



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARIA INÊS POSSEBON

**EFEITO TERAPÊUTICO E MECANISMO DE AÇÃO
ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO
PIMARADIENÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Londrina
2014

MARIA INÊS POSSEBON

**EFEITO TERAPÊUTICO E MECANISMO DE AÇÃO
ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO
PIMARADIENÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina – UEL como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Rúbia Casagrande.
Co-Orientador: Prof. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P856e Possebon, Maria Inês.
Efeito terapêutico e mecanismo de ação analgésico e anti-inflamatório do ácido pimaradienólico em modelos experimentais / Maria Inês Possebon. – Londrina, 2014.
100 f. il.

Orientador: Rúbia Casagrande.
Coorientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Diterpenos – Teses. 2. Plantas – Uso terapêutico – Teses. 3. Analgesia – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Casagrande, Rúbia. II. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.
CDU 615.89

MARIA INÊS POSSEBON

**EFEITO TERAPÊUTICO E MECANISMO DE AÇÃO
ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO
PIMARADIENÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina-UEL.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho ao meu esposo Celso e aos meus filhos, Camila e Arthur pelo incentivo e compreensão em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho.

À minha mãe e a memória de meu pai.

Por todo amor, esforço, dedicação, carinho e exemplos que sempre demonstraram em cada etapa da minha vida, sempre transmitindo valores baseados na verdade e unidade familiar, proporcionando-me alcançar todos os meus objetivos.

Agradeço a professora Dra.Rúbia Casagrande pela orientação neste trabalho, pela sua amizade, incentivo e amor pela pesquisa.

Ao professor Dr. Waldiceu A. Verri Junior pela co-orientação, amizade, incentivo e apoio durante esta caminhada.

Aos colegas do laboratório de dor e inflamação pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos e por contribuírem para minha formação.

Gostaria de agradecer especialmente a Sandra, Ana Carla, Thacyana, Miriam, Larissa, Cássia e todas as pessoas do laboratório de dor e inflamação que contribuíram para a realização dos experimentos, discussões científicas e pela amizade.

Aos coordenadores da Pós-graduação em Ciências da Saúde da UEL pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, pelo meu crescimento científico e pessoal

"Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los, a despeito de todas as dificuldades e obstáculos. Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo nem culpa de sentir prazer. Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito, nem pudor. Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo novo, de novo e de novo, e quantas vezes for preciso. Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa".

Mário Quintana

POSSEBON, Maria Inês. **Efeito terapêutico e mecanismo de ação analgésico e anti-inflamatório do ácido pimaradienólico em modelos experimentais**. 2014. 100 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O ácido pimaradienólico (AP) é um diterpeno isolado da raiz da *Viguiera arenaria* Baker, uma planta herbácea nativa de cerrados do Brasil (Asteraceae; Heliantheae). Vários efeitos biológicos têm sido sugeridos a esse composto; como propriedades antiespasmódicas, vasorelaxantes e antimicrobianas. O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do AP em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação em camundongos, bem como elucidar os possíveis mecanismos de ação. O tratamento com o AP administrado por via oral reduziu o comportamento de dor manifesta induzido pelo ácido acético (de maneira dependente da dose), formalina (em ambas as fases), e pelo adjuvante completo de Freund (CFA). A hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (CGN), CFA e prostaglandina (PGE₂) também foi reduzida pelo AP. O tratamento por via oral com o AP inibiu o edema, a migração de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumora- α (TNF- α), interleucina-33 (IL-33) e citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, a ativação do fator de transcrição NF- κ B foi diminuída. O tratamento com o AP demonstrou capacidade anti-oxidante ao reduzir os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) e prevenir o consumo dos níveis de glutathiona reduzida, no modelo de indução pela CGN. O efeito analgésico e anti-inflamatório do AP foi inibido pelo tratamento com L-NAME, ODQ, KT5823 e glibenclamida, demonstrando que sua atividade também depende da ativação da via de sinalização do óxido nítrico (NO-GMPc-PKG canais de potássio ATP sensíveis). Como não foi observada ação central, através do teste da placa quente, ou ação sedativa e/ou relaxante muscular, através do teste de rota rod, o tratamento com o AP deve atuar de forma periférica. Nos testes de toxicidade o AP não provocou elevação dos níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), indicadoras de lesão hepática, e também não induziu a migração de neutrófilos no estômago, indicativo de lesão gástrica, demonstrando ser um composto eficaz sem os efeitos indesejáveis comuns aos anti-inflamatórios não esteroidais. De acordo com o presente trabalho pode-se concluir que o AP possui atividade analgésica e anti-inflamatória quando avaliado em modelos experimentais de dor e inflamação. Os mecanismos de ação incluem a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento celular, ativação da via do NO-GMPc-PKG canais de potássio ATP-sensíveis, bem como diminuição da ativação do NF- κ B e neutralização de radicais livres.

Palavras-chave: Diterpenos. Ácido Pimaradienólico. *Viguiera arenaria* Baker. Dor. inflamação.

POSSEBON, Maria Inês. **Effect and mechanism of action of analgesic and anti-inflammatory pimaradienoic acid in experimental models.** 2014. 100 p. Dissertacion (Master's in Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The pimaradienoic acid (PA) is a diterpene isolated from the root of *Viguiera arenaria* Baker, a native herbaceous plant savannas of Brazil (Asteraceae, Heliantheae). Several biological effects have been suggested to this compound, as antispasmodic, vasorelaxation and antimicrobial properties. The present study aimed to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory activity of PA in different experimental models of pain and inflammation in mice, as well as to elucidate the possible mechanisms of action. Treatment with PA orally administered reduced pain behavior induced by acetic acid expresses (a dose dependent manner), formalin (both stages), and the Complete Freund's adjuvant (CFA). Mechanical hyperalgesia induced by carrageenin (CGN), CFA and prostaglandin (PGE₂) was also reduced by the PA. The oral treatment with the PA inhibited the edema, neutrophil migration and production of pro-inflammatory cytokines, interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interleukin-33 (IL-33) and anti-inflammatory cytokines IL-10. Furthermore, activation of the transcription factor NF- κ B was decreased. Treatment with PA has demonstrated antioxidant capacity by reducing levels of reactive oxygen species (EROs) and preventing the consumption levels of reduced glutathione in the induction model by CGN. The analgesic and anti-inflammatory effect of PA was inhibited by treatment with L-NAME, ODQ, KT5823 and glibenclamide, indicating that their activity depends also on the activation of the signaling pathway of nitric oxide (NO-cGMP-PKG ATP-sensitive potassium channels). As no central action was observed by the hot plate test, or muscle sedative and/or relaxing action, via the route rod test, treatment with the PA must act peripherally. In toxicity tests, the PA did not cause elevated levels of the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), indicator of liver injury, and did not induce neutrophil migration in the stomach, indicative of gastric damage, proving to be a compound devoid of side effects that are common to non-steroidal anti-inflammatory drugs. According to this study it can be concluded that the PA has analgesic and anti-inflammatory activity as assessed in experimental models of pain and inflammation. The mechanisms of action include inhibition of pro-inflammatory cytokines and, cell recruitment, activation of the NO-cGMP-PKG ATP-sensitive potassium channels as well as decreased of activation of NF- κ B and neutralization of free radicals.

Key words: Diterpene. Pimaradienoic acid. *Viguiera arenaria* Baker. Pain. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura Química do Ácido Pimaradienóico.....	16
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina 3'5'- monofosfato cíclico
AP	Ácido Pimaradienóico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BK	Bradicinina
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGN	Carragenina
COX	Ciclooxigenase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET1	Endotelina 1
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GRD	Gânglios da raiz dorsal
GSH	Glutathiona reduzida
GR	Glutathiona redutase
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
INF γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-33	Interleucina-33
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
L-NAME	N ^G nitro -L- arginina metil éster
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NO	Óxido nítrico

NOs	Óxido nítrico sintase
PBS	Solução salina tamponada
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
v.o	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Produtos Naturais	14
1.2	Ácido Pimaradienóico	15
1.3	Dor e Inflamação.....	17
1.4	Mediadores Envolvidos na Hiperalgesia	21
1.5	Estresse Oxidativo	26
1.6	Justificativa	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Protocolos Experimentais	30
3.3	Modelos Experimentais de Dor Manifesta.....	32
3.3.1	Avaliação do Desempenho Motor pelo Teste do Rota-Rod	32
3.3.2	Avaliação do Efeito Analgésico do AP no Teste da Placa Quente	32
3.3.3	Teste de Dor Manifesta Induzidas por Ácido Acético.....	32
3.3.4	Teste de Dor Manifesta Induzida por Formalina	33
3.3.5	Teste de Dor Manifesta Induzida pelo Adjuvante Completo de Freund.....	33
3.4	Modelos Experimentais de Inflamação	33
3.4.1	Avaliação da Hiperalgesia Mecânica pelo Método da Pressão Crescente na Pata com os Estímulos Carragenina, Adjuvante Completo de Freund e PGE2.....	33
3.4.2	Avaliação do Edema de Pata Induzido por Carragenina, e Adjuvante Completo de Freund	34
3.4.3	Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase Induzida por Carragenina e Adjuvante Completo de Freund.....	34

3.4.4	Avaliação da Participação da Via do NO no Efeito Analgésico e Anti-inflamatório do AP pelo método da Pressão Crescente na Pata	35
3.4.5	Avaliação dos Níveis das Citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-33 e IL-10	35
3.4.6	Avaliação dos Níveis do Fator Nuclear κ B Total e Fosforilado	35
3.5	Avaliação do Estresse Oxidativo	36
3.5.1	Avaliação dos Níveis de Glutathiona (GSH)	36
3.5.2	Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (ABTS)	37
3.5.3	Avaliação da Capacidade Queladora do Ferro (FRAP)	37
3.5.4	Avaliação da Produção do Ânion Superóxido (NBT)	38
3.6	Avaliação Hepática pela Quantificação das Enzimas Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase	38
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	ARTIGO - Analgesic and Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Pimaradienoic Acid	40
6	CONCLUSÕES	76
7	REFERÊNCIAS	77
8	ANEXOS	91
ANEXO A –	Normas do Periódico Journal of Natural Products	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

Os medicamentos naturais obtidos a partir de plantas, constituíram a base para a produção de diversos medicamentos farmacêuticos e foram por muito tempo as principais drogas disponíveis e utilizadas na terapêutica pelos serviços de saúde. As estimativas mostram que cerca de 80% da população mundial que reside nas áreas em desenvolvimento e em países desenvolvidos ainda dependem das plantas medicinais (CECHINEL FILHO et al.; 2002). Essas, as vezes, são a única fonte disponível e acessível aos cuidados de saúde primários para esses indivíduos, especialmente pela ausência de acesso aos serviços médicos modernos. Nesse sentido, o uso da medicina natural tem aumentado nos países desenvolvidos, principalmente devido ao fracasso das modernas terapias para proporcionar um tratamento eficaz para as doenças (CECHINEL FILHO et al.; 2002; UMERABEGAM et al. 2010) e pelos efeitos adversos das drogas sintéticas utilizadas a longo prazo.

A pesquisa de produtos naturais é uma área com grande potencial, muito importante para os países abundantes em espécies de plantas nativas, como o Brasil (RAMOS et al., 2008). Mesmo assim, poucos compostos derivados de plantas foram submetidos a ensaios clínicos para testar seu potencial como agentes anti-inflamatórios, sendo este um campo de estudo promissor, muito atraente e relevante para a identificação de novas drogas anti-inflamatórias eficazes (CALIXTO et al., 2004; TIRAPELLI et al., 2010). Além disso, verifica-se que as investigações com plantas medicinais abrangem pesquisas da medicina tradicional e popular (AGGARWAL et al., 2008), que envolvem desde o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, investigação farmacológica dos extratos e dos constituintes químicos isolados, transformações químicas de princípios ativos; estudo da relação estrutura/atividade, até a descoberta dos mecanismos de ação dos princípios ativos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas conduz a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002). As plantas medicinais têm contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários (KANG et al., 2008). Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou

indireta no organismo, inibindo ou ativando importantes alvos moleculares e celulares, podendo interferir na produção de mediadores envolvidos no processo da dor e inflamação, tais como: metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, enzimas (óxido nítrico sintase – NOS; cicloxigenase-2 - COX-2), produção de segundos mensageiros (proteína-quinase, Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), Adenosina 3'5'- monofosfato cíclico (AMPc)), fatores de transcrição (fator de transcrição nuclear κ B – NF- κ B) (CALIXTO et al., 2004; LEUNG et al. 2005), radicais livres (VALÉRIO et al., 2009), entre outros. Neste contexto, a literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos encontrados na natureza, podendo-se destacar os diterpenos.

