

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* E DE
DERIVADOS 1,2,3,4,6-PENTAGALOIL-O-B-GLUCOPIRANOSÍDEO E
ROBUSTAFLAVONA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO EM
ROEDORES**

ELOISE BALEN

**DOURADOS-MS
2015**

ELOISE BALEN

**ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* E DE
DERIVADOS 1,2,3,4,6-PENTAGALOIL-O-B-GLUCOPIRANOSÍDEO E
ROBUSTAFLAVONA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO EM
ROEDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD- Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dra. CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B183a	<p>Balen, Eloise.</p> <p>Atividade analgésica de extrato de <i>Schinus terebinthifolius</i> e de derivados 1,2,3,4,6-Pentagaloil-O-B-Glucopiranosideo e robustaflavona em modelos experimentais de nocicepção em roedores. / Eloise Balen. – Dourados, MS : UFGD, 2015.</p> <p>52f.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. <i>Schinus terebinthifolius</i>. 2. Roedores. 3. Nocicepção. 4. 1,2,3,4,6-pentagaloil-O-β-glucopiranosideo 5. Robustoflavona. I. Título.</p> <p>CDD – 581.634</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.




REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que, **Cândida Aparecida Leite Kassuya (Presidente)**, **Silvia Aparecida Oesterreich** e **Ubirajara Lanza Junior**, compuseram a Banca de Defesa de Dissertação da discente **Eloise Belen**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD, intitulada "ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* E DE DERIVADOS 1,2,3,4,6-PENTAGALOIL-O-B-GLUCOPIRANOSIDEO E ROBUSTAFLAVONA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO EM ROEDORES", sob orientação da **Prof. Dr. Cândida Aparecida Leite Kassuya**, realizada no dia 28 de agosto de 2015 às 9h, na sala cinco do Bloco da Faculdade de Ciências da Saúde.

Dourados-MS, 28 de agosto de 2015.




Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya
Coordenadora em exercício
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



REGISTRO

Livro nº 0001

Folha nº 0013

Registro nº 0096

Data: 28 / 08 / 2015

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Grande Dourados/UFGB

Anna Paula Figueira



UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA PELA CANDIDATA **ELOISE BALEN**, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 28 DE AGOSTO DE 2015.

Aos vinte e oito dias do mês de agosto de dois mil e quinze (28/08/2015), às 9h, em sessão pública, realizou-se, na sala cinco do Bloco da FCS da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Atividade analgésica do extrato de *Schinus terebinthifolius* e de derivados 1,2,3,4,6-PENTAGALOIL-O-B-GLUCOPIRANOSÍDEO e Robustaflavona em modelos experimentais de nocicepção em roedores" apresentada pela mestrande **ELOISE BALEN**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya** (Presidente/orientador), **Dra. Sílvia Aparecida Oesterreich** (membro titular/UFPGD) e **Dr. Ubirajara Lanza Junior** (membro titular/UFPGD). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer a candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa da candidata. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 28 de agosto de 2015.

Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

Dra. Sílvia Aparecida Oesterreich

Dr. Ubirajara Lanza Junior

ATA HOMOLOGADA EM: / / , PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFPGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente
SEMPRE”.

Martin Luther king

Dedico este trabalho aqueles que me
deram apoio incondicional durante esta
caminhada de aprendizado e vivência.

Especialmente aos meus pais,
Nanete e Luis e a minha irmã Indina Patricia,
E ao meu amor, Eduardo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas escolhas. Sem a presença divina nos dias difíceis não teria eu suportado com tal serenidade as dificuldades encontradas durante a caminhada.

À minha orientadora, prof^a Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya pela oportunidade de trabalho, excepcional orientação e incansável dedicação, amizade, paciência, conselhos, auxílios e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus amigos de mestrado e doutorado Juci, Joyce e Marcelo pelos bons momentos vividos, pela amizade oferecida e por tornar nossos experimentos possíveis.

A Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Leticia Horbach, por ser sempre tão prestativa.

A minhas vizinhas Monique e Tania, pela amizade, pelo apoio afetivo e científico, pelos bons momentos vividos, e por ser a minha segunda família durante esses dois anos de mestrado.

A minha família pelo amor incondicional e apoio sempre. Sem vocês essa conquista não seria possível.

Em especial a minha mãe Nanete e ao meu namorado Eduardo que além de estar sempre ao meu lado me apoiando, me auxiliaram nos experimentos de uma forma ou outra.

A FUNDECT ao apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo/ Abstract.....	vi/vii
Listas de figuras.....	viii
Listas de abreviaturas e símbolos.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3. OBJETIVOS.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
5. ANEXOS.....	28
5.1. ARTIGO.....	29
5.2. FIGURAS.....	47

RESUMO

A planta *Schinus terebinthifolius* é amplamente utilizada no estado do Mato Grosso do Sul como anti-inflamatório e analgésico. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que, o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* e o composto (R)-(+)-limonene exibiram efeito anti-hiperalgésico contra estímulos mecânicos. Sendo assim, objetivava-se estudar o efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico do extrato metanólico do *S. terebinthifolius*, do composto 1,2,3,4,6-pentagalossil-O- β -glucopiranosídeo derivado do metil galato e o composto robustaflavona em modelo animal. As atividades biológicas dos compostos descritos foram avaliadas a partir do modelo de inflamação e dor persistente, induzido por adjuvante completo de Freund (CFA), e pelos modelos de hiperalgisia induzida pela formalina e carragenina em roedores. Os resultados sugerem que o tratamento por um longo período com o extrato de *S. terebinthifolius* reduziu de maneira significativa a hiperalgisia persistente causada pelo CFA, a hiperalgisia induzida pela carragenina e a nocicepção induzida pela formalina. Além disso, os compostos 1,2,3,4,6-pentagalossil-O- β -glucopiranosídeo e robustaflavona foram efetivos na inibição da nocicepção induzida pela formalina. Os resultados do presente estudo revelam que, tanto o extrato como os compostos, (especialmente o 1,2,3,4,6-pentagalossil-O- β -glucopiranosídeo) presentes na folhas de *S. terebinthifolius* apresentam ações antinociceptiva e anti-hiperalgésica em modelos experimentais, indicando uma nova possibilidades para o desenvolvimento de drogas analgésicas e anti-inflamatórias a partir da planta de do *S. terebinthifolius*.

Palavras-chave: *Schinus terebinthifolius*; roedores; nocicepção; 1,2,3,4,6-pentagalossil-O- β -glucopiranosídeo e robustaflavona

ABSTRACT

Previous studies from our group showed that essential oil of *Schinus terebinthifolius* and compound(R)-(+)-limonene exhibited anti-hyperalgesic effects against mechanical stimulus. The chemical composition of essential oil and extract are completely different and this plant is widely used by Mato Grosso do Sul state as anti-inflammatory, and analgesic agent guiding to the focus of our study in the analgesic property of the extract. In this way, the aims of this research was evaluate the anti-nociceptive and anti-hyperalgesic of methanolic extract (MEST), and two pure compounds, the 1,2,3,4,6--penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone, obtained from *S. terebinthifolius* leaves in animal models of pain and arthritis. The products were administrated by oral route for mice and the extract was analysed in CFA- and carrageenan-induced persistent mechanical hyperalgesia, formalin-induced nociception, CFA- induced knee oedema, cold- and hot-hipersensitivity, depression, locomotor activity (open field test) and formalin test while the two isolated compounds was tested only in formalin test. The 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone were detected and isolated from the MEST. The MEST inhibited the mechanical hyperalgesia, knee edema, and cold hyperalgesia, but not the depressive-like behavior, induced by the intraplantar injection of CFA. The MEST, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone prevented the anti-nociceptive effects in both formalin phases of nociception and the mechanical induced by carrageenan. The MEST did not induce alterations in the open field test. The MEST was effective for inhibition of pain and arthritic parameters, but not against depressive-like behavior, without altering locomotor activity. The compounds seem to be the active principle(s) present in the MEST because they proved to be anti-nociceptive and anti-hyperalgesic in models of acute pain. The present results may open new possibilities for the development of new anti-hyperalgesic and anti-arthritic agents from *S. terebinthifolius*

Key-words: *Schinus terebinthifolius*, rodents, nociception, 1,2,3,4,6-pentagalol-O- β -glucopiranosideo and robustaflavona

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos compostos.....	47
Figura 2.	Efeito da administração sistêmica de <i>S. terebinthifolius</i> em CFA induzida em ratos durante 20 dias na indução da alodinia.....	47
Figura 3.	Efeito da administração oral de <i>S. terebinthifolius</i> na indução sensibilidade ao frio, aumento da circunferência tíbiotarsal o e antinocicepção avaliada no teste da placa quente em ratos após a administração de CFA	49
Figura 4.	Efeito do tratamento oral com METS e os compostos ST-1 e ST-2 na fase I (A) e na fase II (B) do comportamento nociceptivo induzido por injeção intraplantar de formalina.....	51
Figura 5.	Efeito da administração oral com METS e dos compostos ST-1 e ST-2 na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina e avaliada pelo teste de Von Frey.....	53

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PGE	Prostaglandinas
LTs	Leucotrienos
PAF	Fator de ativação plaquetária
TNF	Fator de necrose tumoral
IASP	Associação internacional para o estudo da dor
SNC	Sistema nervoso central
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AINEs	Anti-Inflamatórios não esteroidais
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HSV	Vírus do herpes simples
HBV	Vírus hepatite B
NMDA	N-Metil-D-aspartato
CCK	Colecistoquinina
PGI	Prostaciclina
AR	Artrite reumatoide
METS	Extrato metanólico de <i>Schinus Terebinthifolius</i>
CFA	Adjuvante completo de Freund
VO	Via oral
ST-1	1,2,3,4,6-pentagalactil- α -D-glucopiranosídeo
ST-2	Robustoflavona
Anti- TNF	Agentes biológicos bloqueadores do fator de necrose tumoral
Cg	Carragenina
I.pl.	Injeção intraplantar
AcOEt	Acetato de etila
MeOH	Metanol

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial desagradável e subjetiva que resulta da complexa interação entre processos fisiológicos, personalidade e comportamento da pessoa. É um fenômeno perceptivo complexo que normalmente está associado à lesão tecidual [1]. Além disso, os transtornos dolorosos constituem um problema de saúde pública, podem gerar repercussões que incapacitam ou limitam as atividades normais de um indivíduo. Dessa forma, representam um problema de saúde pública, devido ao custo elevado do tratamento terapêutico e a incapacidade de trabalho quando a dor é severa [2].

A classificação de dor pode variar em relação ao aspecto de duração ou fisiopatologia: aguda, inflamatória, neuropática e idiopática. Por ser subjetiva, associada à experiência afetiva e emocional do indivíduo, o diagnóstico correto da etiologia da dor é crucial, pois ela constitui a base de seu tratamento clínico. Os tratamentos terapêuticos disponíveis atualmente apresentam eficácia e segurança limitada, principalmente no tratamento da dor crônica. Os medicamentos normalmente empregados na terapêutica da dor crônica são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticoides, antagonistas de receptor para IL-1 e anti-TNF [3]. Já o tratamento da dor aguda é baseado no uso de analgésicos opioides, AINEs e antagonistas de receptores para o glutamato do tipo NMDA [4].

