

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

Marina de Mesquita Padilha

Estudo farmacognóstico, fitoquímico e farmacológico  
das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta)

Alfenas/MG

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UNIFAL-MG

Marina de Mesquita Padilha

Estudo farmacognóstico, fitoquímico e farmacológico  
das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Alfenas/MG

2009

Padilha, Marina de Mesquita.

Estudo farmacognóstico, fitoquímico e farmacológico das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta) / Marina de Mesquita Padilha.- Alfenas, 2008.

63 f. : il.-

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. *Morus nigra*. 2. Nocicepção. 3. Medição da Dor. I. Título.

CDD: 615.1

Marina de Mesquita Padilha

Estudo farmacognóstico, fitoquímico e farmacológico das folhas de *Morus nigra*  
L. (amoreira-preta)

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em:

**Prof<sup>o</sup>.: Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa**

**Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof<sup>o</sup>.: Elfriede Marianne Bacchi**

**Instituição: Universidade de São Paulo Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof<sup>o</sup>.: Geraldo Alves da Silva**

**Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura: \_\_\_\_\_**

*A sabedoria é saber o que se deve fazer;  
a virtude é fazê-lo.*

(David Starr Jordan)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que tornou possível concretizar esse sonho e a vencer os obstáculos;

Ao Professor Dr. Geraldo Alves da Silva pela constante presença, pela orientação deste valioso trabalho e acima de tudo pela amizade;

Aos Professores Dr. Marcelo Henrique dos Santos e Dr. Alexandre Giusti Paiva pelo auxílio, e amizade.

Ao meu avô Afrânio por uma vida de esforço dedicada ao magistério nos mostrando que o caminho está no conhecimento;

À minha mãe, meu irmão, minha avó Gláucia pelo incentivo, compreensão e tolerância;

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos colegas do Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pela colaboração e amizade;

Às mestrandas Fabiana Cardoso Vilela e Lidiane Orlandi pela amizade que indubitavelmente se eternizará;

Aos amigos Marcelo José Dias e Cláudia Rocha pela parceria constante na realização deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Plantas medicinais são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades desde a antiguidade. Pela sua riqueza química e farmacológica, têm sido alvo de crescentes estudos no intuito de comprovar atividades atribuídas pela crença popular ou mesmo obter novos compostos ativos. *Morus nigra* L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, conhecida comumente como amoreira-preta. Na Medicina popular o chá é empregado nos casos de ondas de calor e até mesmo indicada como terapia de reposição hormonal. As folhas possuem atividade antioxidante, hipoglicemiante, antiinflamatória e antimicrobiana. Neste trabalho, a folha de *Morus nigra* foi estudada em relação à caracterização estrutural, de modo a contribuir na morfodiagnose para o controle de qualidade deste vegetal. O presente trabalho também verificou a possível ação antinociceptiva e antiinflamatória do extrato diclorometânico em modelos químicos e térmicos de nocicepção e inflamação em camundongos e ratos. O extrato, administrado por via oral, produziu atividade antinociceptiva significativa e dependente da dose contra os modelos de nocicepção, como nos testes de contorções, formalina, placa quente e imersão da cauda. O extrato também apresentou efeito antiinflamatório nos modelos de indução do tecido granulomatoso e edema de pata induzido por carragenina quando comparado às drogas padrões dexametasona e indometacina respectivamente. A partir do extrato diclorometânico das folhas de *Morus nigra* foi possível o isolamento de um triterpeno, conhecido como germanicol.

Palavras-chave: *Morus nigra*; nocicepção; medição da dor

## ABSTRACT

Medicinal plants have been used in the treatment and cure of illnesses for many, many years. Due to their chemical and pharmaceutical characteristics, an increasing number of studies have been conducted to prove their theoretical medicinal capabilities or to obtain new active components. *Morus nigra* L. is a specie belonging to the family of the Moraceae usually known as a black mulberry tree. In traditional medicine, tea of *M. nigra* is used in cases of heat waves and even suitable as a therapy of hormonal replacement. This specie has antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory and antimicrobial activities. This work, the *Morus nigra* leaf was studied regarding to structural diagnosis in order to contribute to its quality control this vegetable. The present study also examined the possible antinociceptive and anti-inflammatory actions of the methylene chloride extract (MnE) in chemical and thermal behavioural models of pain and inflammation in mice and rats. The MnE given orally produced a marked and a dose-related antinociception against the chemical models of pain, such as writhing, formalin, hot-plate and tail-immersion tests. The extract also presented anti-inflammatory effect in models of granulomatous tissue formation and carrageenan-induced paw edema in comparison to the reference drugs dexamethasone and indomethacin respectively. Using the methylene chloride extract of *Morus nigra* leaves, it was possible to isolate one terpenoid known as germanicol.

Key-words: *Morus nigra*; nociception; pain measurement



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AINES – antiinflamatório não esteroidal

C5a – fator de complemento C5a

DPPH – radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (ou 2,2-difenil-1-picrilidrazil)

FAP – fator de ativação plaquetária

IL-8 – interleucina - 8

LDL – lipoproteína de baixa densidade

PGE 1 – Prostaglandina 1

PGE 2- Prostaglandina 2

SNC – Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	11
1.2	ESPÉCIE MEDICINAL <i>Morus nigra</i> .....	13
1.3	FARMACOLOGIA DOS COMPOSTOS TERPÊNICOS.....	15
1.3.1	Germanicol.....	17
1.4	O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	17
1.5	DOR.....	20
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
2	<b>RESULTADOS</b> .....	28
2.1	ARTIGO I.....	28
2.2	ARTIGO II .....	40
2.3	ARTIGO III .....	54

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais pela humanidade é tão antigo quanto a origem das civilizações, sendo descrito em todas as populações e grupos étnicos. No início dos tempos, a fitoterapia representava a principal forma terapêutica conhecida. Os primeiros relatos escritos dos quais se tem conhecimento sobre a ação medicinal de plantas são datados antes de Cristo. Existem registros de uso de plantas medicinais na antiga China nos anos 3000 a. C., onde várias plantas são mencionadas, entre elas, o ópio, extraído da papoula e empregado como narcótico e o ginseng, que apresenta propriedades contra reumatismo, problemas respiratórios, digestivos, entre outras (MARTINS, 2000).

O Reino Vegetal, além de ser o maior reservatório de moléculas orgânicas conhecido, é um poderoso laboratório de síntese. Até hoje diversas moléculas com estrutura complexa dependem de síntese biológica (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja por si só, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Na Europa, a fitoterapia já é parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em muitas farmacopéias (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A busca, nas últimas décadas, pelo emprego de plantas medicinais e medicamentos delas derivados, deve-se, entre outras razões, à frustrações advindas à exagerada expectativa em torno dos fármacos de origem sintética, aos efeitos indesejáveis e prejuízos causados tanto pelo uso incorreto quanto pelo uso abusivo destes, como também pelo reconhecimento de que vários vegetais exercem papel importante no desenvolvimento de novas substâncias terapêuticamente ativas e a crescente atenção que vem sendo dada pela comunidade científica para produtos fitoterápicos (De PAULA, 1996; VINATORU, 2001).

Os fitoterápicos possuem algumas vantagens que atualmente justificam seu uso, podendo-se citar por exemplo: efeitos sinérgicos; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; menores riscos de efeitos colaterais e menores custos de pesquisa (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

No Brasil existem cerca de 250.000 espécies de vegetais e, segundo alguns autores, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população. Porém, menos de 1% dessas espécies com potencial já foram objeto de estudos. Muitas substâncias exclusivas de plantas brasileiras encontram-se patenteadas por empresas ou órgãos governamentais estrangeiros, porque a pesquisa nacional não recebe o devido incentivo. Como por exemplo, podemos citar a Merck, que possui plantações próprias no Brasil de jaborandi e fava-d'anta, para a extração de pilocarpina e rutina, respectivamente, que são comercializadas no mercado externo (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 1998).

Atualmente, as substâncias vegetais, na indústria farmacêutica, são empregadas como matéria-prima para a extração de princípios ativos ou precursores e, principalmente, para a produção de tinturas, xaropes, chás, extratos fluidos e secos. Elas são muito cogitadas por profissionais e por órgãos governamentais como um recurso terapêutico nos serviços de saúde. Porém, para que isto ocorra, os compostos vegetais devem estar em formas padronizadas, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna, o que, de modo geral, não acontece nas indústrias fitoterápicas (De SOUZA, 2003).

Parâmetros morfo-anatômicos possibilitam o controle botânico de qualidade de insumos farmacêuticos auxiliando a autenticidade de drogas e seus adulterantes, identificando e separando uma determinada espécie vegetal de outras. Di Stasi (1996) assinala a importância da análise morfo-anatômica para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal na indústria farmacêutica, justificando que esta análise fornece subsídios que contribuem na padronização dos insumos, permitindo a diferenciação inclusive entre espécies botanicamente próximas. Dentre os ensaios anatômicos destacam-se os referentes a histoquímica, pois auxiliam na caracterização de drogas e no monitoramento de análises fitoquímicas, bem como no aproveitamento racional da droga vegetal.

A espécie medicinal *Morus nigra* vem sendo muito utilizada pela população como fitoterápico, mas ainda não apresenta estudos para que possa ser empregado de maneira racional. Sendo assim, estudos que forneçam parâmetros de qualidade e segurança, bem como ensaios biológicos e farmacológicos, são fundamentais para que se possa dar crédito ao uso de plantas medicinais.

## 1.2 ESPÉCIE MEDICINAL *Morus nigra*

A *Morus nigra*, também conhecida como amoreira-preta, é uma espécie vegetal que tem sua origem na Ásia, frutificando com maior intensidade e abundância sobretudo na Ásia Menor e estando plenamente aclimatizada no Brasil (CRUZ, 1979). Sua introdução nos diversos países e continentes ocorreu aos poucos, e hoje está espalhada por todo o mundo (DORIGAN, 1996). É uma planta temporária, de crescimento rápido que se desenvolve sob diferentes condições climáticas (SRIVASTAVA et al., 2003) e é apreciada por sua folhagem, que constitui o mais importante alimento para o bicho da seda (SASTRI, 1962).

Pertence ao gênero *Morus* e a família *Moraceae*, sendo conhecida aproximadamente 24 espécies de *Morus*, com pelos menos 100 variedades (MACHII; KOYAAMA; YMANOUCHI, 2000; TUTIN, 1996).

A amoreira possui grande potencial para as regiões brasileiras com período de inverno marcante e propícia para pequenas propriedades agrícolas. Os frutos podem ser utilizados para consumo *in natura* e para produção de doces caseiros, sendo assim, potencial para as famílias que trabalham com o ecoturismo regional. Além destas características, praticamente não necessita de insumos químicos, sendo ótima opção para o cultivo orgânico. A amoreira é uma das espécies que têm apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro) e tem elevado potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes. Em São Paulo a produção concentra-se na região de Jundiá e em Minas Gerais no Sul (Planalto de Poços de Caldas) e Zona da Mata (Barbacena) (ANTUNES et al., 2000).

A árvore pode atingir de 5 a 20m de altura com folhas bastante grossas, simples e alternas, cordiformes, simétricas na base, de cor verde escura, pecíolos curtos, ásperas, com dentes largos e regulares, estípulas longas, membranosas e felpudas (MORGAN, 1982) (FIGURA 1). As gemas são protegidas por estípulas caducas, inflorescência na forma de espiga ou sicônio. As flores são unissexuais; as masculinas monoclamídeas, isostêmones e as femininas aclamídeas, ovário súpero, bi ou unicarpelar, unilocular, uniovulado, com dois estigmas (AGAREZ; CÉZIO; CECÍLIA, 1994). As infrutescências são grandes, ovaladas, negras ou vermelhas brilhantes, quase sésseis. Suas amoras são comestíveis de sabor agridoce e muito sumosas (MORGAN, 1982).



Figura 1 : Fotografia das folhas da amora – *Morus nigra*  
Fonte: De SÁ; MORAIS (2008, p. 23)

No Brasil, a *Morus nigra* só começou a ser pesquisada em 1972 pela EMBRAPA, na qual foi dado início ao programa de melhoramento genético com o plantio de sementes produzidas por mais de cinquenta cruzamentos efetuados na Universidade de Arkansas, que originaram mais de 12.000 plântulas, e deram origem às primeiras cultivares brasileiras (BASSOLS; MOORE, 1981). O fruto da amoreira *in natura* é altamente nutritiva, contendo 85% de água, 10% de carboidratos, com elevado conteúdo de minerais, vitaminas B, A e cálcio. Uma série de funções e constituintes químicos são relatados na literatura internacional relacionados às qualidades da *Morus nigra*, estando, entre eles, o ácido elágico. Foi demonstrado que o ácido elágico possui funções anti-mutagênica, anticancerígena, antiinflamatória e além de ser um potente inibidor da indução química de vários tipos de câncer (ANTUNES et al., 2000).

O gênero *Morus* é conhecido por conter uma variedade de compostos fenólicos incluindo flavonóides isoprenilados, cumarinas, cromonas e xantonas e fitoalexinas (NOMURA, 1988; NOMURA; HANO, 1994). Muitos destes compostos exibem propriedades biológicas interessantes, tais como atividades antiinflamatória, diurética e efeitos hipotensores, (NOMURA, 1988; TAKASUGI et al., 1978).

Os compostos fenólicos presentes no fruto da *Morus nigra* e de outras espécies apresentam amplo espectro de atividade bioquímica tais como propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas bem como a capacidade moduladora da expressão gênica (NAKAMURA et al., 2003).

Folhas, raízes e galhos de espécies do gênero *Morus* tem sido amplamente usados na Medicina Chinesa para tratamento da febre, proteção hepática, melhora da visão, fortalecimento das articulações e redução da pressão arterial (ZHISHEN; MENGCHENG;

JIANMING, 1999). As folhas de algumas espécies de amora são consumidas na Coreia e Japão como alimento nutracêutico hipoglicemiante por pacientes com diabetes mellitus devido a presença da 1-deoxinojirimicina, conhecida por ser um dos mais potentes inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (KIM et al., 2003).