Os terpenos são uma família de produtos naturais derivados de plantas (DEWICK, 2002). Eles podem apresentar cadeias cíclicas ou acíclicas, e são classificados por suas unidades isoprênicas de cinco carbonos na sua estrutura em monoterpenos (C10; 2 unidades), diterpenos (C20; 4 unidades) e triterpenos (C30; 6 unidades). As plantas podem sintetizar muitos tipos de terpenóides que são essenciais ao seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência. Estes metabólitos desempenham suas atividades biológicas como toxinas de defesa, atrativos polinizantes e fotoprotetores, e têm sido explorados nas últimas quatro décadas como constituintes de produtos medicinais, devido à descoberta de suas atividades farmacológicas (MCGARVEY e CROTEAU,1995). Na família dos diterpenos encontramos a classe dos kauranos e pimaranos, dentre os quais o ácido Kaurenóico é um dos representante do grupo dos kauranos (LOZOYA et al., 1983) e o ácido pimaradienóico, classificado como diterpeno pimarano (AMBRÓSIO et al., 2002).

1.2.Ácido Pimaradienóico

O ácido pimaradienóico (AP) (ent-pimara-8 (14),15-dien-19-óico) (Figura 1) é um diterpeno pimarano pertencente à família das Asteraceae tribo Heliantheae, uma planta herbácea encontrada principalmente no México, Cordilheira dos Andes e zonas de montanhas brasileiras (SCHILING et al. 2000, AMBRÓSIO et al., 2004a). A família Asteraceae é a maior família das Eucotiledôneas, apresenta 1.535 gêneros e cerca de 23.000 espécies conhecidas, agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (BERETA et al., 2008). No Brasil são

encontrados cerca de 35 espécies dessa família, principalmente na região do cerrado, dentre os quais estão os diterpenos kauranos e pimaranos, ambos descritos na literatura pela suas diversas atividades, dentre elas: ação antiespasmódica, relaxante sobre o músculo liso, antiinflamatória, antimicrobiana e analgésica (CHEUNG et al. 1994; AMBRÓSIO et al 2004a).

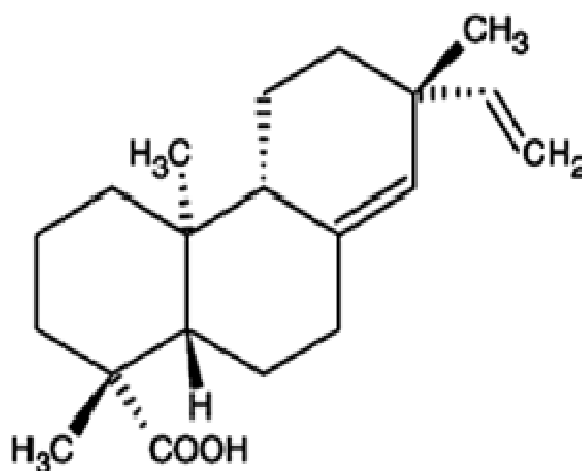


Figura 1 - Ácido Pimaradienóico (AP). Fonte: Tirapelli, et al, 2005.

Com relação aos diterpenos kauranos, como por ex. O ácido kaurenóico, tem demonstrado atividade anti-tumoral, vasorelaxante (CAVALCANTI et al., 2006; CHOI et al., 2011) e antimicrobiana (AMBRÓSIO et al., 2008; PORTO et al., 2009). Foi também demonstrada atividade analgésica e anti-inflamatória deste composto extraído das raízes da *Sphagneticola trilobata* através da inibição da prostaglandina E₂, da produção de citocinas e da ativação da via do óxido nítrico (NO)-guanosina monofosfato ciclico (GMPc)/proteína quinase G (PKG) sensíveis aos canais de potássio dependentes de adenosina trifosfato de potássio (ATP). Além disso, o ácido Kaurenóico possui atividades analgésicas comprovadas em modelos de dor manifesta como a formalina, ácido acético e fenil-p-benzoquinona (PBQ) (CHOI et al., 2011; MIZOKAMI et al 2012).) Nessa linha de conhecimento, diterpenos do tipo pimaranos também apresentam atividades anti-inflamatórias, dentre eles o ácido acanthóico e seus análogos destacam-se pela inibição da enzima COX-2 (DANG et al. 2005; AMBRÓSIO et al., 2008). Foi descrito pela

primeira vez, por Ambrosio e seus colaboradores (2002), a ocorrência de derivados pimaranos numa viguiera brasileira, a *Viguiera arenaria* Baker. Recentemente o diterpeno pimarano ácido pimaradienólico (AP) extraído e isolado das raízes da *Viguiera arenaria* Baker (SCHILLING et al., 2000; AMBRÓSIO et al., 2004a; ARAKAWA et al., 2008), demonstrou diversas atividades biológicas envolvendo ação antihipertensiva (TIRAPELLI et al., 2010), antiepasmódica e relaxante da musculatura lisa (TIRAPELLI et al., 2005), parcialmente dependente da ativação das vias do NO-GMPc e do ácido araquidônico (TIRAPELLI et al., 2004b; HIPÓLITO et al., 2009), bem como atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos em infecções dentárias e da cavidade oral (PORTO et al., 2009). OKUYAMA et al. (1991), demonstrou atividade analgésica e antitérmica do AP em camundongos, no modelo de contorções por ácido acético e da medida retal, respectivamente. Até o momento um único estudo demonstrou *in vivo*, no modelo de edema com a CG, que o AP tem atividade anti-inflamatória de maneira dependente da dose (LIM et al 2009).

A diversidade de estruturas químicas originadas de plantas continua a fornecer novas opções contra vários alvos farmacológicos. Diante dos estudos que têm demonstrado a grande importância dos produtos naturais (ARAKAWA et al., 2008) a partir dos seus extratos ou compostos isolados, como agentes antibacterianos (RAMOS et al., 2008; PORTO et al., 2009), anti-hiperalgésicos (CALIXTO et al., 2003), anti-inflamatórios (ARAKAWA et al., 2008) e antioxidantes (CASAGRANDE et al., 2006; MON, et al.; 2011), é possível que estes compostos possam ser utilizados e viabilizados para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios; com o objetivo de garantir melhor aderência terapêutica pelos indivíduos que necessitam de tratamento eficaz para aliviar os sintomas da dor inflamatória, e com menor incidência de efeitos adversos.

1.3. Dor e Inflamação

A dor é um sintoma comum de muitas doenças e proporciona um impacto profundo na qualidade de vida dos indivíduos podendo ter consequências físicas, psicológicas e sociais (MONGA et al., 2002). Esse sintoma pode levar a redução da mobilidade, comprometer o sistema imune e interferir com a qualidade de vida das pessoas, impedindo o desenvolvimento de diversas atividades diárias

(KLAUMANN et al., 2008; CHAPMAN et al., 2012; CHAPMAN, 2013).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (MERSKEY, 1980). A sensação dolorosa tem papel fisiológico, é transitória e funciona como um sinal de alerta para a percepção de algo que está ameaçando a integridade física do organismo (TEIXEIRA et al., 2001; CHAPMAN, 2005; SHEIBLE et al., 2011). Esta definição explica o conceito de que a dor reflete uma experiência sensorial, mas também possui um componente afetivo e cognitivo. Estes dois componentes, especialmente os fatores psicossociais contribuem para a sensação de dor e dos seus efeitos sobre a qualidade de vida dos indivíduos (LOESER et al., 1999; CHAPMAN, 2005). Pesquisas realizadas nos últimos anos no Brasil confirmam uma tendência mundial, onde a dor tem ocupado lugar de destaque na sociedade moderna. No Brasil, aproximadamente 30% das consultas médicas ocorrem devido à presença de dor, sintoma encontrado em 75% dos pacientes (TEIXEIRA et al., 2001).

O processo da dor está associado com a detecção de estímulos nocivos (nocicepção), da transmissão destas informações para o cérebro, da percepção e do sofrimento. (CHAPMAN, 2005). A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório (VALÉRIO et al., 2009), onde ocorre a sensibilização dos neurônios sensoriais primários (nociceptor), que fazem sinapses com os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, sendo que esses cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente no tálamo. No tálamo, os neurônios de terceira ordem emitem axônios ao córtex, onde ocorre a somatização do estímulo nocivo (BASBAUM et al., 2009) que por sua vez atingem os centros superiores no tronco cerebral e no cérebro originando a consciência da sensação de dor (MICHAEL J. DOCHERTY. et al., 2011). Nos seres humanos, esta sensibilização do nociceptor geralmente leva a condições clínicas conhecidas como hiperalgesia, definida como um aumento da resposta a um estímulo que normalmente é doloroso ou alodinia, dor devido a um estímulo que normalmente não provocaria dor (COUTAUX et al., 2005; KASSUYA et al., 2007; VERRI et al., 2008). A nocicepção é primariamente uma resposta neuronal, iniciada nos tecidos lesionados, nos nociceptores específicos, que são receptores com alto limiar para estímulos térmicos, químicos e

mecânicos. Os nociceptores, que são as fibras aferentes primárias, estão presentes na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são classificadas em função da sua sensibilidade e velocidade de condução do limiar nocivo. (ALMEIDA et al., 2004; BAUSBAN et al 2009). Existe três tipos de fibras aferentes primárias que conduzem esses estímulos, que são: A β , A δ e C. As fibras A β são fibras mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas, as fibras A δ são mielinizadas e de condução rápida que se projetam nas lâminas II e III nos gânglios da raiz dorsal (GRD) da medula espinal e respondem a pressão e calor, as fibras do tipo C são amielinizadas e conduzem os estímulos lentamente, projetam-se nas lâminas I e II, e são denominadas polimodais pois respondem a pressão, calor e estímulos químicos nocivos (ALMEIDA et al., 2004). Além disso, existem os nociceptores chamados silenciosos que fisiologicamente não respondem a estímulos mecânicos ou térmicos, mas são ativados durante processos inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2001).

A ativação periférica dos nociceptores (transdução) é modulada por substâncias químicas, tais como, NO (MONCADA et al., 1993) serotonina (5-HT), bradicinina (BK), histamina, prostaglandinas (PGs) e citocinas como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-33 (VERRI et al., 2008; 2010; ZARPELON et al., 2013), entre outras. Além desta via ascendente existe a via descendente de nocicepção, que se origina no tronco cerebral e exerce importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas, no corno dorsal da medula espinal (SCHAIBLE et al., 2011). Os mecanismos nociceptivos descendentes parecem inibir a excitação dos neurônios através dos neurotransmissores envolvidos (tais como opioides endógenos, serotonina, noradrenalina) que modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios do corno dorsal, para a cessação ou regulação dessa informação (VERRI et al., 2006b; BAUSBAN et al., 2009).

Além disso, a dor pode estar associada a um processo inflamatório dependente da resposta do tecido vascularizado frente a uma lesão que pode ser desencadeada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas ou pela resposta imune. Neste processo, os principais componentes que caracterizam a inflamação são a reação vascular (extravasamento plasmático, ativação enzimática), e a celular (liberação de mediadores químicos, migração de

neutrófilos) (MARCHAND et al., 2005). A vasodilatação é induzida principalmente pela ação da histamina e NO e manifesta-se provocando aumento do fluxo sanguíneo, eritema e calor no local da injúria. A seguir ocorre o aumento da permeabilidade microvascular e perda de fluido rico em proteínas para os tecidos extravasculares. Este processo resulta em concentração de hemácias na luz do vaso, ao mesmo tempo os leucócitos, principalmente os neutrófilos são recrutados para o local inflamado (COTRAN e ROBBINS, 2009).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local lesionado (CUNHA et al., 2006) e uma das etapas fundamentais para que ocorra esta migração é a liberação de substâncias quimioatraentes que irão favorecer a adesão dos neutrófilos às células endoteliais e dar início ao rolamento desses pelo endotélio vascular. Uma vez aderidos ao endotélio, os neutrófilos migram para os tecidos subjacentes (HUTTENLOCHER et al., 1995; DAL SECCO et al., 2008). Os leucócitos ao chegarem ao foco inflamatório podem contribuir para o desenvolvimento da dor (VERRI et al., 2006b).

A inflamação descontrolada faz com que ocorra excesso na produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, PGs, NO e radicais livres. Um dos principais mediadores envolvidos neste processo é o TNF- α que por sua vez, induz a liberação de outras duas citocinas: IL-1 β e IL-8 (em humanos) ou CXCL1 (em camundongos). A IL-1 β promove a ativação da enzima COX-2 responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) e IL-8 ou CXCL1 que promovem a produção local de aminas simpatomiméticas. A CXCL1 assim como o TNF α também induzem a liberação IL-1 β , seguido da liberação de prostanóides (CUNHA et al., 2005; VERRI et al., 2006b; 2008). As PGs e as aminas simpatomiméticas atuam diretamente nos receptores dos neurônios sensitivos primários induzindo a sensibilização, o que facilita a despolarização destes neurônios por outros mediadores ou estímulos possibilitando a instalação da hiperalgesia inflamatória (FERREIRA et al., 1993; CUNHA et al., 2005). Em contrapartida há a liberação de citocinas anti-inflamatórias (VALÉRIO et al., 2009), como a IL-13, IL-4, IL-10 (VERRI et al., 2006b), que reduzem a produção de TNF α e IL-1 β promovendo então um equilíbrio no processo inflamatório (VERRI et al., 2010).