No entanto, o uso desses medicamentos pode implicar em efeitos colaterais e/ou adversos, incluindo imunossupressão, depressão respiratória e dependência [3]. Assim, a literatura relata que o uso contínuo dos AINEs, pode induzir vários efeitos indesejados, tais como: lesões gastrointestinais, renais e hepáticas [5]. Dessa forma, muitos pacientes buscam métodos alternativos para o alívio dos sintomas, cura e prevenção de doenças, como o uso de produtos naturais com ou sem recomendação médica, principalmente de plantas medicinais, através do conhecimento empírico e/ou científico.

Sendo assim, a literatura relata que, a *Schinus terebinthifolius* Raddi e seus compostos apresentam elevado potencial terapêutico, tanto na forma de extrato bruto, quanto na administração de seus compostos vegetais ou frações ativas, isoladas. Vários estudos têm mostrado o efeito biológico do *Schinus terebinthifolius* como anti-inflamatório, antipirético, adstringente, analgésico e depurativo. Nesse mesmo sentido, a literatura relata que o composto galato de metila, isolado de *S. terebinthifolius*, apresenta efeito anti-inflamatório e anti-histamínico [6]. Dois compostos, isolados pela primeira vez de *Schinus terebinthifolius* o 1,2,3,4,6-pentagalatoil-O- β -glucopiranosídeo (**ST-1**) e a

robustaflavona (ST-2), foram isolados pelo nosso grupo de pesquisa. Esse estudo teve como objetivo avaliar a ação anti-nociceptiva e anti-hiperalgésica desses compostos e do extrato, em modelos experimentais de dor inflamatória aguda e crônica em roedores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Processo inflamatório

O processo inflamatório é a primeira reação do organismo contra patógenos invasores. O estímulo inflamatório e doloroso facilita a reparação e a cicatrização do tecido, resultando na manutenção e homeostase do tecido [7, 8]. As primeiras manifestações clínicas observadas na inflamação aguda são eritema, edema, calor e dor, como descritas por Cornelius Celsus, no início da era Cristã. O quinto sinal estabelecido no século 19, é a perda de função do tecido ou órgão lesado, observado em reações crônicas [9,11].

A reação inflamatória envolve alterações vasculares e celulares como: aumento do fluxo sanguíneo para a área lesionada; aumento da permeabilidade vascular de proteínas e fluidos levando à formação do exsudato; migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos para o local da lesão, estimulados pela liberação de quimiocinas, estimulando a interação de moléculas de adesão (ex.: integrinas e selectinas) facilitando a diapedese. Ainda observa-se ativação de linfócitos e de células imunológicas residentes, que contribuem para a síntese e o aumento de mediadores de inflamação e espécies reativas de oxigênio, causando lesão tecidual [12,13,10].

As células do sistema imunológico são capazes de produzir vários mediadores químicos inflamatórios e/ou nociceptivos como a histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral, numerosas proteases, entre outros. Agentes envolvidos no processo da resolução inflamatória, também são produzidos, entre eles as lipoxinas, resolvinas e protectinas que apresentam ação anti-inflamatória, pró-resolutoras e anti-fibróticas [14].

No entanto, falhas nos mecanismos de inibição da inflamação, fazem com que esse processo inicialmente resolutivo, perturbe a homeostase do órgão [15] levando-o a desenvolver processos inflamatórios crônicos.

Dessa maneira, pelo descrito anteriormente, no processo inflamatório ocorre a formação de substâncias capazes de induzir a sensibilização dos nociceptores, o que implica na manifestação da dor inflamatória.

2.2.Processo doloroso

A IASP define a dor como uma sensação desagradável, associada com uma lesão tecidual [1,18]. Estudos demonstram que a dor é a causa principal para a procura por serviços de saúde no Brasil e em outros países e representa uma grande porcentagem dos gastos na saúde pública. Assim, a avaliação e o tratamento adequado incluem além de aspectos técnicos profissionais, questões éticas e jurídicas [19,20].

É importante ressaltar que a dor física é essencial para a sobrevivência do indivíduo, um sinal de alerta para ocorrência de lesões nos órgãos ou tecido, apresentando a função de proteger e preservar o organismo dos agentes nocivos. Entretanto, dependendo da causa, intensidade e qualidade, a dor pode tornar-se prejudicial, como no caso das lesões nervosas, debilitando o paciente [18, 21]. A dor persistente pode levar a um estado de depressão análogo ao desencadeado por estímulos estressantes inevitáveis, não podendo ser considerada como resposta adaptativa.

Dessa forma, estudos na literatura mostram que em estados dolorosos prolongados, há a estimulação constante de nociceptores aferentes, implicando em mudanças no processamento da informação nociva, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central, o que potencializa a fisiopatologia da dor crônica [22,23].

2.3.Classificação

A dor pode ser classificada como *dor nociceptiva*, que é resultante da ativação direta dos nociceptores presentes na pele (somática) e outros tecidos, (visceral) em resposta a lesão acompanhada de inflamação, resultando em dano tecidual [18]; *dor neuropática*, que envolve danos no SNP e/ou no SNC e *dor idiopática*, caracteriza por não apresentar uma causa identificável [22,24].

Quanto à classificação temporal, a dor pode ser classificada como *aguda* ou crônica. Dessa forma, a *dor aguda* é uma resposta normal, originada por lesão tecidual, com consequente ativação dos receptores nociceptivos no local da lesão, sendo autolimitante e o local afetado é reestabilizado.

Em contraste, a *dor crônica* é provocada por uma lesão e/ou fisiopatologia que sobrepuja a capacidade homeostática do organismo [25,19].

A literatura relata que, o diagnóstico efetivo da dor é clinicamente crucial, pois de maneira geral, a *dor crônica* é hiporresponsiva aos fármacos analgésicos. Essa condição pode ser observada em pacientes com dor neuropática, onde esses são mais propensos a desenvolver alívio da dor com o uso de antidepressivos tricíclicos, antidepressivos inibidores seletivos da recaptura de serotonina e fármacos agonistas gabaérgicos [26].

Além da *dor crônica*, o paciente expressa sintomas secundários tais como: alterações nos padrões de sono e libido, incapacidade física e mental, irritabilidade, depressão do SNC bem como a diminuição da capacidade de concentração.

Dessa maneira, a *dor crônica*, mesmo sendo considerada um problema de saúde frequente que acarreta sérios prejuízos pessoais e econômicos à população, a literatura relata que são escassos os estudos epidemiológicos sobre essa condição fisiopatológica, associada ou não às dores múltiplas [2].

2.4. Mecanismo biológico da dor

A transmissão neural da dor, abrange uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais desde a pele, vísceras e outros tecidos até o córtex cerebral. Resumidamente, o processamento neural inicia-se por meio de uma estimulação química, mecânica ou térmica de nociceptores, que são estruturas especializadas em fornecer informações sobre lesão tecidual, com consequentes alterações no potencial elétrico da membrana das fibras sensoriais.

Assim, essas fibras sensoriais são classificadas na dependência de suas estruturas, (diâmetro, grau de mielinização) e da velocidade de condução do potencial elétrico para o SNC em: fibras sensoriais A β , A δ e C (Tabela 1). As fibras sensoriais do tipo C e A δ são responsáveis pela transmissão das informações nociceptivas da periferia até o corno dorsal da medula espinhal [27,28,29]. e são divididas em lâminas, sendo que a lâmina I (lâmina marginal) e a lâmina II (substância gelatinosa), são responsáveis pela maior parte dos estímulos sensoriais recebidos.

Posteriormente, no corno dorsal da medula espinhal, os neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, formando a via de transmissão ascendente. Essa conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato e a substância P, que são

responsáveis pelo desencadeamento de potenciais excitatórios pós-sinápticos. Esse processo envolve canais para o cálcio, sendo os principais moduladores da liberação de neurotransmissores [27,28].

Em seguida, os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender no trato espinotalâmico, espinoreticular, entre outros, chegando até suas fibras terminais localizadas no SNC. As estruturas envolvidas da distribuição da dor são: o córtex, (onde a consciência da dor é formada), o hipotálamo (região que modula as reações físicas à dor, como aumento da pressão e taquicardia), o tronco cerebral (que ativa o estado de alerta), e o giro do cíngulo anterior, onde a magnitude da dor é avaliada [30].

Tabela 1 - Tipos de fibras sensoriais responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.

Tipos de Fibras	A β	A δ	C (Polimodais)
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2-6 μ m	0,4-1,2 μ m
Velocidade de condução	30-100 m/s (rápida)	12-30 m/s (intermediária)	0,5-2 m/s (lenta)
Estímulos	Propriocepção sensibilidade	Mecanotérmico Temperaturas: inferiores a 53°C	Mecânicos, térmicos e químicos

Fonte: Julius e Basbaum.

2.5. Dor inflamatória

A dor inflamatória ou dor associada a processos inflamatórios é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes e pela estimulação em algumas fibras do tipo C silenciosas, que são ativadas por estímulos químicos bem como por mediadores químicos inflamatórios.

Assim, a literatura relata que, a acetilcolina, PGE, histamina, serotonina, bradicinina, LTs, substância P, PAF, [22,29] radicais ácidos, interleucinas (IL-1 e IL-8)

[31], TNF, NGF e AMPc, dentre outras [29,4] sensibilizam os nociceptores quimiossensíveis, resultando no desenvolvimento da dor inflamatória e diminuição do limiar de despolarização dos nociceptores e conseqüentemente, tornando o responsivo a um estímulo de baixa intensidade [32].

Dessa forma, essas alterações morfológicas e funcionais no sistema nervoso podem causar redução do limiar da dor, ativação exacerbada da via da dor, descargas ectópicas ou perda de processos inibitórios e o processo inflamatório nessas condições pode determinar respostas dolorosas anormais, que são classificadas como hiperalgesia que é caracterizada por um aumento da sensibilidade à dor [25,33].

A literatura também relata uma forma inusitada de dor, a alodinia, é uma resposta a um estímulo não nociceptivo, ou não doloroso. Ela é mediada pela ativação periférica de receptores sensíveis ao estímulo tátil que ganham acesso ao processamento nociceptivo central [25,33].

2.6. Dor neuropática

A dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do SNC e do SNP, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico). Essa condição fisiopatológica pode ser gerada por lesões nas raízes e nervos periféricos, na medula espinhal, no tronco cerebral e no encéfalo. A literatura relata que algumas doenças como a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), herpes Zoster, diabetes, lesões nervosas inerentes à amputação ou compressão de membros e uso de quimioterápicos podem implicar no aparecimento desse tipo de dor [34].

Atualmente, estudos epidemiológicos mostram que a prevalência da dor crônica, de origem predominantemente neuropática, tem maior prevalência em mulheres, idosos e indivíduos de baixo nível socioeconômico. No entanto, a literatura também sugere que a prevalência da dor neuropática futuramente pode aumentar, devido à elevada taxa de sobrevivência dos pacientes com doenças crônicas (câncer, AIDS, diabetes entre outras) [35].

As ações em longo prazo dos mediadores químicos tanto em nervos periféricos quanto em nervos centrais, determinam mudanças de neuroplasticidade causadas por alterações na expressão gênica de receptores, caracterizadas pela maior expressão de peptídeos pró-nociceptivos, canais iônicos, proteínas intracelulares, substâncias neuromoduladoras, modificações na sinalização intra e extracelular, entre outras alterações

[36,37,38,23]. A literatura relata ainda que as implicações dessas alterações determinam um aumento da expressão de neurônios nociceptivos espinhais, que respondem de forma exagerada a estímulos inócuos [39].