Extratos das folhas e raízes de *Morus alba* mostraram significativa atividade sequestrante de radicais livres e exibiram atividades antioxidantes (ANDALLU; VARADACJARYULU, 2003; FANG; HOU; CHAO, 2005). O extrato butanólico das folhas da amora também apresentou atividade sequestrante do radical DPPH e inibiu a oxidação do LDL em humanos e coelhos (DOI; KOJIMA; FUJIMOTO, 2000).

Segundo Toshio et al. (2005), foi isolada uma substância denominada chalconoracina de espécies de *Morus*, a qual apresentou considerável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina. A potência da atividade inibitória contra o crescimento microbiano foi similar a vancomicina.

Dai et al. (2004) isolaram e identificaram três constituintes presentes na casca da espécie vegetal *Morus macroura*, o guangsangon H, o guangsangon I e o guangsangon J. que mostraram significativa atividade antiinflamatória e antioxidante experimentalmente.

### 1.3 FARMACOLOGIA DOS COMPOSTOS TERPÊNICOS

Um das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo é a representação do conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário (atividades metabólicas essenciais que envolvem aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos) e secundário (envolvendo compostos que não possuem distribuição universal e, portanto, não são necessários a todas as plantas como, por exemplo, os alcalóides e flavonóides) (KAUFMAN et al., 1999).

Uma importante classe de metabólitos secundários é representada pelos terpenos, um grupo de compostos naturais com ampla distribuição, compreendendo mais de 1500 compostos, além de uma variedade estrutural envolvendo mais de 40 tipos de esqueletos básicos (NES; ZHOU, 2001).

Triterpenos representam uma classe variada derivada dos terpenos (LIU, 2005), sendo um dos constituintes majoritários na maioria das plantas medicinais e são tradicionalmente

utilizados na medicina de muitos países Asiáticos (OVESNA et al., 2004; HUANG; CHEN, 2003). Triterpenos pentacíclicos são conhecidos por apresentarem amplo espectro de atividade farmacológica com toxicidade mínima (POZO et al., 2006). São moléculas constituídas por trinta átomos de carbono contendo seis unidades isoprenóides, derivadas do arranjo do epóxido do esqualeno num arranjo cadeira-cadeira-cadeira-barco seguido de uma condensação (PATOCKA, 2003). Milhares de estruturas têm sido descritas na literatura até o presente momento com centenas de novos derivados descobertos a cada ano (CHATURVEDI et al., 2008).

Devido à sua grande diversidade, o estudo dos triterpenos têm sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades. Diversos trabalhos referem-se a atividade dos triterpenos na oncologia por exibir atividade antineoplásica em vários tipos de células tumorais, incluindo atividades antimutagênica, antiangiogênica e antiviral (HUANG; CHEN, 2003). Estes compostos também têm demonstrado apresentar atividade antiinflamatória por inibir as enzimas lipoxigenase, ciclooxigenase 2 e induzir a óxido nítrico sintetase (SUH et al., 1998). Além disso, alguns triterpenos estão relacionados à supressão da geração do ânion superóxido e prevenção da peroxidação lipídica devido as suas propriedades antioxidantes (SAFAYHI; SAILER, 1997).

Os triterpenóides são compostos constituídos basicamente de trinta unidades de carbono – seis isoprenos (CARDOSO et al., 2001). A maioria possui em sua constituição hidroxilas que podem ser glicosiladas, produzindo os heterosídeos cardiotônicos, importantes agentes terapêuticos para doenças cardiovasculares. Biossinteticamente são derivados de condensação de duas moléculas de farnesilpirofosfato (FPP) unidas cauda-cauda, produzindo o esqualeno, precursor acíclico desta classe de compostos. A provável ciclização da molécula de esqualeno leva à formação da estrutura básica dos triterpenóides, o ciclopentanoidrofenantreno, importante precursor dos esteróides vegetais e animais.

Apesar de haver muitos relatos de atividades biológicas relacionadas aos triterpenos pentacíclicos, o atual conhecimento dos efeitos destes e o estudo da relação estrutura-atividade são preliminares merecendo mais estudos (RECIO et al., 1995).

A baixa toxicidade aguda destes compostos naturais e os indícios revelados pelos estudos de relação estrutura-atividade sugerem que os substituintes no esqueleto lipofílico de cinco membros destas moléculas podem aumentar a seletividade e a potência para uma determinada ação, indicando que os triterpenos pentacíclicos podem ser um recurso natural de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos (SAFAYHI; SAILER, 1997).



### 1.3.1 Germanicol

A literatura revela que o germanicol (FIGURA 2), exemplo de triterpeno pentacíclico pertencente à classe dos oleananos já foi identificado em diversas espécies vegetais: *Lactuca indica*, *Schaefferia cuneifolia* (PARK et al., 1995; GONZALEZ et al., 1989), *Pilocarpus grandiflorus*, *Marsypianthes chamaedrys* (GOMEZ et al., 1997) e *Salvia macrochlamys* (TOPÇU et al., 2007).

Experimentos mostraram que o germanicol apresenta atividade antitumoral (KUNDU et al., 2000). Apenas poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar outros efeitos farmacológicos deste triterpeno.

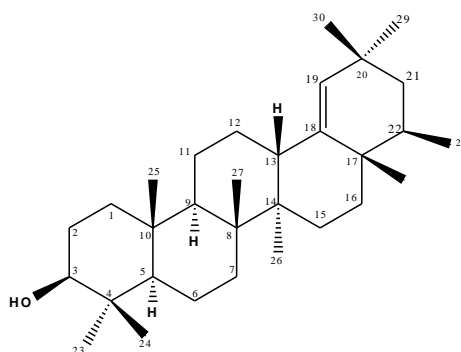


Figura 2: Estrutura química do triterpeno pentacíclico germanicol

### 1.4 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Por muito tempo, a inflamação foi considerada como doença, e somente a partir do século XVIII, é que Hunter propôs ser ela uma resposta benéfica. Desde Celsus (contemporâneo de Cristo), caracteriza-se a inflamação por quatro sinais: rubor, calor, tumor e dor. Virchow, no século XIX, acrescentou um quinto sinal: a perda da função (BIANCHETTI, 2006).

Carvalho (2004) descreveu a inflamação como uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos circunjacentes, sempre que há lesão ou destruição celular. O processo

inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados não só por agentes infecciosos, como também por agentes físicos (radiação, queimadura, trauma), químicos (substâncias cáusticas), isquemia, células tumorais e interações antígeno-anticorpo (KRISHNAMOORTHY; HONN, 2006; CARVALHO, 2004).

O ponto final da inflamação é, frequentemente, um resultado favorável, mas às vezes a inflamação pode se prolongar levando a várias condições patológicas ou também agravar alguma doença já existente. Pesquisas recentes indicam existir uma ligação entre a inflamação e a progressão de muitas patologias no homem (KRISHNAMOORTHY; HONN, 2006).

A inflamação é uma resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões meramente locais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, juntos, com a ativação de fagócitos e das células endoteliais. É um processo mediado por diferentes mecanismos, ela ocorre em três fases distintas, aguda, evento transitório caracterizado pelos sinais clássicos da inflamação; subaguda, retardada, onde se nota, predominantemente, a infiltração leucocitária e fase crônica, onde está destacado a ocorrência da degeneração tissular e da reparação fibrótica (SANTOS JÚNIOR, 2003).

As alterações vasculares ou hemodinâmicas que ocorrem com a inflamação instalam-se quase imediatamente após a lesão e iniciam-se por meio de constrição momentânea dos pequenos vasos da região. A vasoconstrição é seguida imediatamente pela vasodilatação das arteríolas e vênulas que suprem a área. Como resultado, a área torna-se congesta, causando o rubor (eritema) e calor associado com a inflamação aguda. Estas respostas de hiperemia são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade capilar, permitindo que os fluidos escapem para dentro dos tecidos, causando inchaço (edema). Dor e incapacidade funcional seguem-se como resultado do edema tissular e liberação de mediadores químicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O estágio celular da inflamação aguda é marcado pelo movimento dos leucócitos para a área de lesão ou trauma. As primeiras células fagocitárias a responder são principalmente os neutrófilos e em seguida macrófagos. Estes fagócitos de vida mais longa ajudam a destruir o agente causador, auxiliam na sinalização do processo de imunidade específica e atuam na resolução do processo inflamatório. A resposta celular dos fagócitos consiste na marginação ou pavimentação das paredes capilares por leucócitos devido ao aumento da adesividade molecular, emigração dos leucócitos, quimiotaxia ou migração positiva das células para o local de adesão, além da fagocitose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Apesar da inflamação ser precipitada pela lesão, seus sinais e sintomas são produzidos através de mediadores químicos constituindo uma “orquestra biológica”, os quais podem ser classificados de acordo com sua função: aqueles com propriedades vasoativas e propriedades de contração dos músculos lisos tais como histamina, prostaglandinas, leucotrienos e o fator de ativação das plaquetas (FAP); os fatores quimiotáticos, tais como os fragmentos do complemento (C5a) e citocinas (IL-8); as proteases do plasma capazes de ativar o complemento e os componentes do sistema de coagulação, bem como, moléculas reativas e citocinas liberadas dos leucócitos que, uma vez liberadas para o meio extracelular, são capazes de danificar o tecido adjacente (PORTH; KUNERT, 2004).

A histamina é amplamente distribuída por todo o organismo, sendo encontrada em alta concentração nas plaquetas, basófilos e mastócitos. Provoca a dilatação e aumento da permeabilidade capilar. É um dos primeiros mediadores da resposta inflamatória (RANG et al., 2004).

As proteases do plasma consistem nas cininas, complementos protéicos ativados e fatores de coagulação. Uma cinina, a bradicinina, provoca o aumento da permeabilidade capilar e dor. O sistema de coagulação contribui com a fase vascular da inflamação, principalmente através dos fibrinopeptídeos formados durante os passos finais do processo de coagulação (RANG et al., 2004).

As prostaglandinas são moléculas lipossolúveis onipresentes, derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo liberado pelos fosfolipídeos da membrana celular. Diversas prostaglandinas são sintetizadas do ácido araquidônico por meio da via metabólica da ciclooxigenase. As prostaglandinas contribuem com a vasodilatação, permeabilidade capilar, bem como dor e febre que acompanham a inflamação. As prostaglandinas estáveis (PGE1 e PGE2) induzem a inflamação e potencializam os efeitos da histamina e outros mediadores inflamatórios. A prostaglandina tromboxano A2 promove a agregação plaquetária e vasoconstrição (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Os leucotrienos consistem nos mediadores químicos primeiramente descobertos nos leucócitos. Como as prostaglandinas, são formados a partir do ácido araquidônico, porém através da via da lipoxigenase. A histamina e os leucotrienos são complementares em sua ação e possuem funções similares. A histamina é produzida rápida e transitoriamente, enquanto os leucotrienos mais potentes estão sendo sintetizados. Um leucotrieno provoca a constrição lenta e sustentada dos bronquíolos, sendo um importante mediador inflamatório da asma brônquica e das reações imediatas de hipersensibilidade. Os leucotrienos também têm sido descritos como capazes de afetar a permeabilidade das vênulas pós capilares, as

propriedades de adesão das células endoteliais, bem como a quimiotaxia e extravascularização dos neutrófilos, eosinófilos e monócitos (RANG et al., 2004).

Gerado de um complexo lipídico armazenado nas membranas celulares, o FAP afeta uma variedade de tipos celulares e induz a agregação plaquetária. Promove ativação dos neutrófilos e é quimioatraente potente de eosinófilos (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

As inflamações agudas, geralmente, são auto-limitantes e rapidamente controladas pelas defesas do hospedeiro. Por outro lado, a inflamação crônica é autoperpetuante e podem durar semanas, meses ou, anos. Podem desenvolver-se durante o processo inflamatório agudo recorrente ou progressivo, ou ainda, de respostas insidiosas, de baixo grau, geralmente assintomáticas, incapazes de evocar uma resposta aguda. A inflamação crônica é considerada uma inflamação prolongada, na qual a inflamação ativa, a destruição tissular e a tentativa de reparar os danos ocorrem simultaneamente. Em contraste com a inflamação aguda, que manifesta alterações, edema e infiltrado predominantemente neutrofílico, a inflamação crônica é caracterizada por infiltrado de células monucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, por destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias, e pelas tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular, fibrose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

## 1.5 DOR

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial ou de fato, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY; BOGDUK, 1994). A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (MILLAN, 1999).

Nociceção é um termo aplicado aos mecanismos neurológicos que detectam o estímulo lesivo (FERREIRA, 2004). Essa detecção de lesão tecidual ocorre através de transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos do tipo A delta e C. Se a estimulação dos nociceptores vai resultar ou não em dor depende de inúmeros fatores

moduladores. A intensidade da dor percebida varia consideravelmente, dependendo do humor do indivíduo, da quantidade de distração com relação à dor, e das sugestões positivas ou negativas de outras pessoas, assim como de vários sistemas neurológicos periféricos e centrais que são capazes de modular a transmissão nas sinapses nas vias nociceptivas (UMPHERED, 1994).

A transmissão do estímulo doloroso, assim como sua inibição, envolve múltiplos mecanismos (LEWIS; CANNON; LIEBESKIND, 1980). A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, que são neurônios diferenciados com função sensitiva cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais ou trigeminal, e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula e na ponte. Os nociceptores estão presentes em todo o corpo e podem ser divididos em três subtipos: mecanoreceptores, com alto limiar, que respondem à pressão; receptores mecanotérmicos, com baixo limiar, que respondem à pressão e calor e os receptores polimodais, que respondem à pressão, calor e estímulos químicos nocivos (NATALINI, 2000). Os mecanoreceptores e os receptores mecanotérmicos são compostos por terminações nervosas livres de fibras A delta, que são fibras mielinizadas e de condução rápida que se projetam nas lâminas II e III da medula. Por outro lado, os receptores polimodais são inervados pelas fibras C, que não são mielinizadas e, portanto, transmitem o estímulo de forma mais lenta. Essas fibras projetam-se nas lâminas I e II, e são estimuladas por mediadores endógenos (NATALINI, 2000). Essas substâncias endógenas que são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesado (prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios e outros) estimulam os terminais nervosos sensitivos agindo em receptores presentes na membrana desses neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor para o estímulo nocivo (BJÖRKMAN, 1995). Mais especificamente, as prostaglandinas e os leucotrienos sensibilizam os terminais aferentes primários, tornando os nociceptores periféricos mais sensíveis à bradicinina (TAIWO; LEVINE, 1988; COHEN; PERL, 1990). A ativação dos terminais periféricos resulta na liberação de mediadores nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal.