1.4 Mediadores Envolvidos na Hiperálgia

As citocinas são mediadores proteicos produzidos por muitos tipos celulares, principalmente por linfócitos ativados, macrófagos, mastócitos e neutrófilos em diferentes estímulos (VERRI et al., 2006b). A maioria das citocinas tem amplo espectro de ação e pertencem a múltiplas categorias, regulam de forma autócrina e parácrina, a resposta imune e inflamatória através da interação com seus receptores específicos (COTRAN e ROBBINS, 2009; MICHAELA et al., 2010). São também chamadas de interleucinas por mediar a comunicação entre os leucócitos. Dentre as citocinas, a IL-1 β , TNF- α (RIBEIRO et al., 2000a) e IL-33 (SHIMITZ et al., 2005) são essenciais para o desenvolvimento e a amplificação das respostas inflamatórias, contribuindo para a promoção da hiperálgia (RIBEIRO et al., 2000a; ZARPELON et al., 2013).

O TNF- α se liga aos seus receptores do tipo 1 (TNFR1) e 2 (TNFR2) na membrana da célula, sendo estes expressos pelos nociceptores aferentes primários. Esse mediador inicia a cascata de ativação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na resposta inflamatória, bem como induz a sensibilização e migração de neutrófilos, e também é responsável pelo aparecimento da febre, pelo catabolismo muscular, alterações na síntese de proteínas e desenvolvimento dos sinais da inflamação (CUNHA et al., 2008; 2010). Nos modelos experimentais em ratos foi mostrado que o estímulo inflamatório CG induz hiperálgia mecânica através de uma cascata de citocinas, liberadas inicialmente por células residentes (macrófagos) ou migratórias (neutrófilos) e por BK (FERREIRA et al., 1993; POOLE et al., 1999). Na sequência a primeira citocina liberada é a TNF- α que estimula a liberação de PGE₂ e aminas simpáticas que sensibilizam o nociceptor (LORENZETTI et al., 2002; CUNHA et al., 2005;). Além disso, na hiperálgia mecânica e térmica induzida por CFA, há uma liberação sequencial de TNF- α , IL-1 β e fator de crescimento do nervo, demonstrando claramente a participação deste mediador na dor inflamatória (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; CUNHA et al., 2005).

Foi demonstrado em modelos animais a participação da IL-1 β , descrita como a primeira citocina mediando a dor inflamatória. Verificou-se que a injeção intraplantar de IL-1 β , em pequenas doses produz hiperálgia mecânica severa que depende da liberação de prostanóides. (FERREIRA et al., 1988). A IL-

1 β é o membro melhor estudado da família das IL-1 e tem importante papel na mediação de doenças inflamatórias, isto é, está estreitamente relacionada com a resposta da imunidade inata de células, incluindo macrófagos, monócitos e células da glia que por sua vez induz a produção de outros mediadores inflamatórios (DINARELLO, 1998). Foi também demonstrado que a IL-1 β está envolvida em várias funções da inflamação, tais como o recrutamento de leucócitos, febre, na liberação de proteínas da fase aguda (DINARELLO, 1984; 2011; GATTORNO et al., 2007). Estudos mostram que a ligação da IL-1 β ao seu receptor inicia uma transdução de sinais que resulta na translocação do NF- κ B para o núcleo, promovendo a transcrição de genes envolvidos na hiperalgesia e inflamação, bem como estimula a expressão da COX-2 e a subsequente liberação de PGs que sensibilizam o nociceptor (FERREIRA, 1979a; 1993; GRETEN et al., 2007), indicando desta forma a importância desse mediador inflamatório.

Por outro lado as interleucinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 (SAADE et al., 2000) tem a função de limitar as consequências deletérias da ação prolongada das citocinas pró-inflamatórias, como as citocinas TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas modulam os eventos imunes e inflamatórios inibindo a produção e ação dessas citocinas pró-inflamatórias. Esta atividade foi demonstrada em camundongos deficientes para a citocina IL-10 e verificou-se que os animais desenvolveram artrite severa induzida por colágeno. (JOHANSSON et al., 2001). O efeito anti-inflamatório da IL-10 também foi demonstrado no modelo de indução por CG, em que a injeção local de IL-10 inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela administração CG e BK na pata de ratos (POOLE et al., 1995, VERRI et al., 2006b). A IL-10 foi a primeira citocina anti-inflamatória descrita na literatura e é produzida por vários tipos de células como linfócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos (JOHANSSON, et al., 2001; VERRI et al., 2006b).

A IL-33 foi descoberta como o décimo primeiro membro da família da IL-1 (VERRI et al., 2008). É uma nova citocina pró-inflamatória expressa por muitas células e tecidos, incluindo o estômago, cérebro, baço, coração, células epiteliais brônquicas, fibroblastos, células do músculo liso, queratinócitos, macrófagos e células dendríticas (BORISH et al., 2011). Exerce sua atividade biológica ao interagir com o receptor composto ST2, e está implicada em várias doenças inflamatórias (SHIMITZ et al., 2005; VERRI et al., 2008) assim como a asma (BORISH et al., 2011), sepse (ALVES-FILHO et al., 2010), infecções

parasitárias (CHACKERIAN et al., 2011), artrite reumatóide, aterosclerose (KAKKAR et al., 2012) e alterações patológicas no trato digestório e pulmão (SCMITZ et al., 2005). A IL-33 desempenha um papel na inflamação imune inata e nas respostas adaptativas (VERRI et al., 2008, MAGRO et al., 2013), demonstrando ser uma citocina com função dupla, atuando tanto como uma citocina tradicional através da ativação do complexo receptor ST2 e como um fator nuclear intracelular com propriedades na regulação da expressão genética (MILLER, 2011). Atua também como um mediador de alarme, que inicia uma inflamação em resposta à destruição celular (ZARPELON et al., 2013). Estas funções da IL-33 estão relacionadas com a ativação de células endoteliais, mastócitos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (VERRI et al., 2010). Vários estudos com modelos animais evidenciaram a importante função da IL-33/ST2 em asma e inflamação alérgica das vias aéreas. Num modelo de administração intraperitoneal de IL-33 em camundongos foi mostrado que há aumento da produção de citocinas e de imunoglobulina E (IgE), gerando inflamação eosinofílica das mucosas no pulmão e do trato gastrointestinal (BORISH et al., 2011). Também foi demonstrado experimentalmente que a IL-33 tem sido detectada na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide, sugerindo um papel pró-inflamatório da IL-33. Diante destes resultados, foi investigado a função da IL-33 na hiperalgesia inflamatória imune em camundongos, sendo que os resultados obtidos demonstram que a hiperalgesia induzida por antígenos na articulação pode ser mediada por IL-33, que por sua vez desencadeia uma cascata de sinalização que inicia com o TNF- α , IL-1 β , interferon δ (IFN- δ), endotelina-1 (ET-1) e PGE₂ (VERRI et al., 2008). No modelo experimental de indução pela CG foi demonstrado que a IL-33/ST2 está envolvida no recrutamento de leucócitos, formação de edema e hiperalgesia, através de mecanismos que envolvem a produção de citocinas, ET-1 e PGE₂ (ZARPELON et al., 2013).

Como podemos observar, as citocinas descritas, como a IL-1 β , IL-33 e o TNF- α induzem a produção de vários mediadores presentes na inflamação e em outras patologias, como demonstrado nos modelos experimentais citados, enquanto que a IL-10 reduz estas ações provocadas pelas citocinas pró-inflamatórias. Portanto, podemos dizer que há informações na literatura que sugerem que estas citocinas mostram uma perspectiva de serem alvos farmacológicos importantes para drogas potencialmente anti-inflamatórias.

O NF- κ B é constituído por uma família de proteínas nucleares estruturalmente relacionadas com fatores de transcrição genético que promovem a expressão de mais de 150 genes, muitos desempenham um papel importante na regulação da inflamação e morte celular programada (DE LAS HERAS et al., 1999; RAHIMI et al., 2009). Os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas favorecendo o estresse oxidativo, no qual espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são produzidas em abundância, promovendo a indução do fator transcricional NF- κ B, bem como a peroxidação e destruição de membranas celulares e dano no ácido desoxirribonucleico (DNA) (MAY et al., 1998). O NF- κ B é um fator que age como um mediador das respostas imunes e regula a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e o TNF- α , bem como a codificação de genes, moléculas de adesão, fatores de crescimento (MAY et al., 1998) e enzimas como COX-2 e iNOS (Verri et al., 2006). Adicionalmente investigações tem demonstrado que a IL-1 β e o TNF- α também induzem a fosforilação e ativação do NF- κ B (Verri et al., 2006). Está presente constitutivamente no citosol das células, onde é mantido através da interação com proteínas inibitórias do I κ B. O gene do NF- κ B é dependente de transcrição e requer a fosforilação do I κ B, que libera este componente inibitório dos dímeros de proteínas (principalmente de p50/p65), seguido por degradação do I κ B pelo proteassoma, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo e ativação do gene subsequente (CASTRILLO et al., 2001; LEHOUX et al., 2003). Dados bioquímicos, farmacológicos e genéticos indicam que o controle da ativação do NF- κ B constitui um alvo relevante para o tratamento de doenças inflamatórias (OECKINGHAUS et al., 2011). Por esta razão, a investigação sobre moléculas que possuem a capacidade de inibir as etapas consecutivas que levam à ativação do NF- κ B são de interesse atual (MAY et al., 1998). A este respeito, entre os produtos naturais testados, os terpenos têm sido descritos como inibidores potentes da ativação do NF- κ B em resposta à estimulação pró-inflamatória, sendo exemplo desta atividade o diterpeno andalusol (DE LAS HERAS et al., 1999). Muitos terpenos, incluindo diterpenos, tem mostrado atividade anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*, e muitos deles através da inibição da atividade do NF- κ B (CASTRILLO et al., 2001), demonstrando assim a relevância das pesquisas com produtos naturais tendo como alvo esse transcritor genético.

O NO é um importante mediador químico envolvido no relaxamento vascular, apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo (DUSSE et al., 2003), quando em elevadas concentrações provoca várias desordens inflamatórias (LIM et al., 2009). Produzido a partir do aminoácido L-arginina, catalizado pela enzima NOS (MONCADA et al., 1993; DUSSE et al., 2003). Está presente em muitos processos fisiológicos, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares (QUEIROZ et al., 1999; KOPINCOVÁ et al., 2011). Assim, uma grande variedade de estados patológicos, como por exemplo, problemas cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas podem estar relacionadas com um baixo ou alto nível de NO no organismo (SILVA et al., 2007).

O NO é produzido por três isoformas da enzima, a neuronal (nNOS ou tipo I), induzível (iNOS ou tipo II) e a endotelial (eNOS ou tipo III). Sob condições fisiológicas, a liberação de NO é altamente controlada pela liberação de pequenas quantidades de NO pelas NOS constitutivas no endotélio vascular (iNOS) promovendo a dilatação dos vasos sanguíneos (ALDERTON et al., 2001) e inibição da adesão de leucócitos e de plaquetas à superfície endotelial (DAL SECCO et al., 2003). A iNOS é expressa devido à ação de estímulos inflamatórios, incluindo citocinas, endotoxinas, macrófagos, neutrófilos ou espécies reativas de oxigênio, e uma vez induzida, gera grandes quantidades de NO, sendo prejudicial ao organismo, tais como em várias condições inflamatórias agudas, choque séptico, aterosclerose e doenças infecciosas (ALDERTON et al., 2001, PAVANELLI et al., 2010). Uma vez formada, essa molécula ativa a guanilato-ciclase promovendo a elevação dos níveis de GMPc intracelular que atuará como segundo mensageiro desencadeando uma série de reações fisiológicas (RADOMSKI et al., 1987; DAL SECCO et al., 2006), inclusive a regulação da ativação dos nociceptores. Portanto, o aumento da concentração de AMPc nos neurônios sensoriais pode ser neutralizada pela estimulação ou ativação da via da arginina/NO/GMPc e abertura de canais para o potássio sensíveis ao ATP (K^{+}_{ATP}) permitindo a saída deste íon da célula neuronal, equilibrando o aumento do potencial de membrana, evitando a despolarização, ou seja, reduzindo a hiperalgesia; mecanismo esse já demonstrado para os fármacos opióides, como a morfina e analgésicos periféricos, como a dipirona (FERREIRA, 1993).