2.7. Modelos de inflamação em roedores

Existem diversos modelos animais descritos na literatura que são utilizados na avaliação da dor e inflamação. No entanto, os resultados obtidos nesses estudos são extrapolados para a condição humana. A maioria dos modelos mimetiza certos aspectos dessa condição fisiopatológica, e podem ser usados como ferramentas para aumentar a compreensão específica do mecanismo da doença inflamatória.

2.7.1. Modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina

Esse modelo avalia o limiar nociceptivo dos animais por meio da estimulação mecânica pelo método de o Von Frey eletrônico, após a administração I.pl. de carragenina (substância química que apresenta alto potencial inflamatório por determinar a liberação de prostaglandinas, resultando no processo algico).

2.7.2. Modelo de nociceção induzida pela formalina

A nociceção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos de dor: a **dor de origem neurogênica**, que é caracterizada pela estimulação direta dos neurônios nociceptivo (resposta imediata) e a **dor de origem inflamatória** caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (resposta tardia) (Correa e Calixto, 1993). Os animais são avaliados pelo tempo de reação da dor (lambida na pata) em segundos, durante o período de 0 a 5 minutos (primeira fase) e de 15 a 30 minutos (segunda fase) (Hunskar e Hole, 1987).

2.7.3. Hiperalgesia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)

Estudos têm utilizado modelos de monoartrite induzidas por CFA para investigar características da doença, mecanismos de sensibilização e o comportamento nociceptivo induzido pela inflamação. Nos camundongos C57BL/6, a inflamação induzida por CFA resulta em limiares nociceptivo baixos, no desenvolvimento da alodinia e da hiperalgesia na pata inflamada.

2.8. Tratamento da dor

Para estabelecer um tratamento adequado com eficácia terapêutica no bloqueio da dor é necessário realizar o diagnóstico correto quanto à etiologia da dor. Também é indispensável conhecer a fisiopatologia e os mecanismos que conduzem o desequilíbrio orgânico para que a escolha da conduta seja apropriada.

Alguns medicamentos podem ser eficazes para a dor aguda e determinar pouco ou nenhum efeito benéfico, quando utilizados para as síndromes de dores crônicas. Dessa forma, é de fundamental importância conhecer a farmacologia geral das substâncias que fazem parte do arsenal farmacoterapêutico disponível na atualidade [40].

Por outro lado, várias terapias não farmacológicas são empregadas no tratamento da dor, como fisioterapia, psicoterapia, aplicação de frio ou calor no local da dor, massagem, acupuntura e estimulação elétrica nervosa transcutânea. Essas modalidades terapêuticas estão associadas a um melhor fluxo de sangue para locais afetados e à liberação endógena de mediadores analgésicos, como a beta-endorfina e encefalina [28]. Porém, devido à complexidade do processo algésico, a terapia farmacológica sobrepuja a terapia não-farmacológica [41].

Assim, a escolha do fármaco a ser utilizado no controle terapêutico da dor fundamenta-se no tipo de situação dolorosa a ser debelada. Dentre as classes de fármacos, podemos citar os: anestésicos gerais, anestésicos locais, analgésicos opioides, agonistas α -2 adrenérgicos, AINEs, antagonistas de receptores adrenérgicos, antidepressivos, antagonistas de NMDA e relaxantes musculares [4]. Em adição, combinações de analgésicos podem oferecer abordagens terapêuticas mais efetivas, proporcionando alívio da dor, por meio de diferentes mecanismos.

Nesse sentido, a literatura relata que o uso dos anestésicos gerais bloqueiam a percepção da dor induzindo o córtex cerebral a não percepção da informação nociceptiva que está sendo recebida, ou seja, a inconsciência [42]. Anestésicos dissociativos como a cetamina antagonizam de maneira não competitiva os receptores NMDA para o glutamato, determinando efeito analgésico [43]. A amantadina é outro antagonista de receptores NMDA para o glutamato, que pode ser usado no tratamento da dor neurogênica e osteoartrites crônicas [4,28].

Os anestésicos locais agem bloqueando os canais para o sódio voltagem dependentes, inibindo a passagem do íon sódio pelos canais íons seletivos nas membranas nervosas, retardando a velocidade de despolarização modulando negativamente a

propagação do potencial de ação o que determina o bloqueio da condução nervosa, tanto motora quanto sensorial[42]. Por esse motivo, os anestésicos locais são utilizados na vigência da dor aguda por meio de aplicações locais, mas também podem ser utilizados de forma injetável, através da injeção por punção lombar e/ou infiltração por via epidural ou subaracnoidea. Além disso, esses fármacos podem ser utilizados também no tratamento da dor crônica, principalmente na dor neuropática. Nesse caso, utiliza-se bloqueio nervoso ou aplicação local [44,45].

Ainda em relação aos fármacos utilizados no tratamento da dor, os opioides são analgésicos de alta potência farmacológica sendo representados pela morfina e seus derivados como a codeína, fentanil, buprenorfina e o butorfanol. A eficácia desses fármacos está relacionada ao seu mecanismo de ação ou seja, eles são agonistas dos receptores opioides (do tipo μ , k e, em alguns casos δ), que localizam-se principalmente no SNC e em regiões da medula espinhal envolvidas na transmissão e modulação da dor, alterando a atividade sensitiva, motora e psíquica [46].

Por outro lado, na vigência da dor inflamatória, os receptores opioides são expressos na periferia o que pode ser reflexo da atividade diminuída da colecistoquinina (CCK) associada com mediadores inflamatórios [28]. A administração sistêmica dos opioides é o meio mais efetivo de aliviar a dor severa em várias situações que incluem dor aguda, inflamatória persistente e neuropática [47].

Os AINES também são utilizados como analgésicos, atuando no bloqueio de etapas da inflamação por inibição dos componentes do sistema enzimático envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico e formação de eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (sensibilizadores de nociceptores), e pela inibição das isoenzimas cicloxigenases [48]. A PGI causa hiperalgia de curta duração e a PGE induz hiperalgia de longa duração [4]. A vantagem da utilização dos AINES é a ausência de depressão do sistema nervoso, cardiovascular e respiratório. Seus efeitos analgésicos são potencialmente aumentados pela combinação com opiáceos [49].

Em relação à analgesia determinada pelos agonistas de receptores α -2 adrenérgicos pré sinápticos encontrados nos neurônios dorsais da medula espinhal é devida à redução da excitação dos neurotransmissores nociceptivos, como as catecolaminas, substância P [4].

A literatura também relata de fármacos simpatolíticos e simpatomiméticos no controle farmacológico da dor. Assim antagonistas de receptores α e β adrenérgicos, podem ser usados associados a derivados triptanos e ergotamínicos, no controle de certos tipos de cefaleia e como auxílio na terapia das enxaquecas [50]. Em contraste, estudos recentes mostram que o uso de agonistas de receptores β_2 adrenérgicos é indicada para aliviar a alodinia e também podem oferecer uma alternativa terapêutica para o tratamento da dor neuropática crônica [51].

Também de maneira alternativa aos analgésicos, fármacos antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina, imipramina e clomipramina, mostram-se eficazes como coadjuvantes no tratamento da dor, especialmente no caso de dor crônica neuropática e/ou por nocicepção na fibromialgia, profilaxia da enxaqueca e na neuralgia pós-herpética [52]. Sua ação analgésica está relacionada à inibição da recaptura neuronal de noradrenalina e serotonina, bem como à ativação das vias descendentes inibitórias da dor. O efeito analgésico periférico dos antidepressivos tricíclicos tem sido atribuído à diminuição do AMP cíclico, via ativação de receptores da adenosina e ao bloqueio dos canais para o sódio voltagem-dependentes [53].

Do mesmo modo alternativo, os fármacos relaxantes musculares como a ciclobenzaprina, a tizanidina e carisoprodol são usados para controlar dores resultantes de traumatismos e doenças degenerativas. No mesmo sentido, a glicosamina e o sulfato de condroitina, classificados como nutracêuticos, são utilizados como adjuvantes no alívio de dores oriundas de problemas articulares degenerativos, associados aos AINES [4].

Clinicamente a literatura relata que o tratamento da dor crônica e da artrite reumatoide (AR) baseia-se no uso de medicamentos como os AINEs, glicocorticoides, antagonista do receptor da IL-1 e anti-TNF. Vários estudos também têm mostrado a eficácia clínica e segurança dos inibidores de TNF no controle dos sinais e sintomas da AR, expressa pela redução da progressão da doença [54,55]. Os estudos clínicos em pacientes com AR mostram que o uso de antagonistas específicos para o TNF, reduz a inflamação e retarda a destruição das articulações [54,56]. Atualmente encontram-se disponíveis no mercado três antagonistas de TNF: etanercepte, infliximabe e adalimumabe. No entanto, seus usos são associados com impactantes efeitos colaterais, incluindo a imunossupressão e o surgimento de infecções oportunistas que podem aumentar a morbidade e a mortalidade do paciente.

Apesar de existir uma ampla variedade de medicamentos utilizados no tratamento da dor, a maioria deles apresenta efeitos colaterais, variando de lesões gastrointestinais renais e hepáticas [5,57], disfunção plaquetária, problemas cardiovasculares até tolerância e dependência. Dessa maneira, torna-se necessário e plausível, investir em novas pesquisas científicas, que possam proporcionar o desenvolvimento de novas terapias, bem como a procura por novas substâncias químicas, biologicamente mais efetivas contra os diferentes tipos de dor e que apresentem baixo risco de desenvolvimento de efeitos indesejados durante a farmacoterapia dessas condições fisiopatológicas.

2.9. Importância de produtos naturais e obtenção de novos fármacos

Apesar de a dor ser um processo biológico importante para a sobrevivência, ela é uma sensação desagradável e muitas vezes associada ao sofrimento em diversas fisiopatologias. Dessa forma, a ciência interfere no curso natural dos processos fisiopatológicos por meio do alívio dos sintomas da dor [58].

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos podem ser alcançados pela produção de novas moléculas oriundas da química sintética, alteração estrutural de compostos de origem natural e extração de princípios ativos de produtos naturais [59].

Os derivados de plantas incluindo produtos naturais contribuíram ao longo dos anos em grande parte para o desenvolvimento de terapias modernas. A descoberta de novos alvos relevantes para o desenvolvimento de medicamentos não poderia ter sido alcançada sem o importante papel desempenhado pelos produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas superiores. É consenso que muitos medicamentos importantes no mercado foram obtidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, como: morfina, pilocarpina, digitálicos, quinino, artemisinina, atropina, escopolamina e captopril, além de muitos outros medicamentos, como os utilizados no tratamento do câncer, por exemplo a vinblastina, vincristina e paclitaxel, a despeito de muitos antibióticos e agentes imunossupressores [60,61].

Dessa maneira, os estudos científicos envolvendo plantas medicinais continuam. A presente dissertação é um exemplo disso e estudou os potenciais efeitos biológicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

2.10. *Schinus terebinthifolius*

Schinus terebinthifolius Raddi pertence à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira da praia, aroeira vermelha, aroeira pimenteira e aroeira mansa. É uma planta nativa da América do Sul que pode ser encontrada em quase todo o território brasileiro, no nordeste, cerrados, chegando ao Rio Grande do Sul e estendendo-se à Argentina e Paraguai [62].

