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 4, 168-71, 1997.

STANIC, G.; PETRICIC, J.; TODORIC, A.; BLAZELIC, N. Sterols in the root of *Mirabilis jalapa* L. *Acta Pharmacol Jugosl.*, 38 (3), 255-7, 1988.

STEWART, J.M. Roles for kinins in inflammation. In: HERSON, P.M.; MURPHY, R.C. Mediators of the inflammation process. Amsterdam: Elsevier, p. 189 - 215, 1989.

STOCK, C. C.; CLARK, D. A.; PHILIPS, F. S. Sarcoma 180 – inhibitor *screening* data. *Cancer Research* 2: 2-3, 1955.

SUGIURA, M. et al. Cryptic dysfunction of cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) carriers and its actualization by an environmental immunosuppressive factor. *In vivo*. v. 8(6), p. 1019-1022, 1994.

SUGIURA, K.; STOCK, C.C. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Research*, v.2, pp. 318, 1954.

TONNEL, A.B.; et al. Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammation. *In: Cytokines and Adhesion Molecular in lung inflammation*. New York: Academy of Sciences, v. 746, 1996.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 38, p.97 – 120, 1998.

VINEGAR, R.,W.; SCHEIRBER; HUGO, R.. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp.Ther.*150: 328-334, 1969.

VINEGAR R., TRUAX, J F.; SELPH, J.L.. Some quantitative temporal characteristics of carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 143, pp. 711-714, 1973.

VIVANCO, J.M.; SHARMA, N.; VEPADECHU, R.; PARK, SW. Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta*, 219: 1093-1096, 2004.

VIVANCO, J.M.; SAVARY, B.J.; FLORES, H.E. Characterization of Two Novel Type I Ribosome-Inactivating Proteins from the Storage Roots of the Andean Crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiology*, v. 119: (4) 1447-1456, 1999.

VIVANCO, J.M.; QUERCI, M.; FLORES, H.E. Inhibitory effect of the *Mirabilis jalapa* extracts against potato virus infection. *Plant Physiology*, v. 114: (3) 1192-1192, 1997.

VULTO, A.G., SMET, P.A.G.M., Drugs used in non-orthodox medicine. *In: DUKES, M.M.G. (Ed.). Meyler's Side Effects of Drugs, 11th Ed. Elsevier, Amsterdam, p. 999–1005, 1988*

World Health Organization (WHO). Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). *International Ethical Guidelines for Biomedical Research involving Humans Subjects*. Geneva, 1993.

WINTER, C. A.; RISHLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced edema en hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 3, p. 544-547, 1962.

WONG, R.N.; CHAN, S.H.; DONG, T.X.; YEUNG, H.W. Characterization of *Mirabilis* antiviral protein-a ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa* L. *Biochem. Int.*, vol. 28, n.4, p. 585-593, 1992.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. Nyctaginaceae Juss. The Families of Flowering Plants.1992. Disponível em: www.biodiversity.uno.edu/delta/angio/ acessada em 31/08/2004.

YANG, X.S.; WEI, Y.; HAO, X.J. Studies on chemical constituents from the root of *Mirabilis jalapa*; *ZhongguoZhongyaozazhi*, (dec,28)v.12, 1151-1152, 2003.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B.. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*. *J. Nat. Prod.* 64: (3) 313-317, 2001.

APÊNDICE



PERFIL FITOQUÍMICO DA FOLHA DE *Mirabilis jalapa* Linn.

1. Introdução

Análises fitoquímicas de *Mirabilis jalapa* demonstraram que ela é rica em compostos ativos que incluem proteínas, alcalóides, flavonóides, triterpenóides, esteróides, além de arabinose, alanina, beta-amirinas, resina e dopamina (ANSARI *et al.* 2000; KATAOKA *et al.*, 1992; SIDDIQUI *et al.* 1990; YANG *et al.* 2001; WATSON, 1992).

Em suas folhas em extrato aquoso etanólico, já foram identificados os alcalóides (12-tricosano), alcoóis (n-hexacosanol), esteróides (β -sitosterol) e ácidos graxos (ácido tetracosanóico) (SIDDIQUI *et al.*, 1989). Além da presença das leucinas, valina, triptófano, alanina, glicina, ácido tartárico e ácido cítrico. Do extrato metanólico de suas partes aéreas: β -sitosterol, stigmasterol, ácido ursólico, oleanólico, brassicasterol e triterpenóides (BEHARI *et al.*, 1976; SIDDIQUI *et al.*, 1989; SIDDIQUI B.S. *et al.* 1994). Nas folhas também já foram identificados polissacarídeos, como o D-pinitol (BIELESKI, 1994; PLOUVIER, 1963). Em 2001, YANG *et al.*, identificou em extrato metanólico, três novos componentes fenólicos: (2'-O-Methylabronisoflavona; 9-O-Metil-4-hidroxi-boeravinona B; 6-Metoxiboeravinona C).