As PGs são mediadores importantes da dor inflamatória e fazem parte de um grupo de substâncias químicas chamadas de eicosanóides, geradas a partir do ácido araquidônico, pela atividade das enzimas COX. Estes mediadores atuam nos seus receptores presentes na membrana neuronal acoplados a proteína G e ativam a via dos segundos mensageiros, como o AMPc e as proteínas quinases A (PKA) e C (PKC) levando à fosforilação desses receptores, dos canais de sódio e de potássio, promovendo diminuição do limiar de ativação da célula neuronal, causando a sua sensibilização (GOLD et al., 1996; KASSUYA et al., 2007; SCHAIBLE et al., 2011; SUNDER et al., 2013). A importância deste mecanismo de sensibilização é ressaltada pela capacidade dos inibidores da síntese de PG, em reduzir essa sensibilização (FERREIRA et al., 1979a; SCHAIBLE et al., 2011). Dentre os prostanóides, a PGE₂ é a mais pesquisada e está envolvida na patogênese da dor e da febre (COTRAN e ROBINS, 2009), além disso, provoca vasodilatação arteriolar e edema, sendo a sua produção intimamente relacionada com a produção prévia de mediadores intermediários como as citocinas pró-inflamatórias (VERRI et al., 2006b). As drogas que atuam inibindo a síntese de PGE₂, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), (NAKAMURA et al., 1987; STAURENGO-FERRARI et al., 2013) apresentam muitos efeitos colaterais deletérios, como lesões gástricas e hepáticas, principalmente em tratamentos prolongados, sendo muitas vezes ineficazes (VERRI et al., 2006b, STAURENGO-FERRARI et al., 2013). Diante do exposto pode-se concluir que são necessárias mais pesquisas sobre os compostos obtidos a partir de extratos de plantas, para controlar os sintomas envolvidos no processo inflamatório.

1.5 .Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do sistema biológico em neutralizá-las. O processo respiratório é uma das causas da produção de EROs, com a consequente reação destas com o DNA levando a alterações das funções celulares (BODERA et al., 2013). Normalmente o estresse oxidativo é mantido sob o controle do sistema antioxidante endógeno, que é constituído por diferentes enzimas e substâncias antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), glutatona-redutase (GSR), glutatona reduzida (GSH) e catalase. No

entanto, durante o processo inflamatório, a geração de EROs aumenta de maneira que supera a capacidade antioxidante endógena, promovendo um desequilíbrio que resulta em lesão, dor e inflamação (CHUNG, 2004). Este desequilíbrio também pode ocorrer devido a pouca ingestão de antioxidantes na dieta, como ácido ascórbico, tocoferol e caroteno (LIMÓN et al., 2009). Antioxidantes estes que são vitais ao organismo e podem contribuir na eliminação dos agentes pró-oxidantes pela sua capacidade em reduzir a quelação do ferro ou eliminar radicais livres (SEALET et al., 2013).

A inflamação, o envelhecimento ou a exposição a fatores ambientais, também gera metabólitos como íons de oxigênio ($O^{\cdot-}$), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podendo ser altamente tóxicos, danificar as células e ter como consequência a morte celular por apoptose (GUPTA et al., 2009). Os radicais livres contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e tem função benéfica para as moléculas endógenas, durante o processo fisiológico, como o DNA, proteínas e lipídeos; mas em condições patológicas contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças (HALLIWEL, 1995; MON et al., 2011).

O cérebro é particularmente sensível ao estresse oxidativo, possivelmente devido ao seu alto teor de lipídios e alta atividade metabólica aeróbica (MON et al., 2011). Há uma variedade de substâncias que são liberadas após um dano celular, enquanto outras são sintetizadas durante estes eventos, promovendo desta forma um impacto qualitativo e quantitativo na produção da inflamação. Os produtos do estresse oxidativo, as EROs são componentes importantes da dor inflamatória e estão relacionadas na ativação do neurônio durante a lesão dos tecidos. Esses efeitos tóxicos das EROs têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e crônico-degenerativas (CHUNG, 2004; MON et al., 2011).

Paralelamente a estas pesquisas, tem aumentado o interesse no potencial terapêutico medicinal das plantas como antioxidantes, na redução da lesão dos tecidos induzida por radicais livres. Muitos extratos vegetais e compostos isolados têm demonstrado a propriedade de eliminar radicais livres, sendo portanto, considerado uma abordagem terapêutica promissora, pois podem funcionar como neuroprotetores, prevenindo várias doenças degenerativas e inflamatórias (MON et al., 2011).

Neste sentido, tendo em vista as ações prévias descritas para o AP e que são necessárias mais pesquisas para avaliar os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios; o nosso trabalho teve como objetivo investigar esses mecanismos através dos modelos experimentais de dor manifesta, inflamação e estresse oxidativo. Adicionalmente verificamos os possíveis efeitos tóxicos do composto avaliando os biomarcadores de lesão gástrica e hepática.

1.6 Justificativa

A busca por novos compostos bioativos, obtidos de plantas, apresentam uma perspectiva na descoberta de novas drogas que atuam em processos inflamatórios acompanhados de dor. Os diterpenos estão descritos na literatura pelas suas diversas atividades, dentre elas, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antiespasmódica. Os estudos demonstram que esses compostos provenientes de metabólitos secundários, extraídos de plantas atuam em diferentes alvos terapêuticos. Entre os representantes dos diterpenos pimaranos, o AP tem se destacado como um composto isolado com atividades biológicas que envolvem ação antihipertensiva, antimicrobiana e anti-edematogênica, no entanto, não há estudos suficientes que relatem os mecanismos que envolvem a atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica deste composto. Ademais, os AINES atualmente existentes para o controle da dor inflamatória, produzem muitas vezes lesão gástrica e hepatotoxicidade quando utilizadas a longo prazo, levando os pacientes a interromper a terapêutica estabelecida e não obtendo a recuperação desejada. Neste sentido, tendo em vista as ações prévias descrita para o AP, são necessários mais pesquisas para avaliar os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios envolvidos, incluindo a produção de citocinas, atividade da MPO, NF- κ B e ânion superóxido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico e mecanismos de ação analgésico e anti-inflamatório do AP, em diferentes modelos experimentais.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar:

- ✓ efeito do tratamento com o AP sobre o desempenho motor dos camundongos;
- ✓ efeito do tratamento com o AP sobre o SNC;
- ✓ efeito do tratamento com o AP em modelos de dor manifesta; hiperalgesia mecânica, edema e atividade da MPO;
- ✓ participação da via do NO através do uso de inibidores farmacológicos;
- ✓ efeito do tratamento com o AP sobre os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-33, IL-10 e do NF- κ B na pata de camundongos estimulados com CGN;
- ✓ efeito do tratamento com o AP sobre o estresse oxidativo;
- ✓ efeito do tratamento com o AP sobre os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas;
- ✓ efeito do tratamento prolongado com o AP na migração de neutrófilos para o estômago.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O Composto AP utilizado neste estudo foi extraído a partir das raízes secas da *V. arenaria* com CH_2Cl_2 por 30 min usando um processador ultrassônico para obter 82 g de extrato bruto. Este extrato foi suspenso em MeOH e H_2O e foi lavado exaustivamente com hexano e CH_2Cl_2 para obter 39.5 g (fase hexano) e 25.0 g (fase CH_2Cl_2). A fase hexano foi cromatografada sobre sílica gel utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão para se obter seis frações: F1 (0.5 g), F2 (13.3 g), F3 (14.2 g), F4 (5.3 g), F5 (2.4 g) e F6 (3.6 g). A fração F2 forneceu o diterpeno AP. O isolamento e a purificação foram realizadas por cromatografia de flash (hexano-EtOAc), PTLC (Si gel, hexano-EtOAc ou hexano- CHCl_3) e recristalização a partir do MeOH. A estrutura do diterpeno foi estabelecida pela comparação das ressonâncias magnéticas nucleares (RMN) ^1H e ^{13}C dos dados espectrais relatados na literatura (Arakawa et al., 2008).

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos Swiss, machos adultos, pesando 20 a 25 grs, criados no Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – UEL, e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL pelo menos dois dias antes dos experimentos. Nos biotérios é utilizado ciclo claro/escuro (12/12hs) com livre acesso a água e ração; mantidos em temperatura controlada em torno de 22^o C. Os animais foram alocados em caixas plásticas (gaiolas) em número máximo de seis por caixa, com cama de cepilho. O número de animais por grupo foi utilizado de acordo com os dados da literatura e mínimo para a análise estatística.

Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o número 1531.2013.76/2013. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados nesta pesquisa.

3.2 Protocolos Experimentais

Para os experimentos de dose-resposta foram avaliados a dor

manifesta induzida por ácido acético, a hiperalgesia mecânica, o edema e a atividade da MPO, utilizando-se as doses de 1, 3 e 10 mg/kg de AP. A partir desses experimentos foi escolhida a melhor dose, que foi a de 10 mg/kg. Adicionalmente, para verificar a melhor via de administração foi injetado intraperitonealmente (i.p., 10 mg/kg) e via subcutâneo (s.c., 10 mg/kg), o tratamento com AP ou veículo (2% de DMSO em soro fisiológico) 30 minutos antes do estímulo inflamatório. Todas as vias apresentaram resposta significativa, mas foi escolhida a oral pela facilidade de administração aos animais. Durante os experimentos, os camundongos foram tratados, via oral (vo, 10 mg/kg) com o AP ou salina 30 min antes ou 24 h após os estímulos inflamatórios. As doses dos estímulos inflamatórios foram determinadas com base em estudos previamente realizados em nosso laboratório (Borghini et al., 2013; Guazelli et al., 2013; Magro et al., 2013; Zarpelon et al., 2013). As respostas das contorções foram avaliadas por 20 min após a injeção de ácido acético (0.8 %). As respostas de sacudidas e lambidas da pata foram quantificadas por 30 min após injeção do estímulo por formalina 1.5 % (25 µL/pata) ou CFA (10 µL/pata). O efeito sedativo e relaxante muscular do AP foi avaliado 30 minutos após o tratamento dos animais, nos testes da placa quente e rota rod respectivamente. A hiperalgesia mecânica foi avaliada 1-5 h após o estímulo com CGN (300 µg/pata). Também foi avaliado neste modelo de hiperalgesia a administração de inibidores da via do NO e estímulo com a PGE₂ (100 ng/pata). No estímulo com CFA (10 µL/pata) a hiperalgesia foi avaliada de 1-7 dias. Animais inoculados somente com solução salina foram utilizados como controle, sendo que os estímulos inflamatórios induziram hiperperalgesia mecânica somente na pata injetada. Para os testes do FRAP, ABTS, NBT e dosagem dos níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1β, TNF-α, IL-33 e IL-10), GSH e NF-κB fosforilado e total foram coletadas amostras da pata, e avaliados 3 horas após a injeção de CGN (i.pl., 300 µg/pata). Amostras de plasma foram coletadas para avaliar os níveis de AST e ALT, após a quinta hora da administração do estímulo CGN. Além disso, a migração de neutrófilos foi avaliada 5 horas após a injeção com CGN, em amostras da pata e de estômago coletadas para o ensaio da atividade da MPO em animais tratados diariamente com AP (v.o., 10 mg/kg), veículo ou indometacina (v.o., 2,5 mg/kg) em até 7 dias.

3.3 Modelos Experimentais de Dor Manifesta

3.3.1 Avaliação do Desempenho Motor pelo Teste do Rota-Rod

Este teste consiste de um aparelho com uma barra giratória com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos. A barra gira a 22 rotações por minuto. Os animais foram selecionados no dia anterior ao experimento e foram eliminados aqueles que não permaneceram na barra por três vezes consecutivas por 180 segundos. O tempo foi cronometrado imediatamente após o tratamento dos animais com o AP (10 mg/kg), avaliando-se a ocorrência de mudanças em seu desempenho motor nos tempos 1,5 h, 3,5 h e 5,5 h. O resultado foi obtido pela média de tempo em segundos de permanência de cada grupo no aparelho (Valério et al., 2009).

3.3.2 Avaliação do Efeito Analgésico do AP no Teste da Placa Quente.

Este experimento avalia a hiperalgesia induzida por estímulo térmico e foi realizado de acordo com o método descrito previamente por Verri et al (2005). Os animais foram selecionados 24 h antes do teste, sendo que foram utilizados somente os que permaneceram por no mínimo 12 e no máximo 20 segundos na placa aquecida em torno de 55 °C. A resposta ao estímulo térmico foi medida pelo tempo em que os animais permaneceram lambendo ou sacudindo a pata, que foi avaliado 1, 3 e 5 h após o tratamento com o AP. O tempo máximo para permanência na placa quente foi de 30 s para evitar lesão tecidual.