Na medicina popular ou empírica, a casca, folhas e frutos de *S. terebinthifolius* Raddi são usados como anti-inflamatório, antipirético, adstringente, analgésico, depurativo e para tratar doenças do sistema urogenital e outros [63]. Alguns estudos têm indicado que as propriedades medicinais de *S. terebinthifolius* estão ligadas à alta quantidade de derivados fenólicos como o ácido gálico, galato de metila, taninos e flavonoides, que são responsáveis pelas atividades antioxidantes e antitumorais do *S. terebinthifolius* [64,66]. Devido ao amplo uso populacional dessa planta, e pela importância demonstrada, ela foi incluída na Farmacopeia Brasileira [67].

Um dos compostos isolados de *S. terebinthifolius*, já citado, foi o galato de metila [65]. Seu nome sistemático é metil 3,4,5-tri-hidroxi-benzoato de metila (C₈H₈O₅). A literatura relata que esse composto determina efeitos antibacteriano e bacteriostático [68] bem como atividade antitumoral [69,70]. Tanto os derivados naturais quanto os derivados sintéticos do ácido gálico apresentaram importante atividade biológica em vários estudos. O galato de metila mostra ação sobre as células do melanoma metastático [71] e ação fungicida contra *Paracoccidioides brasiliensis* [72].

Estudos anteriores demonstraram que tanto o extrato metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi quanto o composto isolado galato de metila, também apresentam efeito anti-inflamatório e anti-histamínico [6]. A atividade anti-histaminérgica do composto foi observada por meio da inibição da formação do edema, da degranulação dos mastócitos e do influxo de eosinófilos como resultado da diminuição da produção de mediadores quimiotáticos de eosinófilos. Além disso, o tratamento com o galato de metila inibe o edema da pata na mesma proporção que a prometazina, fármaco anti-histamínico [6].

Por outro lado a literatura relata que as substâncias: galato de metila, miricetrina, quercitrina e miricetina obtidas da fase acetato de etila, provenientes do extrato etanólico das folhas do *S. terebinthifolius*, estão associadas às propriedades antioxidantes [65].

No mesmo sentido, o composto 1,2,3,4,6-pentagaloi-O- β -glucopiranosideo inibe a peroxidação lipídica induzida por H₂O₂ [76] e também é eficaz contra a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* [77].

A literatura relata ainda que, o composto robustaflavona, isolado de sementes *Rhus succedanea*, exibe efeito inibidor contra o vírus da gripe A e da gripe B anti-HSV-1, anti-HSV-2 [78] e anti-HBV [79].

Pelas atividades biológicas acima descritas, dois novos compostos o do 1,2,3,4,6-pentagaloi-O- β -glucopiranosideo (ST-1) derivado do galato de metila e a robustaflavona (ST-2) foram isolados pelo nosso grupo de pesquisa e suas ações anti-nociceptivas e anti-hiperalgésicas foram testadas em modelos experimentais de dor em camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo farmacológico (atividade analgésica, anti-edematogênicas) do extrato de *S. terebinthifolius*, do composto 1,2,3,4,6-pentagaloi-O- β -glucopiranosideo derivado do galato de metila e robustaflavona (**ST-2**), em modelos experimentais.

3.2. Objetivos Específicos

Verificar possíveis atividades anti-hipernociceptivas e antiedematogênicas de extrato de *S. terebinthifolius* no modelo de inflamação e hiperalgesia persistente induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos;

Avaliar o efeito anti-nociceptivos do extrato de *S. terebinthifolius*, e o composto 1,2,3,4,6-pentagaloi-O- β -glucopiranosideo derivado do galato de metila e robustaflavona (**ST-2**), em modelo de nocicepção induzida pela formalina e ácido acético em camundongos;

Avaliar o efeito anti-hiperalgésico do extrato de *S. terebinthifolius*, e do composto 1,2,3,4,6-pentagaloi-O- β -glucopiranosideo derivado do galato de metila e robustaflavona (**ST-2**), em modelo de hiperalgesia mecânica, induzida pela carragenina em camundongos.

4. REFERÊNCIAS

1. Garcia, J.B.S. 2010. Dor neuropática. Sociedade Brasileira para Estudos da Dor.1-7.
2. Kreling, M.C.G.D., D.A.L.M. Cruz, C.A.M. Pimenta. 2006. Prevalência de dor crônica em adultos. Revista Brasileira de Enfermagem 59: 509-13.
3. Faleiro, L.R., L.H. Araújo, M.A.Varavallo. 2011. A Terapia Anti-TNF- α na Artrite Reumatóide. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde 32: 77-94.
4. Andrade. S.F., R.N.Cassu. 2008. Analgésicos. Manual de terapêutica veterinária 3: 98-113.
5. Rao, P., E.E.Knaus. 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. J Pharm Pharm Sci 11(2): 81s-110s.
6. Cavalher-Machado, S.C., E.C.Rosas, F.A.Brito, A.P.Heringe, R.R.Oliveira,M.A. Kaplan. 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. Int Immunopharmacol 8(11):1552-60.
7. Nathan, C., Points of control in inflammation.2010. Nature 420(6917): 846-52.
8. Medzhitov, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. Cell 140(6): 771-6.
9. Gilroy, D.W., T.Lawrence, M.Perrett, A.G.Rossi. 2004. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. Nat Rev Drug Discov 3(5): 401-16.
10. Nourshargh, S., P.L.Hordijk, M.Sixt. 2013. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. Nat Rev Mol Cell Biol 11(5):366-78.
11. Alessandri, A.L., L.P.Sousa, C.D.Lucas, A.G.Rossi, V.Pinho, M.M.Teixeira. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. Pharmacol Ther 139(2): 189-212.
12. Williams, T.J. 1983. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. Br Med Bull 39(3): 239-42.
13. Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 76(2): 301-14.
14. Serhan, C.N. 2008. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 79(3-5) :157-63.
15. Lawrence, T., D.A.Willoughby, D.W.Gilroy. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol 2(10): 787-95.
16. Subbarao, P., P.J.Mandhane, M.R.Sears. 2009. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. CMAJ 181(9): E181-90.
17. Goeij, M., L.T.Van Eijk, P.Vanelderren, O.H.Wilder-Smith, K.C.Vissers, J.G.Van der Hoeven. 2013. Systemic inflammation decreases pain threshold in humans in vivo. PLoS One 8(12): e84159.
18. Lundeberg, S. 2014. Pain in children - are we accomplishing the optimal pain treatment? Paediatr Anaesth 25(1): 83-92.
19. Freitas, C.C., G.V.B.Torres. 2009. Financiamento em saúde e parcerias público-privadas: Repercussões da dor. Revista Dor 10: 267-75.
20. Dellaroza, M.S.G., C.A.M.Pimenta, Y.A.Duarte, M.L.Lebrão. 2013. Dor crônica em idosos residentes em São Paulo, Brasil: prevalência, características e associação com capacidade funcional e mobilidade (Estudo SABE). Cad Saúde Pública 20:325-34.
21. Besson, J.M. 1999. The neurobiology of pain. Lancet 353(9164): 1610-5.
22. Fantoni, D.T., S.Mastrocinque. Fisiopatologia e Controle da Dor. Anestesia em Cães e Gatos 323-36.

23. Schaible, H.G., M.Schmelz, I.Tegeder. 2006. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Ver* 58(2): 323-42.
24. Almeida, T.P., J.Z.Maia, C.D.B.Fischer, M.V.Pinto, R.S.Pulz, P.R.C. Rodrigues. 2006. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária:Revisão de literatura. *Veterinária em foco* 3:107-18.
25. Loeser, J.D., R.D.Treede. 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137(3): 473-7.
26. Thakur, M., A.H.Dickenson, R.Baron. 2014. Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic *Nat Rev Rheumatol* 10(6): 374-80.
27. Drewes, A.M. 2006. The physiology of pain. *Ugeskr Laeger*168(20): 1941-3.
28. Greene, S.A. 2010. Chronic pain: pathophysiology and treatment implications. *Top Companion Anim Med* 25(1): 5-9.
29. Rocha, A.P.C. 2007. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 57:94-105.
30. Usunoff, K.G., A. Popratiloff, O. Schmitt, A.Wree. 2006. Functional neuroanatomy of pain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 184:1-115.
31. Cunha, F.Q., B.B.Lorenzetti, S.Poole, S.H.Ferreira. 1991. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 104(3): 765-7.
32. Coutaux, A., F.Adam, J.C.Willer, D.Le Bars. 2005. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72(5): 359-71.
33. Sandkühler, J. 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89(2):707-58.
34. Chong, M.S., Z.H.Bajwa. 2003. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 25(5):S4-S11.
35. Schestatsky, P. 2008. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Revista do Hospital das Clinicas de Porto Alegre* 28:177-87.
36. Quintão, N.L., D.Balz, A.R.Santos, M.M.Campos, J.BCalixto. 2006. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology* 50(5): 614-20.
37. Lamont, L.A., W.J.Tranquilli, K.A.Grimm. 2000. Physiology of pain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30(4): 703-28.
38. Ji, R.R., G.Strichartz. 2004. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Sci Stke* 2004(252): reE14.
39. Pitcher, G.M., J.L.Henry. 2004. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 186(2): 173-97.
40. Pisera, D., P.E.Otero. 2005. Fisiologia da dor. Avaliação e tratamento em pequenos animais 30-75.
41. Melnikova, I. 2010. Pain market. *Nat Rev Drug Discov* 9(8):589-90.
42. Klaumann ,P.R., A.F.P.F.Wouk, T.Sillas. 2008. Pathophysiology of pain. *Archives of Veterinary Science* 13:1-12.
43. Fantoni, D.T., S.R.Cortopassi. 2008. Anestésicos dissociativos. *Manual de terapêutica veterinária* 455-60.
44. Mao, J., L.L.Chen. 2000. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain* 87(1): 7-17.
45. Chestnut,D.H., S.E.Abrão, S.Black. 2008. *Year Book of Anesthesiology and Pain Management*. Elsevier.

46. Fragata, F.S., V.I.Imagawa. 2008. Analgesia na Terapia Intensiva. Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais: Bases para o atendimento hospitalar 2ªed São Paulo 817 – 36.
47. Falkenberg, B., A.P.Pablo. 2007. Epibatidina: uma breve revisão. Latin American Journal of Pharmacy 26:614-8.
48. Teixeira, M.W. 2005. Dor em pequenos animais. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária 139(34): 31-41.
49. Otero, P.E. 2007. Acute pain management in emergency. Acta Scientiae Veterinariae 35:256-8.
50. Bortolotto, L.A., C.F.M.Consolim. 2009. Betabloqueadores adrenérgicos. Revista Brasileira de Hipertensão 16:215-20.
51. Yalcin, I., L.H.Tessier, N.Petit-Demoulière, E.Waltisperger, L.Hein, M.J.Freund-Mercier. 2010. Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. Exp Neurol 221(1): 115-21.
52. Dworkin, R.H. 1999. Prevention of postherpetic neuralgia. Lancet 353 (9165): 1636-7.
53. Simone, D.A., M.Nolano, T.Johnson, G.Wendelschafer-Crabb, W.R.Kennedy. 1998. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. J Neurosci 18(21): 8947-59.
54. Scheinberg, M., J.Goldenberg, B.D.Souza, R.D.C.Monteiro, R.G.Tsuji, M.L.O.M.Martins. 2005. Análise custo-minimização da terapia anti-TNF no Brasil. Revista Brasileira de Medicina 62:90-5.
55. Machold, K.P., V.P.Nell, T.A.Stamm, J.S.Smolen. 2006. Aspects of early arthritis. Traditional DMARD therapy: is it sufficient? Arthritis Res Ther 8(3): 211.
56. Ikeda, K., S.Cox, P.Emery. 2007. Aspects of early arthritis. Biological therapy in early arthritis – overtreatment or the way to go? Arthritis Research & Therapy 9: 211-21.
57. Lam, F.F., E.S.Ng. 2010. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. British Journal of Pharmacology 159: 958-69.
58. Mori, L.S., S.Boller, C.A.L. Kassuya, M.E.A.Stefanello, A.R.Zampronio. 2011. Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopine, a semi-synthetic analogue of xylopine. Phytomedicine 8(2-3):143-7.
59. Ortholand, J.Y., A.Ganesan. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Curr Opin Chem Biol 8(3): 271-80.
60. Smet, P.A. 1997. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. Drugs 54(6): 801-40.
61. Strohl, W.R., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. Drug Discov Today 5(2): 39-41.
62. Corrêa, M.P., 1974. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.
63. Farias, P.C. 2013. Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpiniiifolia*.
64. Queires, L.C., F.Fauvel-Lafève, S.Terry, A.De la Taille, J.C.Kouyoumdjian, D.K.Chopin. 2006. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. Anticancer Res 26(1A): 379-87.
65. Ceruks, M., P.Romoff, A.O.Fávero, J.H.G.Lago. 2007. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Quím Nova 30:597-9.

66. Mesquita, M.L., J.E.Paula, C.Pessoa, M.O.Moraes, L.V.Costa-Lotuf, R.Grougnet, S.Michel, F.Tillequin, L.S.Espindola. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 123(3): 439-45.
67. Brandão, M.G.L., G.P.Consenza, R.A.Moreira, R.L.M.Monte-Mor. 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-20.
68. Choi, J.G., O.H.Kang, Y.S.Lee, Y.C.Oh, H.S.Chae, H.J.Jang, J.H.Kim, D.H.Sohn, D.W.Shin, H.Park, D.Y.Kwon. 2008. In vitro activity of methyl gallate isolated from *Galla rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. *J Microbiol Biotechnol* 18(11):1848-52.
69. Bendaoud, H., M.Romdhane, J.P.Souchard, S.Cazaux, J.Bouajila. 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J Food Sci.* 75(6): C466-72.
70. Lee, H., Y.Kwon, J.H.Lee, J.Kim, M.K.Shin, S.H.Kim, H.Bae. 2010. Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 185(11): 6698-705.
71. Matsuo, A.L., C.R.Figueiredo, D.C.Arruda, F.V.Pereira, J.A.Scutti, M.H.Massaoka. 2011. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem Biophys Res Commun* 411(2):449-54.
72. Johann, S., N.P.Sá, L.A.Lima, P.S.Cisalpino, B.B.Cota, T.M.Alves. 2010. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 9:30.
74. Silva, S.L., Ja.S.Chaar, T.Yano. 2009. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *Eur J Pharmacol* 608(1-3): 76-83.
75. Hasegawa, T., F.Takan, T.Takata, M.Niiyama, T.Ohta. 2008. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry* 69(3):747-53.
76. Söhretoğlu, D., S.A.Sabuncuoğlu, M.K.Sakar, H.Ozgüneş, O.Sterner. 2010. Antioxidant effects of secondary metabolites from *Geranium psilostemon*. *Nat Prod Commun* 5(6):899-902.
77. Lin, M.H., F.R.Chang, M.Y.Hua, Y.C.Wu, S.T.Liu. 2011. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55(3):1021-7.
78. Lin, Y.M., M.T.Flavin, R.Schure, F.C.Chen, R.Sidwell, D.L.Barnard. 1999. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med* 65(2):120-5.
79. Lin, Y.M., D.E.Zembower, M.T.Flavin, R.M.Schure, H.M.Anderson, B.E.Korba. 1997. Robustflavone, a naturally occurring biflavanoid, is a potent non-nucleoside inhibitor of hepatitis B virus replication in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7(17) :2325-8.

5. ANEXOS

5.1 Artigo

Este trabalho deu origem ao artigo “**Atividade analgésica de extrato de *Schinus terebinthifolius* e dos derivados 1,2,3,4,6-pentagalol-O- β -glucopiranosídeo e robustaflavona em modelos experimentais de nocicepção em roedores**” que será submetido para publicação no periódico “Inflammation”.

Anti-nociceptive, anti-arthritic, and anti-hyperalgesic potential of the 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -glucopyranoside, robustaflavone and methanolic extract obtained from *S.*

terebinthifolius

Eloise Balen^a, Jucicléia da Silva Arrigo^a, Anelise Samara Nazari Formagio^b, Marciane Maximo^b, Candida Aparecida Leite Kassuya^a.

^a College of Health Science, Federal University of Grande Dourados, , Dourados, MS, Brazil

^b College of agronomical Science, Federal University of Grande Dourados, , Dourados, MS, Brazil

**Corresponding author*: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326. *E-mail address*: candida2005@gmail.com

Abstract

Previous studies from our group showed that essential oil of *Schinus terebinthifolius* and compound(R)-(+)-limonene exhibited anti-hyperalgesic effects against mechanical stimulus. The chemical composition of essential oil and extract are completely different and this plant is widely used by Mato Grosso do Sul state as anti-inflammatory, and analgesic agent guiding to the focus of our study in the analgesic property of the extract. In this way, the aims of this research was evaluate the anti-nociceptive and anti-hyperalgesic of methanolic extract (MEST), and two pure compounds, the 1,2,3,4,6--penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone, obtained from *S. terebinthifolius* leaves in animal models of pain and arthritis. The products were administrated by oral route for mice and the extract was analysed in CFA- and carrageenan-induced persistent mechanical hyperalgesia, formalin-induced nociception, CFA- induced knee oedema, cold- and hot-hipersensitivity, depression, locomotor activity (open field test) and formalin test while the two isolated compounds was tested only in formalin test. The 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone were detected and isolated from the MEST. The MEST inhibited the mechanical hyperalgesia, knee edema, heat and cold hyperalgesia, but not the depressive-like behavior, induced by the intraplantar injection of CFA. The MEST, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone prevented the anti-nociceptive effects in both formalin phases of nociception and the mechanical induced by carrageenan. The MEST did not induce alterations in the open field test. The MEST was effective for inhibition of pain and arthritic parameters, but not against depressive-like behavior, without altering locomotor activity. The compounds seem to be the active

principle(s) present in the MEST because they proved to be anti-nociceptive and anti-hyperalgesic in models of acute pain. The present results may open new possibilities for the development of new anti-hyperalgesic and anti-arthritic agents from *S. terebinthifolius*.

Key-words: *Schinus terebinthifolius*, rodents, nociception, 1,2,3,4,6--penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavona

INTRODUCTION

Pharmacological and non-pharmacological treatment is established depending on the classification of type of pain in neuropathic, inflammatory or idiopathic [1]. The pain is a very common clinical sign in inflammatory diseases, being one of the first manifestations observed also in acute inflammation [2]. Inflammatory diseases or neuropathies lead to sensitization of nociceptors where painful sensations are perceived abnormally when a stimulus innocuous generating the allodynia and hyperalgesia is an exaggerated pain to a noxious stimulus [3].

In terms of duration, the acute pain is a normal response caused by an injury of the tissue with consequent local activation of receptors, and this pain disappears after the resolution, in this way the pain has a protective function. In other way, in chronic pain is persistent and has no protective character [4].

The currently available therapeutic treatments for pain generally are non-specific and have limited efficacy and safety, particularly in the treatment of chronic pain and arthritis such as NSAIDS, glucocorticoids and cytokines blockers. However, its use is associated with a multitude of side effects, including immunosuppression and

emergence of opportunistic infections that may increase morbidity and mortality [5]. Often, the repeated use of NSAIDs may induce several side effects, such as gastrointestinal, renal and hepatic lesions [6]. In addition, some painful conditions such as neuropathic pain refractory to current medications are analgesics, including opioids [7].

Schinus terebinthifolius (Anacardiaceae), known as “aroeira-vermelha”, “aroeira-pimenteira” or “poivre-rose” and aroeira, is native to South America is widely distributed in the Brazil [8]. Biological applications of bark and leaves of this plant are known for many years, have been used in traditional medicine as anti-inflammatory, antipyretic, analgesic and as a purifying astringent, diuretic and diarrhea medication [9, 10, 11]. There scientific evidence for the effectiveness as an anti-inflammatory [12], anti-hyperalgesic [13], antimicrobial [14,15] and antihistamine [16].

Recent investigation of our research group showed that essential oil extracted of fruits of *S. terebinthifolius* collected in Dourados-MS exhibited a marked anti-inflammatory activity and analyzed by GC-MS, exhibited predominance of monoterpenes. In continuation chemical studies of the extract methanolic of the leaves resulted in isolated and characterization of two derivatives of gallic and five flavonols, including 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone. Biological activity the extract methanolic and methyl gallate, previously isolated, (both at a dose of 100 and 300 mg/kg) exhibited anti-inflammatory activity in model of carrageenan-induced paw edema in mice [17] (unpublished results) [18].

The robustaflavone inhibited the replication of hepatitis B virus and HIV virus[19].The 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -glucopyranoside reduced the lipidic

peroxidation induced by H₂O₂ [20] and inhibited the film formation by *Staphylococcus aureus*[21].

The present study aims to evaluate the potential anti-nociceptive, anti-hyperalgesia, and anti-arthritic effects of methanolic extract (MEST) of *S. terebinthifolius* in chronic inflammation and nociception induced by complete Freund's Adjuvant (CFA) and check antidepressant activity of the extract in the same model. The compounds 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl-O-β-glucopyranoside and robustaflavone were tested on formalin-induced nociception and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Schinus terebinthifolius leaves were collected in Federal University of Grande Dourados (22° 11' 43.7''S, 54° 56' 08.5''W e 430 m), Dourados-MS, in November, 2012, and identified by Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira of the college of agronomical Sciences of the UFGD. A voucher specimen (DDMS 4600) was deposited in the herbarium of the UFGD, MS, Brazil.

Preparation of the methanolic extract and isolation of compounds

Methanolic extract and compounds

Air-dried aerial parts of *S. terebinthifolius* (620 g) were exhaustively extracted by maceration with methanol at room temperature. Evaporation of the solvent afforded

the methanol extract (MEST) (38 g). Part of this extract was dissolved in MeOH–H₂O 1:1 and partitioned with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate. The same procedure was used for purification of the fraction ethyl acetate, which resulted in isolation of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone (Figure 1, unpublished results) [18].

The MEST and the compounds were dissolved in distilled water with Tween 80 as vehicle just before administration. The percentage of compounds in the MEST was approximately 10 %.

Animals

The experiments were conducted using male *Swiss* mice (25-35g), male C57Bl6 *mice* (25-35 g) and male *Wistar* rats (160-250 g) provided from Federal University of Grande Dourados (UFGD) biotherium. The animals were maintained under a 12 h light-dark cycle, with controlled humidity (60-80 %), and temperature (22 \pm 1°C). The animals were acclimatized to the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments (n = 5/group). All experimental procedures were carried out in accordance with U.S. National Institute of Health, and were approved by the ethics committee for research on laboratory animal of the UFGD (Nbr. 004/2012).

The extract and compounds were dissolved in a solution of Tween 0.2% with 0.9 % saline for oral administration. The MEST was tested at 10, 30, and 100 mg/kg by the oral route in an experimental model of hyperalgesia and nociception (data not shown), and because the 100 mg/kg dose was the most effective, the tests were conducted with this dose in all models of inflammation.

CFA-induced hyperalgesia model

Mechanical measurement with von Frey analgesimeter and respective treatment was made daily in male mice C57Bl6 for 20 days after CFA injection. In addition, response to acetone (sensitivity to cold), hot plate, forced swimming (to analysis depression) and knee edema were also performed. After basal measurements, the mice were divided into groups (n = 6/group) that were orally dosed (gavage) with a vehicle (0.9% saline solution), MEST (100 mg/Kg) or dexamethasone (1 mg/Kg). After one hour (for oral treatment), animals received a solution of 50 μ L of CFA (Freund's Complete Adjuvant) injection subcutaneously in the right hind paw, and each animal after one day (at 2 p.m.) was housed in the same containment boxes under the same steel mesh to measure the mechanical hyperalgesia until 20 th day.

One day prior to the experiment, mechanical basal measurement of all male Swiss mice was performed. Mice were housed in containment boxes (W x D x H - 230 x 200 x 180 mm - Insight ®) under a steel mesh with 1 cm diameter spacing for a period of 30 minutes. During this time, a digital analgesimeter von Frey (Insight ® - EFF 301 - Digital analgesimeter) was used to determine the baseline for the mechanical stimulus in the right hind paw.

Analysis of response to acetone (sensitivity to cold) - Cold sensitivity was assessed after 2 days from CFA injection by the acetone drop test as described by Decosterd and Woolf (2000) [22]. A blunt needle connected to a syringe was used to drop 30 μ l of acetone on the paw and the duration (in seconds) of the paw withdrawal was recorded. Minimal and maximal cut-offs were assigned at 0.5 and 20 seconds, respectively.

Forced Swim test (FST) - The test was conducted using the method previously described [23]. with modifications. Animals were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter: 10 cm; height: 25 cm), enclosing 19 cm of water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$; the total duration of immobility during a 5 minutes test was observed

Knee Oedema – The knees measurement was made on day 20 post-injection in the CFA group with a micrometer.

Heat-induced hyperalgesia - The test was conducted using the method of [24]. Animals were placed on an aluminum plate heated at fixed temperature ($55 \pm 0.5^\circ\text{C}$) and the response to heat latency time was assessed by 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.

Formalin induced-Licking

The procedure used was similar to that described previously[25,26]. Mice were pretreated with the MEST (100 mg/Kg), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -glucopyranoside (10 mg/kg), robustaflavone (10 mg /kg), dexamethasone (1 mg/kg) or vehicle by oral route, 1 h before injection of the 20 μL of 2.5% formalin (0.92% formaldehyde), in the right hind paw. The animals were then placed in glass cylinders and the time that the animal spent licking and/or elevating of the injected paw was recorded in blocks of 5min up to 30 min. The first 5min were considered phase I (neurogenic) while the phase II (inflammatory) was between 15 and 30 min[26].

Analysis of locomotor activity in open-field

Mice were pretreated with the MEST (100 mg/Kg), ST 1 (10 mg/kg), ST 2 (10 mg /kg), dexamethasone (1 mg/kg) or vehicle by oral route and after 50 minutes the open-field test was performed. The open field apparatus was constructed with plywood and measured 80 x 80cm 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 plexi-glass floor. The lines divided the floor into sixteen 20x20cm squares. A central square of equal size was drawn in the middle of the open field (20 x 20cm). The locomotor was measure until 5 minutes analyzing the times that mice did line crossing - 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 = 5/group) that were orally dosed (gavage) with a vehicle (0.9% saline solution), MEST (100 mg/Kg) or dexamethasone (1 mg/Kg), another groups received the isolated compounds direct in the paw by intraplantar injection of a solution containing 10 µg. After one hour (for oral treatment), animals received a solution of 50 µL (with 300 µg) Cg injection 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 4 hours after Cg injection using the digital analgesymeter previously described.

Statistical analysis

The results were presented as 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 or Bonferroni test. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

RESULTS

Effects of MEST on Mechanical hyperalgesia, thermic sensitivity, depression and knee oedema induced by CFA

A single intraplantar injection of CFA was able to induce persistent mechanical hyperalgesia, cold sensibility, heat sensibility, and depression as well as knee oedema. The mechanical hyperalgesia was observed from the 1st day after application of CFA and persisted for at least 20 days (Figure 2).

The oral treatment with the METS (100 mg/kg) and the dexamethasone dose (1 mg/kg) reduced the mechanical hyperalgesia induced by CFA when compared with control group. The maximal inhibition was detected at the 5th, 10^o and 20^o day after application of the CFA (Figure 2).

The development of cold sensitivity was evaluated on the second day, after administration of CFA. Figure 3A shows that after administration of the METS, the cold sensitivity was decreased significantly in about twice in animals that were treated with METS (7.71 seconds) (71%) and dexamethasone (7.85 seconds) (60%) when compared to the control group.

The animals who receive the METS demonstrated an significantly increase in latency on the hot plate of 33.6 (83%) seconds, when compared to the control group which presented a lag time of 20.7 seconds (Figure 3B). The analyses were carried out in 15 day of the experiment.

There was a significant decrease of edema in tibiofibular articulation in group treated with METS (0.23 mm) (71%) and dexamethasone (90%) (0.07 mm) when compared to the control group (0.38mm) (Figure 3D).

There was no significant difference between the groups who received METS and the control group in Forced Swim test. The extract or pure compounds did not exhibited any antidepressant effect (data were not presented).

Effects of MEST, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside, and robustaflavone on formalin-induced nociception and measured motor activity in the open field test

The oral treatment with METS (100 mg/kg) or with the 1 ST, 2 ST compounds (10 mg/kg) significantly reduced the formalin-induced nociception in neurogenic phase (0 to 5 min), and in the inflammatory phase (15 to 30 min) (Figure 4).

The average length of time licking in the first phase (0-5 min) was 103.5 seconds and in the second phase (15-30 min) was 219.5 seconds for control group. After 60 minutes of treatment with the METS, the doses of 30 and 100 mg/kg inhibited significantly the neurogenic phase around (70%) at 59.6 and (56%) 53.3 seconds and the second phase in (87%)71.4 and (92%) 42.6 seconds respectively. Dexamethasone in dose of 1 mg/kg also presented significant effect in both phases. These data were demonstrated in Fig. 4A, 4B, 4C and 4D. In the open field, the treatment was not able to change the locomotor activity (results not shown).

Effects of MEST, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside, and robustaflavone on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia

The intraplantar injection of Cg was able to induce mechanical hyperalgesia in mice after 4 hours, with a reduction of 50 % from basal values (Figure 5).

The treatment of animals with the METS 100 mg/kg prevented significantly the carrageenan induced-mechanical hyperalgesia cerca de 73% (880 mg) when compared to the control group (533 mg), while the application of dexamethasone inhibited completely the mechanical hyperalgesia.

The administration in the paw of the compounds ST-1 and ST-2 (10 μ g/paw) were able to inhibit the mechanical hyperalgesia four hours after administration of carrageenan. The inhibition was of 84% of the compound ST-1 and 70% in the compound ST-2, indicating that the local administration has produced a significant effect when compared to oral administration.

There was a reduction of paw edema of mice treated with METS to approximately 53% (0.116 mm) and dexamethasone to 89% (0.02 mm) when compared to the control group (Fig. 5A).

DISCUSSION

The results of this study demonstrate that oral treatment with the extract obtained from *S. terebinthifolius* (METS) significantly reduced the CFA- and carrageenan-induced persistent mechanical hyperalgesia, and also formalin-induced nociception. The MEST also reduced significantly CFA- induced knee oedema, cold- and hot-hipersensitivity, but not the depression, without change in locomotor activity (open field test). In addition, compounds 1, 2, 3, 4, 6-pentagalol-O- β -glucopiranosideo and robustaflavone were effective in significantly inhibit the formalin-induced nociception showing to relation of MEST activity in spontaneous pain. All this data

convicted us that *S. terebinthifolius*, used in popular medicine as analgesic [9], exhibited an anti-hyperalgesic and anti-nociceptive action.

One single injection of CFA was enough to produce hyperalgesia, knee oedema, myeloperoxidase activity [27], depression [28], cold- and hot-hypersensitivity [29] in mice. Frequently, dexamethasone is used as positive control, known as steroidal anti-inflammatory, this substance is able to reduce hyperalgesia, knee oedema, myeloperoxidase activity [27]. The treatment with dexamethasone inhibited also the carrageenan induced hyperalgesia, similar results was obtained by Ferreira et al. therefore the dose are different [30]. Our experimental model is in line to produce same results observed in scientific reports with CFA because this complex is a powerful inductor of inflammation and immunogenic response and also for carrageenan. 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. In carrageenan induced mechanical hyperalgesia, the MEST also had anti-hyperalgesic effect. The first hyperalgesic and depression study with this plant showed a anti-hyperalgesic and antidepressive action in neuropathic pain model (spared nerve injured - SNI) [24]. Therefore the plant is the same, the essential oil is totally different from chemical composition of extract and also the effect in relation to depression. The extended treatment with METS promoted the reduction of sensitivity to cold and heat, showing that there are composed in the extract that alter the threshold of fiber responsive to mechanical stimulus, thermal (hot and cold). The results of present work suggested that MEST presents not only an anti-hyperalgesic, but also anti-arthritic action without anti-depressive effect.

Several anti-inflammatory substances classics, like indomethacin, naproxen, and hydrocortisone induce significant inhibition of the second phase of the formalin-induced nociception [26]. In addition, the METS significantly inhibited the neurogenic and inflammatory phase of the formalin, indicating that MEST has anti-nociceptive effect against inflammatory and pain mediators. Thus, the antinociceptive property of *S. terebinthifolius* extract, on the model of formalin-induced nociception, seems to be related directly to the fact that extract inhibit nociceptors and also the inflammatory process.

Phytochemical studies of the extract of *s. terebinthifolius* led to the identification and isolation of 1,2,3,4,6--penta-O-galloyl- β -glucopyranoside the leaves of this plant and the robustaflavone of *S. terebinthifolius*. As few studies have tested these compounds on pain and how METS had a good efficacy and potency as analgesic, decided to test the two compounds on nociception. In this way, both the ST-1 and the ST-2 at a dose of 10 mg/kg orally demonstrated ability to inhibit nociception induced by formalin and ST 2 presented most significant effect. In this way, demonstrates that the ST 1 can contribute, at least in part, by the antinociceptive action of the extract of *S. terebinthifolius*.

In summary, the results of this study show that the extract and compounds, especially the 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl-O- β -glucopyranoside present in the leaves of *s. terebinthifolius* feature Antinociceptive actions in experimental models of short duration such as formalin and carrageenan. In addition, demonstrates that the METS has anti-inflammatory action in the paw edema induced by carrageenan, edema of knee and Antinociceptive also both in experimental models of short duration as long lasting as in CFA, inhibiting hyperalgesia to mechanical, thermal stimulus in the cold and heat.

These results suggest that the extracts from *s. terebinthifolius* have compound (s) of importance for analgesia.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful do CAPES, CNPq, FUNDECT, and FAPESP for the financial support.

