

## **Analgesic effect of methanolic extract obtained from *Schinus terebinthifolius* leaves**

*Efeito analgésico do extrato metanólico obtido das folhas de *Schinus terebinthifolius**

**Pedro Cruz de Oliveira Jr.,<sup>1</sup> Eloise Balen,<sup>2</sup> Jucicléia da Silva Arrigo,<sup>2</sup> Anelise Samara Nazari Formagio,<sup>1</sup> Marciane Maximo da Silva,<sup>1</sup> Candida Aparecida Leite Kassuya<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>College of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>2</sup>College of Health Science, Federal University of Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

\*corresponding author: candida2005@gmail.com

---

### **Abstract**

Previous studies from our group showed the analgesic effects of essential oil and extracts of *Schinus terebinthifolius*. The aims of this research were to evaluate the anti-nociceptive, anti-arthritic properties of methanolic extract obtained from *S. terebinthifolius* (MEST) leaves in animal models of experimental pain and arthritis. The MEST (30 and 100 mg/kg) reduced both phases of formalin induced licking behavior in Swiss mice. The MEST (100 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia induced by carrageenan in swiss mice. The MEST (100 mg/kg) oral administration reduced significantly the mechanical hyperalgesia (day 2, 5, 10, and 20), knee oedema (day 2), cold (day 15) and heat sensitivity (day 20), but not depressive-like behavior (Forced Swim Test), after Complete Freund's Adjuvant (CFA) in C57Bl6 mice. The MEST prevented the anti-nociceptive effects in formalin nociception and did not interfere with locomotor activity in Swiss mice (open field test). The MEST was effective for the inhibition of pain and arthritic parameters without altering locomotor activity or depressive-like behavior. The present results may open new possibilities for the development of new analgesic agents from *S. terebinthifolius*.

**Keywords:** *Schinus terebinthifolius*, Anacardiaceae, rodents, nociception, arthritis.

---

### **Resumo**

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram os efeitos analgésicos do óleo essencial e extratos de *Schinus terebinthifolius*. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar propriedades anti-nociceptivas e antiartríticas do extrato metanólico obtido das folhas de *S. terebinthifolius* (EMST) em modelos animais experimentais de dor e artrite. O EMST (30 e 100 mg/kg) reduziu comportamento de lambe a pata como reflexo à dor nas fases neurogênica e inflamatória induzidas pela formalina em camundongos *Swiss*. O EMST (100 mg/kg) reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos *Swiss*. A administração oral do EMST (100 mg/kg) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica (dia 2, 5, 10 e 20), edema do joelho (dia 2), sensibilidade ao frio (dia 15) e sensibilidade ao calor (dia 20), mas não o comportamento depressivo (Teste de nado forçado), após o adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos C57Bl6. O EMST previniu efeitos antinociceptivos na nocicepção de formalina e não interferiu na atividade locomotora de camundongos *Swiss* (teste de campo aberto). O EMST foi eficaz na inibição da dor e dos parâmetros artríticos, sem alterar atividade locomotora ou comportamento depressivo. Os presentes resultados podem abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos a partir de *S. terebinthifolius*.

**Palavras-chave:** *Schinus terebinthifolius*; Anacardiaceae; roedores; nocicepção, artrite.

## Introduction

Pharmacological and non-pharmacological pain treatment is complex and performed based on pain classification (1). This pain process is a clinical sign observed in inflammatory diseases, being one of the first manifestations in acute inflammation (2). Inflammatory diseases and neuropathies determine nociceptor sensitization, implying the occurrence of different subtypes of pain such as allodynia and hyperalgesia (3).

In this way, the currently available therapeutic treatments for pain are generally non-specific and have limited efficacy and safety, particularly with chronic pain and arthritis treatments, such as NSAIDs and cytokine blockers (4). However, many side effects are observed with the use of these drugs, including immunosuppression, opportunistic infections, and gastrointestinal, renal, and hepatic lesions that may increase morbidity and mortality (4). In addition, some painful conditions such as neuropathic pain are refractory to currently available drugs, including opioids (5).

Herbal products (fresh medicinal plants, herbal extracts, plant drugs and phytotherapies) are included in the search for new drugs with fewer adverse effects in the treatment of different pathophysiologies, including pain. The Brazilian small tree “aroeira-vermelha”, “aroeira-pimenteira” or “poivre-rose” and “aroeira” (6) is known scientifically as *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). The empirical therapy with this plant as an anti-inflammatory, antipyretic, analgesic, purifying astringent, diuretic and diarrhea medication was made by the population (7-9).

However, the literature also reports pharmacological evidence that this plant, administered in the form of different preparations, has anti-hyperalgesic (10), antimicrobial (11-12) and anti-histaminergic actions (13). Previous studies in our research group have shown methanolic extract from leaves of *S. terebinthifolius* (collected in Dourados, MS, Brazil) exhibited marked antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-oedematogenic activity, and chemical analysis revealed the predominance of phenolic compounds (14).

The aim of this study was to evaluate the potential anti-nociceptive (in a formalin model), anti-hyperalgesic (in a carrageenan model), antidepressant and anti-arthritis (in the Complete Freund's Adjuvant persistent (CFA) model) effects of the methanolic extract (MEST) of *S. terebinthifolius*. The present research extends the work of Araujo *et al.* (14).

## Introdução

O tratamento farmacológico e não farmacológico da dor é complexo e realizado com base na classificação da dor (1). Esse processo doloroso é um sinal clínico observado em doenças inflamatórias, sendo uma das primeiras manifestações na inflamação aguda (2). As doenças inflamatórias e neuropatias determinam a sensibilização dos nociceptores, implicando a ocorrência de diferentes subtipos de dor, como alodinia e hiperalgesia (3).