3.3.3 Teste de Dor Manifesta Induzidas por Ácido Acético

O teste consiste na administração de ácido acético, via intraperitoneal (i.p.), 30 min. após tratamento com AP. Os animais foram tratados com o AP nas doses de 1, 3, 10 mg/kg de animal; administrado v.o. (0,1 ml/kg), s.c. (100 µl/animal) e i.p.(100 µl/animal). Logo após os animais foram colocados sob funis de vidro invertido, para a observação individual e o número de contorções foi quantificado cumulativamente, durante um período de 20 minutos. O resultado obtido a partir dos grupos tratados foi comparado com os grupos controles e

quantificou-se o número de contorções abdominais e extensões da pata que o animal realizou no período de 0-20 min (Mizokami et al., 2011).

3.3.4 Teste de Dor Manifesta Induzida por Formalina

Para avaliar os efeitos da dor manifesta induzidos pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina, utilizamos o método descrito por Dubuisson & Dennis 1977. Os camundongos foram tratados com AP v.o.(10 mg/kg), 30 minutos antes da injeção i.pl. de 25 μ L de formalina diluída em salina (1,5%) ou salina. Imediatamente após, os animais foram colocados sob um funil de vidro invertido e o tempo foi cronometrado durante 30 minutos, divididos em intervalos de 5 minutos. O número de sacudidas da pata traseira injetada com formalina e o tempo em segundos (s) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como índice de dor manifesta. Neste experimento foram avaliados dois tipos de dor: a dor neurogênica onde há a estimulação direta dos neurônios nociceptivos nos 5 minutos iniciais do teste; e a dor inflamatória onde ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios nos 10 a 30 minutos finais (Staurengo-Ferrari et al., 2013).

3.3.5 Teste de Dor Manifesta Induzida pelo CFA

A dor manifesta foi avaliada pela aplicação de 10 μ l de CFA (adjuvante completo de Freund) na pata traseira do camundongo, ou salina, 30 minutos após o tratamento com AP v.o. (10 mg/kg). Em resumo, os animais foram colocados em um funil de vidro invertido e o tempo foi cronometrado durante 30 minutos. O número de sacudidas da pata traseira injetada com CFA e o tempo em segundos (s) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi contado cumulativamente por um período total de 30 minutos, como índice de dor (Zarpelon et al., 2013).

3.4 Modelos Experimentais de Inflamação

3.4.1 Avaliação da Hiperálgia Mecânica pelo Método da Pressão Crescente na Pata.

Para avaliar a hiperalgesia mecânica foi realizada a medição dos animais pelo método de pressão crescente na pata, de acordo com o método descrito por Cunha et. al., 2005. O teste consiste em um transdutor de pressão com uma ponteira de polipropileno de $0,5 \text{ mm}^2$ adaptado a um contador digital de força expresso em gramas. Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico com uma tela de arame por 15 minutos antes dos testes, para adaptação. Utilizou-se um espelho inclinado abaixo da grade para obtermos uma visão clara da pata traseira do animal. A avaliação do limiar de hiperalgesia consiste em aplicar a ponta de polipropileno perpendicularmente ao centro da área da pata traseira do animal, com um aumento gradual da pressão para provocar um reflexo de retirada e sacudida da pata estimulada. Foi registrado a média de três medições nos tempos 1, 3, 5 h após os estímulos e o valor final obtido foi expresso pelo delta (Δ) subtraindo-se o valor do tempo zero (basal) de cada tempo avaliado, sendo que os animais foram desafiados previamente aos estímulos (CGN, CFA e PGE_2 e após o tratamentos com o AP (10 mg/kg – v.o).

3.4.2 Avaliação do Edema de Pata.

Os camundongos receberam o tratamento com o AP (v.o.10 mg/kg) e depois de 30 minutos foi injetado na pata direita 25 μl de CGN dissolvidos em salina (300 μg /pata) ou 10 μl de CFA. O volume das patas foi medido no tempo zero, com paquímetro e serviu como controle individual .A medida do edema foi realizado após 1, 3 e 5 h após a injeção dos estímulos inflamatório CGN e CFA e diariamente na 3ª hora foi medido o edema com o estímulo CFA por até 7 dias. Os valores foram calculados subtraindo-se as medidas finais de cada horário mensurado pela inicial (Mizokami et al., 2011).

3.4.3 Avaliação da Atividade MPO.

A medida da atividade da MPO foi realizada por ensaio cinético-colorimétrico, utilizado para avaliar a migração de leucócitos para o tecido subcutâneo plantar da pata traseira do camundongo no estímulo CGN e para o estômago no estímulo com CFA. Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta das amostras do tecido subcutâneo plantar e do estômago, que foram

recolhidos separadamente em tampão fosfato com HTAB e em seguida homogeneizadas e centrifugadas a 16.100g durante 4 min, o sobrenadante foi avaliado espectrofotometricamente para determinação da atividade da MPO em 450 nm. A atividade da MPO das amostras foram comparadas com uma curva padrão de neutrófilos. Resumidamente, 10 a 30 μ L de amostra foi misturada com 200 μ L de tampão fosfato 50 mM a pH 6,0, contendo 0,167 mg/mL de dicloridrato de o-dianisidina e peróxido de hidrogênio. 0,015%. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos / mg de tecido.

3.4.4 Avaliação do Envolvimento da Via do NO no Efeito Analgésico e Anti-inflamatório do AP pelo método da Pressão Crescente na Pata.

A participação da via do NO foi avaliada pelo método da hiperalgesia mecânica crescente na pata, de acordo com o método descrito por Cunha et. al., 2005, descrito no item 3.4.1. Os inibidores da via do NO (L-NAME, ODQ, KT5823 e glibenclamida) foram administrados i.p nas dose de 90mg/kg, 0,3mg/kg, 0.5 μ g/animal e 0,3 mg/kg respectivamente e 30 minutos após foi administrado o estímulo inflamatório CGN.

3.4.5 Avaliação dos Níveis das Citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-33 e IL-10

A determinação da produção das citocinas, como o TNF α , IL-1 β , IL-33 e IL-10 foi realizada através do ensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience). Os animais foram anestesiados e eutanasiados para coletar as amostras do tecido cutâneo plantar que trituradas e homogeneizadas em 500 μ l de solução tampão apropriado contendo inibidores de proteases; e os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-33 e IL-10 foram determinados. Os resultados foram expressos em picogramas (pg) de citocina/100 mg de tecido. Como controle, a concentração destas citocinas foi determinada em animais que receberam somente salina i.pl.

3.4.6 Avaliação dos Níveis do Fator Nuclear NF- κ B Total e Fosforilado

A avaliação da produção de NF- κ B total e fosforilado foram

realizadas pelo método ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a partir de kits comerciais. As amostras de pele da pata foram coletadas e homogeneizadas em solução tampão. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para avaliar os níveis de NF-κB total e fosforilado por ELISA. Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas por toda à noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas a 37°C com uma solução a 1% de albumina bovina. Após as amostras foram adicionadas e incubadas a 37°C por 2h (100 ul/poço). As absorbâncias foram determinadas em 450 nm. Os resultados foram obtidos comparando-se a densidade óptica das amostras e o peso do tecido.

3.5 Avaliação do Estresse Oxidativo

Foi avaliada a atividade antioxidante através dos ensaios dos níveis de GSH, potencial redutor do ferro (FRAP), capacidade sequestradora de radicais livres (ABTS) e quantificação da produção do ânion superóxido (NBT) presentes nas amostras que foram coletadas do tecido cutâneo plantar dos camundongos, três horas após o estímulo com CG (300 µg, i.pl.), trituradas, homogeneizadas e centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios.

3.5.1 Avaliação dos Níveis de GSH

Os níveis de GSH da pele da pata dos camundongos foram determinados usando o ensaio de fluorescência conforme descrito por P.J. Hissin, R. Hilf, 1976. As amostras do tecido cutâneo plantar dos camundongos foram homogeneizadas com EDTA 0,02% e após adicionado ácido tricloracético 50% e centrifugadas (1500g x 15 min x 4°C). O sobrenadante foi adicionado ao tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e ao ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e em seguida foi misturado. A fluorescência foi determinada após 5 minutos a 412 nm. A curva padrão foi preparada com GSH em diversas concentrações e os resultados foram apresentados em µmol GSH por mg de tecido.

3.5.2 Avaliação da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres (ABTS)

Este ensaio é baseado na inibição da absorvância do radical catiônico 2,2 V-azinobis 3-etilbenzotiazolino 6-sulfonato (ABTS), que ocorre pela presença de radicais livres na amostra. Para o estudo, a solução ABTS⁺ foi diluída com tampão fosfato pH 7,4 (PBS) a uma absorvância de 734 nm e equilibrada a 30°C. Foi realizado a medição do ABTS sem amostra, ou seja, o branco, e após a medição do ABTS contendo a amostra. A amostra foi coletada 3 hs após o estímulo i.pl. com Cg (300 µg), homogeneizada com 500 µL de KCl. 1.15%, centrifugada por 10 min × 200 g × 4 °C e o sobrenadante foi usado para o ensaio. Também realizou-se a medição com o padrão Trolox. As amostras foram incubadas durante 6 minutos à 30°C e a absorvância foi determinada após 6 minutos. Todas as medições foram realizadas em quatro repetições. A porcentagem de inibição do ABTS⁺ pela amostra foi calculado de acordo com a fórmula: % Inibição = [(AbsBranco – Absamostra) / AbsBranco] x 100. A capacidade de eliminação de radicais livres da amostra foi calculada como porcentagem de inibição de ABTS + foi comparado contra uma curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox por grama de peso de tecido (Borghetti et al., 2013).

3.5.3 Avaliação da Capacidade Queladora do Ferro (FRAP)

O ensaio de FRAP mede a mudança na absorvância a 593 nm devido à formação de um composto de cor azul oxidado pela doação de elétrons antioxidantes. Foi aquecido 1,5 mL do reagente de trabalho FRAP até 37 °C e uma leitura do reagente em branco foi realizada em 593 nm. Subsequentemente, 50 µL da amostra de tecido da pata e 150 µL de água desionizada foram adicionadas ao reagente FRAP incubadas a 37 °C por 4 minutos e posteriormente realizado a leitura. A diferença entre entre a leitura do branco e a leitura contendo a amostra foi calculada e utilizada para o cálculo do valor de FRAP com referência do resultado que foi obtido por uma solução de Fe II de concentração conhecida. Os valores foram expressos como micromol de Fe II por grama de tecido. Todas as medições foram feitas em quatro repetições para cada amostra (Borghetti et al., 2013).

3.5.4 Avaliação da Produção do Ânion Superóxido (NBT)

A quantificação da produção de O_2^- no homogenato de tecido (10 mg / ml em 1,15% de KCl) foi realizada utilizando o ensaio de tetrazólio nitroazul (NBT). 50 μ L de homogeneizado adicionado com 100 μ L de NBT (1 mg/ml) que foi incubado em placas de 96 poços a 37°C durante 1h. O sobrenadante foi removido e o precipitado formazano foi solubilizado pela adição de 120 μ L de 2 M de KOH e 140 μ L de DMSO. A redução do NBT foi medida a 600 nm em espectrofotômetro. O teor de proteínas foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores foram ajustados utilizando os pesos das amostras (mg de tecido) e os dados apresentados como redução do NBT a 600 nm (Borghini et al., 2013).

3.6 Avaliação hepática pela quantificação das enzimas AST e ALT

Em microtubos contendo 50 μ L do anticoagulante heparina (5000 UI/ml) foi coletado 1 ml de sangue. Em seguida as amostras foram centrifugadas (200g x 10 min x 4°C), e o plasma foi separado para a determinação dos níveis plasmáticos do AST e ALT por metodologia cinética UV, de acordo com as instruções do fabricante (Labetest Diagnóstico S.A., Brasil), utilizando Multiscan EX (Uniscience – LabSystems, Helsinki, Finlândia). Os resultados foram expressos em U/L.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM) dos experimentos realizados por grupo de animais. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) seguido do teste de Tukey usando o software GraphPad Prisma 5. Foram consideradas significativas diferenças para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do atual trabalho estão descritos no artigo científico a ser submetido à revista *Journal Natural Products* com o título “Analgesic and anti-inflammatory effect and mechanism of action of Pimaradienoic acid”. As normas da revista encontram-se no Anexo A.