Do ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica e, sob a óptica da fisiopatologia, descreve-se a dor como associada à inflamação, à neuropatia e à de influência pelo sistema nervoso simpático. A dor aguda é aquela que está relacionada à instalação de um processo patológico, seja ele de origem traumática ou inflamatória. A dor deriva normalmente do excesso de nocicepção, porém pode resultar também da sensibilização ou da hipoatividade do sistema supressor da dor ou ambos. Ela serve como sinal de alerta para

a ocorrência da lesão. A resolução desse quadro normalmente acompanha a finalização do quadro doloroso. Caso a dor não se resolva com o fim do processo causal, persistindo, além da ausência da lesão, vai configurar um dos quadros possíveis de dor crônica (CAVALCANTI; MADDALENA, 2003).

Na terapia da dor existem duas classes principais de drogas analgésicas: opióides e antiinflamatórios. Os opióides abolem diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervosa central (SNC) (VANE, 1971; AGUIRRE-BANUELOS; GRANADOS-SOTO, 1999). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são moléculas sintéticas que possuem ações antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas (BORNE, 1995). No entanto, os efeitos colaterais descritos para muitos AINES, como irritação gastrointestinal e anormalidades da função renal, têm limitado o uso dessas substâncias, especialmente no tratamento da dor crônica (FERNANDEZ; SALCEDO; PALACIOS, 1995; LICHTENBERGER et al., 1995).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro, R.J. p. 132, 1998.
- AGAREZ, F. V; CÉZIO, P; CECÍLIA, M. R. **Botânica: Taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. 256p.
- AGUIRRE-BANUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.42, p.70 – 85, 1999.
- ANDALLU, B; VARADACJARYULU, N. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 338, p. 3- 10, 2003.
- ANTUNES, L.E.C. et al. Fenologia e produção de variedades de amora-preta nas condições do planalto de Poços de Caldas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.89-95, 2000.
- BASSOLS, M. do C.; MOORE, J. N. **‘Ébano’ primeira cultivar de amoreira-preta sem espinhos lançada no Brasil**. Pelotas : EMBRAPA UEPAE de Cascata, 1981b. 16p.
- BIANCHETTI, E. S. **Estudo da interferência de diferentes dietas nutricionais sobre as ações antiinflamatória e analgésica do Etoricoxib (Arcóxia®)**. 2006. Dissertação (Mestrado) – UNIFENAS, Alfenas, 2006.
- BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non - steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.39, p.103, 144, 1995.
- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti - inflammatory drugs. In: Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. (Eds.) **Medicinal Chemistry**. Williams and Wilkins, Baltimore,p.535-580, 1995.
- CARDOSO, M.G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Editora da UFLA: Brasil, 2001.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios : aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004.
- CAVALCANTI, I. L.; MADDALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: SAERJ, 2003.
- CHATURVEDI, P, K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v.263, p.1-13, 2008.
- COHEN, R. D.; PERL, E. R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **Journal of Neurophysiology**, v.64, p. 457- 464, 1990.

CRUZ, G. L. **Dicionário de plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização brasileira, 1979. 599p.

DAI, S. H. et al. Guangsangons F-J, anti-oxidant and anti-inflammatory Diels-Alder type adducts, from *Morus macroura* Miq. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3135-3141, 2004.

De PAULA, I. C. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (LAM) DC. Compositae**. 1996. Dissertação (Mestrado) - UFRGS, Porto Alegre, 1996.

De SÁ, V. A; MORAIS, G. A. A percepção ambiental da vegetação urbana por residentes do bairro Vitória em Ivinhema – MS. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.2,p -, 2008.

De SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leite de jorro**. 2003. Dissertação (Mestrado) - USP, Ribeirão Preto, 2003.

Di STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1996.

DOI, K; KOJIMA, T; FUJIMOTO, Y. Mulberry leaf extract inhibits oxidative modification of rabbit and human low-density lipoprotein. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1066-1071, 2000.

DORIGAN, C. J. **Avaliação nutricional da amoreira (*Morus alba* L.) por meio de modelos biológicos**. 1996. Dissertação (Mestrado) - UNESP,Jaboticabal, 1996.

FANG, S. H; HOU, Y. C; CHAO, P. D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interations of morin and cyclosporine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, p. 65-70, 2005.

FERNANDEZ, A. G.; SALCEDO, C.; PALACIOS, J. M. Aspirin, salicylate and gastrointestinal injury. **Nature Medicine**, v.1, p.602-603, 1995.

FERREIRA, J. **Participação de receptores B1 e B2 para as cininas em modelos experimentais de dor crônica**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia aplicada: fundamentos da terapêutica racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GOMEZ, M. A. et al. Cytostatic activity againsty HEp-2 cells of methanolic extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. And two isolated principles. **Phytoterapia Res.**, v. 11, p. 240 – 242, 1997.

GONZALEZ, A. G. et al.  $\Delta^{18}$  oleanane triterpene from *Schaefferia cuneifolia*. **J. Nat. Prod**, v. 52, p. 567 – 570, 1989.

GOYATÁ, S. L. T. et al. **Manual de normatização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG**. Alfenas: UNIFAL-MG, 2006.



HUANG, L.; CHEN, C. H. Molecular targets of anti-HIV-1 Triterpenes. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v.2, p.33-36, 2002.

KAUFMAN, P. B. et al. **Natural Products from Plants**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.

KIM, J. W. et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9- fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1002,p. 93-99, 2003.

KRISHNAMOORTHY, S; HONN, K. V. Inflammation and disease progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p. 481 – 491, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUNDU, J. K. et al. Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 577-579, 2000.

LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Opioid and non - opioid mechanisms of stress analgesia. **Science**,v.208, p.623-625, 1980.

LICHTENBERGER, L.M. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAIDs - induced gastrointestinal injury. **Nature Medicine**, v.1, p.154-158, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.92-94, 2005.

MACHII, H; KOYAMA, A; YAMANOUCHI, H. FAO Eletronic Conference: **Mulberry for animal production**. 2000. Disponível em <<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/mulberry>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

MARTINS, P. M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* D. C. STAPF)**. 2000. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2000.

MERSKY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. Seattle: IASP Press, 1994.

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

MONTANARI, C. A; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105 -111, 2001.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e Plantas Mediciniais**. São Paulo: Hemus Editora, 1982. 555p.

NAKAMURA Y. et al. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 3309-3312, 2003.

NATALINI, C. C. **Comparative evaluation of the effects of epidural morphine, alentanil, buthorphanol, tramadol and U-50488H in horses.** Tese (doutorado) – University of Minnesota, 2000.

NES, W. D.; ZHOU, W. Terpenoids: Higher, 2001. In: **Encyclopedia of Life Sciences**, London: Nature Publishing Group, Disponível em: <http://www.els.net>.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Progress in the chemistry of organic natural products**, v. 53, p. 87, 1988.

NOMURA, T; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic- compounds of Moraceous Plants. **Nat Prod Rep**, v. 11, p. 205, 1994.

OVESNA, Z.; VACHALKOVA, A.; HORVATHOVA, K.; TOTHOVA, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. **Neoplasm**, v.51, p. 327- 333, 2004.

PARK, H. J. et al. Serum cholesterol lowering effect of triterpene acetate obtained from *Lactuca indica*. **Kor. J. Pharmacogn**, v. 26, p. 40- 46, 1995.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p.7-12, 2003.

PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

POZO, M. et al. Ursolic acid inhibits neointima formation in the rat carotid artery injury model. **Atherosclerosis**, v.184, p.53-62, 2006.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RECIO, M. C. et al. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Med.**, v. 61, p. 182 – 185, 1995.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Med**, v. 63, p.487-493, 1997.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 206 –210, 2003.

SASTRI, B. N. The wealth of Índia, raw materials. **Council of Scientific and Industrial Research**, p. 429 – 439, 1962.

SRIVASTAVA, S. et al. Mulberry (*Morus alba*) leaves as human food: a new dimension of sericulture. **Internacional Journal of Food Science and Nutrition**, v. 54, p.411- 416, 2003.

SUH, N. et al. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v.58, p.717-723,1998.

TAIWO, Y.; LEVINE, J. D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradikinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Research**, v.458, p.402 - 406, 1988.

TAKASUGI, M. et al. Structure of moracin A and B, new phytoalexins from diseased mulberry. **Tetrahedron Lett**, v.19, p. 797 -798, 1978.

TOPÇU, G. et al. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. **Arkivoc**, v. 7, p. 195-208, 2007.

TOSHIO F; KIYOSHI, K; SUMIO , T. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . **Fitoterapia**, v. 76, p. 708-711, 2005.

TUTIN, G. T. *Morus L.* In Flora Europa. **Psilotaceae to Platanaceae**. Australia: Cambridge University Press, v. 1, 1996.

UMPHRED, D. A. **Fisioterapia Neurológica**. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Manole, 1994.

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

VIEGAS, JR ; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303 – 313, 2001.

ZHISHEN, J; MENGCHENG, T; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

## 2 RESULTADOS

### 2.1 Artigo I

#### Estudo farmacobotânico das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta)

**Marina M. Padilha\***, Lucimara Q. Moreira, Fernanda F. Morais, Tomáz. H. Araújo,  
Geraldo Alves-da-Silva

*Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, Departamento de Farmácia,  
Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, CEP 37.130-000 -  
Alfenas- MG, Brasil*

**RESUMO:** *Morus nigra* L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, conhecida comumente como amoreira-preta. Na Medicina popular é empregada nos casos de ondas de calor e até mesmo indicada como terapia de reposição hormonal. Possui atividade antioxidante, hipoglicemiante, antiinflamatória e antimicrobiana. O presente trabalho trata da caracterização estrutural da folha, de modo a contribuir na morfodiagnose para o controle de qualidade da espécie *M. nigra*. Amostras do material vegetal foram seccionadas, fixadas e coradas com fucsina e toluidina. A folha apresenta estômatos anomocíticos na face abaxial, tricomas tectores, mesofilo bifacial, drusas, nervura central semi-convexa e o pecíolo exibe feixes vasculares em arco fechado.

**Unitermos:** amoreira-preta, *Morus nigra*, Moraceae, morfodiagnose.

**ABSTRACT:** *Morus nigra* L. is a specie belonging to the family of the Moraceae usually known as a black mulberry tree. In traditional medicine, *M. nigra* is used in cases of heat waves and even suitable as a therapy of hormonal replacement. This specie has antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory and antimicrobial activities. This work has dealt with the structural diagnosis of the leaf, in order to contribute to its quality control of *M. nigra* specie. Samples of the botanical material were sectioned, fixed and stained with fuchsine and toluidine. The leaf has anomocytic stomata on the abaxial side, non-glandular trichomes,

bifacial mesophyll, druses, semiconvex midrib and the petiole exhibits a vascular bundle in a closed arch shape.

**Keywords:** black-mulberry, *Morus nigra*, Moraceae, structural diagnosis.

## INTRODUÇÃO

Os parâmetros morfo-anatômicos possibilitam o controle botânico de qualidade de insumos farmacêuticos auxiliando a autenticidade de drogas e seus adulterantes, identificando e separando uma determinada espécie vegetal de outras. Di Stasi (1996) assinala a importância da análise morfo-anatômica para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal na indústria farmacêutica, justificando que esta análise fornece subsídios que contribuem na padronização dos insumos, permitindo a diferenciação inclusive entre espécies botanicamente próximas. Dentre os ensaios anatômicos destacam-se os referentes a histoquímica, pois auxiliam na caracterização de drogas e no monitoramento de análises fitoquímicas, bem como no aproveitamento racional de insumos vegetais.

*Morus nigra* é uma espécie vegetal que tem sua origem na Ásia, frutificando com maior intensidade e abundância sobretudo na Ásia Menor e estando plenamente aclimatizada no Brasil (Cruz, 1979). Pertence à família Moraceae, sendo conhecida aproximadamente 24 espécies de *Morus* e uma sub-espécie, com pelos menos 100 variedades (Machii et al., 2000; Tutin et al., 1996). A árvore pode atingir de 5 a 20m de altura com folhas bastante grossas, simples e alternas, cordiformes, simétricas na base, de cor verde escura, pecíolos curtos, ásperas, com dentes largos e regulares, estípulas longas, membranosas e felpudas (Morgan, 1982). As gemas são protegidas por estípulas caducas, inflorescência na forma de espiga ou sicônio. As flores são unissexuais; as masculinas monoclamídeas, isostêmones e as femininas aclamídeas, ovário súpero, bi ou unicarpelar, unilocular, uniovulado, com dois estigmas (Agarez et al., 1994). As infrutescências são grandes, ovaladas, negras ou vermelhas brilhantes, quase sésseis. Suas amoras são comestíveis de sabor agridoce, muito sumosas e refrescantes (Morgan, 1982). Na medicina popular as folhas da amoreira-preta têm sido indicadas para mulheres durante a menopausa. Estudos estão sendo realizados para a comprovação da ação em receptores estrogênicos (Franzotti et al., 2004). Os compostos fenólicos presentes no fruto da *Morus nigra* e de outras espécies apresentam amplo espectro de atividade bioquímica tais como propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas bem como a capacidade de modificar a expressão gênica (Nakamura et al., 2003).

Diferentes grupos de compostos químicos têm sido investigados no gênero *Morus*, tais como alcalóides, cumarinas, flavonóides, triterpenos e esteróides (Toshio et al., 2005; Camélia et al., 1997). Numerosos ensaios farmacológicos têm comprovado propriedades

laxativas, anti-helmínticas, expectorantes e hipoglicêmicas em diversas espécies da família Moraceae. Na medicina chinesa, as plantas do gênero *Morus* são usadas como antiinflamatório, diurético, antitussígeno, analgésico e antipirético (Nomura, 1988; Jiang, 1977). As raízes são utilizadas no tratamento de hipertensão arterial, reumatismo, problemas oculares e espasmos infantis. O fruto da amora é usado para doenças hepáticas e renais e suas folhas utilizadas para o tratamento de febre, dor de cabeça, beribéri, vômitos e dor estomacal causada pelo agente da cólera. Os ramos jovens da árvore são usados para o tratamento de hipertensão e paralisia de braços e pernas (Jiang, 1977). Segundo Toshio et al. (2005), foi isolado uma substância denominada chalcomoracina de espécies de *Morus*, a qual apresentou considerável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes á metilina. A potência da atividade inibitória contra o crescimento microbiano foi similar a vancomicina.

Do mesmo modo que a morfo-anatomia de algumas plantas de interesse medicinal foi investigada em trabalhos anteriores (Duarte; Debur, 2003; Souza et al., 2003; Duarte; Hayashi, 2005; Duarte; Wolf, 2005; Farago et al., 2005; Larrosa; Duarte, 2005; Budel et al., 2006; Toledo et al., 2006), a presente investigação tem por objetivo abordar os caracteres anatômicos foliar de *Morus nigra*, de modo a contribuir na morfodiagnose dessa espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras do material vegetal foram coletadas de plantas cultivadas no município de Alfenas, MG, Brasil, em agosto de 2007, cujas coordenadas aproximadas são 21°26' S e 45°56' W. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva, responsável pelo Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas e a exsicata foi depositada no herbário, sob o nº HUNIFAL 00193.

### **Caracterização Macroscópica**

A morfodiagnose macroscópica da folha foi realizada com auxílio de lupa e à vista desarmada, utilizando como instrumento de medida uma régua. Foram realizadas fotografias para documentar a caracterização (Silva & Akisue, 2000).

## **Caracterização Microscópica**

O estudo anatômico, visando a caracterização microscópica da droga vegetal, foi realizado de acordo com as técnicas de Kraus e Ardrin (1997) e Oliveira et al. (1991). A folha adulta foi seccionada transversalmente em micrótomo, na espessura de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . As secções paradérmicas foram realizadas em lâminas temporárias, com material fresco, seccionado a mão livre, e coradas com fucsina e toluidina. Todas as secções foram analisadas e fotografadas em microscópio com câmara digital.

## **RESULTADOS**

### **Caracterização Macroscópica**

As folhas apresentaram o limbo simples, com coloração verde escuro na face ventral e coloração verde claro na face dorsal, flexível e membranácea. O limbo apresenta subdivisão íntegra, superfície rugosa e forma oval. Em média, as folhas atingem 16,0 x 8,0 cm. A margem é levemente serrilhada, apresentando base arredondada e ápice acuminado. A nervação é do tipo peninérvia, apresentando cor mais clara que o limbo (Figura 1).

O pecíolo apresenta coloração verde claro, é torcido, curto, podendo aparecer exemplares medianamente peciolados. Atingem em média 9 cm, possui superfície pilosa, inserção lateral e é biconvexo em secção transversal (Figura 1).

### **Caracterização Microscópica**

Em secção paradérmica as células epidérmicas apresentam contorno levemente ondulado, com paredes finas e justapostas (Figura 2). Os estômatos anomocíticos localizam-se exclusivamente na face abaxial (Figura 3) e inserem-se no mesmo nível das células circunvizinhas, podendo estar rodeados de 3, 4, 5 até 6 células. A análise possibilitou a observação de cutícula estriada na epiderme inferior e cutícula lisa na epiderme superior.

A folha em seção transversal apresenta mesofilo heterogêneo bifacial, com aproximadamente 50% de parênquima paliádico. As células da epiderme inferior se apresentam menores que as células da epiderme superior. No mesofilo observou-se presença de litocistos com cistólitos em forma de pêndulo ou badalo de sino (Figuras 5 e 6).



Em cortes transversais da nervura central observou-se a presença de tricomas tectores e captados (Figura 4). A nervura central tem secção semi-convexa (Figura 7) e a epiderme possui as mesmas características previamente descritas. Subjacente ao sistema de revestimento, nota-se o colênquima angular, formado por cerca de 5 a 6 camadas junto a face adaxial e 4 a 5 no lado oposto. Mergulhado no parênquima fundamental encontra-se um feixe vascular colateral em arco aberto. Internamente ao sistema vascular, localizado entre o parênquima fundamental e o colênquima, ocorre a presença de pequenos cordões de xilema e floema (Figura 8). Observou-se a presença de drusas no parênquima fundamental (Figuras 9, 10 e 11)

Observou-se também a presença de tricomas tectores e captados em secções transversais do pecíolo. Este revela organização interna mostrando feixes vasculares do tipo colateral, constituído de floema e xilema e separados por raios de parênquima fundamental (Figura 12). Apresenta também uma camada de epiderme com cutículas bem espessas e presença de pêlos. O colênquima é do tipo angular, e formado por aproximadamente 12 camadas, seguido de células parenquimáticas (Figura 12).

## **DISCUSSÃO**

Em relação a análise macroscópica da *M. nigra* foi verificado que as características morfológicas da folha não destoam do gênero como um todo. Mas segundo Morgan, 1982, as folhas são cordiformes e apresentam pecíolos curtos. No entanto na espécie estudada as folhas apresentaram forma oval e pecíolo curto, podendo aparecer exemplares medianamente peciolados.

Os caracteres da epiderme foliar são discordantes com a descrição de Sonibare et al., 2006, quanto ao formato das células epidérmicas, que segundo os autores são retangulares, e no presente estudo observou-se que estas células apresentam contorno levemente ondulado.

Diferentemente ainda foi observado por Sonibare et al., 2006, que algumas espécies da família Moraceae apresentam 2 a 3 camadas de células no parênquima paliçádico. Embora tenha observado a presença do parênquima paliçádico no mesófilo da espécie estudada, este se encontra com o mesmo número de camadas do parênquima lacunoso (torno de 50% em cada).

Na epiderme deve ser destacada a presença de tricomas captados e tectores que concordam com a descrição de Sonibare et al., 2006 e Biasiolo et al., 2004. Outra característica relevante na anatomia foliar desta espécie, que pode ser útil em sua diagnose

como insumo farmacêutico, é que as células da epiderme inferior apresentam-se menores que na epiderme superior.

A análise microscópica revelou a ocorrência de estômatos do tipo anomocítico, localizando-se exclusivamente na face abaxial, o que não foi encontrado em literatura.

Metcalfe & Chalk (1957) caracterizaram a anatomia foliar de plantas da família Moraceae, tendo constatado na epiderme de *Morus* spp, a presença de idioblastos de mucilagens e cristólitos. Katsumata (1971) e Fujita & Uchikawa (1986) também observaram idioblastos de cristólitos na epiderme foliar de amoreira. Segundo Mauseth (1988), os cristais podem ocorrer em diferentes órgãos das plantas e em vários formatos, tais como drusas, cristais prismáticos e estilóides. Entretanto cristais de carbonato de cálcio são encontrados apenas em poucas famílias como Moraceae, Urticaceae e Acanthaceae. O cristólito de carbonato de cálcio é localizado no litocisto e ocorrem principalmente na epiderme das folhas. Existe um número crescente de registros revelando a formação de cristais de cálcio que tanto podem ser de oxalato (Franceschi & Horner, 1980; Borchert, 1986; Doaigey, 1991; Kuo-Huang et al., 1994) como cristais de carbonato de cálcio (Watt et al., 1987; Yu e Li, 1990; Kuo-Huang & Yen, 1996). Apenas poucos relatos descrevem a presença de ambos cristais em uma mesma espécie (Fahn, 1990) e tem correspondência com o verificado neste estudo, onde foi observado apenas cristólitos com inclusões de carbonato de cálcio.

## CONCLUSÕES

Vários parâmetros morfo-anatômicos listados neste trabalho são significativos na diagnose da *M. nigra* como insumo farmacêutico. Como características relevantes no controle botânico de qualidade desta planta destaca-se a presença de estômatos anomocíticos exclusivamente na face abaxial, feixe vascular colateral em arco aberto, mesofilo heterogêneo, drusas no parênquima fundamental, tricomas tectores e captados e cristólitos com inclusões de carbonato de cálcio. Todavia, devem ser considerados em conjunto levando-se em conta que alguns caracteres são comuns a outros representantes do gênero e isoladamente não apresentam valor taxonômico para sua diferenciação, uma vez que espécies em grupos muito próximos apresentam caracteres estruturais e compostos químicos em comum.

## AGRADECIMENTOS

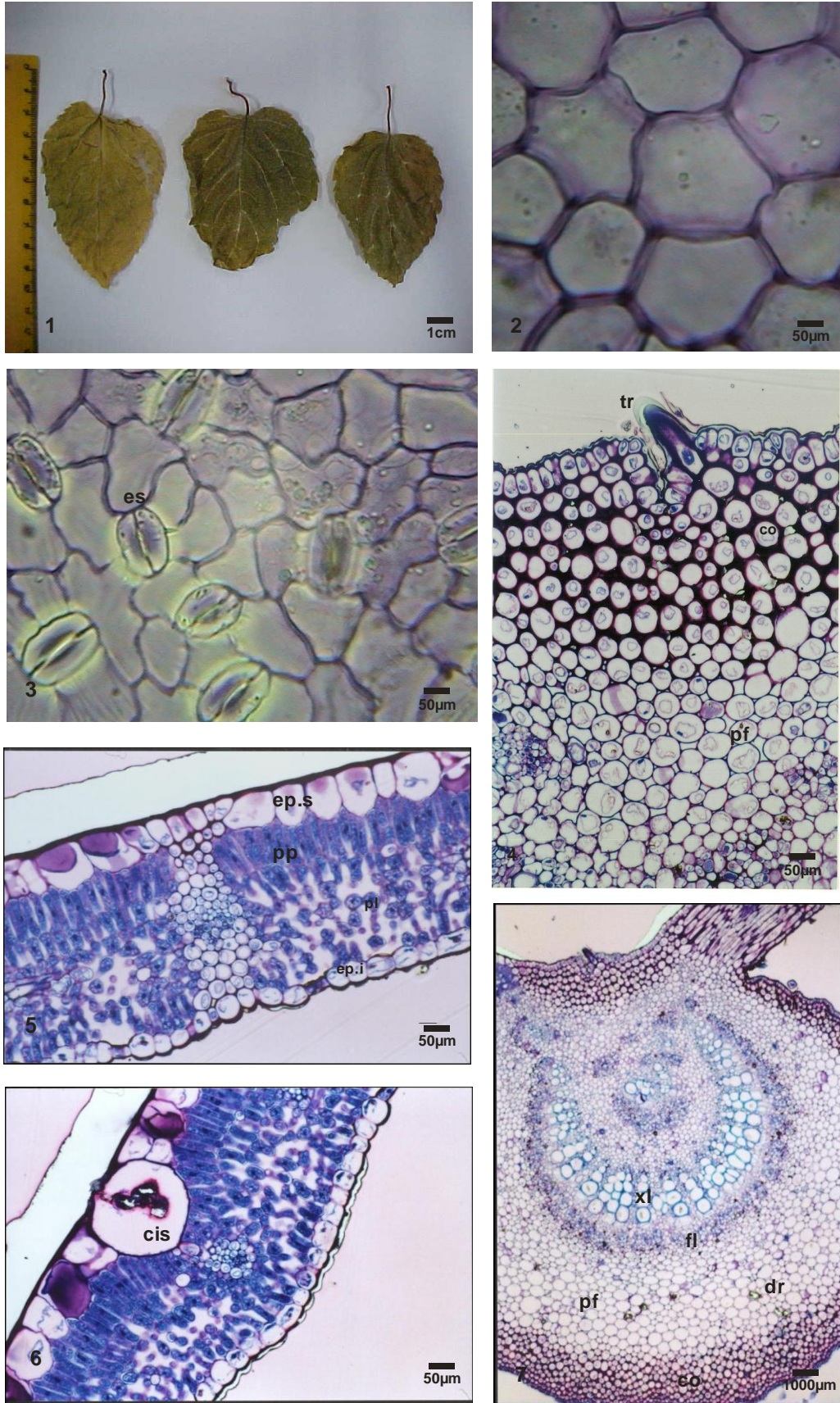
Os autores agradecem a CAPES e PIBIC/CNPq pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