REFERENCES

- 1.Thakur, M., A.H. Dickenson, R. Baron. 2014. Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic? *Nature Reviews Rheumatology* 10: 374-80.
- 2.Nourshargh, S., P.L. Hordijk, M. Sixt. 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 366-78.
- 3.Schestatsky, P. 2008. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Revista do Hospital das Clinicas de Porto Alegre* 28(3): 177-87.
4. Loeser, J.D., R.D. Treede. 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137: 473-7.
5. Eisenberg, D.M., R.B. Davis, S.L. Ettner, S. Appel, S. Wilkey, M. Van Rompay, R.C. KESSLER. 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *Journal of American Medical Association* 280(18): 1569-75.
6. Lam, F.F., E.S. Ng. 2010. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *British Journal of Pharmacology* 159(4): 958-69.
7. Portenoy, R.K., N.A. Hagen. 1990. Breakthrough pain: definition, prevalence and characteristics. *Pain* 41(3) :273-81.
8. Corrêa, M.P. 1974. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*.

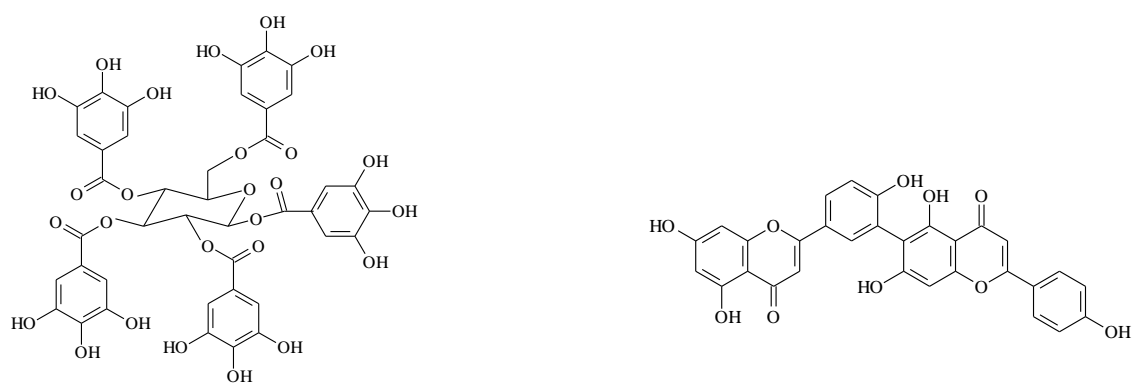
9. Carvalho, M.G., A.G.N. Melo, C.F.S. Aragão, F.N. Raffin, T.F.A.L. Moura. 2013. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 15: 158-169.
10. Matos, F.J.A. 1998. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. *Revista Fortaleza* 3: 200.
11. Oliveira, J.L.F.G., R.B. Santos, F.O. Reis, S.T. Matsumoto, W.M.S.Bispo, L.P. Machado, L.F.M. Oliveira. 2013. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 15(1):150-157.
12. Medeiros, K.C.P., J.C. Monteiro, I.A. Medeiros, B.A. Silva, M.R. Piuvezam. 2007. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globules* Labill, *Peltodon Radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(1): 23-28.
13. Piccinelli, A.C., J.A. Santos, E.C. Konkiewitz, S.A. Oesterreich, A.S. Formagio, J. Croda, E.B. Ziff, C.A.L. Kassuya. 2014. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience* 18(5): 217-24.
14. Cole, E.R., R.B. Santos, J.V. Lacerda, J.D. Martins, S.J. Greco, N.A. Cunha. 2014. Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital organ. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(3): 821-8.
15. Vieira, D.R., F.M. Amaral, M.C. Maciel, F.R. Nascimento, S.A. Libério, V.P. Rodrigues. 2014. Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *Journal Ethnopharmacol* 155(3): 1441-9
16. Cavalher-Machado, S.C., E.C. Rosas, F.A. Brito, A.P. Heringe, R.R. Oliveira, M.A. Kaplan, M.R. Figueiredo, M. Henriques. 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology* 8(11): 1552-60.
17. Iriguchi, E., A.S.N. Formagio, L.M. Roveda, M.C. Vieira, C.A.L. Cardoso, N.A.H. Zárata, L.A. Tabaldi, C.A.L. Kassuya. 2011. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) fruits. *Acta Farmaceutica Bonaer*. 30: 1555-1559.

18. Formagio, A.S.N., M.Da. Silva, E. Iriguchi, M.C.Vieira, M.A. Foglio, J.De. Carvalho, A.L. Ruiz, K. Souza, C.A.L. Kassuya. 2015. Chemical composition and in vitro antioxidant, antiproliferative, acetylcholinesterase and in vivo antiinflammatory activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi [dissertation]. Federal University of Grande Dourados.
19. Lin, Y.M., D.E. Zembower, M.T.Flavin, R.M. Schure, H.M. Anderson, B.E.Korba. 1997. Robustaflavone, a naturally occurring biflavanoid, is a potent non-nucleoside inhibitor of hepatitis B virus replication in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7(17): 2325-2328.
20. Lin, Y.M., M.T. Flavin, R. Schure, F.C.Chen, R.Sidwell, D.L. Barnard. 1999. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* 65(2): 120-5.
21. Lin, M.H., F.R.Chang, M.Y. Hua, Y.C.Wu, S.T.Liu. 2011. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 55(3): 1021-7.
22. Decosterd, I., C.J.Woolf. 2000. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87(2): 149-58.
23. Porsolt, R.D., A. Bertin, M. Jalfre. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie Therapie* 229(2): 327-36.
24. Eddy, N.B., D.Leimbach.1953.Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutica* 107(3):385-93.
- 25.Hunskaar,S., O.B. Fasmer, K. Hole. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods* 14(1): 69-76.
26. Hunskaar, S., K. Hole. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30(1): 103-14.
27. Shi, M., A.Wang, D.Prescott, C.C.Waterhouse, S.Zhang, J.J. McDougall. 2011. Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in mice. *Arthritis Rheumatology* 63(2): 434-44.
28. Maciel, I.S., R.B. Silva, F.B. Morrone, J.B. Calixto, M.M. Campos. 2013. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. *PLoS One* 8(9): e77227.

29. Montrucchio, D.P., M.M. Córdova, A.R.Santos. 2013. 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 8 (7): e67730.

30. Ferreira, S.H., F.Q.Cunha, B.B.Lorenzetti, M.A. Michelin, M. Perretti, R.J.Flower, S. Poole. 1997. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. British Journal of Pharmacology 121(5): 883-8.

Legends to Figures



1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside

robustaflavone

Figure 1 Chemical structure of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside and robustaflavone .

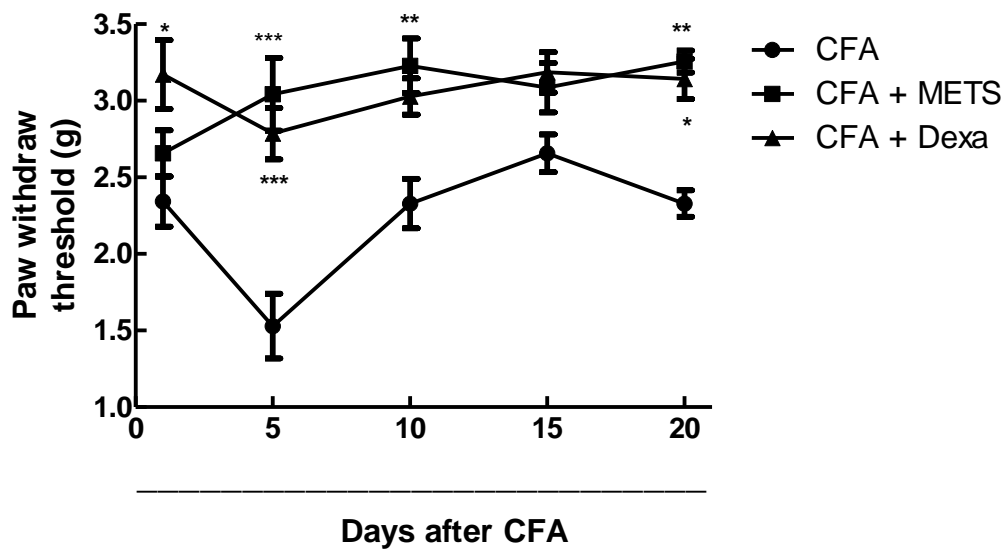
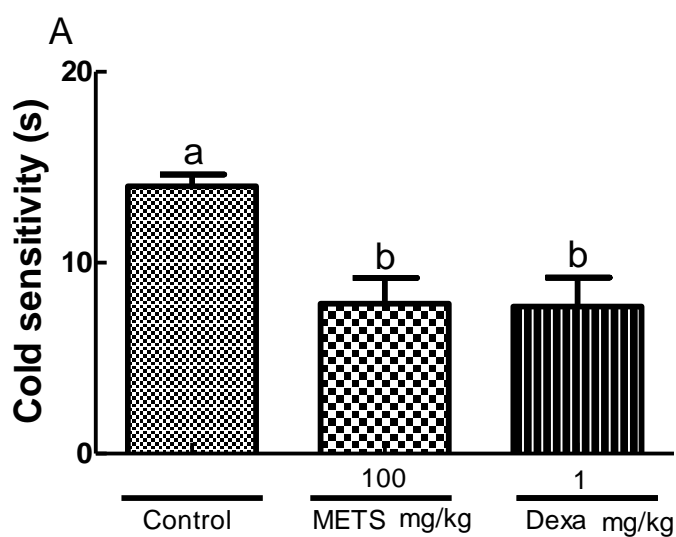


Figure 2 Effects of oral administration of the MEST at 100 mg/kg on mechanical hyperalgesia induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA). Mechanical hyperalgesia was assessed using von Frey filaments before (baseline) and 20 days after CFA injection. The MEST significantly prevented reduction in the mechanical threshold of sensitivity at all time points. 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.