5.1 Artigo

Analgesic and Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Pimaradienoic Acid

Maria I. Possebon,[†] Sandra S. Mizokami,[†] Ana C. Zarpelon,[†] Miriam S. N. Hohmann,[†] Larissa Staurengo-Ferrari,[†] Thacyana T. Carvalho,[†] Rodrigo C. S. Veneziani,[§] Anderson R. de Souza,[§] Sergio R. Ambrosio,[§] Nilton S. Arakawa,[‡] Rubia Casagrande,[‡] and Waldiceu A. Verri, Jr.,^{*,†}.

†Departamento de Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057970 Londrina, Brazil

‡ Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências de Saúde, Universidade Estadual de Londrina, 86039440 Londrina, Brazil

§Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade de Franca, 14404600, Franca, Brazil

***Author to whom correspondence should be addressed.** Tel: + 55 43 3371 4979. Fax: + 55 43 3371 4387. E-mail: waverri@uel.br or waldiceujr@yahoo.com.br

ABSTRACT

Pimaradienoic acid (**1**) is a pimarane diterpene (ent-pimara-8 (14),15-dien-19-oic acid) extracted at high amounts from various plants, such as *Vigueira arenaria* Baker (Asteraceae). Compound **1** inhibited carrageenan-induced paw edema and acetic acid-induced abdominal writhing, which are the only known anti-inflammatory activities for it. Therefore, it is important to further investigate the analgesic and anti-inflammatory effects of **1**. Per oral pre-treatment with **1** at the doses of 1, 3 and 10 mg/kg inhibited the acetic acid-induced abdominal writhing. This was also observed at 10 mg/kg via sc and ip routes. Both phases of the formalin and CFA induced paw flinch and time spent licking the paw were inhibited by **1** (10 mg/kg). Compound **1** inhibited carrageenan- and CFA-induced mechanical hyperalgesia, edema, and myeloperoxidase activity and hyperalgesia induced by PGE₂. Pharmacological inhibitors also demonstrated that the analgesic effects of **1** depends on activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway, respectively. Treatment with **1** prevented the reduction of antioxidant defenses and superoxide production in the plantar tissue. Treatment with **1** inhibited carrageenan-induced production of TNF- α , IL-1 β , IL-33 and IL-10, and nuclear factor κ B activation. Compound **1** did not alter plasma levels of AST and ALT and myeloperoxidase activity in the stomach per se. These results demonstrate that **1** shows analgesic effects and the mechanisms involve the inhibition of cytokine production, activation of the NO signaling pathway, inhibition of oxidative stress, and NF- κ B activation and does not induce liver or stomach damage.

Keywords: Diterpene, Pimaradienoic acid, *Viguiera arenaria* Baker, Pain, inflammation.

INTRODUCTION

One of the most important symptoms of the inflammatory process is pain.^{1,2,3} The carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia (exacerbated pain due to stimulus that normally provoke pain) model shows that the release of prostaglandins (PGs) and sympathetic amines (e.g., dopamine, epinephrine) occurs subsequent to the release of a cascade of cytokines and other inflammatory mediators.^{4,5,6,7} This cascade is initiated with the release of IL-33,⁸ which induces the production of tumor necrosis factor α (TNF- α) and keratinocyte-derived chemokine 1 (CXCL1). TNF- α induces the production of IL-1 β which in turn induces the production of PGs. CXCL1 is also responsible for stimulation of sympathetic amines on their receptors present in the membrane of nociceptors.^{1,2} This induces a decrease in the nociceptor depolarization threshold, which increases the neuronal membrane excitability,⁹ facilitating primary nociceptor activation and impulse transmission, resulting in hyperalgesia.^{10,11} On the other hand, the anti-inflammatory cytokine IL-10 limits inflammatory hyperalgesia by inhibiting the production of hyperalgesic cytokines such as TNF- α and IL-1 β and PGs.^{1,12,13}

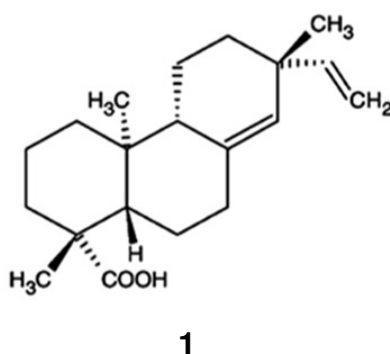
Another important component of inflammatory pain is oxidative stress with generation of highly reactive molecules such as superoxide anion and peroxynitrite, which are produced in response to stimuli including carrageenan.¹⁴ There is a link between cytokines and reactive oxygen species. For instance, IL-1 β and TNF- α stimulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase and increase the production of reactive species. Reactive oxygen species can activate the transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and upregulate cytokine production.^{15,16,17} Furthermore, TNF- α and IL-1 β induce the activation and expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) to induce the production of prostanoids that sensitize the nociceptors, causing hyperalgesia.¹ Moreover, oxidative stress and cytokines can activate NF- κ B, which in turn induces the expression of cytokines and NADPH oxidase components.¹⁸ Thus, this relationship between cytokines and free radicals/oxidative stress is an important component of inflammation and pain.

Additionally, increasing attention has been focused on the activation of the NO-cyclic-GMP-PKG-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway as an important analgesic mechanism activated, for instance, by morphine,^{19,20} non-steroidal anti-inflammatory drugs such as diclofenac²¹ and dypirone.¹⁹

Pimaradienoic acid (**1**) is a pimarane diterpene (ent-pimara-8 (14),15-dien-19-oic acid) present in various plants and in higher concentration in *Vigueira arenaria* Baker (Asteraceae), a plant found in the herbaceous native savannas of Brazil.^{22,23,24} This compound presents a wide variety of activities, including antispasmodic and relaxant actions on vascular smooth muscle and inhibition of rat carotid contractions,^{25,26} partly dependent on the activation of the NO-cGMP pathway and the release of arachidonic acid metabolites.²⁷ Furthermore, it also shows significant antimicrobial activity.^{28,29}

Regarding the anti-inflammatory effects of **1**, *in vitro* evidence shows that it reduces LPS-induced production of NO and PGE₂ that co-related with the inhibition of LPS-induced COX-2 and iNOS mRNA expression, and NF-κB activation in RAW 264.7 macrophages.³⁰ *In vivo* there is only evidence that **1** significantly inhibits the carrageenan-induced paw edema in mice³¹ and acetic acid writhing score.³²

In view of the information presented above, we further addressed the anti-inflammatory and analgesic effects of **1** in additional models and investigated whether its mechanisms of action depends on modulation of oxidative stress, cytokine production, NF-κB activation, and activation of the NO–cyclic GMP–PKG–ATP-sensitive potassium channel signaling pathway in the carrageenin-induced inflammation model.



RESULTS AND DISCUSSION

Pimaradienoic acid (1) Inhibits the Writhing Response Induced by Acetic Acid. Mice received per oral (po) treatment with **1** (1-10 mg/kg, 2% DMSO diluted in saline) 30 minutes before ip injection of acetic acid 0.8 % diluted in saline. All doses of **1** inhibited the abdominal writhing (Figure 1A) with significant

differences comparing the dose of 10 mg/kg and the other lower doses. Compound **1** administered ip (Figures 1B) and sc (Figures 1C) also inhibited the writhing response. Considering these data, the dose of 10 mg/kg and po route were chosen for the next experiments. The oral route is considered better than ip³² and sc route, since it is a more convenient and less invasive mode of administration, which is widely accepted by patients and does not need a health care specialist to be administered. However, the ip and sc routes of administration can be an alternative for cases in which it is impossible to access the oral route.³³ The acetic acid model has nociceptive mechanisms that include the participation of inflammatory mediators, such as PGs that sensitize nociceptors and cytokines such as TNF- α , IL- β , and IL-33,^{34,35} directly linked to inflammatory and nociceptive processes.³⁶ Additional endogenous molecules include superoxide anion, which induces abdominal contortions.³⁷ Furthermore, drugs that activate the NO-cyclic GMP-PKG-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway reduce the number of abdominal contortions.³⁸ Therefore, it is possible that the antinociceptive activity compound **1** may be related to modulation of those pathways.

Pimaradienoic Acid (1) Inhibits Paw Flinch and Time Spent Licking the Paw induced by Formalin and Complete Freund's Adjuvant (CFA). Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po) 30 min before intraplantar (ipl) injection of formalin 1.5 % (25 μ L). Compound **1** inhibited both phases of the formalin test regarding to paw flinches (Figure 2A) and time spent licking the paw (Figure 2B). In the first phase (0-5 min), direct activation of TRPA1 receptors present on primary nociceptive neurons¹⁷ and the release of neurotransmitters such as bradykinin, serotonin, and histamine occur.³⁹ In the second phase (10-30 min), which is also called inflammatory phase, there is the release of mediators such as TNF- α , IL- β , and PGs⁴⁰ and IL-33,³⁵ which are responsible for the activation and sensitization of primary and spinal sensory neurons. Therefore, **1** could potentially act in one or more targets to inhibit formalin-induced nociception. The CFA-induced inflammation depends on IL- β , TNF- α , and PGE₂ production that induces nociceptor sensitization.^{41,42} Pre-treatment with **1** (10 mg/kg, po, 30 min) reduced paw flinch behavior (Figure 2C) and paw licking (Figure 2D) induced by CFA (10 μ L ipl), suggesting that the analgesic effect of **1** might be dependent on cytokine and prostanoid reduced production.

Pimaradienoic acid (1) Inhibits Mechanical Hyperalgesia, Edema, and Myeloperoxidase (MPO) Activity Induced by Carrageenan. Mice were treated with **1** (1–10 mg/kg, po) or vehicle 30 min before carrageenan (300 µg/paw) injection. Mechanical hyperalgesia and edema were evaluated at 1-5 h after carrageenan injection. At 5 h, mice were euthanized and samples of the subcutaneous plantar tissue were collected for MPO activity determination. Treatment with **1** (1-10 mg/kg) inhibited in a dose-dependent manner mechanical hyperalgesia (Figure 3A) and edema (Figure 3B) induced by carrageenan. The doses of 3 and 10 mg/kg significantly inhibited the mechanical hyperalgesia in the first hour after carrageenan injection and this effect remained up to 5 h. No significant effect was observed with the dose of **1** mg/kg (Figure 3A). In carrageenan-induced edema, the dose of 10 mg/kg of **1** significantly reduced paw edema at 1-5 h (Figure 3B). In agreement, previous data have demonstrated that **1** inhibits paw edema.³¹ Regarding MPO activity, only the dose of 10 mg/kg of **1** reduced carrageenan-induced neutrophil recruitment to the paw skin (Figure 3C). Based on these results the dose of 10 mg/kg of **1** was selected for next experiments. The carrageenan-induced hyperalgesia model depends on the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-33), PGE₂, and oxidative stress.^{1,8,17,43} Previous *in vitro* study has demonstrated that **1** inhibits the expression of COX-2 and PGE₂ production,³⁰ corroborating with our data.

Pimaradienoic acid (1) Inhibits Mechanical Hyperalgesia, Edema, and Myeloperoxidase (MPO) Activity induced by CFA. To further address the possible therapeutic usefulness of the compound, mice received ipl injection of CFA (10 µL/paw) and were treated with **1** (10 mg/kg, po) daily during 7 days, starting 24 h after CFA stimulus injection. Mechanical hyperalgesia and edema were evaluated 3 h after treatment (Figures 4A and 4B). On the seventh day of treatment, mice were sacrificed and samples of the subcutaneous plantar tissue were collected for MPO activity determination (Figure 4C). The control group was treated with indomethacin (2.5 mg/kg, po) daily during 7 days, starting 24 h after CFA injection (Figures 4A-C). There was significant inhibition of mechanical hyperalgesia (Figure 4A) and edema (Figure 4B) at all-time points evaluated during treatment with **1**. MPO activity was also reduced by daily treatment with **1** (Figure 4C) and with significant difference when compared to the indomethacin group (Figure 4C). These

results demonstrate the anti-inflammatory effect of **1** and its potential applicability in pain and inflammation. As for the overt pain-like behavior induced by CFA, the mechanical hyperalgesia, edema, and increase of myeloperoxidase activity depend on cytokines and can be inhibited by antioxidants.¹⁷