Nas sementes, já foram identificadas polissacarídeos (α e β -D-glucosídeo) (GHOSH *et al.*, 1981) e ácidos graxos (AHMAD *et al.*, 1984), além de serem encontradas as maiores concentrações de peptídeos tóxicos e MAP's (CAMUE *et al.*, 1992; DE BOLLE, 1996).

Em suas raízes, podemos encontrar esteróides (Stigmasterol e β -sitosterol) (STANIC *et al.*, 1988), polissacarídeos (RAY *et al.*, 1988). YANG *et al.* (2003), em

extrato etanólico isolou um componente novo, o (2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-urea e o monoecicosato de glicerina.

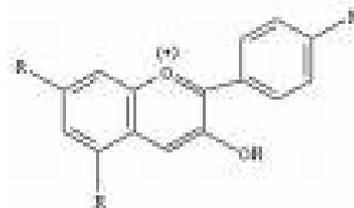
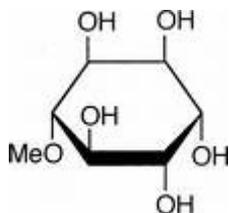
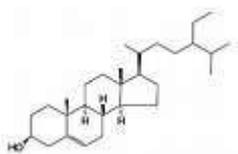


Figura 1 – Estrutura química de β -Sitosterol

Figura 2 – Estrutura química de Pinitol

Figura 3 – Estrutura química de Flavonóides

O presente trabalho compreende um perfil fitoquímico da folha de *Mirabilis jalapa* através do emprego de cromatografia em camada delgada empregando reveladores específicos para cada classe de metabólitos. Isto se torna imprescindível como abordagem introdutória a estudos mais aprofundados tais como: isolamento e caracterização de moléculas, definição de extratos ou frações para ensaios farmacológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Local de Trabalho

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. Identificação do Material Botânico

A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela Dr^a. Marlene Barbosa, botânica do Herbarium Geraldo Mariz, UFPE, e armazenada neste herbarium sob

número 41.766.

2.3. Obtenção do Material Botânico

O material vegetal foi coletado no campus da UFPE, no jardim do Departamento de Turismo e Hotelaria. As folhas foram secas em estufa com circulação de ar (45°C) durante 24 horas. Para a execução dos ensaios fitoquímicos cerca de 5 g do extrato foram submetidos à infusão metanólica durante 30 minutos. Alíquotas deste extrato (10 µL) foram submetidas a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas prontas de gel de sílica (Merck-Alemanha, art. 105554), diversas fases móveis e reveladores consoante a classe de compostos a analisar (Tabela 1).

Esta abordagem da investigação fitoquímica coloca em evidência os principais tipos de metabólitos secundários: alcalóides, terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides, saponósidos), e polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides, proantocianidinas).

Tabela 1 – Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a investigação fitoquímica de *Mirabilis jalapa* Linn.

METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	Dragendorf	Wagner (1996)
monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides	Tolueno-AcOEt 97 : 3	Vanilina Sulfúrica	Wagner (1996)
triterpenóides, esteróides	Tolueno-AcOEt 90 : 12	Libermann-Burchard	Harborne (1998); Sharma & Dawra (1991)
Iridóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	Vanilina Sulfúrica	Harborne (1998)
Saponinas	-	Afrogenicidade	Schenkel, Gosmann, Athayde (2000)
Cumarinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	U.V.	Wagner (1996)
Derivados Cinâmicos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	NEU	Wagner (1996)
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	NEU	Wagner (1996)
Flavonóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 2: 2: 2 v/v e AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 3: 3: 3 v/v	NEU	Markham (1982) Harborne (1998)
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O 100 : 11: 11: 26 v/v	Vanilina clorídrica	Robertson (1956)
Açúcares Redutores	n-butanol-acetona-tampão fosfato 40:50:10 v/v	Cloreto de Trifeniltetrazólio	Russel (1982)

2.4. Resultados

Conforme demonstrado na tabela 2, a abordagem fitoquímica da espécie *M. jalapa* Linn. realizada com extrato hexânico das folhas do vegetal, indicou a marcante presença dos polifenóis, esteróides (beta-sitosterol) e polissacarídeo de baixa polaridade, além da glicose.

Tabela 2 - Metabólitos encontrados no HE da folha de *M. jalapa* Linn

METABÓLITOS	HE
Alcalóides	-
monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides	-
triterpenóides, esteróides	++
Iridóides	-
Saponinas	-
Glicosídeos Cardíacos	-
Cumarinas	-
Derivados Cinâmicos	-
Fenilpropanoglicosídeos	-
Flavonóides	++
Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	-
Polissacarídeos	+

Expressão dos resultados: (+) = positivo; (-) = negativo; (++) = fortemente positivo.



Figura 4-Cromatograma de caracterização de açúcares redutores – **HE** de M. jalapa; **P**- Padrões de glicose e rhamnose.

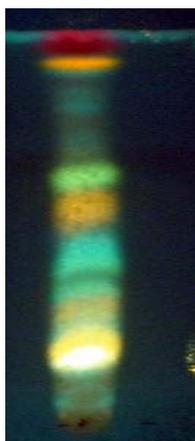


Figura 5-Cromatograma de flavonóides (polifenóis) – **HE** de M. jalapa

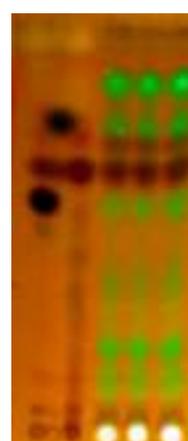


Figura 6 – Cromatograma de triterpenóides e esteróides – **HE** de M. Jalapa; **P** – Padrões de β -sitosterol, β -amirina e ácido ursólico.

2.5. Discussão e Conclusão

Entre os metabólitos encontrados destaca-se a classe dos flavonóides, além de esteróides e polissacarídeos.

Os flavonóides são compostos fenólicos naturalmente encontrados em vegetais e amplamente consumidos na dieta humana e de animais, atuando na modulação de diversas enzimas e no comportamento de muitos sistemas celulares (DI CARLO *et al.*, 1999).

A presença de polifenóis está de acordo com os dados obtidos na literatura, que apontam os derivados fenólicos em suas folhas (YANG, 2001). Estes são conhecidos por suas inúmeras propriedades medicinais, destacando-se seu poder antioxidante (BOHM e cols., 1998; GROOT; RAUEN, 1998); antiinflamatório; (FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991); antitrombótico (PIETTA, 2000); antimicrobiano (RUSSO *et al.*, 2000); antialérgico (RUSSO *et al.*, 2000); antitumoral; antiasmático (HIRONO, 1987) e inibidor de enzimas como a transcriptase reversa, proteína quinase C, tirosina quinase

C, calmodulina, ornitina decarboxilase, hexoquinase, aldol redutase, fosfolipase C e topoisomerase II (GROOT; RAUEN, 1998; FORMICA; REGELSON; OLIVEIRA, 1995).

Os Triterpenos são produtos naturais que pertencem à classe dos terpenos, e derivam dos mesmos ou dos sesquiterpenos. Estes são conhecidos por suas atividades biológicas como: antiinflamatórios, bactericidas, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (MENDES, 2004). Os esteróides derivam do mesmo precursor dos triterpenos, o esqualeno, que além de sua importância na biossíntese dos triterpenos, é um metabólito com atividade antitumoral e imunoestimulante (DI STASI, 1996). A presença de esteróides (ex. β -sitosterol) foi identificada no extrato (Figura 3), conforme relatos de BEHARI *et al.*(1976) e SIDDIQUI (1989) e (1994).

Os polissacarídeos foram verificados no extrato, como demonstrado na figura 1, ocorrendo também a presença de açúcar (glicose), como observaram BIELESKI (1994), PLOUVIER (1963) e YANG (2001). Os polissacarídeos pertencem a uma importante classe de produtos naturais dotados de atividades bioativas como: antiinflamatórios, antivirais, hipoglicemiantes, anticoagulantes, imunoestimulantes, antitumorais e como quimioprevenção a diversos tipos de câncer (PELUCHI *et al.*, 2001; SIMÕES, 2004)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.R.; “Plantas Mediciniais Brasileiras – Conhecimentos Populares e Científicos”, São Paulo; Ed. Hemus, p. 12-15, 1993.
- ANSARI, S.M.; ALI, M. Phytochemical Investigation on *Mirabilis jalapa*. *Hamdard Med*, 43 (3) 65-67, 2000.
- BEHARI, M., ANDHIWAL, C. K.; STREIBE, M. Some Chemical Constituents of the leaves of *Mirabilis jalapa* L. *Collec. Czech. Chem. Commun.*, 41 (1), 295-298, 1976
- BIELESKI, R.L. Pinitol is a major carbohydrate in leaves of some coastal plants indigenous to New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. Vol.32: 73-78. 1994.
- BOHM H, BOEING H, HEMPEL J, RAAB B, KROK A. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss*, v. 2, pp. 147-63, 1998.
- CACERES, A.; MENENDEZ, H.; MENDEZ, E.; COHOBON, E.; SAMAYO, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethnopharmacol*, 42 (2), 85-88, 1995.
- CACERES, A.; LOPEZ, B.R.; GIRON, M.A.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. *Screening* for antimycotic activity of 44 plant extracts.. *J Ethnopharmacol*, 31 (3), 263-276, 1991
- CORRÊA, M. Pio; “Dicionário de Plantas Úteis do Brasil”, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Rio de Janeiro, 1984, vol. 5.
- COWLDRIY, E.V. Cancer Research. In: SAUNDERS, W.B. (org), *Cancer cells*. Philadelphia, p.546-574, 1955.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutics drugs. *Life Sci.*, 65 (4): 337-353, 1999.
- DI STASI, L.C. “Plantas medicinais: arte e ciência”. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.
- FERRANDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, v. 32, pp. 283-8, 1991.
- FILHO, G.B. “Patologia”. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 157-159, 2000.
- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, v.33, pp.1061-80, 1995.

GOSH, T. K.; RAO V. N., C.C. Some Structural Features of the D-glucan from the seed of *Mirabilis jalapa*. *Carbohydr.Res.*, 90 (2), 243-50. 1981.

GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 3, pp. 249-55, 1998.

HARBONE, J.B. "Phytochemical methods". 3 ed., London: Chapman & Hall, p.228, 1998.

HIRONO I. Bioactive molecular. Naturally occurring carcinogenes of plant origin. Toxicology pathology and Biochemistry. *Biol Pharm Bull*, v. 2, pp. 120-58, 1987.

MARKHAN, K.R. "Techniques of flavonoid identification". London: Acad. Press., p.52-61, 1982.

MENDES, C.L.A. Triterpenóides e sua atividade antiinflamatória. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova Lisboa, Portugal.2004.

PELUCHI, C. ; LA VECHIA, C. ; CHATENOUA, L. ; NEGRIA, E. ; CONTIC, E. ; MONTELLAND, M. ; CALZAB, S. ; DAL MASOE, L. ; FRANCEESCHIF, S.Dietary fibres and ovarian cancer risk. *European Journal of Cancer*, v.37,n.17,p. 2235-2239, 2001.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, v.63, p.1035-42, 2000.

PLOUVIER, V. Sur la recherché des itols à chaine droite et des cyclitols chez les végétaux. Relations entre leur répartition et la classification systématique. *Bulletin de la Societé de Chimie Biologique*, 45: 1079-1117, 1963.

RAY, B.; GHOSAL, P.K.; THAKUR, S.; MAJUMDAR, S.G. Structural Studies of a neutral Polysaccharide from the Root Bulb of *Mirabilis jalapa*. *Carbohydr Res*, 176 (2), 324-328, 1988.

ROBERTSON, E.H.; CARTWRIGHT, R.A; WOOD,J. *J. Sci Food Agr.* , v..7, 637-640, 1956.

RUSSEL, J.E. Constribuion à l'étude botanique et chimiotaxonomique du genre *Verbascum* en Languedoc-cevennes. Tese de Doutorado. Université de Montpellier, 1983.

RUSSO A, ACQUAVIVA R, CAMPISI A, SORRENTI V, DI GIACOMO C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, v. 16, pp. 91-98. 2000.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas In: SIMÕES,C.M.O. (Ed) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis:Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 181-196, 2000.

SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K. Thin_layer chromatographic separations of lantandenes, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*). *Plant. J. Chromat.* 587, 351-354, 1991.

SIDDIQUI, B.S.; ADIL, Q.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, S. Terpenoids and Steroids of the aerial parts of *Mirabilis jalapa* Linn. *Park J Sci Ind Res*, 37 (3), 108 – 110, 1994.

SIDDIQUI, .S.; ADIL, Q.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S. Constituents of *Mirabilis jalapa*. *Fitoterapia*, 61 (5), p.471, 1990.

SIMÕES, C.M.º; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO,J.C.P.; MENTZ,L.^a; PETROVICK,P.R. “Farmacognosia da planta ao medicamento”. 5.ed., Porto Alegre: Ed. Da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SILVA, R. C; Plantas medicinais na saúde bucal, Vitória, 2001.

YAN, X.; WANG, W.; XING, D.; ZHAO, Y.; DU, L. Development and optimization of a method for the analysis of Brazilein by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, v. 1077, pp. 44 –48, 2005.

YANG, S.W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M.K.; ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*. *J.Nat. Product*. 64, 313-317, 2001.

YANG, XS.; WEI, Y.; HAO, X.J. Studies on chemical constituents from the root of *Mirabilis jalapa*; *ZhongguoZhongyaozazhi*, (dec,28)v.12, 1151-1152, 2003.

WAGNER, H.; BLADT, S. “Plant drug analysis. A thin layer chromatografy atlas”. 2ed Berlim: Springer Verlag, p.384, 1996.