Dessa forma, os tratamentos terapêuticos atualmente disponíveis para a dor geralmente são inespecíficos e têm eficácia e segurança limitadas, principalmente em tratamentos crônicos de dor e artrite, como AINEs e bloqueadores de citocinas (4). No entanto, muitos efeitos colaterais são observados com o uso desses medicamentos, incluindo imunossupressão, infecções oportunistas e lesões gastrointestinais, renais e hepáticas que podem aumentar a morbimortalidade (4). Além disso, algumas condições dolorosas, como a dor neuropática, são refratárias às drogas atualmente disponíveis, incluindo os opióides (5).

Os produtos a base de plantas (planta medicinal *in natura*, extratos a base de plantas, droga vegetal e fitoterápico) são incluídos na busca de novos medicamentos com menos efeitos adversos no tratamento de diferentes fisiopatologias, incluindo a dor. A pequena árvore brasileira “aroeira-vermelha”, “aroeira-pimenteira” ou “poivre-rose” e “aroeira” (6) é conhecida cientificamente como *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). A terapia empírica com essa planta como remédio anti-inflamatório, antipirético, analgésico, adstringente, diurético e diarreia é realizada pela população (7-9).

No entanto, a literatura também relata evidências farmacológicas de que esta planta, administrada na forma de diferentes preparações, possui ações anti-hiperalgésica (10), antimicrobiana (11-12) e anti-histaminérgica (13).

Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* (coletadas em Dourados-MS) apresentou atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-edematogênica *in vivo*, e as análises químicas revelaram a predominância de compostos fenólicos (14).

O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais anti-nociceptivo (no modelo de formalina), anti-hiperalgésico (no modelo de carragenina), antidepressivo e anti-

artrítico (no modelo persistente adjuvante completo de Freund (CFA)) do extrato metanólico (EMST) de *S. terebinthifolius*. A presente pesquisa estende o trabalho de Araujo et al. (14).

## Materials and Methods

### *Chemicals and drugs*

$\lambda$ -carrageenan (Cg), Complete Freund adjuvant (CFA), Tween 80 and dexamethasone (DEXA) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### *Plant material*

Leaves of the plant *S. terebinthifolius* were collected at the Federal University of Grande Dourados (UFGD) and identified by Maria do Carmo Vieira, Ph.D. (researcher of the College of Agronomical Sciences of the UFGD). A voucher specimen (DDMS 4600) was deposited in the herbarium of the UFGD in Mato Grosso do Sul state of Brazil. This specie was registered on National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under the code A51F665.

### *Production of MEST*

After oven drying and grinding, collected leaves of *S. terebinthifolius* (620 g) were extracted by maceration with 8 L of methanol at room temperature. After filtration, concentration under reduced pressure, and lyophilization, the methanolic extract (MEST, 38 g) was obtained.

### *Experimental animals*

The experiments were performed using male Swiss mice (25-35 g) and male C57Bl6 mice (25-35 g) provided by the Federal University of Grande Dourados (UFGD) biotherium. The animals were maintained under a 12-hour light-dark cycle, with controlled humidity (60-80%) and temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The animals were acclimatized to the experimentation room for at least two hours before the experimental protocol. The experimental procedures were carried out after the approval by the ethics committee for research on laboratory animals of the UFGD (Nbr. 004/2012).

## Materiais e Métodos

### *Produtos químicos e drogas*

$\lambda$ -carragenina (Cg), adjuvante Freund completo (CFA), Tween 80 e dexametasona (DEXA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os outros reagentes foram adquiridos de fornecedores de boa qualidade.

### *Material vegetal*

As folhas de *Schinus terebinthifolius* foram coletadas na Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD) e identificadas por Maria do Carmo Vieira, Ph.D (Faculdade de Ciências Agrônômicas do pesquisador da UFGD). Uma amostra (DDMS 4600) foi depositada no herbário da UFGD no estado do Mato Grosso do Sul no Brasil. Esta espécie foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código A51F665.

### *Obtenção do EMST*

Após secagem em forno e moagem, as folhas coletadas de *S. terebinthifolius* (620 g) foram extraídas por maceração com 8 L de metanol à temperatura ambiente. Após filtração, concentração sob pressão reduzida e liofilização, obteve-se o extrato metanólico (EMST, 38 g).

### *Animais experimentais*

Os experimentos foram realizados usando camundongos Swiss machos (25-35 g) e camundongos machos C57BL6 (25-35 g) fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com umidade (60-80%) e temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas. Os animais foram aclimatados à sala de experimentação por pelo menos duas horas antes do protocolo experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação no comitê de ética para pesquisa em animais de laboratório da UFGD (Nbr. 004/2012).

The MEST was dissolved in aqueous solution containing 1% of Tween 80. The vehicle administration was made by a solution of water plus 1% of Tween 80 (1%). All oral pretreatments (or administrations) described with the respective tests with the MEST were made via gavage.

#### *Formalin induced-Licking Test*

The procedure used was similar to that described by Hunskaar and Hole (18). Groups of mice ( $n=6$ ) were pretreated orally with the MEST (100 mg/kg), subcutaneously with dexamethasone (1 mg/kg), or orally with vehicle solution one hour before injection of 20  $\mu$ L of 2.5% formalin (0.92% formaldehyde) in the right hind paw. These animals were placed in glass cylinders, and the time that the animal spent licking and/or elevating the injected paw was recorded in blocks of five minutes for up to thirty minutes. The first five minutes were considered Phase I (neurogenic), while Phase II (inflammatory) was between fifteen and thirty minutes.

#### *Analysis of locomotor activity in the open-field test*

Mice were orally pretreated with the MEST (100 mg/kg), dexamethasone (1 mg/kg), or vehicle by oral route, and the open-field test was performed after fifty minutes. The open field apparatus was constructed with plywood and measured 80 x 80 cm with 40 cm walls. The walls and floor were both white. Blue lines were drawn on the floor with a marker and were visible through the clear plexiglass floor. The lines divided the floor into sixteen 20 x 20 cm squares. A central square of equal size was drawn in the middle of the open field (20 x 20 cm). The locomotor activity was measured for five minutes, analyzing the frequency with which the mice crossed one of the grid lines with all four paws.

#### *Carrageenan-induced hyperalgesia model*

After basal mechanical measurements, the mice were divided into groups ( $n = 6$ /group) that orally received vehicle (0.9% saline solution), MEST (100 mg/kg), or dexamethasone (1 mg/kg). After one hour, the animals received a 50  $\mu$ L injection containing 300  $\mu$ g carrageenan (Cg) subcutaneously in the right hind paw, and each animal was housed in the same containment boxes under the same steel mesh. Mechanical hyperalgesia was measured four hours after Cg injection using the digital von Frey analgesimeter.

O EMST foi dissolvido em solução aquosa contendo 1% de Tween 80 (1%). A administração do veículo foi feita por uma solução de água contendo 1% de Tween 80. Todos os pré-tratamentos (ou administrações) descritas com os respectivos teste com EMST foram feitas por gavagem.

#### *Teste de comportamento de lambe a pata induzida por formalina*

O procedimento foi semelhante ao descrito por Hunskaar e Hole (18). Grupos de camundongos ( $n= 6$ ) foram pré-tratados por via oral com o EMST, por via subcutânea com dexametasona (1 mg/kg) ou via oral com solução veicular uma hora antes da injeção de 20  $\mu$ L de formalina a 2,5% (0,92 % de formaldeído) na pata traseira direita. Esses animais foram colocados em cilindros de vidro e o tempo que o animal passou lambendo e/ou elevando a pata injetada foi registrado em blocos de cinco minutos por até trinta minutos. Os primeiros cinco minutos foram considerados fase I (neurogênica), enquanto a fase II (inflamatória) foi entre quinze e trinta minutos.

#### *Análise da atividade locomotora no teste de campo aberto*

Os camundongos foram pré-tratados por via oral com o EMST (100 mg/kg), dexametasona (1 mg/kg) ou veículo por via oral, e o teste em campo aberto foi realizado após cinquenta minutos. O aparelho de campo aberto foi construído com madeira compensada e medindo 80 x 80 cm com paredes de 40 cm. As paredes e o chão eram brancos. Linhas azuis foram desenhadas no chão com um marcador e eram visíveis através do piso de vidro transparente. As linhas dividiram o chão em dezesseis quadrados de 20 x 20 cm. Um quadrado central de tamanho igual foi desenhado no meio do campo aberto (20 x 20 cm). A atividade locomotora foi medida por cinco minutos, analisando a frequência com que os camundongos cruzaram uma das linhas da grade com as quatro patas.

#### *Modelo de hiperalgesia induzida por carragenina*

Foram realizadas mensurações mecânicas basais, os camundongos foram distribuídos em grupos ( $n=6$ / grupo) que receberam via oral (solução salina 0,9%), EMST (100 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg). Após uma hora, os animais receberam uma solução de 50  $\mu$ L (300  $\mu$ g) de injeção de carragenina (Cg) por via subcutânea na pata traseira direita, e cada animal foi alojado nas mesmas caixas de contenção. A hiperalgesia

### *CFA-induced hyperalgesia model*

Mechanical measurement with a von Frey analgesimeter and respective MEST treatment (100 mg/kg, p.o.), or other treatments described below, was made once daily in C57Bl6 mice for 20 days after CFA injection. In addition, response to acetone (sensitivity to cold), hot plate, forced swimming (to analyze depression), and knee oedema tests were also performed. After basal measurements, the mice were divided into groups (n = 6/group) and orally received vehicle (0.9% saline solution), MEST (100 mg/kg), or dexamethasone (1 mg/kg). One hour after this procedure, animals received an injection of 50 µL of CFA (*Freund's Complete Adjuvant*) subcutaneously in the right hind paw.

*Mechanical hyperalgesia analysis* - One day prior to CFA treatment, and on Days 1 to 20 of CFA treatment, the mechanical measurement of all mice was performed. Mice were housed in containment boxes (W x D x H - 230 x 200 x 180 mm) under a steel mesh with 1 cm diameter spacing for a period of thirty minutes. During this time, a digital von Frey analgesimeter (*Insight®*, SP, Brazil) was used to determine the baseline for the mechanical stimulus in the right hind paw.

*Analysis of response to acetone (sensitivity to cold test)* - Cold sensitivity was analyzed two days after CFA injection by the acetone drop test as described by Decosterd and Woolf (15). A blunt needle connected to a syringe was used to drop 30 µL of acetone on the paw, and the duration of the paw withdrawal (in seconds) was recorded. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 20 seconds, respectively.

*Forced Swim Test (FST)* - This experimental test was performed on the twentieth day using the method previously described by Porsolt (16). Animals were individually forced to swim in an open cylindrical container with a volume of 1,932 cm<sup>3</sup> containing water at 25 ± 1°C, and the total time duration of immobility was observed for five minutes.

*Knee Oedema Test* - Knee measurements were performed with a micrometer (*Mitutoyo®*) on the twentieth day after CFA injection in the experimental group.

mecânica foi mensurada quatro horas após a injeção de Cg usando o analgesímetro digital de von Frey.

### *Modelo de hiperalgesia induzida por CFA*

A mensuração mecânica com um analgesímetro de von Frey e o respectivo tratamento EMST (100 mg/kg, p.o.) (ou outros tratamentos descritos abaixo) foram feitos diariamente (uma vez por dia) em camundongos C57Bl6 por 20 dias após a injeção de CFA. Além disso, foram realizados testes de resposta à acetona (sensibilidade ao frio), placa quente, nado forçado (para analisar a depressão) e edema no joelho. Foram realizadas mensurações basais, após isso os camundongos foram distribuídos em grupos (n= 6 / grupo) e receberam veículo por via oral (solução salina a 0,9%), EMST (100 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg). Uma hora após este procedimento, os animais receberam uma solução de 50 µL de injeção de CFA (*Freund's Complete Adjuvant*) por via subcutânea na pata traseira direita.

*Análise de hiperalgesia mecânica* - Um dia antes do tratamento com CFA e no dia 1 ao dia 20 após o tratamento com CFA, foi realizada a mensuração mecânica de todos os camundongos machos. Os camundongos foram alojados em caixas de contenção (L x P x A - 230 x 200 x 180 mm) sob uma grade de aço com espaçamento de 1 cm de diâmetro por um período de trinta minutos. Durante esse período, um analgesímetro digital de von Frey (*Insight®*, SP, Brazil) foi utilizado para determinar a linha de base do estímulo mecânico na pata traseira direita.

*Análise da resposta à acetona (teste de sensibilidade ao frio)* - A sensibilidade ao frio foi analisada dois dias após a injeção de CFA pelo teste de gota de acetona, conforme descrito por Decosterd & Woolf (15). Uma agulha cega conectada a uma seringa foi usada para soltar 30µL de acetona na pata, e a duração da retirada da pata (em segundos) foi registrada. Os pontos de corte mínimo e máximo foram atribuídos em 0,5 e 20 segundos, respectivamente.

*Teste de nado forçado (FST)* - Este experimento foi realizado no vigésimo dia, utilizando o método descrito anteriormente por Porsolt (16). Os animais foram forçados a nadar individualmente em um recipiente cilíndrico aberto com volume de 1.932 cm<sup>3</sup> com água a 25 ± 1 ° C, e o tempo total de imobilidade foi observado por cinco minutos.

*Teste de edema do joelho* - As medidas do joelho foram realizadas com um micrômetro (*Mitutoyo®*) no vigésimo dia após a injeção de CFA no grupo experimental.

*Heat-Induced Hyperalgesia Test* - This test was performed on Day 15 using the method of Eddy and Leimbach (17). The experimental animals were placed on an aluminum plate heated at a fixed temperature ( $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ), and the response to the heat latency time was assessed. They measuring the time it took to the animal to withdraw its hind paw from the hot plate and lick it. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 30 seconds, respectively.

#### *Statistical Analysis*

The results represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Data were compared by one and two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman Keuls test. P values lower than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered significant.

## **Results**

### *Effects of MEST on formalin-induced nociception and measured motor activity in the open field test*

Gavage administration of MEST reduced formalin-induced nociception in the neurogenic phase (Phase I, 0 to 5 minutes) and the inflammatory phase (Phase II, 15 to 30 minutes) (Figure 1). In the control group, the average time licking in the neurogenic phase was 103.5 seconds, and in the inflammatory phase was 219.5 seconds.

After one hour of treatment with MEST, the doses of 30 and 100 mg/kg significantly inhibited the neurogenic phase (56% and 70%, respectively). In the inflammatory phase, the observed inhibitions were 87% and 92%, respectively. Dexamethasone treatment (1 mg/kg) also significantly reduced effects in both phases (Figures 1A and 1B). The treatments did not determine changes in the locomotor activity in the open field test (data not shown).

### *Effects of MEST on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia*

Intraplantar Cg treatment induced mechanical hyperalgesia in mice after four hours. MEST (100 mg/kg) treatment prevented the carrageenan induced-mechanical hyperalgesia with statistical significance compared to the respective control group. Dexamethasone treatment (1 mg/kg) eliminated the mechanical hyperalgesia (Figure 2).

*Teste de hiperalgesia induzida pelo calor* - Esse teste foi realizado no dia 15, usando o método de Eddy and Leimbach (17). Os animais testados foram colocados em uma placa de alumínio aquecida a uma temperatura fixa ( $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), e a resposta ao tempo de latência do calor foi avaliada medindo-se o tempo que o animal levou para retirar sua pata traseira da placa quente e lambar. Os pontos de corte mínimo e máximo foram atribuídos em 0,5 e 30 segundos, respectivamente.

#### *Análise Estatística*

Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (MEV). Os dados foram comparados pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman Keuls. Valores de p inferiores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados significativos.

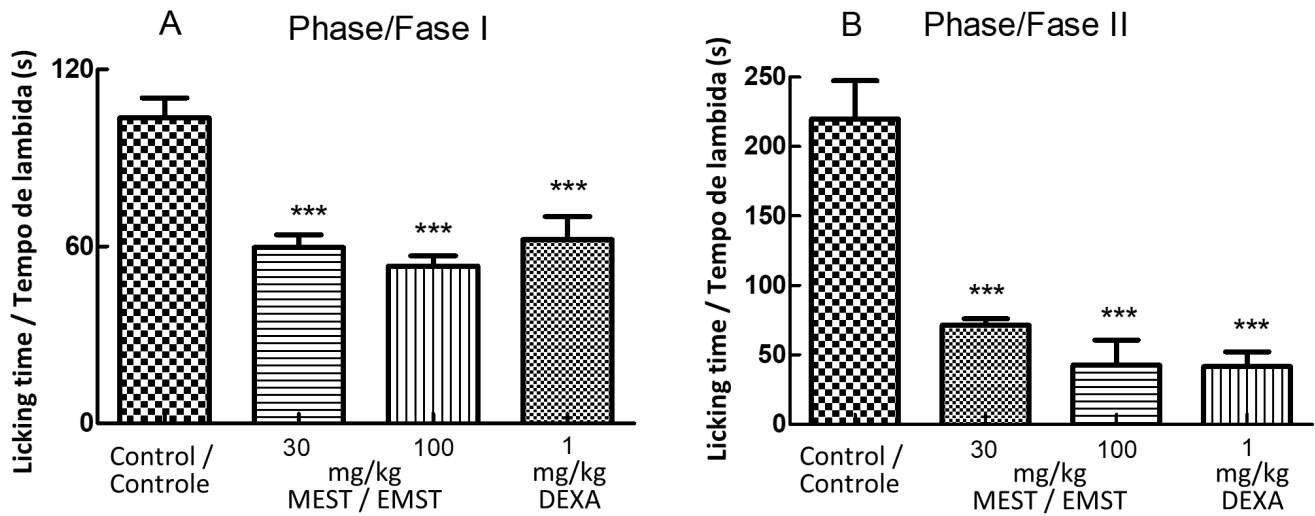
## **Resultados**

### *Efeitos do EMST na nocicepção induzida por formalina e atividade motora medida no teste de campo aberto*

A administração de EMST por gavagem reduziu a nocicepção induzida por formalina na fase I (neurogênica) (0 a 5 minutos) e na fase II (inflamatória) (15 a 30 minutos, (Figura 1). No grupo controle, o tempo médio de lambar na primeira fase (0-5 min) foi de 103,5 segundos e na segunda fase (15-30 min) foi de 219,5 segundos. Após uma hora de tratamento com EMST, as doses de 30 e 100 mg/kg inibiram significativamente a fase neurogênica (56%) e (70%). Na segunda fase, as inibições observadas foram de 87% e 92%, respectivamente. O tratamento com dexametasona (1 mg/kg) também reduziu efeitos significativos em ambas as fases (Figuras 1A e 1B). Os tratamentos não determinaram alterações na atividade locomotora no teste de campo aberto (dados não mostrados).

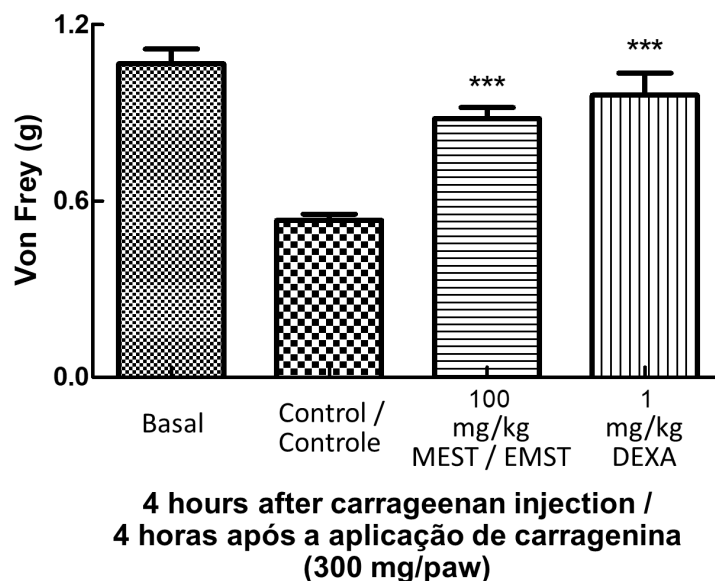
### *Efeitos do EMST na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina*

O tratamento intra-plantar com Cg induziu hiperalgesia mecânica em camundongos após quatro horas. O tratamento com EMST (100 mg/kg) previniu a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina com estatística significativa em comparação com o respectivo grupo controle. O tratamento com dexametasona (1 mg/kg) aboliu a hiperalgesia mecânica (Figura 2).



**Figure 1** - Effect of the oral administration of MEST at 30 and 100 mg/kg on pain-related behaviors in the formalin-induced nociception model. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with the control group (vehicle). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls test.

**Figura 1** - Efeito da administração oral de EMST 30 e 100 mg/kg nos comportamentos relacionados à dor no modelo de nocicepção induzida por formalina. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o grupo controle (veículo). As diferenças entre os grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Newman–Keuls.



**Figure 2** - Effect of the MEST at 100 mg/kg on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with the control group (vehicle). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls test.

**Figura 2** - Efeito do EMST a 100 mg/kg na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o grupo controle (veículo). As diferenças entre os grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Newman–Keuls.

### **Effects of MEST on mechanical hyperalgesia, thermic sensitivity, depressive behavior and knee oedema induced by CFA**

A single intraplantar injection of CFA induced persistent mechanical hyperalgesia, cold sensibility, heat sensibility, and knee oedema as well as depressive behaviour.

Mechanical hyperalgesia was observed from the first day following application of CFA and persisted for at least 20 days (Figure 3).

Oral administration of MEST (100 mg/kg) or dexamethasone (1 mg/kg) reduced the mechanical hyperalgesia induced by CFA compared to the respective control group. The maximal inhibition was observed on the 5th, 10th and 20th days following the induction of hyperalgesia by CFA (Figure 3).

Cold sensitivity development was evaluated on the second day. After the administration of CFA and MEST, cold sensitivity decreased significantly compared to the respective control group (Figure 4A).

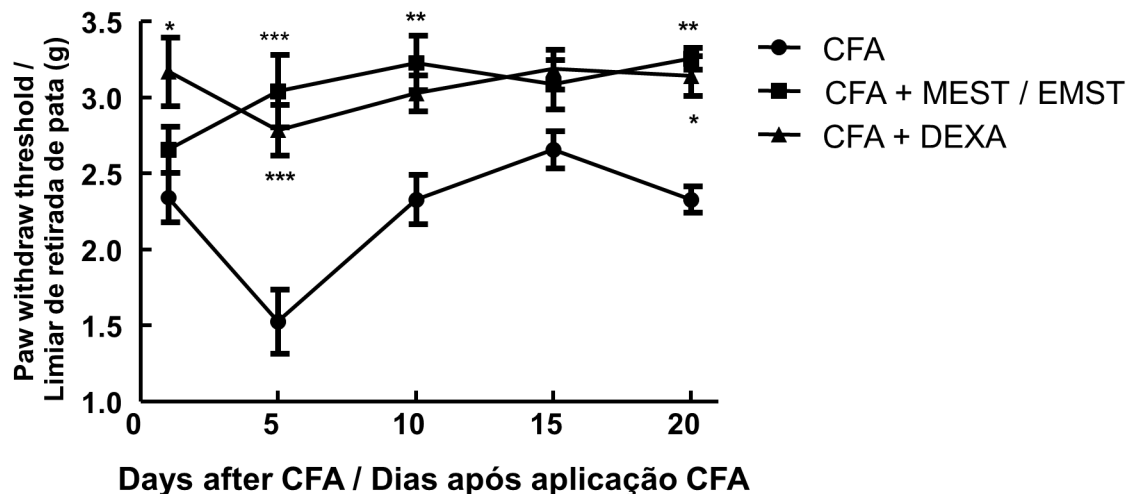
### **Efeitos do EMST na hiperalgesia mecânica, sensibilidade térmica, comportamento depressivo e edema do joelho induzido por CFA**

Uma única injeção intraplantar de CFA induziu hiperalgesia mecânica persistente, sensibilidade ao frio, sensibilidade ao calor e edema do joelho, além de comportamento depressivo.

A hiperalgesia mecânica foi observada desde o 1º dia após a aplicação do CFA e persistiu por pelo menos 20 dias (Figuras 3).

A administração oral de EMST (100 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela CFA em comparação com o respectivo grupo controle. A inibição máxima foi observada no 5º, 10º e 20º dia após a hiperalgesia ter sido induzida por CFA (Figura 3).

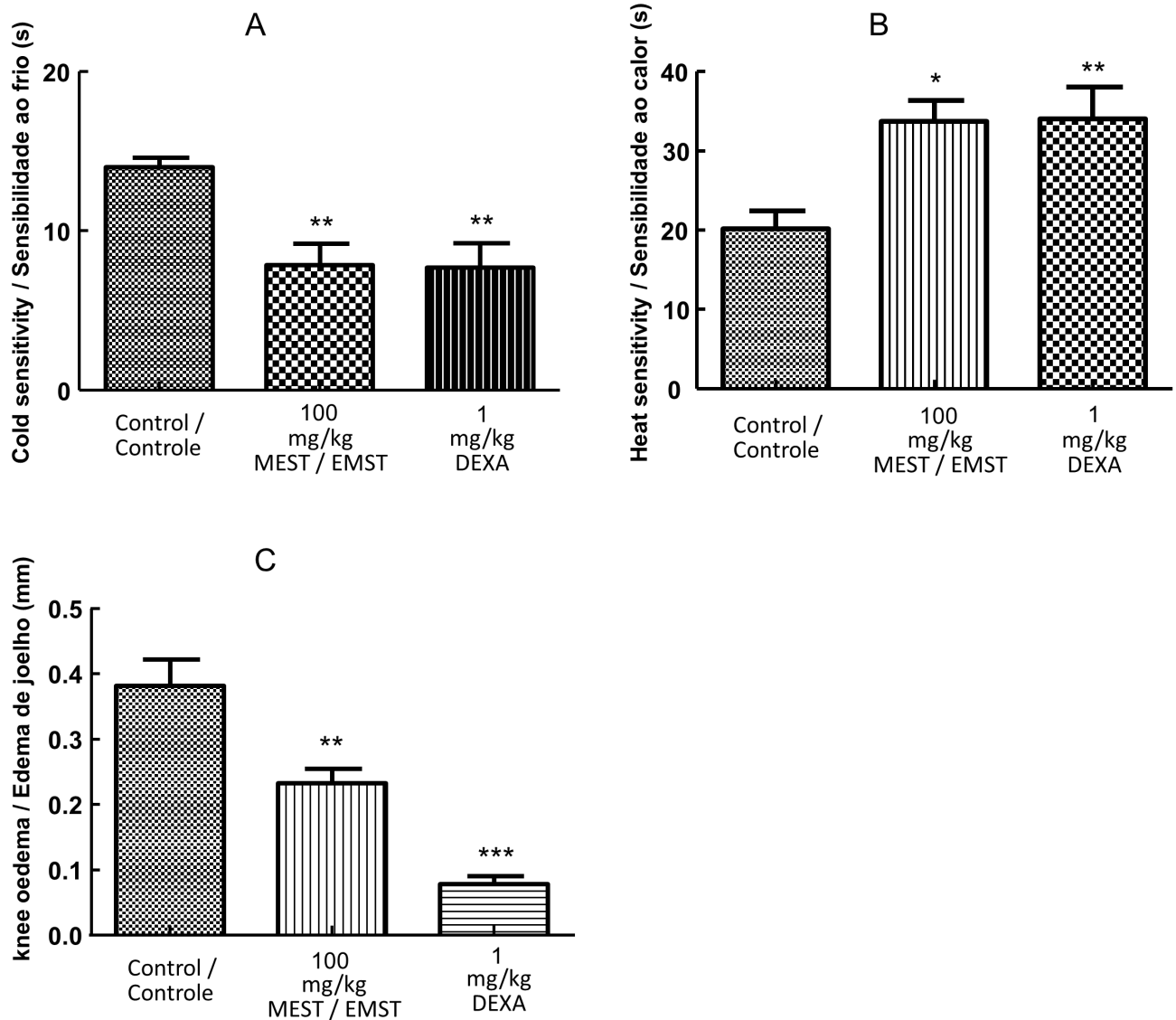
A hipersensibilidade ao frio foi avaliado no segundo dia. Após a administração de CFA e EMST, a sensibilidade ao frio diminuiu significativamente em comparação com o respectivo grupo controle (Figura 4A). O tratamento



**Figure 3** - Effects of oral administration of MEST at 100 mg/kg on mechanical hyperalgesia induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). Mechanical hyperalgesia was analyzed until 20 days after CFA injection. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with the vehicle group (CFA). Differences between groups were analyzed by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Bonferroni test variance (one-way ANOVA) followed by the Newman-Keuls test.

**Figura 3** - Efeitos da administração oral de EMST a 100 mg/kg na hiperalgesia mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA). A hiperalgesia mecânica foi analisada até 20 dias após a injeção de CFA. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o grupo veículo (CFA). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA a dois fatores) seguida pelo teste de Bonferroni. o grupo controle (veículo). As diferenças entre os grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Newman-Keuls.





**Figure 4** - Effects of oral administration of the MEST at 100 mg/kg on cold sensitivity (A), hot plate test (B), and knee oedema induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with the vehicle group (CFA). Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

**Figura 4** - Efeitos da administração oral do EMST a 100 mg/kg na hipersensibilidade ao frio (A), teste de placa quente (B) e edema do joelho induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o grupo veículo (CFA). As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

In studies carried out on Day 15 of the experiment, MEST treatment also showed a significant increase in hot plate latency compared to the respective control (Figure 4B). Significant decreases of oedema in tibiofibular articulation in groups treated with MEST and dexamethasone were observed compared to the respective control group (Figure 4C).

There were no statistically significant differences between the groups that received MEST and the control group in the forced swim test. Neither the extract nor the pure compounds exhibited an antidepressant effect (data not shown).

## Discussion

This study showed that the extract obtained from *S. terebinthifolius* negatively modulates the carrageenan-induced persistent mechanical hyperalgesia and formalin-induced spontaneous pain. In the same way, MEST also significantly reduced CFA-induced knee oedema and cold- and hot-hypersensitivity, but not depression, without changing locomotor activity (open field test).

Nonsteroidal anti-inflammatory (indomethacin, naproxen) and immunosuppressive (hydrocortisone) drugs elicit significant inhibition of the second phase of the formalin-induced nociception (18). In addition, the MEST also inhibited the neurogenic and inflammatory phase of the formalin test, suggesting that MEST has anti-nociceptive effects against inflammatory and pain mediators. Thus, we have demonstrated the anti-nociceptive property of *S. terebinthifolius* extract without the modification of the locomotor performance.

In carrageenan model, which induced mechanical hyperalgesia, the MEST presents an anti-hyperalgesic effect. The release of several mediators could induce the peripheral nociceptor sensibilization. Dexamethasone treatment inhibited carrageenan-induced hyperalgesia, and similar results were shown by Ferreira *et al.* with a different dose (19) showing that anti-inflammatory agent reduce hyperalgesia. These results showed that MEST also resulted in a reduction of nociceptor sensibilization induced by carrageenan. The animal model of CFA-induced inflammation is widely used in chronic arthritis experiments, and the single injection of CFA used in our study induced hyperalgesia, knee oedema, myeloperoxidase activity, depression, and cold- and hot-hypersensitivity in mice, corroborating other studies in the literature (20-22).

com EMST também mostrou um aumento significativo na latência da placa quente em comparação com o respectivo controle (Figura 4B). Os estudos foram realizados no dia 15 do experimento. Diminuições significativas de edema na articulação tibiofibular nos grupos tratados com EMST e dexametasona foram observadas em comparação com o respectivo grupo controle (Figura 4C).

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que receberam EMST e o grupo controle no teste de nado forçado. Nem o extrato nem os compostos puros exibiram um efeito antidepressivo (dados não mostrados).

## Discussão

Este estudo mostrou que o extrato obtido de *S. terebinthifolius* modula negativamente a hiperalgesia mecânica persistente induzida por carragenina e a dor espontânea induzida por formalina. Do mesmo modo, o EMST também reduziu significativamente o edema do joelho induzido por CFA e a hipersensibilidade ao frio e ao calor, mas não a depressão, sem alterar a atividade locomotora (teste de campo aberto).

Drogas anti-inflamatórias não esteróides (indometacina, naproxeno) e imunossupressoras (hidrocortisona), provocam inibição significativa da segunda fase da nocicepção induzida por formalina (18). Além disso, o EMST também inibiu a fase neurogênica e inflamatória do teste da formalina, sugerindo que o EMST tem efeitos antinociceptivos contra mediadores inflamatórios e da dor. Assim, demonstramos a propriedade antinociceptiva do extrato de *S. terebinthifolius* sem modificar o desempenho locomotor.

No modelo de carragenina, que induziu hiperalgesia mecânica, o EMST apresenta um efeito anti-hyperalgesico. A liberação de vários mediadores pode induzir a sensibilização do nociceptor periférico. O tratamento com dexametasona inibiu a hiperalgesia induzida por carragenina, e resultados semelhantes foram mostrados por Ferreira *et al.* com uma dose diferente (19), mostrando que o agente anti-inflamatório reduz a hiperalgesia. Esses resultados mostraram que o EMST também resultou redução da sensibilização do nociceptor induzida pela carragenina.

O modelo animal de inflamação induzida por CFA é amplamente utilizado em experimentos de artrite crônica, hiperalgesia induzida por uma única injeção de CFA usada em nosso estudo induz edema do

Dexamethasone is typically considered a positive control drug because this drug reduces hyperalgesia, knee oedema, and myeloperoxidase activity in experimental studies (20). On the other hand, the extract obtained from *S. terebinthifolius* inhibited four parameters (mechanical hyperalgesia, knee oedema, cold- and hot-hypersensitivity) but not the depression induced by unilateral paw injection of CFA injection. The anti-arthritis and decreased sensitivity to cold and heat effects induced by MEST treatment suggest an alteration of fibers responsive to mechanical stimulus and thermal (hot and cold) thresholds. These data suggest that *S. terebinthifolius* demonstrates anti-hyperalgesic mechanical and thermal effects without inferring in depression-like behavior induced by CFA.

## Conclusion

The results obtained in this study suggest that the methanolic extract of *S. terebinthifolius* leaves may be valuable for the development of new active drugs against pathophysiological processes related to pain and inflammation.

## Authors Contributions

EB, JA, MMS and CALK performed pharmacological assays. ASNF and PCOJr prepared the extract and did the phytochemical analysis. PCOJr and CALK ensured statistical analysis, wrote, and corrected the manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) for their financial support.

## Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interest.

joelho, a atividade de mieloperoxidase, depressão, e a hipersensibilidade ao frio e calor em camundongos, corroborando com outros estudos na literatura (20-22). Geralmente, a dexametasona é considerada uma droga de controle positivo, porque reduz a hiperalgesia, edema do joelho e atividade da mieloperoxidase em estudos experimentais (20). Por outro lado, o extrato obtido de *S. terebinthifolius* inibiu quatro parâmetros (hiperalgesia mecânica, edema do joelho, hipersensibilidade ao frio e ao calor), mas não a depressão induzida pela injeção unilateral de CFA na pata. A sensibilidade antiartrítica e a redução aos efeitos do frio e do calor induzidos pelo tratamento com EMST sugere uma alteração das fibras responsivas ao estímulo mecânico e aos limiares térmicos (quente e frio). Estes dados sugerem que os efeitos mecânicos e térmicos anti-hiperalgésicos de *S. terebinthifolius* sem interferir na depressão como comportamento induzido por CFA.

## Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* pode ser valioso para o desenvolvimento de novos fármacos ativos contra processos fisiopatológicos relacionados à dor e inflamação.

## Contribuições dos autores

EB, JÁ, MMS e CALK realizaram ensaios farmacológicos. ASNF e PCOJr prepararam o extrato e fizeram a análise fitoquímica. PCOJr e CALK, garantiram a análise estatística, escreveram e corrigiram o manuscrito.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) por seu apoio financeiro.

## Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver relações financeiras e/ou pessoais que possam apresentar um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Finnerup NB. Nonnarcotic Methods of Pain Management. *N Engl J Med.* 2019; 380(25):2440-2448.
2. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(5):366-78.
3. Nijs J, Leysen L, Vanlauwe J, Logghe T, Ickmans K, Polli A, Malfliet A, Coppieters I, Huysmans E. Treatment of central sensitization in patients with chronic pain: time for change? *Expert Opin Pharmacother.* 2019; 20(16):1961-1970.
4. Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019; 15(1):9-17.
5. Portenoy RK., Hagen NA, Breakthrough pain: definition, prevalence and characteristics. *Pain,* 1990; 41(3):273-281.
6. Corrêa MP. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984; 1, 747.
7. Carvalho MG, Melo AGN, Aragão CFS, Raffin FN, Moura TFAL. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2013; 15:158-169.
8. Matos FJA, *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades*, 3rd Ed., Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Edições UFC; 1998; p 219.
9. Oliveira JLFG, Santos RB, Reis FO, Matsumoto ST, Bispo WMS, Machado LP, Oliveira LFM, Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2013; 15(1):150-157.
10. Piccinelli AC, Santos JA, Konkiewitz EC, Oesterreich SA, Formagio ASN, Croda J, Ziff EB, Kassuya CAL. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutr. Neurosci.* 2014; 18(5): 217-224.
11. Cole ER, Santos RB, Lacerda JV, Martins JD, Greco SJ, Cunha NA. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Braz. J. Microbiol.*, 2014; 45(3):821-828.
12. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Libério SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharm.* 2014; 155(3):1441-1449.
13. Cavalher-Machado SC, Rosas EC, Brito FA, Heringe AP, Oliveira RR, Kaplan MA, Figueiredo MR, Henriques M. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(11), 1552-1560
14. Silva MM, Iriguchi E, Vieira MC, Foglio MA, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Souza KP, Kassuya CAL, Formagio ASN. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2016; 27(4):445-452.
15. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain,* 2000; 87(2):149-158.
16. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977; 229(2), 327-336.
17. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1953; 107(3),385-393.
18. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain,* 1987; 30:103-114.
19. Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ, Poole S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Bri J Pharmacol.* 1997; 121(5):883-888.
20. Shi M, Wang A, Prescott D, Waterhouse CC, Zhang S, McDougall JJ. Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(2), 434-444.
21. Maciel IS, Silva RB, Morrone FB, Calixto JB, Campos MM. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. *PLoS One,* 2013; 8(9):e77227.
22. Montrucchio DP, Córdova MM, Santos AR. Plant derived aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic inflammatory pain models: evidence for a role of TRPA1 channels. *PLoS One* 2013; 8(7):e67730