Pimaradienoic acid (1) Prevents Oxidative Stress Induced by Carrageenan. An important component of inflammatory pain is oxidative stress.^{15,17} During inflammatory processes, such as occurs after the injection of inflammatory stimuli, the generation of reactive oxygen species exceeds the capacity of the endogenous antioxidant system and this imbalance plays an important role in tissue injury and inflammatory pain.^{14,44,45} Thus, the effect of **1** on carrageenan-induced depletion in antioxidant capacity and reactive oxygen species production was assessed. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po) 30 min before the ipl injection of carrageenan (300 µg/paw) and, after 3 h, samples of cutaneous plantar tissue were collected for GSH level, ferric reducing potential (FRAP assay), free radical scavenging ability (ABTS assay), and superoxide anion production (NBT reduction assay) assessment. Carrageenan depleted GSH levels (Figure 5A), reduced the free radical scavenging ability (ABTS assay, Figure 5B), and the ferric-reducing ability (FRAP assay, Figure 5C) while treatment with **1** prevented this oxidative imbalance induced by carrageenan. Carrageenan-induced hyperalgesia has been attributed to oxidative stress in the plantar tissue,^{14,15,16,17} thus, it is possible that the reduction of antioxidant depletion is an important analgesic mechanism of **1** action. Supporting the results of **1** preventing carrageenan-induced antioxidant depletion, treatment with **1** also inhibited the carrageenan-induced increase in superoxide anion production (NBT assay, Fig. 5D) in plantar skin. Like other reactive oxygen species, superoxide anion is a known mediator of inflammation and pain.^{44,45} In the carrageenan-induced hyperalgesia model, superoxide anion is responsible for peripheral sensitization, and the reduction in its levels at the inflammatory site reduces hyperalgesia and further tissue damage.⁴⁴ Thus, the inhibition of superoxide production may also be associated to the analgesic and anti-inflammatory effect of **1**. Additionally, the reduction of superoxide anion production observed in **1** treated mice may be a result of the reduced carrageenan-induced leukocyte recruitment (MPO activity) since recruited leukocytes at the site of inflammation are an important source of superoxide anion and other reactive oxygen

species, which are responsible for oxidative damage and peripheral sensitization.^{46,47}

Pimaradienoic Acid (1) Inhibits Carrageenan-induced Cytokine Production. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po) 30 min before carrageenan ipl injection (300 µg/paw) and after 3 additional hours samples of cutaneous plantar tissue were collected for cytokine level measurement (Figure 6). Treatment with **1** significantly reduced carrageenan-induced production of TNF-α (Figure 6A), IL-1β (Figure 6B), IL-33 (Figure 6C), and IL-10 (Figure 6D). Supporting these data, **1** significantly inhibits the production of the cytokine IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.³⁰ Importantly, TNF-α, IL-1β and IL-33 contribute to inflammatory edema, neutrophil recruitment, mechanical hyperalgesia, and overt pain-like behaviors (abdominal writhing, paw flinch and licking), and inhibition of their production is an important anti-inflammatory mechanism.^{8,34,35,40,43,48,49} IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that is co-released with pro-inflammatory cytokines and has a role as endogenous down-regulator of inflammation since targeting IL-10 increases inflammation and pain.¹² The present data disprove that the anti-inflammatory and analgesic effects of **1** depend on increase of IL-10 levels, and possibly the reduction of pro-inflammatory cytokine production resulted in reduced IL-10 levels considering that its endogenous down-regulator role was not necessary.¹

Pimaradienoic acid (1) Inhibits Carrageenan-induced Nuclear Factor κB (NF-κB) Activation. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po) 30 min before ipl injection of carrageenan (300 µg/paw). Carrageenan induced the activation of NF-κB as observed by the decreased ratio of total NF-κB/phosphorilated NF-κB and treatment with **1** inhibited the activation of carrageenan-induced NF-κB activation (Figure 7). NF-κB is a major transcription factor involved in the production of pro-inflammatory cytokines, COX-2 dependent PGE₂ production, and reactive oxygen species such as superoxide anion and the expression of a variety of enzymes responsible for many inflammatory diseases. In agreement, targeting NF-κB is an effective pharmacological approach to inhibit inflammation and pain.^{50,51} NF-κB activation has been linked to both reactive oxygen species and cytokines as well as NF-κB activation up-regulates reactive oxygen species and cytokines.¹⁸ Thus, the

results of Fig. 5 and 6 on oxidative stress and cytokines are tightly related to reduced NF- κ B activation.

Pimaradienoic Acid (1) Inhibits Inflammatory Pain by Activating the NO-Cyclic GMP-PKG-ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po) or vehicle 30 min before ipl injection of PGE₂ (100 ng/paw, n=5 per group per experiment). PGE₂ (8,53 \pm 0,21) significantly increased the mechanical hyperalgesia compared to saline group (0,84 \pm 0,05). Treatment with **1** significantly inhibited PGE₂-induced mechanical hyperalgesia at 3 h (3,08 \pm 3,03). Notably, the inhibition of PGE₂-induced hyperalgesia indicates that **1** also inhibits the hyperalgesia induced by a direct acting nociceptor sensitizing mediator, thus, its analgesic effects might also involve activation of neuronal events in addition to the inhibition of oxidative stress, cytokine production and NF κ B activation.⁵² Previous reports have shown that the relaxant action of **1** on vascular smooth muscle are dependent on the release of NO from the vascular smooth muscle resulting in activation of guanylyl cyclase-dependent mechanism.²⁷ Furthermore, NO donors^{53,54} and analgesics that release NO such as opioids and dipyron inhibit inflammatory hyperalgesia, including that induced by PGE₂, by activating the cyclic GMP-PKG-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway.¹¹ Therefore, the next step was designed to investigate the possible activation of the NO-GMP-PKG-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway by **1**.

Mice were treated with L-NAME (L-nitro-arginine methyl ester, non selective NOS inhibitor, 90 mg/kg, ip, diluted in saline, 60 min), ODQ (a soluble guanylyl cyclase inhibitor, 0.3 mg/kg, diluted in 2% DMSO in saline, 30 min), KT5823 (an inhibitor of PKG, 0.5 μ g/animal, diluted in 2% DMSO in saline, 5 min) and glybenclamide (an inhibitor of ATP-sensitive potassium channels, 0.3 mg/kg, diluted in 20 % Tween 80 in saline, 45 min) before **1** (10 mg/kg, po) treatment (Figure 8). After an additional 30 min mice received an ipl injection of carrageenan (300 μ g/paw), and mechanical hyperalgesia was evaluated after 1, 3, and 5 h. The inhibition of carrageenan-induced hyperalgesia by **1** was prevented by L-NAME, ODQ, KT5823, and glybenclamide treatments at 1, 3 and 5 h (Figure 8). Control treatments with L-NAME, ODQ, KT5823, or glybenclamide in mice that received saline ipl administration did not alter the nociceptive threshold of mice (data not

shown). Therefore, the antinociceptive effect of **1** depends on the induction of NO production and consequent activation of cyclic GMP-PKG-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway, which diminishes the nociceptive transmission resulting in diminished inflammatory mechanical hyperalgesia.

It is noteworthy to mention that oxidative stress impairs the availability of NO. For instance, NO reacts with superoxide anion to form peroxynitrite. Therefore, the inhibition of oxidative stress and inhibition of cytokine production that lead to oxidative stress, might be a contributing mechanism to the increase of NO levels by compound **1**.⁵⁵

Pimaradienoic acid (1) Does not Induce Hepatic or Gastric Toxicity. In order to assess if **1** induces hepatic or gastric toxicity, plasma levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) and gastric mucosa MPO activity were determined, respectively, using the same treatment protocol. Mice were treated daily (during 7 days) with **1** (10 mg/kg, po), vehicle (DMSO 2 % diluted in saline or Tris/HCl buffer, pH 8.0, with the data for the vehicles pooled since there is no difference between the vehicles), or indomethacin (2.5 mg/kg).³³ No significant difference was observed in plasma levels of AST (Figure 9A) and ALT (Figure 9B) between mice treated with **1** or vehicle, on the other hand mice treated with the positive control indomethacin (a nonselective cyclooxygenase inhibitor) presented significant increases in AST and ALT plasma levels when compared to those treated with saline or **1**. AST and ALT are enzymatic markers of liver injury widely used to assess hepatotoxicity of drugs,^{17,33} thus these results indicate that treatment with **1** during 7 days does not induce hepatic toxicity.

Per oral treatment with indomethacin or other COX inhibitors can induce gastric mucosa tolerance described as no detectable gastric mucosal lesions concomitantly with an increase in polymorphonuclear cell infiltrate, which can be assessed by determining the MPO activity in the stomach tissue.⁵³ Accordingly, indomethacin induced a significant increase of MPO activity in the stomach tissue compared to the group treated with vehicle (Figure 9C). No statistical difference between groups treated with vehicle or **1** was observed (Figure 9). Therefore, **1** does not induce stomach inflammation as assessed over a seven-day period of treatment.

Pimaradienoic Acid (1) Showed No Muscle-Relaxing or Sedative Effects.

Per oral treatment with 10 mg/kg of **1** did not alter the motor response of the test animals 1.5, 3.5, and 5.5 h after treatment. These time points were based on the 30 min of pretreatment plus 1, 3, and 5 h until mechanical hyperalgesia measurement in the carrageenan model. The vehicle control response in the rota rod test was 180 s vs 180 s of **1**-treated animals (data not shown). These results support the notion that **1** is diminishing the nociceptive threshold induced by inflammation and not that the mice are incapable of responding because of muscle-relaxing or sedative effects. The vehicle control responses and **1**-treated animals in the rota-rod, respectively (data not shown). These results support the notion that **1** diminishes the nociceptive threshold induced by inflammation and not that the mice are incapable of responding because of muscle-relaxing or sedative effects.¹⁵

Pimaradienoic Acid (1) Did Not Exhibit Any Effect in the Hot Plate Test in Naive Mice. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po route) or morphine hydrochloride (8 mg/kg, ip route) and the thermal nociception was evaluated. Morphine hydrochloride treatment increased the thermal threshold of mice (data not shown) as expected because of its central analgesic effects. On the other hand, **1** did not alter the thermal threshold of mice (data not shown). This result further supports a specific effect of **1** upon inflammatory pain 1, 3, and 5 h after treatment (data not shown). On the other hand, **1** did not alter the thermal threshold of mice (data not shown). This result further supports a peripheral neuronal effect of **1** upon inflammatory pain, since the hot plate test is considered to be modulated by supraspinal mechanisms.¹⁵

In conclusion, the present study demonstrates that **1** exerted anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects in varied models *in vivo*. The mechanisms of action of **1** involve the activation of NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway, inhibition of oxidative stress, cytokine production and NF- κ B activity. Therefore, these data demonstrates the therapeutic potential of **1** in the treatment of inflammatory conditions.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. The optical rotation of PA was measured in CHCl_3 using a Perkin Elmer 241 polarimeter. Nuclear magnetic

resonance (NMR) spectra were run on a Bruker DPX 400 spectrometer (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C). Samples were dissolved in CDCl_3 , and the spectra were calibrated with the solvent signals at δ 7.26 (^1H) and δ 77.0 (^{13}C). Mass spectrometric analysis was performed at low resolution on a Micromass Quattro-LC instrument (Manchester, UK) provided with an ESI ion source and a triple quadrupole mass analyzer. Solutions were dissolved in MeOH- H_2O 8:2 (v/v) and infused into the ESI source at a flow-rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, using a Harvard apparatus model 1746 (Holliston, MA) syringe pump. Vacuum-liquid chromatography (VLC) was carried out using silica gel 60H (Merck, art. 7736) in glass columns with 5-10 cm i.d.²⁹ High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was accomplished using a Shimadzu CBM-20A liquid chromatography controller, operating with LC solution software, equipped with a Shimadzu UV-DAD detector SPD-M20A and a Shimadzu ODS column (4.6 x 250 mm, 5 μm , 100 \AA).³³

During the experiments, mice received per oral (po), subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) treatment with PA (**1**; 1, 3 and 10 mg/kg) or vehicle (saline) 30 min before or 24 h after inflammatory stimulus as indicated. The doses of inflammatory stimuli were determined previously in our laboratory in pilot studies and are based on previous work.^{56,57,58,59} The writhing response was evaluated during 20 min after ip injection of acetic acid (0.8 %). The paw flinching and licking nociceptive responses were quantified for 30 min after formalin 1.5 % (25 $\mu\text{L}/\text{paw}$) or CFA (10 $\mu\text{L}/\text{paw}$) injection. Mechanical hyperalgesia were evaluated 1-5 h after carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$), or 1-7 days after CFA (10 $\mu\text{L}/\text{paw}$) stimulus. All inflammatory stimuli induced only ipsilateral (in the paw in which the stimulus was injected) mechanical hyperalgesia. GSH, FRAP, ABTS, NBT, NF- κB , TNF α , IL-1 β , IL-33 and IL-10 levels were evaluated 3 h after carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$) injection. The plasma levels of AST, ALT, and MPO activity in stomach samples were determined in mice treated po daily with vehicle, **1** (10 mg/kg), or indomethacin (2.5 mg/kg) for 7 days.