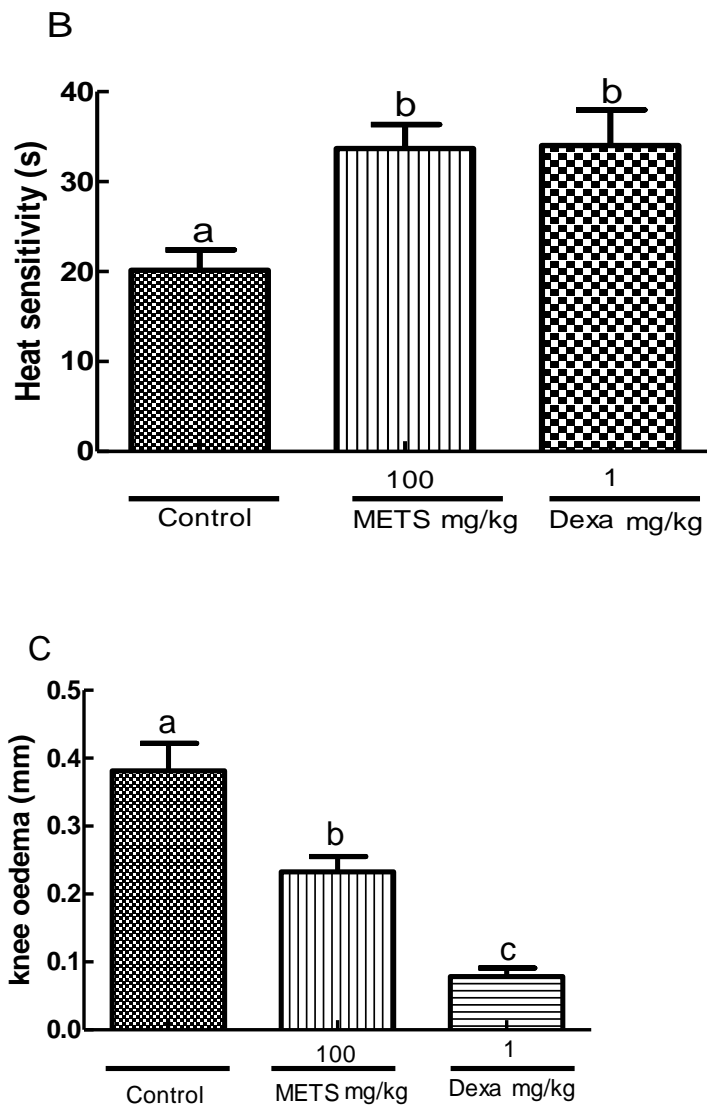
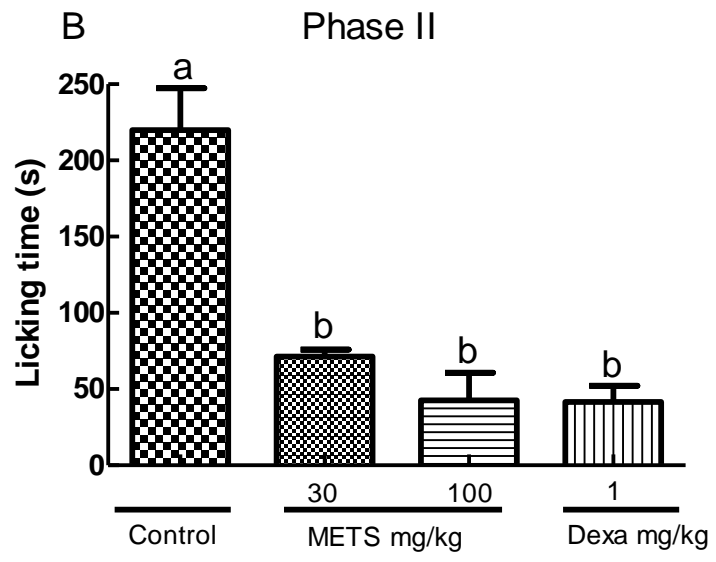
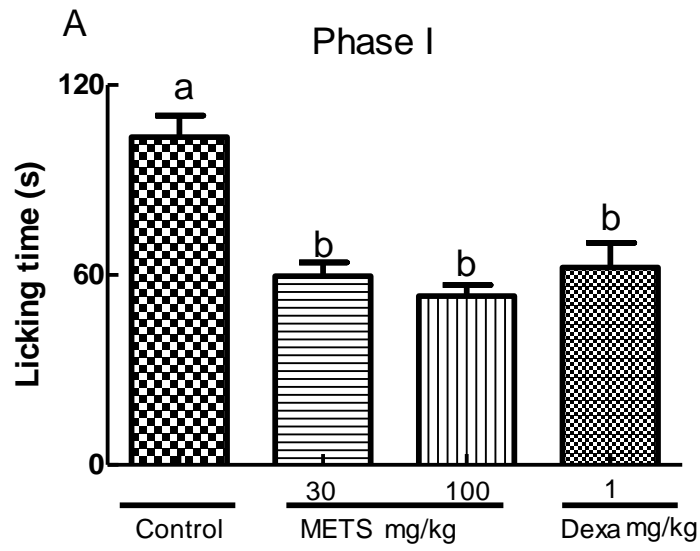


Figure 3 Effects of oral administration of the MEST at 100 mg/kg on cold sensitivity (A), hot plate test (B), and knee oedema induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) (A) Assessment of cold sensitive through the hot plate model on the 2nd day after CFA injection, where the MEST treatment increased the resistance of the animals. (B) Assessment of heat response through the hot plate model on the 15th day after CFA injection, where the MEST treatment increased the resistance of the animals. (C) Effect of administration of the MEST on inhibition of knee edema on the 20th day 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 one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test.



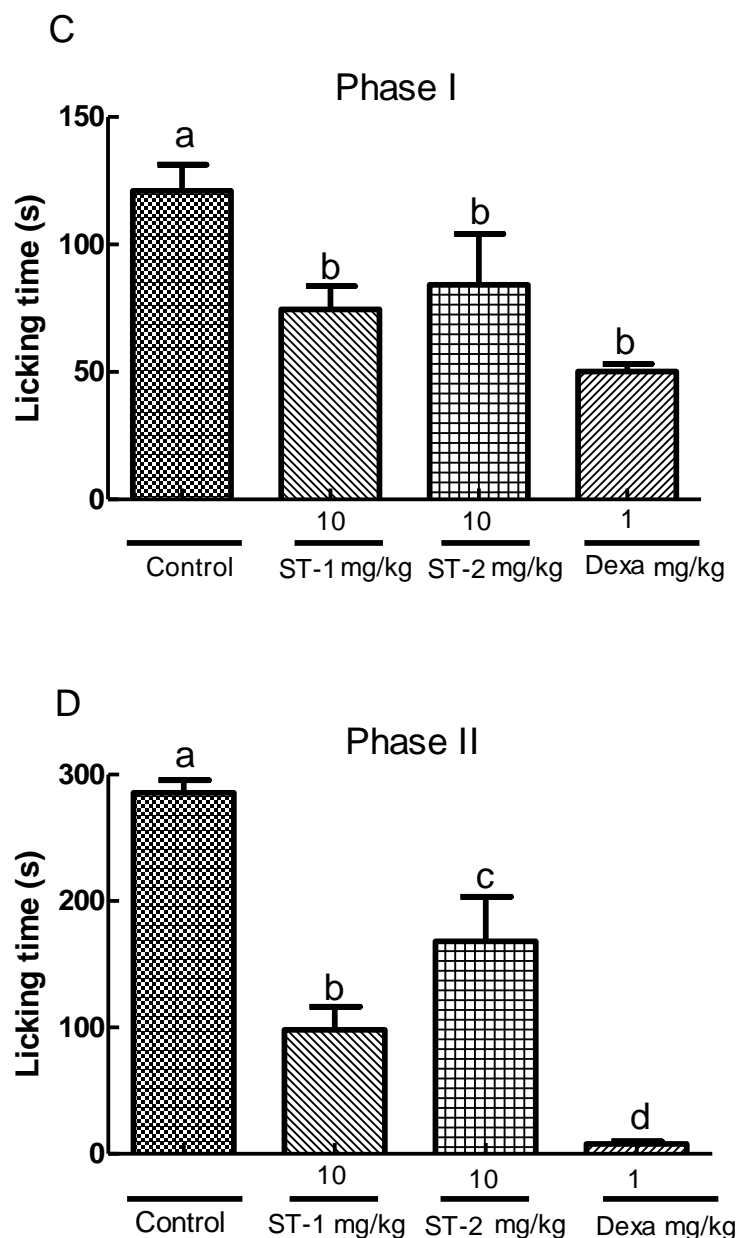
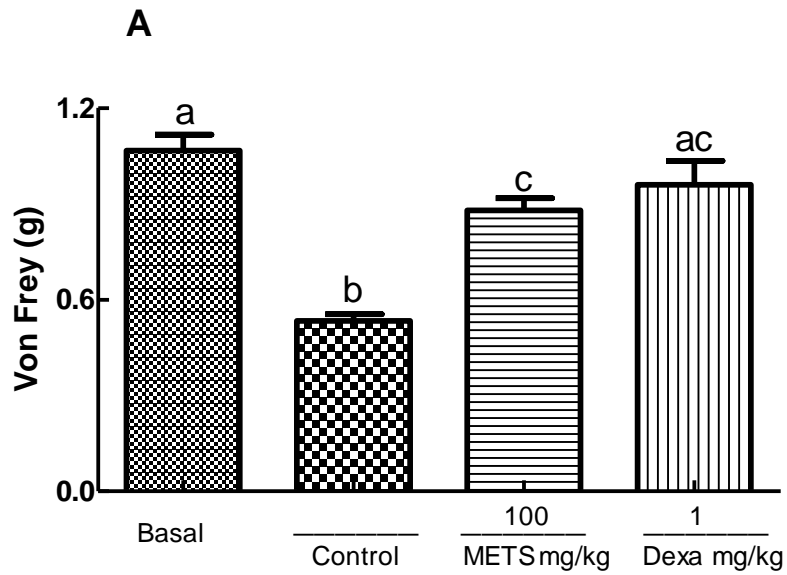


Figure 4 Effect of the MEST at 30 and 100 mg/kg, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside (ST-1) at 10 mg/kg and and robustaflavone (ST-2) at 1 mg/kg on pain-related behaviors in the formalin-induced nociception model. **(A)** Administration of the MEST decreased pain in phase I (neurogenic origin pain). **(B)** Administration of the MEST significantly decreased pain in phase II (inflammatory response), **(C)** Administration of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside (ST-1), and robustaflavone (ST-2) decreased pain in phase I (neurogenic origin pain). **(D)** Administration of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside (ST-1), and

robustaflavone (ST-2) significantly decreased pain in phase II (inflammatory response).. 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.



**4.0 hour after carrageenan
injection (300 μ g/paw)**

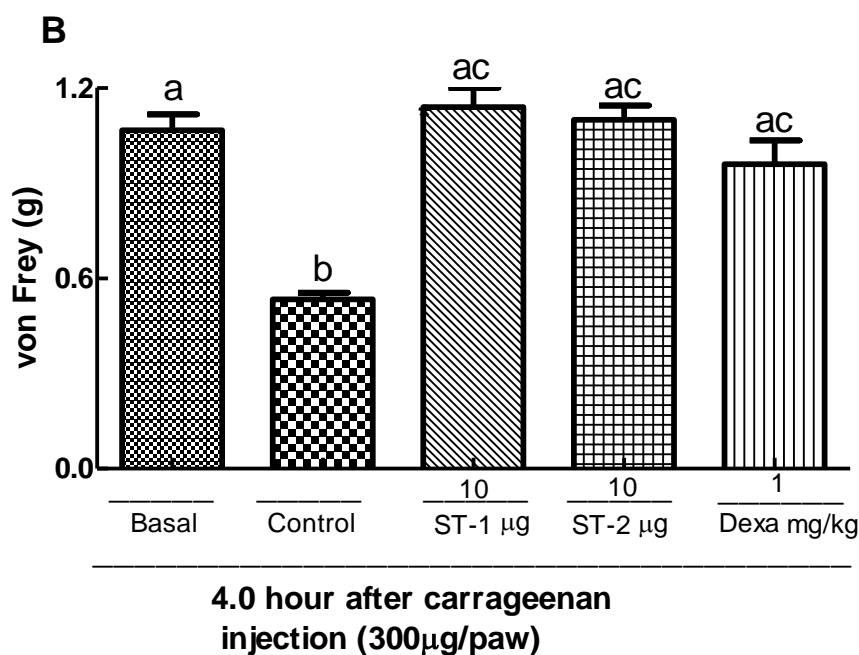


Figure 5 Effect of the MEST at 100 mg/kg, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside (ST-1) by intraplantar route (10 μ g/paw), and robustaflavone (ST-2) at 10 mg/kg on carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice (**A**) Administration of the MEST significantly decreased carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (**B**) Administration of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -glucopyranoside (ST-1) at 10 mg/kg and and robustaflavone (ST-2) significantly decreased carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. 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.