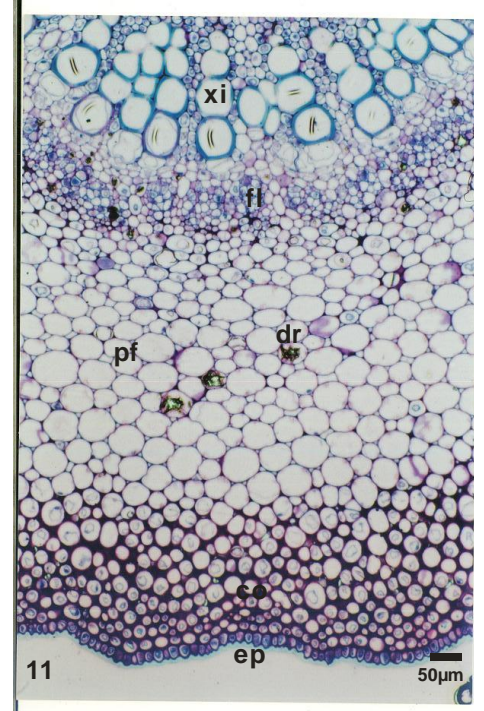
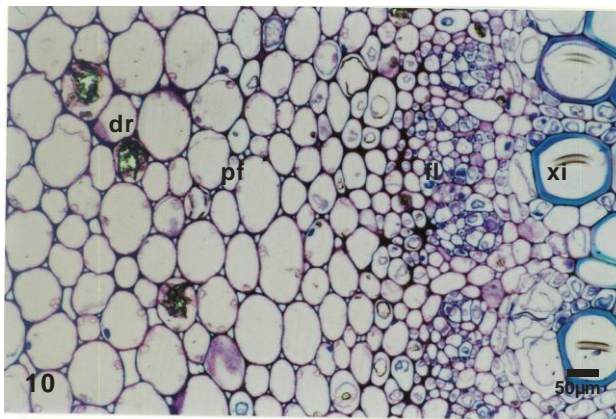
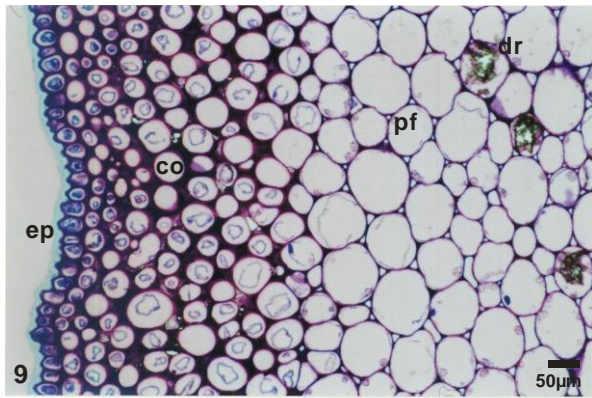
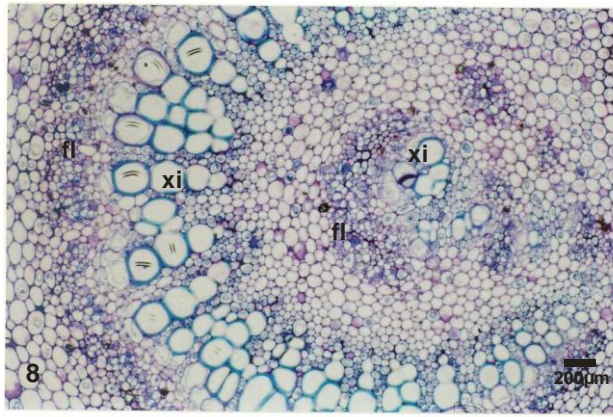
- Agarez FV, Cézio P, Cecília MR 1994. *Botânica: Taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 256p.
- Biasiolo M, Canal MTD, Tornadore N 2004. Micromorphological characterization of tem mulberry cultivars (*Morus* spp). *Economic Botany* 58(4): 639- 646.
- Borchert R 1986. Calcium acetate induces calcium uptake and formation of calcium oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. *Planta* 168: 571-578.
- Budel JM, Duarte MR, Farago PV, Takeda IJM 2006. Caracteres anatômicos de folha e caule de *Calea uniflora* Less., Asteraceae. *Rev Bras Farmacogn* 16: 53-60.
- Camelia GAM, Kent DC, Don Wiley S 1997. Phytoestrogens and floral development in dioecious *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. and *Morus rubra* L. (Moraceae). *Plant Science*. 130: 27-40.
- Cruz, GL 1979. *Dicionário de plantas úteis no Brasil*. Rio de Janeiro: Civilização brasileira. 599p.
- Di Stasi, LC 1996. *Plantas Medicinais: arte e ciência*. São Paulo:UNESP. 230p
- Doaigey AR 1991. Occurrence, type, and location of calcium oxalate crystals in leaves and stem of 16 species of poisonous plants. *Amer. J. Bot.* 78(12): 1608-1616.
- Duarte MR, Debur MC 2003. Caracteres morfo-anatômicos de folhas e caule de *Bauhinia microstachaya* (Raddi) J. F. Macbr. (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 13: 7-15.
- Duarte MR, Hayashi SS 2005. Estudo antômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 103- 109.
- Duarte MR, Wolf S 2005. Anatomical characteres of the phyllode and stem of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 71-76.
- Fahn A 1990. *Plant Anatomy*. 4th ed. *Pergamon Press*. Oxford.
- Farago PV, Budel JM, Duarte MR, Nakashima T 2005. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. *Rev Bras Farmacogn* 15: 250- 255.
- Franceschi VR, H.T. Jr. Horner 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.* 46: 361.427.

- Franzotti EM, Melo SRO, Neves FAR, Silveira D, Simeoni LA 2004. Ação de extratos de *Morus nigra* em receptores de estrogênio. XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Manaus, Brasil.
- Fujita H, Uchikawa C 1986. Electron microscopical study of mulberry with special reference to the identification of cultivars. In: Kitaura, K. (Ed.). Development of new technology for identification and classification of tree crops and ornamentals. Yatabe-cho, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, Japan: Fruit Tree Research Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. p.25-29.
- Jiang Su Xin Yi Xue Yuan (*New Jiang-Su Medical School working party*), Zhong Yao Da Ci Dian (*Encyclopaedia of Chinese crude drugs*), Shanghai: Shanghai Ke Xue Ji Shu Chu Ban She (*Shanghai Science and Technology Publisher*); 1977.
- Katsumata F 1971. Shape of idioblasts in mulberry leaves with special reference to the classification of mulberry trees. *Journal of Sericultural Science of Japan* 40: 313-322.
- Kraus JE, Arduin M 1997. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. In: Seropédica. Rio de Janeiro: EDUR, p.198.
- Kuo-Huang LL, Sheue CR, Yang YP, and Chiang SHT 1994. Calcium oxalate crystals in some aquatic angiosperms of Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 34: 179-188.
- Kuo-Huang LL, Yen TB 1996. The development of lithocysts in the leaves and sepals of *Justicia procumbens* L. *Taiwania* 41: 17- 26.
- Larrosa CRR, Duarte MR 2005. Contribuição ao estudo anatômico do caule de *Hymatanthus sucuuba* (spruce ex Mull. Arg.) Woodson, Apocynaceae. *Rev Bras Farmacogn* 15: 110-114.
- Machii H, Koyama A, Yamanouchi H 2000. FAO Electronic Conference: *Mulberry for animal production*. Disponível em <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/mulberry>.
- Metcalf, CR; Chalk, L 1957 . Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press 1: 1259-1271.
- Nakamura Y, Watanabe S, Miyake N, Kohno H, Osawa T 2003. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3309-3312.
- Nomura T 1988. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. In: Herz W, Grisebach H, Kiurby GW, Tamm Ch, editors. Progress in the chemistry of organic natural products, vol 53. Vienna: Springer Publishing. P. 87.
- Oliveira F, Akissue G, Akissue MK 1991. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, p. 412.

- Morgan R 1982. *Enciclopédia das ervas e Plantas Mediciniais*. São Paulo: Hemus editora. 555p.
- Silva, GA, Akisue, G 2000. Morfodiagnose de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal). *Lecta, Bragança Paulista* 15: 63-97.
- Sonibare MA, Jaycola, Egunyomi A 2006. Comparative leaf anatomy of *Ficus* Linn. Species (Moraceae) from Nigeria. *Journal of Applied Sciences* 6 (15): 3016- 3025.
- Souza WM, Santos CA, Duarte MR, Bardal D 2003. Morfo-anatomia das folhas de nespeira – *Eriobotrya japonica* Lindl., Rosaceae. *Ver Brás Farmacogn* 13: 41-49.
- Toledo ACO, Duarte MR, Nakashima T 2006. Caracterização morfoanatômica de raiz e rizoma de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Rev Bras Farmacogn* 16: 185-191.
- Toshio F, Kiyoshi K, Sumio T 2005. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . *Fitoterapia* 76: 708-711.
- Tutin GT et al. 1996. *Morus* L. In *Flora Europa . Psilotaceae to Platanaceae . vol 1*. Australia: Cambrigde University Press.
- Watt WM, Morrell CK, Smith DL, Steer MW 1987. Cystolith development and structure in *Pilea cadierei* (Urticaceae). *Ann. Bot.* 60: 71-84.
- Yu FG, Li ZI 1990. Anatomy of the lithocyst in the epidermis of leaf in *Broussonetia papyrifera*. *Acta Bot. Sin.* 33: 249-255.



**Figuras 1-7. *Morus nigra*(L):** 1. folhas; 2. face epidérmica adaxial; 3. face epidérmica abaxial; 4. nervura central, em secção transversal, indicando a epiderme com tricoma, colênquima e parênquima fundamental; 5, 6. secção transversal do mesófilo dorsiventral; mostrando epiderme, parênquimas paliçádico e lacunoso, feixe vascular marginal e detalhe do cystólito em forma de pêndulo; 7. secção transversal da nervura central semi-convexa. cis - cystólito, co - colênquima, dr - drusas, ep.i - epiderme inferior, ep.s - epiderme superior, es - estômato, fl - floema, pf - parênquima fundamental, pl - parênquima lacunoso, pp - parênquima paliçádico, tr - tricomas, xi - xilema.



**Figuras 8–12.** *Morus nigra*(L): 8, 9, 10 e 11. nervura central, em secção transversal, onde se notam detalhes dos feixes vasculares e drusas; 12. pecíolo, em secção transversal, onde se evidencia feixes vasculares do tipo colateral e presença de pêlos. co – colênquima, dr – drusas, ep – epiderme, fl – floema, pc – parênquima clorofiliano, pf – parênquima fundamental, tr – tricoma, xi – xilema.

## 2.2 Artigo II

### Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice

Marina de Mesquita Padilha<sup>a</sup>, Fabiana Cardoso Vilela<sup>b</sup>, Marcelo José Dias da Silva<sup>a</sup>, Marcelo Henrique dos Santos<sup>a</sup>, Geraldo Alves-da-Silva<sup>a</sup>, Alexandre Giusti-Paiva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy of Federal University of Alfenas–MG, Alfenas, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Biological Science of Federal University of Alfenas–MG, Alfenas, Brazil.

E-mail: giustipaiva@unifal-mg.edu.br

Corresponding author:

Alexandre Giusti-Paiva, PhD

Departamento de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Alfenas–MG

37130-000 - Alfenas - MG

Brazil

Phone: 55-35-3299-1303

FAX: 55-35-3299-1063

E-mail: giustipaiva@unifal-mg.edu.br

#### Abstract

**Ethnopharmacological relevance:** Several *Morus* species have been used to relieve pain in Brazilian folk medicine.

**Aim of the study:** To evaluate the antinociceptive activities of dichloromethane extract from leaves of *Morus nigra*.

**Material and methods:** Investigate the antinociceptive activity in mice using acetic acid-induced writhing, formalin, and hot-plate test and tail-immersion test.

**Results:** The extract at test doses of 100 and 300 mg/kg, p.o. clearly demonstrated antinociceptive activity in all tests. The extract administered at 300 mg/kg, p.o. had a stronger antinociceptive effect than indomethacin (5 mg/kg, p.o.) and morphine (10 mg/kg, p.o.).

**Conclusion:** The extract of *Morus nigra* markedly exhibited antinociceptive action in mice.

**Key words:** Nociception; Inflammatory pain; Analgesia; Tail flick assay; Tail formalin test; Writhing test



## 1. Introduction

*Morus nigra* L. is a species belonging to the family of the Moraceae and the genus *Morus*, usually known as a black mulberry, and has been widely cultivated to feed silkworms (Nomura, 1988). *M. nigra* is found in the temperate and subtropical regions of the Northern Hemisphere. The cultivation of *M. nigra* in Brazil began with the Japanese migration into the country.

Several species of *Morus* are widely used in traditional medicine as an analgesic, diuretic, antitussive, sedative, anxiolytic, hypotensive, and for the treatment of edema (Nomura, 1998; Nomura and Hano, 1994; Yadav et al., 2008).

This genus contains a variety of phenolic compounds that exhibit interesting biological properties such as antioxidants or free radical scavengers effects (Kim et al., 1999; Sharma et al., 2001; Nomura, 1988; Nomura and Hano, 1994; Takasugi et al., 1978). The leaves of mulberry species are consumed in Korea and Japan as anti-hyperglycemic nutraceutical foods for patients with diabetes mellitus because the leaves contain 1-deoxynojirimycin, known to be one of the most potent  $\alpha$ -glycosidase inhibitors (Kim et al., 2003). Many extracts from plants of this family have been proven to possess anti-inflammatory activities in many animal models. The ethanolic extract from the leaves of *Morus indica* showed anti-inflammatory activity on carrageenan-induced edema in rats and cotton-pellet granuloma models (Balasubramanian et al., 2005).

On the basis of the traditional claim on *M. nigra* and the lack of scientific studies to establish its potential pharmacological properties, the objective of this study was to evaluate the antinociceptive properties of methylene chloride extract of *M. nigra* leaves in mice.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Leaves of *M. nigra* L. (Moraceae) were collected in January 2008 in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. The plant was identified by Dr. Geraldo A. da Silva, Department of Pharmacy of Federal University of Alfenas and voucher specimen is deposited at the Herbarium of Federal University of Alfenas–MG, Brazil (voucher number HUNIFAL–00193).

## 2.2. Preparation of the plant extracts and reference drugs

Leaves of *M. nigra* were air dried at 40° C and powdered. The dried powders were extracted with hydroethanolic solution 50%, and followed by percolation with methylene chloride at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure to obtain a residue for bioactivity determination. The *M. nigra* extract (MnE) was administered in 30, 100, and 300 mg/kg doses after suspending in vehicle (1% sodium carboxymethylcellulose suspension in distilled water). Indomethacin (5 mg/kg) and morphine sulphate (10 mg/kg) in vehicle were used as reference drugs. All test drugs were orally administered in an equivalent volume of 10 ml/kg body weight of the animal.

## 2.3. Assessment of antinociceptive activity of *M. nigra* extract

### 2.3.1. Animals

Adult male Swiss mice (22–28 g) obtained from the Central Animal Facility of Federal University of Alfenas, were housed in a temperature-controlled room, with access to water and food ad libitum until they were used. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas.

### 2.3.2. Acetic acid-induced writhing in mice

Acetic acid (0.6% v/v, 10 ml/kg) was injected into the peritoneal cavities of mice, which were placed in a large glass cylinder, and the intensity of nociceptive behavior was quantified by counting the total number of writhes occurring between 0 and 20 min after stimulus injection, as described earlier (Collier et al. 1968). Oral treatments (p.o.) with vehicle, indomethacin, or MnE were given 1 h prior to acetic acid injection ( $n = 8$  per group). The writhing response consists of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs. The antinociceptive activity was expressed as the writhing scores over a period of 20 min.

### 2.3.3. Formalin-induced nociception

The method used was according to the process described earlier (Santos and Calixto, 1997). Formalin solution (5% in 0.9% saline; 20 $\mu$ l/paw) was injected into the hind paw plantar surface (i.pl.) and the animals were individually placed in transparent cage observation chambers. Oral treatments (p.o.) with vehicle, indomethacin, or MnE were given 1 h prior to formalin injection ( $n = 8$  per group). Morphine sulphate was administered 30 min before the test. The time spent in licking the injected paw was recorded and expressed as the total licking time in the early phase (0–5 min) and late phase (20–30 min) after formalin injection.

### 2.3.4. Tail-immersion test

The lower two-thirds of the tail were immersed in a beaker containing water kept at  $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (Wang et al., 2000). The time in seconds until the tail was withdrawn from the water was considered as the reaction time. The reaction time was then measured 30, 60, and 120 min after the oral administration of vehicle, MnE, and morphine ( $n = 8$  per group). The mice were exposed to hot water for no longer than 12 s to avoid tissue injury.

### 2.3.5. Hot-plate test

The hot plate consisted of an electrically heated surface kept at a constant temperature of  $50.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Mice were placed on the heated surface, within the Plexiglas walls to constrain their locomotion on the plate, and the latency to a discomfort reaction (licking of the paws or jumping) was recorded 0, 30, 60, and 120 min after oral administration of vehicle, morphine, or MnE ( $n = 8$  per group). A cut-off time of 20 s was chosen to indicate complete analgesia and to avoid tissue injury. The latencies for paw licking or jumping were recorded for each animal.

### 2.3.6. Open-field test

In order to discard possible nonspecific muscle relaxant or the sedative effects of extract, mice-motor performance were evaluated on the open-field apparatus (Archer, 1973). Groups

of mice ( $n = 6$ ) were treated with vehicle (10 ml/kg, p.o.) or MnE (30, 100, 300 mg/kg, p.o.) 1 h before the performance of test. For the test, each animal was placed in the center of open-field arena and allowed to have free ambulation for 5 min of observation of the locomotion frequency (number of floor units the animal entered on all its limbs).

#### 2.4. Evaluation of acute toxicity of the *M. nigra* extract

The MnE was orally administered to a group of mice, both male and female. Behavior parameters observed after administration were convulsion, hyperactivity, sedation, grooming, loss of righting reflex, and increased or decreased respiration during a period of 8 h and 7 days. Food and water were provided ad libitum.

#### 2.5. Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad software program Version 4.0 and expressed as a mean  $\pm$  S.E.M. Statistically significant differences between groups was calculated by the application of analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test.  $p$ -values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were used as the significance level.

### 3. Results

#### 3.1. Acetic acid-induced writhing in mice

The MnE administered orally at different doses (100 and 300mg/kg) caused a significant reduction in the number of writhing episodes induced by acetic acid ( $p < 0.05$ ), compared to the control. Indomethacin produced a 53.35% reduction compared to the control. The results are depicted in Fig. 1.

#### 3.2. Formalin test in mice

The MnE at doses of 100 and 300mg/kg, p.o. had a significant antinociceptive activity ( $p < 0.01$ ) compared to the control in both the early and late phase. The reference drug, indomethacin, suppressed only the second phase of the formalin test, while morphine inhibited both phases of the pain stimulus (Fig. 2).

### 3.3. Tail-immersion and hot-plate test induced nociception in mice

As demonstrated in Fig. 3A, MnE administrated at doses of 30–300 mg/kg caused a significant increase in tail-flick response latency time as compared to the control animals. In the hot-plate test, oral treatment with MnE at doses of 30–300 mg/kg increased the latency time as compared to the control group (Fig. 3B). Morphine significantly increased the latency-time response in both tests.

### 3.4. Open-field test

Mice treated with MnE at 30–300 mg/kg did not cause reduction in the numbers of crossings and rearings when compared to the control group in the open-field test (data not shown).

### 3.5. Acute toxicity

The MnE at the dose of 0.5–5 g/kg, p.o. given to mice had no affect on their behavioral responses during the observation periods of 8 h and 7 days after administration. No mortality was observed up to 7 days of monitoring. The LD<sub>50</sub> value of the extract in mice was therefore estimated to more than 5 g/kg, p.o. As the effective dose used in the present study (100 mg/kg, p.o.) was 50-fold less than the dose used in this acute toxicity test, it was safe to assume that the normal doses of 30, 100, and 300 mg/kg, p.o. given to mice in this study were safe.

## 4. Discussion

*Morus nigra* extract demonstrated potent analgesic effect both in the visceral and central nociceptive mouse models. Intraperitoneal injection of acetic acid can produce peritoneal inflammation (acute peritonitis), which causes the response characterized by contraction of the abdominal muscle accompanied by an extension of the forelimbs and elongation of the body. This writhing response is considered as a visceral inflammatory pain model (Koster et al., 1959). This method has been associated with the increased levels of prostaglandins in the peritoneal fluids (Derardt et al., 1980). The results in this study revealed

that MnE significantly reduced the acetic acid-induced writhing responses similar to that of the reference drug, indomethacin.

The formalin test produced a distinct biphasic response, and different analgesics may act differently in this test (Dubuisson and Dennis, 1977; Morteza-Semmani et al., 2002; Nascimento and Branco, 2007). The first phase results from direct chemical stimulation of the nociceptive afferent fibers, mainly C fibers, and may be inhibited by centrally acting analgesics such as morphine. The second phase results from the action of inflammatory mediators released locally, such as prostaglandins, serotonin, histamine, and bradykinin (Rujjanawate et al., 2003) and also from enhanced synaptic transmission in the spinal cord (Tjolsen et al., 1992; França et al., 2001). Drugs whose principal mode of action is central inhibit both phases of this test, whereas peripherally acting drugs only inhibit the second phase. As other substances that act on the central nervous system (CNS), MnE inhibited both phases of the test in a manner similar to that of morphine. Moreover, the results of this test are in agreement with those obtained in the hot-plate and tail-immersion tests, confirming the central antinociceptive effect of this extract.

In the tail-immersion test, which consists of a thermal stimulus, an increase in the reaction time is generally considered as an important parameter for evaluating central antinociceptive activity (Rujjanawate et al., 2003). This test is able to differentiate between central opioid like analgesics and peripheral analgesics (Asongalem et al., 2004). The antinociceptive activity of MnE was observed at a dose of 100 and 300 mg/kg, showing a similar effect to that of morphine. This test also revealed that the antinociceptive effect of MnE on mice remained present for at least up to 120 min after administration of the extract. The tail-flick response is believed to be a spinally mediated reflex (Chapman et al., 1985). The MnE was found to have antinociceptive activity in the hot-plate test, which is a specific central antinociceptive test. The antinociceptive effect of MnE involves supraspinal as well as spinal components, as demonstrated by the use of the hot-plate (Yaksh and Rudy, 1976; Yaksh and Rudy, 1977; Yeung et al., 1977) and tail-immersion (Woolf et al., 1980; Luttinger, 1985) tests, respectively. The results suggest that MnE has a central antinociceptive effect, as shown by the prolonged delay in response when mice were subjected to a nociceptive stimulus in the tail-immersion test, and also by the increase in reaction time of the mice in the hot-plate test.

The present study showed the efficacy of the MnE in different antinociceptive responses generated by chemical noxious stimulus in the tissue injury produced by formalin, or acetic acid injections, or by an exposure to thermal noxious stimulus in the hot-plate and

tail-immersion tests. The antinociceptive effect of MnE would appear to occur at doses that evoked no visible modification in the overall behavior of the animals. However, further studies should be carried out to investigate the molecular mechanism of action of MnE and its participation in the inhibitory mechanisms of pain in the CNS.

#### Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG and CNPq. A Giusti-Paiva received a research fellowship from CNPq.

#### References

Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior* 21, 205–235.

Asongalem, E.A., Foyet, H.S., Ekobo, S., Dimo, T., Kamtchouing, P., 2004. Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 63–68.

Yadav, A.V., Kawale, L.A., Nade, V.S., 2008. Effect of *Morus alba* L. (mulberry) leaves on anxiety in mice. *Indian Journal of Pharmacology* 40, 32–36.

Balasubramanian, A., Ramalingam, K., Krishnan, S., Ajm, C., 2005. Anti-inflammatory activity of *Morus indica* Linn. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 4, 13–15.

Chapman, C.R., Casey, K.L., Dubner, R., Foley, K.M., Gracely, R.H., Reading, A.E., 1985. Pain measurement: an overview. *Pain* 22, 1–31.

Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 32, 295–310.

Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallée, F., Flahaut, M., 1980. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* 61, 17–24.

Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161–174.

França, D.S., Souza, A.L., Almeida, K.R., Dolabella, S.S., Martinelli, C., Coelho, M.M., 2001. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *European Journal of Pharmacology* 421, 157–164.

Kim, J.W., Kim, S.U., Lee, H.S., Kim, I., Ahn, M.Y., Ryu, K.S., 2003. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1002, 93–99.

Kim, S.Y., Gao, J.J., Lee, W.C., Ryu, K.S., Lee, K.R., Kim, Y.C., 1999. Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Archives of Pharmacal Research* 22, 81–85.

Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. 18, 412–416.

Luttinger, D., 1985. Determination of antinociceptive efficacy of drugs in mice using different water temperatures in a tail-immersion test. *Journal of Pharmacological Methods* 13, 351–357.

Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Hamidian, M., Vafamehr, H., Dehpour, A.R., 2002. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 181–186.

Nascimento, C.G., Branco, L.G., 2007. Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: evidence for a cGMP signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 556, 55–61.

Nomura, T., Hano, Y., 1994. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Natural Product Reports* 11, 205–218.



Nomura, T., 1988. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 53, 87–201.

Rujjanawate, C., Kanjanapothi, D., Panthong, A., 2003. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 91–95.

Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 31, 381–389.

Sharma, R., Sharma, A., Shono, T., Takasugi, M., Shirata, A., Fujimura, T., Machii, H., 2001. Mulberry moracins: scavengers of UV stress-generated free radicals. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65, 1402–1405.

Takasugi, M., Shigemitsu, N., Masamune, T., Shirata, A., and Takahashi, K., 1979. Structures of Moracin E, F, G, and H, new phytoalexins from diseased mulberry. *Tetrahedron Letters* 48, 4675–4678.

Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunnskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.

Wang, Y.X., Gao, D., Pettus, M., Phillips, C., Bowersox, S.S., 2000. Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain* 84, 271–281.

Woolf, C.J., Mitchell, D., Barrett, G.D., 1980. Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat. *Pain* 8, 237–252.

Yaksh, T.L., Rudy, T.A., 1976. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 192, 1357–1358.

Yaksh, T.L., Rudy, T.A., 1977. Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 202, 411–428.

Yeung, J.C., Yaksh, T.L., Rudy, T.A., 1977. Concurrent mapping of brain sites for sensitivity to the direct application of morphine and focal electrical stimulation in the production of antinociception in the rat. *Pain* 4, 23–40.

Figure 1. Effect of *M. nigra* extract (MnE) administered orally against acetic acid- induced writhing movements in mice. Animals were pretreated orally with vehicle, MnE (doses 30, 100, and 300 mg/kg) or indomethacin for 30 min prior to the acetic acid (0.6%, i.p.). Each column represents the mean with S.E.M. for six mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): \* $p < 0.05$ .

Figure 2. Effect of *M. nigra* extract (MnE) given by oral route on the licking induced by formalin in mice. Animals were pretreated orally with vehicle, MnE (doses from 30–300 mg/kg), indomethacin or morphine for 30 min prior to formalin. The total time spent licking the hind paw was measured in the first (Panel A) and the second (Panel B) phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): \* $p < 0.05$ .

Figure 3. Effect of *M. nigra* extract (MnE) administered orally on the tail-immersion test (A) or hot-plate test (B) in mice. Animals were pretreated orally with vehicle, MnE (doses from 30–300 mg/kg) or morphine for 30 min prior to tail-immersion or hot-plate test at 50°C. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): \* $p < 0.05$ .

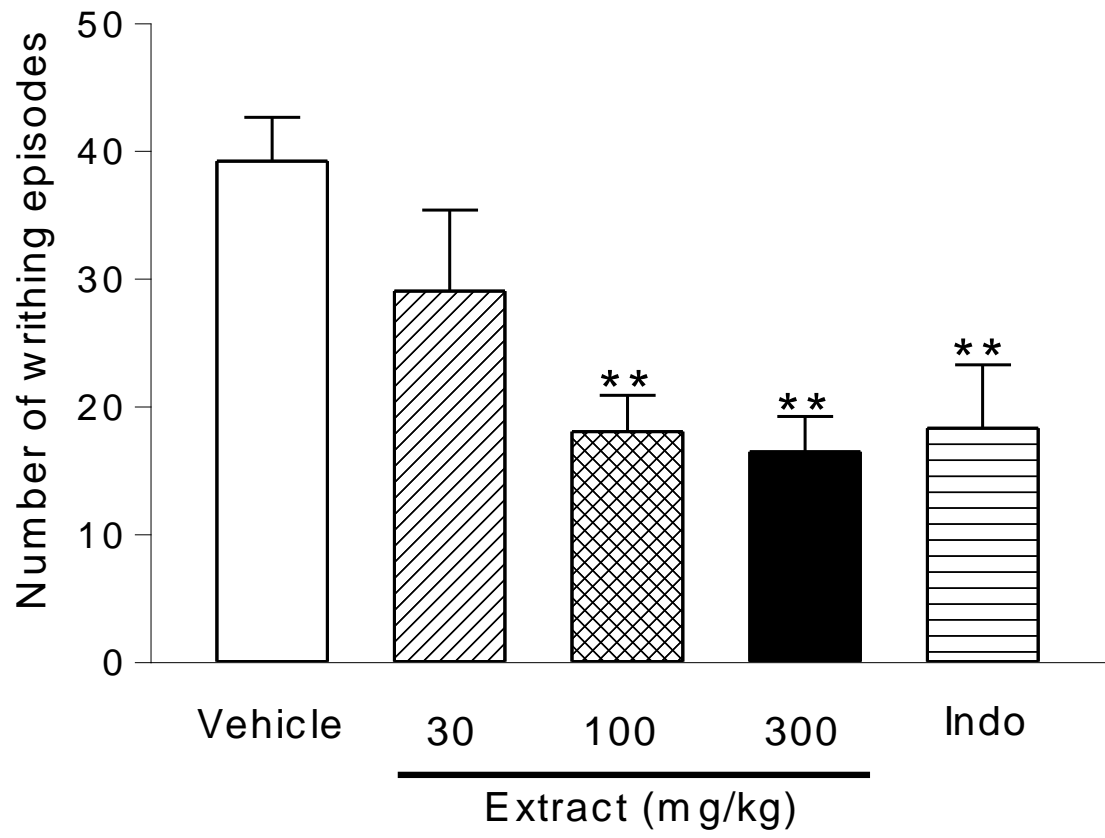


Figure 1. Padilha et al.

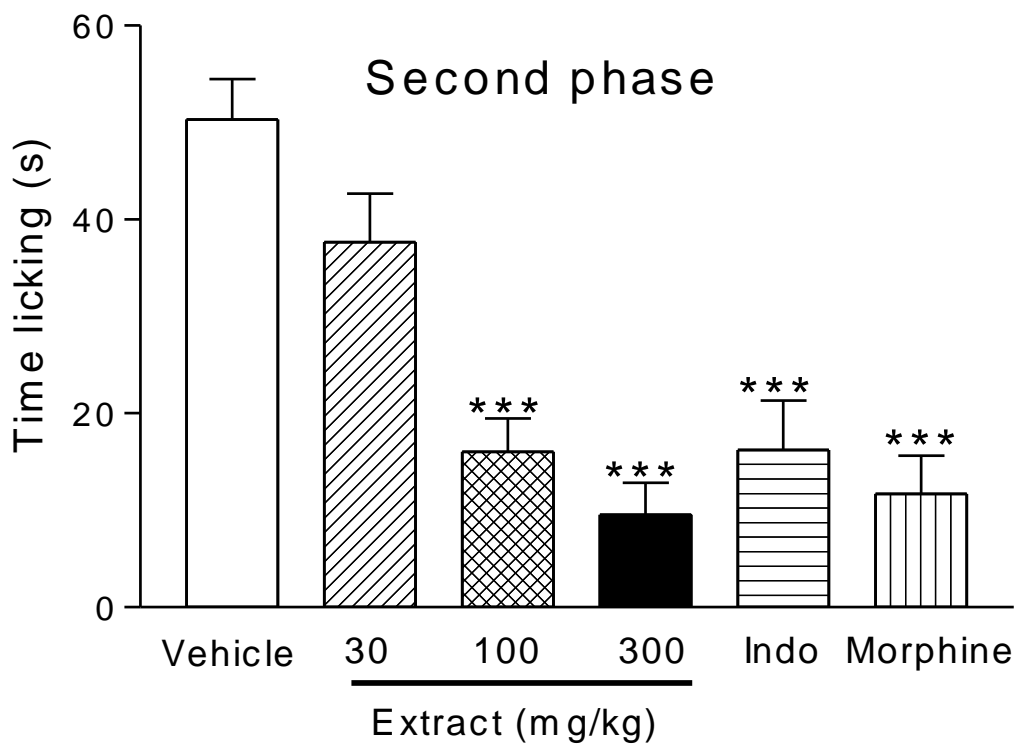
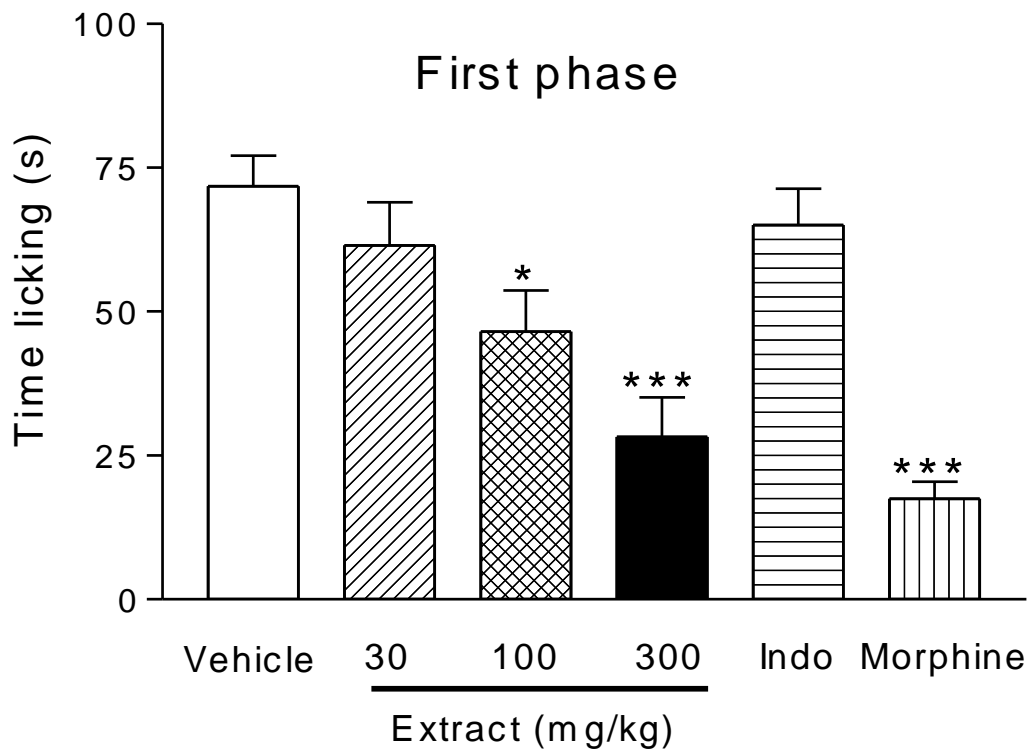


Figure 2. Padilha et al.

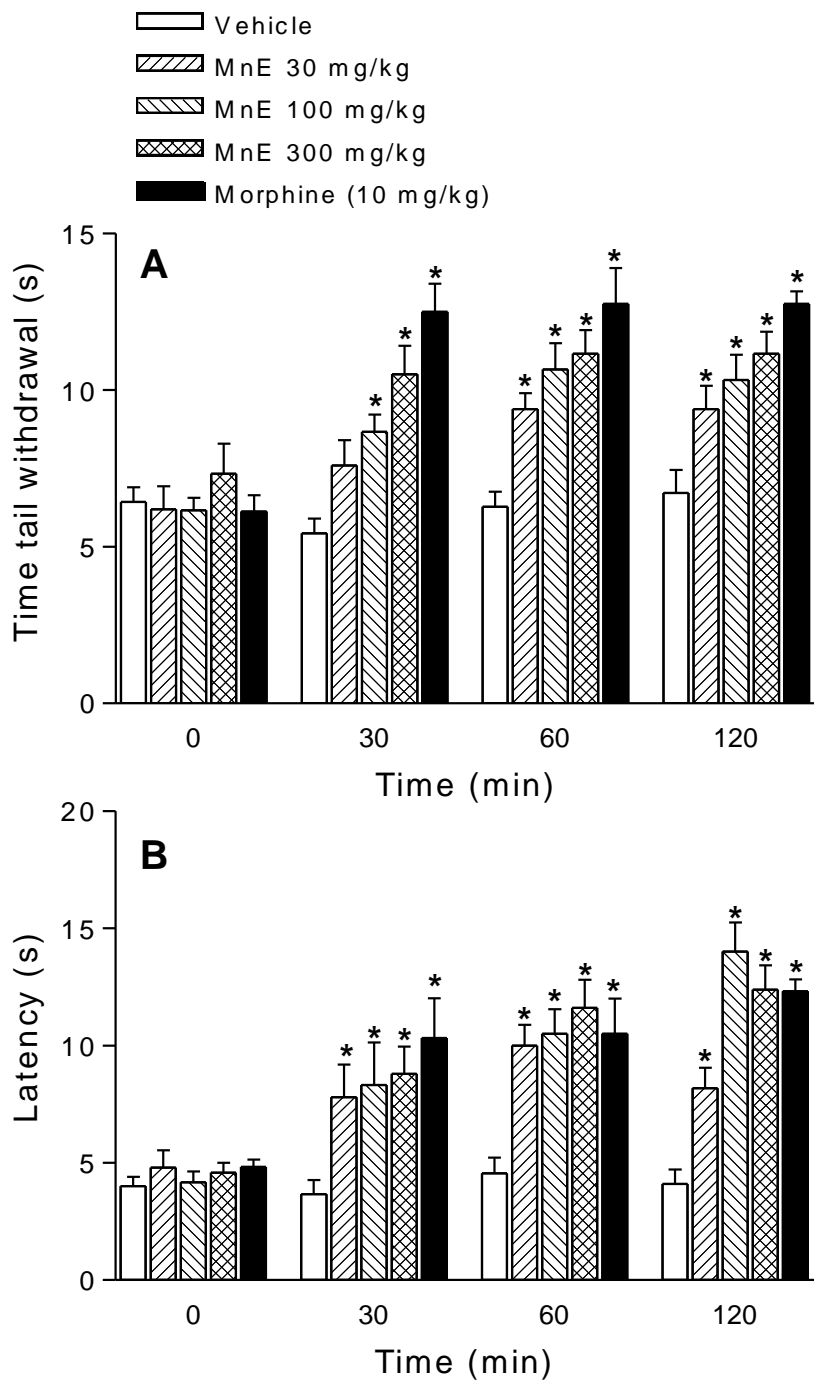


Figure 3. Padilha et al.

## 2.3 Artigo III

### Anti-inflammatory activity and isolation of pentacyclic triterpene from *Morus nigra* leaves

Marina de M. Padilha<sup>1\*</sup>, Fabiana C. Vilela<sup>2</sup>, Marcelo José Dias<sup>1</sup>, Cláudia Q. da Rocha<sup>3</sup>, Alexandre Giusti-Paiva<sup>2</sup>, Marcelo H. dos Santos<sup>3</sup>, Geraldo Alves-da-Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, UNIFAL – MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas-MG, CEP:37130-000, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Fisiologia, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil.

Corresponding author

Marina de M. Padilha. e-mail: [marina\\_mmp@hotmail.com](mailto:marina_mmp@hotmail.com); phone: (+55)-35-32991343; Fax: (+55)-35-32991067

### Abstract

The present study describes the chemical constituent isolated and anti-inflammatory evaluation of *Morus nigra* leaves grown in Brazil. The plant materials were extracted previously with hydroethanolic solution 50%, following by percolation with methylene chloride at room temperature. From the extract were obtained the pentacyclic triterpene named germanicol. The structure of natural product were identified on basis of spectral data. The anti-inflammatory effect of *M. nigra* extract were studied at doses of 30, 100 and 300 mg/Kg p.o. using carrageenan-induced edema and granulomatous tissue formation tests. The extract produced a significant decrease in edema caused by carrageenan and inhibited the granulomatous tissue formation. The results of pharmacological tests performed in the present study suggest that the extract of *M. nigra* presents anti-inflammatory effect.

## 1. Introduction

Medicinal plants are still a major part of traditional medical systems in developing countries. Several herbal remedies are now being intensively used in therapy. The use of medicinal plants as analgesic and anti-inflammatory drugs in folk medicine is a common practice, although in most cases the active principles of the plants are unknown. However evaluation of the pharmacological effects of the herbals crude extracts can still be used as a logical research strategy for searching of new drugs (Nafisy, 1989; Javan et al., 1997).

*Morus nigra* L. (Moraceae) – known in Brazil as “amoreira-preta” – has been used as an analgesic, diuretic, antitussive, sedative, anxiolytic, hypotensive, and also has been used for the treatment of a variety of ailments including inflammatory disorders (Nomura, 1998; Nomura and Hano, 1994). This vegetal variety is geographically distributed throughout Brazil and temperate and subtropical regions of the Northern Hemisphere. Many extracts from plants of this family have been proven to posses anti-inflammatory and analgesic activities in many animal models. The ethanolic extract from the leaves of *Morus indica* showed anti-inflammatory activity on carrageenan-induced edema in rats and cotton pellet granuloma models (Balasubramanian et al., 2005). We have previously shown a antinociceptive action for the methylene chloride extract of *M. nigra* leaves in models of nociception in mice. However, no report on the chemical constituents of *M. nigra* leaves has been published. Thus, this study was undertaken to investigate the anti-inflammatory activity of the methylene chloride extract and to describe the isolation and identification of one terpenoid from *M. nigra* leaves.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Leaves of *Morus nigra* L. were collected in January 2008, in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. The plant was identified by Dr. Geraldo A. da Silva, from the Department of Pharmacy of Federal University of Alfenas and voucher specimen is deposited at the Botanic Departament Herbarium of Federal University of Alfenas - MG (voucher number HUNIFAL-00193).

## 2.2. Preparation of the plant extract and reference drugs

Leaves of *M. nigra* were air dried at 40° C and powdered. The dried powder was extracted with hydroethanolic solution 50%, following by percolation with methylene chloride at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure to obtain a residue for bioactivity determination. The *Morus nigra* extract (MnE) was administered in 30, 100 and 300 mg/kg doses after suspending in vehicle (1% sodium carboxymethylcellulose suspension in distilled water). Indomethacin (5 mg/kg) and dexamethasone (0,2 mg/Kg) in vehicle were used as reference drugs. All test drugs were orally administered in an equivalent volume of 10 mL/Kg body weight of the animal.

## 2.3. Phytochemical tests

The extract of the plant material was screened for various classes of natural products using standard qualitative methods as described by Harborne (1973). The test for tannins was carried out by subjecting 1 g of plant extract in 2 mL of distilled water, filtered and ferric chloride reagents added to the filtrate. For alkaloids, the test was carried out by subjecting 1 g extract in 10 mL 1% HCl, boiled, filtered and Mayer's reagent. The extract was subjected to frothing test for the identification of saponins. The presence of flavonoids was determined using 1% aluminum chloride solution in methanol concentrated HCl, magnesium turnins, and potassium hydroxide solution. Steroids and Triterpenes were screened by adding 1 mL of acetic anhydride to 0,25 g extract with 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 2.4. Isolation of terpenoid

The MnE, which demonstrated the most promising analgesic activity, was studied in more detail. A part of this extract (6 g) was chromatographed using a silica gel column eluted with n-hexane, ethyl-acetate and ethanol in order to result fifty-seven fractions that were rejoined in groups for similarity in TLC (thin layer chromatography). The most promising group, denoted as F1 (2,5 g), was rechromatographed over a silica gel column eluted with same solvents, given about eighty-four fractions. The fraction 35 (0,15g) was rechromatographed again obtaining a compound pure named as Compound A. The chemical structures of isolated compound was identified on the basis of nuclear magnetic resonance (NMR).



## 2.5. Animals

Adult male Wistar rats (120-180 g) obtained from the Central Animal Facility of Federal University of Alfenas, were housed in a temperature-controlled room, with access to water and food *ad libitum* until use. All experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on the welfare of experimental animals and with the approval of Ethics Committee of the Federal University of Alfenas.

## 2.6. Anti-inflammatory activity

### 2.6.1. Granulomatous tissue formation

This assay was described by Niemegggers et al. (1975), Swingle & Shideman (1972) and Meier et al. (1950). Pellets weighing approximately 40 mg each were made with 5 mm of dental cotton tampon. The pellets were sterilized and then impregnated with 0,4 mL ampicillin aqueous solution at the moment of implantation. Having the animals anaesthetized, the pellets were subcutaneously introduced, through abdominal skin incision. The MnE group was daily treated (30, 100 e 300 mg/Kg), for six consecutive days. The second group was treated, during six-day period, with dexamethasone (0,2 mg/Kg). The third group (control) was treated daily, for six consecutive days, with 1% sodium carboxymethylcellulose suspension in distilled water (p.o). This treatment was initiated 2 hours following the implantation of pellets and continued until the sixth day. In the seventh day, the animals were sacrificed and the granulomas removed, dried for 24 hours (60°C) and the weigh determined. The difference between the initial and final weighs was considerate the weigh of the produced granulomatous tissue.

### 2.6.2. Carrageenan-induced rat paw edema

The method used was described by Winter et al. (1962) and modified by Carvalho et al. (1999). The animals were divided into five groups consisting of eight rats each. The control group received vehicle (10 mL/Kg), the standard group received indomethacin (5 mg/Kg) and the test groups received the extract at the dose of 30, 100 e 300 mg/Kg, p.o. One hour after oral administration of different substances, 0,1 mL (1000 µg/paw) of carrageenin suspension was injected to all animals in the right paw and 0,1 mL of saline 0,9% solution

into the left paw. The paw volume, up to the tibiotarsal articulation, was measured using a plethysmometer (model 7150, Ugo Basile). The measures were determined at 0 h (before carrageenin injection) and 1, 2, 3 and 4 h later.

## 2.7. Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad software program version 4.0 and expressed as a mean±S.E.M. Statistically significant differences between groups was calculated by the application of analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *p*-Values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were used as the significance level.

## 3. Results

### 3.1. Phytochemical tests

The crude extract was found to be positive for the presence of steroids and triterpenoids. However the crude extract was found negative for the presence of tannins, alkaloids, saponins and flavonoids (phenols and polyphenols).

### 3.2. Isolation of terpenoid

Fig.1 shows the molecular structure of compound isolated of extract of *M. nigra*. The compound was deduced using <sup>13</sup>C NMR analyse, which was afterwards confirmed by comparison with data from literature.

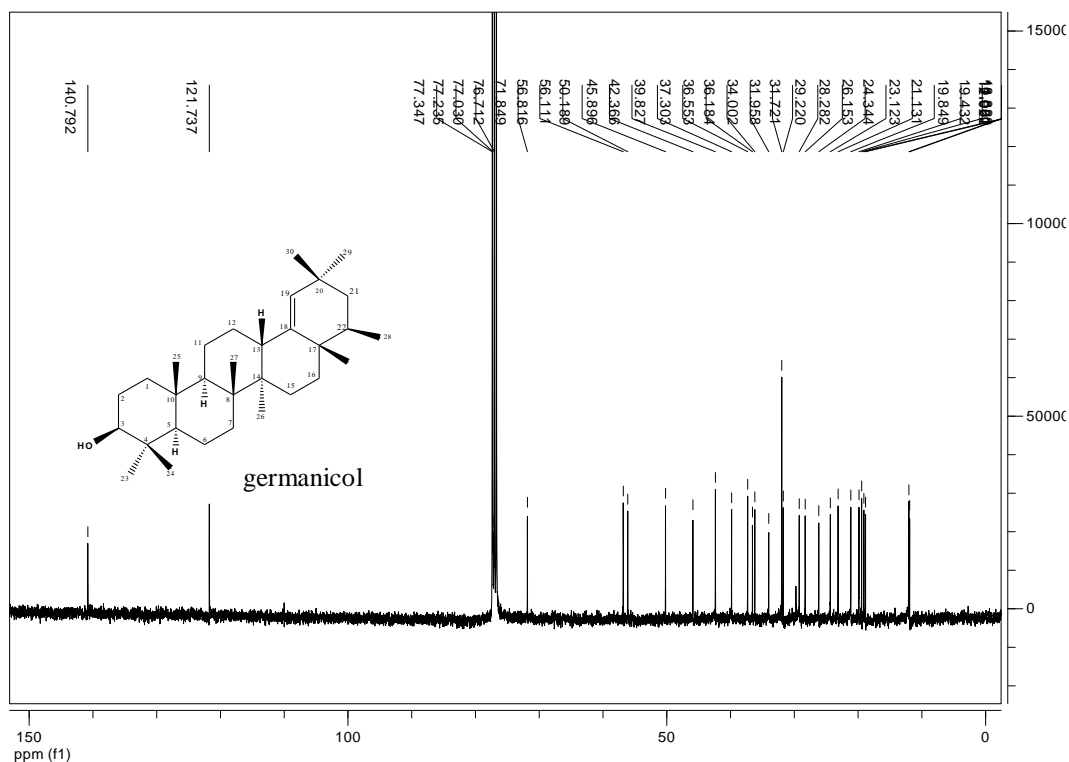


Fig.1. NMR data of pentacyclic triterpene germanicol

### 3.3. Granulomatous tissue formation

Daily administration of MnE (300 mg/Kg, p.o) inhibited the formation of granulomatous tissue by 39,7% in comparison to the control group ( $p < 0,05$ ). Moreover, the administration of dexamethasone reduced its formation by 72,2% when compared to the control group ( $p < 0,001$ ). These results are depicted in Figure 2.

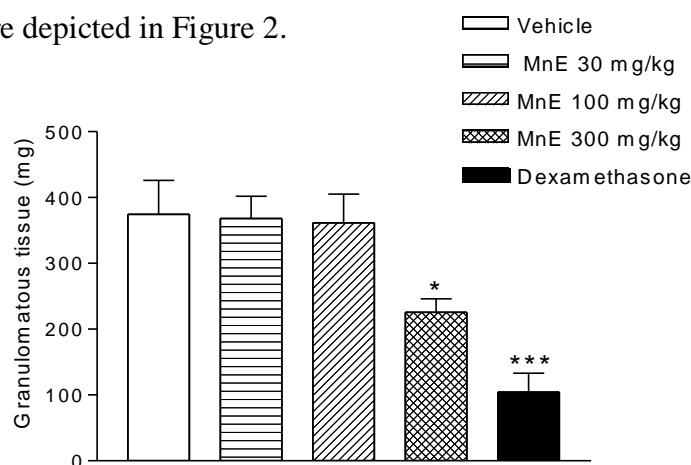


Fig.2. Effect of administration of MnE (30, 100 and 300 mg/Kg, p.o.), dexamethasone (0,2 mg/Kg p.o.) and 1% sodium carboxymethylcellulose suspension on the formation granulomatous tissue. Each point represent the mean  $\pm$  S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test): \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p, 0,001$

### 3.4. Carrageenan-induced rat paw edema

The results obtained with extract and indomethacin in the carrageenan-induced edema test are showed in Figure 3. The degree of swelling of the carrageenan-injected paws maximal 3 h after carrageenan injection. Statistical analysis shows that 3 h after carrageenan injection, the MnE at doses of 30, 100 and 300 mg/Kg produced a significant decrease in the degree of swelling in comparison with the control group ( $p < 0,05$ ) by 45,5, 59,5 and 53,2% respectively. This result is quite similar to the one observed for the group treated with indomethacin, which inhibited edema formation by 66,9% ( $p < 0,001$ ).

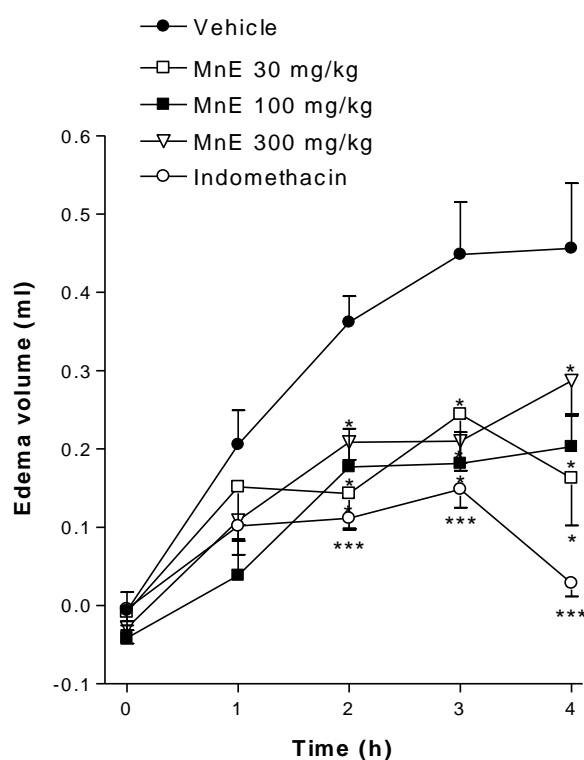


Fig.3. Effect of administration of MnE (30, 100 and 300 mg/Kg, p.o.), indomethacin (5mg/Kg, p.o.) and 1% sodium carboxymethylcellulose suspension on the rat paw edema induced by intraplantar carrageenan injection (1000  $\mu$ g/paw). Each point represent the mean  $\pm$  S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with control group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test): \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p, 0,001$

## 4. Discussion

The study of ethnopharmacological uses, phytochemistry and pharmacology of *M. nigra* represents a successfully combination of efforts to discover new compounds related to some properties of this medicinal specie. The results reported in the present investigation

demonstrate for the first time that *M. nigra* grown in Brazil exerts anti-inflammatory effects in rats, which are related specially to the presence of terpenoids.

Carrageenan-induced edema has been commonly used as an experimental animal model for acute inflammation and is believed to be biphasic. The early phase (1 – 2 h) of the carrageenan model is mainly mediated by histamine, serotonin and increased synthesis of prostaglandins in the damaged tissues surroundings. The late phase is sustained by prostaglandin release and mediated by bradykinin, leukotrienes, polymorphonuclear cells and prostaglandins produced by tissue macrophages (Brito and Antonio, 1998). The inhibitory activity shown by the extract of *Morus nigra* leaves (30, 100 e 300 mg/Kg) over period of 4 h in carrageenan-induced paw inflammation was quite similar to that exhibited by the group treated with indomethacin. These results indicate that it acts in later phases, probably involving arachidonic acid metabolites, which produce an edema dependent on neutrophils mobilization (Just et al., 1998).

The induction of granulomatous tissue presented a chronic inflammatory response as reported by Swingle and Shideman, 1972. These authors showed that non-steroidal anti-inflammatory agents such as aspirin give only slight inhibition whereas steroidal anti-inflammatory agents have a strong inhibition on the transudative and proliferative phases. In present study, MnE (300 mg/Kg) inhibited significantly this process although dexamethasone, a steroidal anti-inflammatory drug, inhibited more 50% in this process.

In summary, our results demonstrate that *M. nigra* cultivated in Brazil produces active compounds which act as anti-inflammatory in different models in animals. Presence of phytoconstituents like pentacyclic triterpenes and steroids have been previously found to be responsible for analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities in plants. Through NMR technique it was possible to identify the compound germanicol as belonging to class of triterpenes. Due to the strong anti-inflammatory activity presented by *M. nigra* extract, it can be concluded that the germanicol is an important source of natural anti-inflammatory compound. We can suggest that the extracts of *M. nigra* leaves possess an anti-inflammatory property supporting its folk use in the treatment of inflammatory disorders.

#### Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq.

## References

Balasubramanian, A., Ramalingam, K., Krishnan, S., Ajm, C. (2005) Anti-inflammatory activity of *Morus indica* Linn. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics 4:13-15.

Brito, ARMS., Antonio, MA (1998) Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). Journal of Ethnopharmacology 61: 215-228.

Carvalho, JC.; Sertie, JA.; Barbosa, MV.; Patrício, KC.; Caputo, LR.; Sarti, SJ.; Ferreira, L. P.; Bastos, JK (1999) Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. J Ethnopharmacol 64:127-133.

Harborne, JB (1973) Phytochemical Methods. Chapman & Hall, New York, pp. 1-150.

Javan, M., Ahmadiani, A., Semnani, S., Kamalinejad, M (1997) Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. Journal of Ethnopharmacology 58:125- 129.

Just, MJ., Recio, MC., Giner, RM., Cullar, MJ., Manez, S., Bilia, AR (1998) Anti-inflammatory activity of unusual Lupane saponins from *Bupleurum fruticosum*. Planta Medica 64: 404-407.

Meier, R.; Schuler, W.; Desaulles, P (1950) L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. Experimentia 6: 469-471.

Nafisy, AT (1989) A Review of Traditional Medicine in Iran. Isfahan University Publications, Isfahan. 1 - 2, 8 - 11, 121.

Niemeggers, CJE.; Awouters, F.; Lenaerts, FM.; Janssen, AJ (1975) The activity of suprofen on nystatin-induced paw edema in rats. Arzneimittel-Forsch 25: 1516- 1519.

Nomura, T (1988) Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe 53: 87-201.

Nomura, T., Hano, Y (1994) Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Natural Product Reports* 11: 205-218.

Swingle, KF., Shideman, FE (1972) Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 132, 608.

Swingle, KF.; Shideman, FE (1972) Phases of inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. *J. Pharmacol Exp Ther* 183: 226-234.

Winter, CA.; Risley, EA.; Nuss, GW (1962) Carrageenan-induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Prog Soc Biol Med* 11: 544-547.