Plant material. *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae) was collected by F.B. Da Costa from the vicinity of the Washington Luís highway (km 223, 22°10' S, 47°59' W, SP, Brazil, in March 1999). The plant material was identified by J. N. Nakajima (Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brazil) and E. E. Schilling (University of Tennessee, TN, USA). A voucher specimen (FBC 60) was deposited under code

SPFR 4006 in the herbarium of the Departamento de Biologia; Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo; SP; Brazil.²⁵

Extraction and Isolation. Air-dried tuberous roots (980 g) from *V. arenaria* were extracted with CH_2Cl_2 for 30 min using a sonicator to yield 82 g of crude extract. This extract was suspended in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v/v) and exhaustively washed with hexane and CH_2Cl_2 to yield 39.5 g (hexane phase) and 25.0 g (CH_2Cl_2 phase). The hexane phase was chromatographed over Si gel using vacuum liquid chromatography to yield six fractions: F1 (0.5 g), F2 (13.3 g), F3 (14.2 g), F4 (5.3 g), F5 (2.4 g) and F6 (3.6 g). Fraction F2 furnished the diterpene PA. Isolation and purification steps were carried out by flash chromatography (hexane-EtOAc), PTLC (Si gel, hexane-EtOAc or hexane- CHCl_3) and recrystallization from MeOH. The structure of the diterpene was established by comparison of the ^1H and ^{13}C NMR spectral data with those reported in the literature.²³

Test Compounds. The compounds used in this study were carrageenan (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States), L-NAME (Research Biochemicals, Natick, MA, United States), acetic acid and formaldehyde (Mallinckrodt Baker, S.A., Mexico, Mexico City), KT5823 (Calbiochem, San Diego, CA, United States), 1H-(1,2,4)-oxadiazolol-(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) from Tocris Cookson (Baldwin, MO, United States), and complete Freund's adjuvant, glibenclamide, and prostaglandin E_2 (PGE_2) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, United States), and indomethacin from Prodome (Campinas, SP, Brazil).

Animals. Male Swiss mice (20-25 g), from the Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, were used in this study. Mice were housed in standard clear plastic cages with free access to food and water, a light/dark cycle of 12:12 h, and kept at 21°C . All behavioral testing was performed between 9 a.m. and 5 p.m. in a temperature-controlled room. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina

(process number 1531.2013.76). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Overt pain-like behavior. *Writhing Response Tests:* The acetic acid-induced writhing models were performed as previously described, acetic acid (0.8 % v/v, diluted in saline, 10 mL/kg), or vehicle was injected into the peritoneal cavities of mice. Each mouse was placed in a large glass cylinder and the intensity of nociceptive behavior was quantified by counting the total number of writhes occurring between 0 and 20 min after stimulus injection. The writhing response consisted of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs. The intensity of the writhing response was expressed as the cumulative writhing score over 20 min.¹⁷ *Formalin Test:* The number of paw flinches and the time spent licking the paws were determined between 0-30 min after intraplantar (ipl) injection of 25 μ L of formalin 1.5 %, as previously described. The period was divided in intervals of 5 min, and clearly demonstrated the presence of the first and second phases, which are characteristic of the method. Results were obtained for both the first (0-5 min) and second (10-30 min) phases.⁵⁵ *Complete Freund's Adjuvant (CFA) Test:* The number of paw flinches and time spent licking the stimulated paw were determined between 0 and 30 min ipl injection of 10 μ L of CFA. Results were expressed by the total number of flinches and licks performed in 30 min.¹⁴

Electronic pressure-meter test. Mechanical hyperalgesia was assessed as previously reported.⁴³ In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12×10×17 cm) with wire grid floors, 30 min before testing. The test consisted of evoking a hind paw reflex with a hand-held force transducer (electronic anesthesiometer; Insight, Ribeirao Preto, SP, Brazil) adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hind paw with a gradual increase in pressure. The end point was characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements, and the intensity of pressure was recorded automatically. The animals were tested before (basal) and after treatment and stimuli, and the value for each interval was an average of three measurements. The results are expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in g), calculated by subtracting the basal mean measurements from the mean

measurements obtained at 1, 3 or 5 h after ipl stimuli with the hyperalgesic agents carrageenan (300 µg/paw), CFA (10 µL/paw) or PGE₂ (100 ng/paw).

ABTS and FRAP assays. The ability of samples to resist oxidative damage was determined as free radical scavenging ability (ABTS assay) and ferric reducing ability (FRAP assay). The tests were adapted to a 96-well microplate format from previously described assays.¹⁴ Plantar tissue samples were collected 3 h after ipl stimulus with carrageenan (300 µg, ipl) and immediately homogenized with 500 µL of 1.15% KCl. The homogenates were centrifuged (10 min × 200 g × 4 °C) and the supernatants were used in both assays. For ABTS assay, ABTS solution was diluted with phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) to an absorbance of 0.80 at 730 nm. 200 µL of diluted ABTS solution were then mixed to 20 µL of sample in each well. After 6 min of incubation at 25 °C, the absorbance was measured at 730 nm. For FRAP assay, 50 µL of supernatant was mixed with 150 µL of FRAP reagent freshly prepared. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance was measured at 595 nm. The results of ABTS and FRAP assays were equated against a Trolox standard curve (0.02–20 nmol). The results of both assays are expressed as nmol of Trolox equivalents per mg of tissue, which is the amount of Trolox (nmol) with an equivalent antioxidant potential to 1 mg of the tissue under investigation.

GSH levels assay. Plantar tissue samples were collected 3 h after stimulus with carrageenan (300 µg, ipl) injection and the levels of GSH were determined using an adapted spectrophotometric method.⁵⁶ Samples were homogenized using Tissue-Tearor (Biospec®) in 4 mL of EDTA 0.02 M. Homogenates (2.5 mL) were treated with 2 mL H₂O Milli Q plus 0.5 mL of trichloroacetic acid 50%. After 15 min, the homogenates were centrifuged at 1500 g for 15 min, and 1 mL of the supernatant was added to 2 mL of a solution containing Tris 0.4 M (pH 8.9) plus 50 µL of DTNB. After 5 min, the measurements were performed in 412 nm against a blank control [UV - vis spectrophotometer (UV-1650, SHIMADZU)]. The results were presented as nmol of GSH per mg of tissue.

Nitroblue Tetrazolium Reducing (NBT) assay. The superoxide anion production in tissue homogenates (10 mg/mL in 1.15% KCl) was performed using a

NBT assay, as previously described.⁶⁰ Briefly, 50 μ L of homogenate previously obtained for FRAP and ABTS assay were incubated with 100 μ L of NBT (1 mg/mL) in 96-well plates at 37 °C for 1 h. The mixture was then carefully removed from wells and the reduced formazan solubilized by adding 120 μ L of KOH 2 M and 140 μ L of DMSO. The absorbance was measured at 600 nm (Multiskan GO ThermoScientific). The weight of samples was used for data normalization and results presented as NBT reduction (OD at 600 nm).

Cytokine Measurement. Mice were treated with vehicle or **1** (10 mg/kg, po) 30 min before carrageenan (300 μ g/paw) stimulus. Three hours after the injection of carrageenan, mice were euthanized, and the skin tissues were removed from the injected and control paws (saline). The samples were homogenized in 500 μ L of buffer containing protease inhibitors, and TNF- α , IL-1 β , IL-33, and IL-10 levels were determined as described previously² by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using eBioscience kits. The results are expressed as pg of cytokine/100 mg of tissue. As a control, the concentrations of these cytokines were determined in animals injected with saline.

Myeloperoxidase activity (MPO). The neutrophil migration to paw or stomach, were indirectly evaluated by the MPO activity kinetic-colorimetric assay.^{61,62} Briefly, samples were collected in 50 mM K₂PO₄ buffer (pH 6.0) containing 0.5% HTAB and were homogenized using Ultra-Turrax® (IKA T10 Basic, CQA Química, Paulínea, SP). Then the homogenates were centrifuged at 16,100 g for 2 min at 4°C. 15 μ L of resulting supernatant was mixed with 200 μ L of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.167 mg/mL o-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide and was assayed spectrophotometrically for MPO activity determination at 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, São Paulo, SP, Brazil). MPO activity of samples were compared with a standard curve of neutrophils and presented as MPO activity (number of neutrophils /mg of tissue).

NF- κ B Activity. The assessment of total and phosphorylated NF- κ B production was performed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits as specified by the manufacturer. Mice were treated with vehicle or **1** (10 mg/kg, po) 30 min before carrageenan (300 μ g/paw) stimulus. Three hours after the injection of

carrageenan, mice were euthanized, and the skin tissues were removed and homogenized in lysis buffer and the samples were centrifuged (3000 rpm/10 min, 4°C) and the supernatant was used to assess the levels of total and phosphorylated NF-κB by ELISA following manufacturer instructions. The results were obtained by comparing the optical density of samples and the samples weight.⁵³

Hepatic and gastric toxicity. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) plasmatic levels and MPO activity in the stomach were used as indicators of hepatic and gastric toxicity, respectively.³³ Mice treated daily (during 7 days) with **1** (10 mg/kg, po), vehicle (DMSO 2 % diluted in saline or Tris/HCl buffer, pH 8.0), or indomethacin (2.5 mg/kg) were terminally anesthetized and blood and stomach samples were collected. The blood samples were collected in heparinized tubes and centrifuged (200 ×g, 10 min, 4 °C). AST and ALT plasma levels were determined by using a diagnostic kit from Labtest® according to the manufacturer's instructions. The MPO activity in stomach samples was determined and described previously in the text.

Measurement of Motor Performance. In order to discard possible non-specific muscle relaxant or sedative effects of **1**, mice motor performance was evaluated using the rota-rod test. The apparatus consisted of a bar with a diameter of 2.5 cm, subdivided into four compartments by disks 25 cm in diameter (Ugo Basile, model 7600). The bar rotated at a constant speed of 22 rotations per min. The animals were selected 24 h previously by eliminating those mice that did not remain on the bar for two consecutive periods of 180 s. Animals were treated with vehicle (DMSO 2% in saline) or **1** (10 mg/kg, po), and testing was performed 1.5, 3.5 and 5.5 h after treatment. The cut-off time used was 180 sec.⁶³

Hot-Plate Test. Mice were placed in a 10 cm wide glass cylinder on a hot plate (IITC Life Science Inc. Woodland Hills, CA) maintained at 55 °C. Two control latencies at least 10 min apart were determined for each mouse. The normal latency (reaction time) was 12-20 s. The latency was also evaluated 1, 3 and 5 h after test compound administration. The reaction time was scored when the animal jumped or licked its paws. A maximum latency (cutoff) was set at 30 s to avoid tissue damage.¹⁴

Statistical Analysis. Results are presented as means \pm SEM of experiments made on 5 (Figures 1–3, 5 and 6), 6 (Figures 7 and 8), or 8 (Figures 4 and 9) animals per group and are representative of two separate experiments. Differences between groups were evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Tukey's t test. Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI)/Fundação Araucária and Governo do Estado do Paraná (Brazil).

REFERENCES

- (01) Verri, W.A., Jr.; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. *Pharmacology & Therapeutics*. **2006a**, 112, 116 – 138.
- (02) Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M.; Ferreira, S.H.; Wei, X.; Leung, B.P.; Fraser, A.; McInnes, I.B.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q. 2007. *Eur. J. Immunol.* **2007**, 37, 3373-3380.
- (03) Cunha, T.M.; Verri, W.A., Jr.; Fukada, S.Y.; Guerrero, A.T.G.; Santodomingo-Garzón, T.; Poole, S.; Parada, C.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F. *Eur. J. Immunol.* **2007**, 37(12), 3373–3380.
- (04) Ferreira, S.H.; Lorenzetti, B.B.; Bristow, A.F.; Poole, S. *Nature*. **1988**, 334(6184), 698-700.
- (05) Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Poole, S. *J. Pharmacol.* **1993**, 110(3), 1227–1231.
- (06) Cunha, F.Q.; Lorenzetti, B.B.; Poole, S.; Ferreira, S.H. *British Journal of Pharmacology*. **1991**, 104(3), 765-767.
- (07) Cunha, F.Q., Poole, S.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. *British Journal of Pharmacology*. **1992**, 107(3), 660-664.
- (08) Zarpelon, A.C.; Cunha, T.M.; Alves-Filho, J.C.; Pinto, L.G.; Ferreira, S.H.; McInnes, I.B.; Xu, D.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A., Jr. *British Journal of Pharmacology*. **2013**, 169(1), 90-101.
- (09) Coutaux, A.I.; Adam, F.; Willer, J.C.; Le Bars, D. *Joint Bone Spine*. **2005**, 72, 359–371.
- (10) Villarreal, C.F.; Funez, M.I.; Figueiredo, F.; Cunha, F.Q.; Parada, C.A.; Ferreira, S. H. *Life Sciences*. **2009**, 85(23), 822-829.
- (11) Cury, Y.; Picolo, G.; Gutierrez, V.P.; Ferreira, S.H. *Nitric Oxide*. **2011**, 25, 243–254.
- (12) Poole, S.; Cunha, F.Q.; