



Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae)

Grasielly Rocha Souza¹; Juliane Cabral Silva¹; Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior¹; Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva²; Amanda Leite Guimarães¹; Ana Paula de Oliveira¹; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^{1*}

¹Universidade Federal do Vale do São Francisco, Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Petrolina, PE, Brasil.

²Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

O extrato etanólico bruto das folhas de *M. nigra* (Mn-EtOH) foi avaliado quanto à atividade antinociceptiva em modelos experimentais em camundongos. Foram usados os métodos de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da formalina e placa quente. No teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, Mn-EtOH (100, 200 e 400 mg/kg, *i.p.*) reduziu o número de contorções em 38,82, 97,65 e 100%, respectivamente. O extrato também produziu uma significativa inibição de ambas as fases do teste da formalina, sendo que o efeito foi mais significativo na segunda fase (dor inflamatória). O extrato diminuiu em 42,19, 56,96 e 40,50%, respectivamente, o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste de formalina, assim como 84,04, 77,20 e 61,07%, respectivamente, na segunda fase. Além disso, não apresentou efeito no teste da placa quente. Os dados obtidos sugerem que o extrato tem efeito antinociceptivo, provavelmente mediado através de mecanismos periféricos. Novos estudos estão sendo realizados para caracterizar o mecanismo responsável por esse efeito.

Palavras-chave: *Morus nigra*. Moraceae. Atividade antinociceptiva. Dor.

INTRODUÇÃO

Morus nigra L. (Moraceae) é uma espécie pertencente ao gênero *Morus*, que possui pelo menos 24 espécies e uma subespécie, com aproximadamente 100 variedades. Em algumas regiões do Brasil é conhecida como “amora-preta”, entretanto, na região do Vale do São Francisco é popularmente denominada de “amora-miúra” (Almeida *et al.*, 2011).

Várias espécies de *Morus* são amplamente usadas na medicina tradicional como analgésico, diurético, antitussígeno, sedativo, ansiolítico, hipotensivo e para o tratamento de edema (Padilha *et al.*, 2009, Yadav *et al.*, 2008; Nomura & Hano, 1994).

Morus nigra possui como origem a região do extremo oriente, sendo bastante utilizada na medicina tradicional chinesa como hepatoprotetor, hipotensor, antipirético, analgésico, diurético, expectorante, antidiabético (Chen *et al.*, 1995) bem como para o tratamento de anemia e artrite (Ozgen *et al.*, 2009). Sabe-se que no Japão é utilizada por pacientes com diabetes mellitus, uma vez que possui em suas folhas um composto denominado de 1-desoxinojirimicina, o qual é um potente inibidor da enzima α -glicosidase (Kim *et al.*, 2003). Esta é uma enzima chave que catalisa a etapa final do processo digestivo dos hidratos de carbono. Assim, α -glicosidase inibidores podem retardar a liberação da glicose na dieta de carboidratos complexos e atraso na absorção de glicose, resultando em redução dos seus níveis plasmáticos (Kumar *et al.*, 2011).

Esta espécie foi trazida para o Brasil por imigrantes japoneses, adaptando-se bem às condições de clima e solo. No Vale do São Francisco a população utiliza o chá das folhas (decocto) para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (Oliveira *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que, embora bastante utilizada na medicina popular, estudos químicos e farmacológicos com essa espécie ainda são poucos. Entretanto, estudos realizados por Souza *et al.* (2000), demonstraram que a morusina, um prenilflavonoide isolado das

Autor correspondente: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, E-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br

raízes, apresentou atividade antinociceptiva em modelos de dor em camundongos. Além disso, estudos realizados por Naderi *et al.* (2004) com os extratos dos frutos demonstraram uma ação protetora contra o estresse oxidativo em biomembranas e biomoléculas. Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato diclorometânico das folhas dessa espécie também foram demonstradas (Padilha *et al.*, 2010; Padilha *et al.*, 2009). Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial hipoglicemiante e a toxicologia do extrato etanólico bruto dessa espécie (Almeida *et al.*, 2011), bem como a toxicidade do chá das folhas (Oliveira *et al.*, 2013) e foi demonstrado que a planta pode ser considerada de baixa toxicidade, pois não produziu efeitos tóxicos nos animais tratados.

Os modelos animais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de um extrato os substância isolada envolvem diversas respostas nociceptivas geradas por estímulos químicos ou térmicos (Silva *et al.*, 2013). Apesar de, na maioria das vezes, não se chegar ao mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta em estudo, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir com o curso da dor.

Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham a capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos (Lapa *et al.*, 2003). Os modelos mais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais são: teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente.

O teste de contorções abdominais é um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético. O teste da formalina é um método de avaliação comportamental em que a dor está associada à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata do animal. A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação. O teste da placa quente avalia o tempo que os animais permanecem sobre uma placa metálica aquecida até reagirem ao estímulo térmico e é bastante utilizado como um modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central (Silva *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva do extrato etanólico bruto das folhas de *M. nigra* em modelos experimentais de nocicepção.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As folhas de *Morus nigra* L. foram coletadas na Fazenda Ouro Verde, município de Casa Nova, BA em fevereiro de 2010. Uma excisada da planta (1764) está depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Processamento do material vegetal e obtenção do extrato etanólico bruto

O material vegetal foi seco em estufa com ar circulante, mantido à temperatura média de 45 °C por um período de 72 horas. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho mecânico. O material vegetal seco e pulverizado (714 g) foi macerado com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas 3 extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração. A solução extrativa foi destilada em evaporador rotativo à pressão reduzida, à temperatura média de 50 °C. Após este processo, obteve-se o extrato etanólico bruto (Mn-EtOH), que pesou 69 g.

Avaliação fitoquímica preliminar

O extrato etanólico bruto foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes no mesmo. Foram realizados testes para a identificação de fenóis e taninos (cloreto férrico 2%), flavonoides (Shinoda), alcaloides (Dragendorff, Mayer e Bouchardat), esteroides e terpenoides (Liebermann-Burchard) segundo metodologia descrita por Matos (1997).

Testes de atividade antinociceptiva

Reagentes e fármacos

Ácido acético, formaldeído, ácido acetilsalicílico (AAS) e Tween 80 foram comprados da Sigma (Estados Unidos). Morfina foi adquirida da União Química (Brasil).

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos, albinos, com peso entre 25-35 gramas, provenientes do Biotério Central da UNIVASF. Antes dos experimentos, os animais (6 animais por caixa) foram randomicamente mantidos em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) com ventilação e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com a fase de luz iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, com livre acesso à ração tipo “pellets” e água *ad libitum* (disponível em frascos de plástico com bicos apropriados). Vinte e quatro horas antes da realização dos protocolos experimentais, os animais foram colocados no ambiente de trabalho, a fim de que houvesse adaptação ao ambiente e evitar possíveis alterações comportamentais. Os experimentos foram realizados em tempo real e todas as avaliações foram feitas pelo mesmo observador. Todos os

protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVASF sob o número 024240408.

Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Foram utilizados grupos de seis camundongos machos (n=6), os quais receberam por via intraperitoneal (*i.p.*) o veículo (salina + gota de tween), extrato etanólico bruto de *Morus nigra* (Mn-EtOH) nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e as drogas de referência, ácido acetilsalicílico (200 mg/kg) e morfina (10 mg/kg). Após trinta minutos dos pré-tratamentos, foi administrado uma solução de ácido acético (0,9% v/v) e os animais foram colocados em caixas de polipropileno para observação (Lima-Saraiva *et al.*, 2012). O volume de injeção do ácido acético foi de 0,1 mL/10 g de peso. As contorções abdominais foram contadas cumulativamente entre 5 e 15 minutos após a administração do ácido acético. O total de contorções desse período corresponde ao índice da resposta nociceptiva (Queiroz *et al.*, 2010).

Teste da formalina

Foram utilizados grupos de seis animais (n=6), os quais receberam, via *i.p.* o veículo (salina + gota de tween), Mn-EtOH (100, 200 e 400 mg/kg) e as drogas de referência, ácido acetilsalicílico (200 mg/kg) e morfina (10 mg/kg). Após 60 minutos, foi administrado 20 µL de uma solução de formalina (2,5% v/v em salina), a qual foi injetada por via subplantar na pata traseira direita. O indicativo de nocicepção foi considerado como o tempo de lambidas na pata que recebeu o agente químico. Registrou-se o tempo total de lambidas durante 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória). Os animais foram observados em uma câmara com um espelho montado em três lados, para permitir a visualização das patas (Gouveia *et al.*, 2011).

Teste da placa quente

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n=6). Estes foram pré-selecionados no aparelho de placa quente (Insight, Brasil), na temperatura de $55 \pm 0,5$ °C. O indicativo de nocicepção foi considerado como o ato de levantar ou lambar as patas traseiras. Animais que apresentaram um tempo de reação (definido como latência para levantar ou lambar as patas traseiras) maior que 10 segundos foram excluídos do teste. Após trinta minutos, os animais receberam por via intraperitoneal (*i.p.*), o veículo (salina + gota de tween), Mn-EtOH (100, 200 e 400 mg/kg) e morfina (10 mg/kg). Os animais foram colocados na placa quente para avaliação nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após os pré-tratamentos (Lima-Saraiva *et al.*, 2012). Um tempo de corte de 20 s foi escolhido para indicar completa analgesia e para proteger o animal de lesão tecidual. A latência foi medida para cada animal.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa Graph Pad Prism, versão 4.0, usando análise de variância (ANOVA “one-way”) seguido do teste de Dunnett, e expressos como média \pm e.p.m. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ quando comparados com o controle negativo.

RESULTADOS

Avaliação fitoquímica preliminar

Na triagem fitoquímica preliminar, o extrato apresentou reação positiva para a presença de fenóis e taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides. Não foi constatada em Mn-EtOH a presença de alcaloides.

Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Inicialmente avaliou-se a atividade antinociceptiva através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Neste modelo, Mn-EtOH (100, 200 e 400 mg/kg, *i.p.*) reduziu o número de contorções em 38,82, 97,65 e 100%, respectivamente. Pode-se observar que Mn-EtOH apresenta atividade antinociceptiva, uma vez que houve redução no número de contorções após a administração do extrato em todas as doses testadas, entretanto, as doses mais efetivas foram as de 200 mg/kg e a de 400 mg/kg, que praticamente aboliram as contorções induzidas pelo ácido acético (Figura 1).

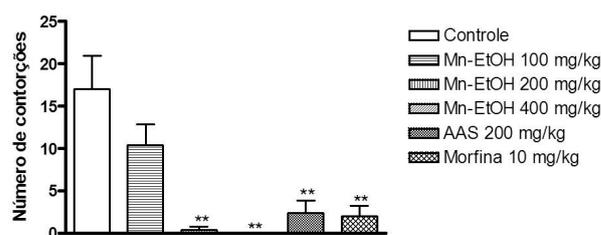


Figura 1. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *M. nigra* (Mn-EtOH), ácido acetilsalicílico (AAS) e morfina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,9%. Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, n = 6. ** $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Teste da formalina

Posteriormente foi realizado o teste da formalina, e os resultados podem ser observados na Figura 2. O extrato apresentou efeito antinociceptivo nas duas fases do teste,

sendo que o efeito foi mais pronunciado na segunda fase (dor inflamatória). O extrato diminuiu em 42,19, 56,96 e 40,50%, respectivamente, o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste de formalina (dor neurogênica), assim como 84,04, 77,20 e 61,07%, respectivamente, na segunda fase (dor inflamatória). Morfina apresentou efeito em ambas as fases do teste.

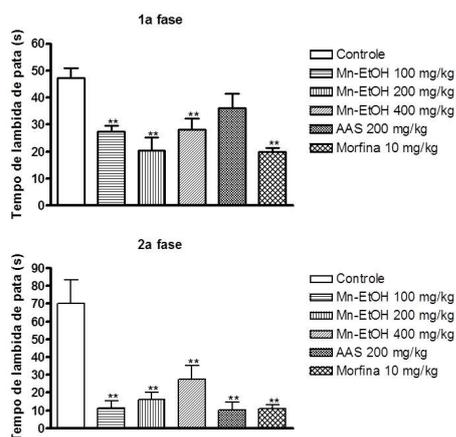


Figura 2. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *M. nigra* (Mn-EtOH), ácido acetilsalicílico (AAS) e morfina no teste da formalina (1ª e 2ª fases). Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6$. ** $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Teste da placa quente

No teste da placa quente, Mn-EtOH não alterou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo térmico (Tabela 1), apenas a morfina apresentou efeito significativo.

DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico das folhas de *M. nigra* (Mn-EtOH) revelou a presença de fenóis e taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides. Em estudo anterior realizado por Padilha *et al.* (2010), o extrato diclorometânico das folhas

apresentou reação positiva para a presença de esteroides e terpenoides, e reação negativa para a presença de taninos, alcaloides, saponinas e flavonoides. Vários estudos mostram que espécies do gênero *Morus* são ricas fontes de substâncias fenólicas, incluindo os flavonoides (Kumar & Chauhan, 2008), o que está de acordo com os resultados apresentados no nosso estudo.

Três diferentes modelos animais foram usados neste estudo para investigar o potencial antinociceptivo do extrato etanólico bruto das folhas de *Morus nigra* (Mn-EtOH). Os métodos foram selecionados baseados em sua capacidade de investigar tanto efeitos mediados periféricamente como centralmente.

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético baseia-se na quantificação das contorções da parede abdominal seguida de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, em resposta à injeção intraperitoneal de ácido acético, o qual provoca uma ativação dos nociceptores periféricos. É realizado como uma triagem para a determinação da atividade antinociceptiva, uma vez que a administração intraperitoneal de ácido acético provoca um aumento na liberação de mediadores da inflamação, principalmente prostaglandinas, mas também induz a liberação de mediadores do sistema nervoso simpático. Dessa forma, não se pode afirmar o mecanismo de ação envolvido, por isso, o método pode ser considerado como um modelo inespecífico para avaliação da atividade antinociceptiva (Soares *et al.*, 2009). Através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi possível comprovar a atividade antinociceptiva de Mn-EtOH.

Com o objetivo de distinguir entre um efeito central ou periférico do extrato, o teste da formalina foi realizado. Este é um modelo bifásico de dor persistente. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P (Tjolsen *et al.*, 1992; Hunskaar & Hole, 1987). Caso haja inibição dessa fase, será indicativo de que o extrato apresenta ação central, pois a primeira fase é de caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opioides e

Tabela 1 - Efeito do extrato etanólico de *Morus nigra* (Mn-EtOH) e morfina no teste da placa quente em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de latência (s)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	---	6.96 \pm 0.56	9.31 \pm 0.83	7.67 \pm 1.84	9.41 \pm 0.42
	100	9.42 \pm 1.44	10.32 \pm 1.22	11.50 \pm 1.06	12.33 \pm 1.22
Mn-EtOH	200	9.57 \pm 1.29	13.47 \pm 1.90	10.03 \pm 1.54	13.75 \pm 1.61
	400	9.75 \pm 1.10	8.79 \pm 0.71	11.49 \pm 1.20	12.13 \pm 1.00
Morfina	10	15.00 \pm 1.40**	16.85 \pm 1.62**	14.93 \pm 1.65**	14.93 \pm 1.86*

Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 6$. ** $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

a alguns agonistas das vias descendentes (Hunskaar & Hole, 1987). A segunda fase (dor inflamatória) representa um tipo de dor inflamatória e envolve transmissão sináptica reforçada pela medula espinhal, bem como pela liberação dos mediadores inflamatórios locais, como prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina (Padilha *et al.*, 2009). Drogas que possuem mecanismo de ação central, como a morfina, apresentam efeito em ambas as fases do teste, enquanto que drogas que apresentam mecanismo de ação periférico, como os anti-inflamatórios não-esteroides, possuem apenas efeito na segunda fase. Estudos realizados por Padilha *et al.* (2009) demonstraram que o extrato de *Morus nigra* apresentou efeito em ambas as fases do teste, porém, com maior efeito na segunda fase, o que corrobora os resultados apresentados neste estudo. Como o extrato apresentou atividade antinociceptiva em ambas as fases do teste, isso é indicativo de um possível efeito central.

O teste da placa quente avalia a participação de mecanismos centrais de antinocicepção. Dessa forma, trata-se de um teste seletivo para componentes analgésicos tipo opioides, só permitindo avaliar substâncias com esse tipo de analgesia (Janssen *et al.*, 1963). Embora substâncias com efeitos central e periférico possam diminuir o número de contorções abdominais e o tempo de lambida de pata induzidos por estímulos químicos, somente drogas com ação central podem aumentar o tempo de latência no teste da placa quente (estímulo térmico). Assim, esse efeito não foi observado nos nossos experimentos, sugerindo uma possível ação periférica para o extrato, provavelmente pela inibição da síntese e liberação de prostaglandinas. Em estudo anterior (Padilha *et al.*, 2010) foi demonstrado o efeito anti-inflamatório do extrato de *M. nigra*. O mecanismo pelo qual o extrato exerce esse efeito não está completamente entendido, mas pode ser atribuído à presença de esteroides e terpenoides no extrato.

Em conclusão, o extrato etanólico bruto das folhas de *Morus nigra* apresentou atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina, porém, não foi efetivo no teste da placa quente. Os resultados sugerem que Mn-EtOH apresenta atividade antinociceptiva envolvendo mecanismos de ação periférica. Estudos posteriores devem ser realizados para tentar elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, e ao Centro de Referência para a Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD) pelo auxílio na identificação do material botânico.

ABSTRACT

Antinociceptive activity of ethanolic extract of the leaves of Morus nigra L. (Moraceae)

The crude ethanolic extract of the leaves of *M. nigra* (Mn-EtOH) was evaluated for antinociceptive activity in mice using models of nociception. The evaluation of antinociceptive activity was carried out by the acetic acid-induced writhing, formalin and hot plate tests. In the acetic acid-induced writhing test, the Mn-EtOH (100, 200 and 400 mg/kg, *i.p.*) reduced the number of writhing by 38.82, 97.65 and 100%, respectively. The extract also produced a significant inhibition of both phases of the formalin test, and the effect was more significant in the second phase (inflammatory pain). The extract decreased by 42.19, 56.96 and 40.50%, respectively, the paw licking time in the first phase of the formalin test, as well as 84.04, 77.20 and 61.07%, respectively, in the second phase of this test. Also, no effect on the hot plate test was observed. The data suggest that the extract has antinociceptive activity, probably mediated via peripheral mechanisms. Pharmacological studies are continuing in order to characterize the mechanism responsible for this effect.

Keywords: *Morus nigra*. Moraceae. Antinociceptive activity. Pain.

REFERÊNCIAS

- Almeida JRGS, Guimarães AL, Oliveira AP, Araújo ECC, Silva FS, Neves LF, Oliveira RA, Sá PGS, Quintans-Júnior LJ. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). *Lat Am J Pharm.* 2011;30(1):96-100.
- Chen FJ, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*folium mori*) and cortex *mori radiceis* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi.* 1995;115(6):476-82.
- Gouveia MGS, Xavier MA, Barreto AS, Gelain DP, Santos JPA, Araújo AAS, Silva FA, Quintans JS, Agra MF, Cabral AGS, Tavares JF, Silva MS, Quintans-Júnior, LJ. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Combretum duarceanum* in rodents. *J Med Food.* 2011;14(11):1389-96.
- Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987;30(1):103-14.
- Janssen PA, Niemegeers CJ, Dony JG. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneim Forsch.* 1963;13:502-7.
- Kim JW, Kim SU, Lee HS, Kim I, Ahn MY, Ryu KS. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl

- chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1993;1002(1-2):93-9.
- Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(9):19-29.
- Kumar VR, Chauhan S. Mulberry: Life enhancer. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008;2(10):271-8.
- Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MSA, Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais; 2003.
- Lima-Saraiva SRG, Saraiva HCC, Silva JC, Lima JT, Siqueira-Filho JA, Damasceno PKF, Branco CRC, Branco A, Amorim ELC, Almeida JRGS. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) in mice. *J Med Plant Res*. 2012;6(40):5330-6.
- Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed., Fortaleza: Edições UFC; 1997.
- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojoy H, Afshin-Nya F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytother Res*. 2004;18(5):365-9.
- Nomura T, Hano Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. *Nat Prod Rep*. 1994;11:205-18.
- Oliveira ACB, Oliveira AP, Guimarães AL, Oliveira RA, Silva FS, Reis SAGB, Ribeiro LAA, Almeida JRGS. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Rev Bras Pl Med*. 2013;15(2):244-9.
- Ozgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scient Hort*. 2009;119(3):275-9.
- Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytother Res*. 2010;24(10):1496-1500.
- Padilha MM, Vilela FC, Silva MJD, Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of *Morus nigra* leaves in mice. *J Med Food*. 2009;12(6):1381-5.
- Queiroz AC, Lira DP, Dias TL, Souza ET, Matta CB, Aquino AB, Silva LH, Silva DJ, Mella EA, Agra MF, Barbosa-Filho JM, Araújo-Júnior JX, Santos BV, Alexandre-Moreira MS. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *J Ethnopharmacol*. 2010;128(2):377-83.
- Silva JC, Lima-Saraiva SRG, Oliveira-Júnior, RG, Almeida JRGS. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev Bras Farm*. 2013;94(1):18-23.
- Soares CC, Marques TM, Rigolin GG, Neis E, Friaça AMV, Silva AS, Barreto GS, Lopes L. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(1):77-81.
- Souza MM, Bittar M, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Messana I, Delle-Monache F, Ferrari F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Zeitschrift Für Naturforschung*. 2000;55(3-4):256-60.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51:5-17.
- Yadav AV, Kawale LA, Nade VS. Effect of *Morus alba* L. (mulberry) leaves on anxiety in mice. *Indian J Pharmacol*. 2008;40:32-6.

Recebido em 4 de outubro de 2013

Aceito em 12 de dezembro de 2013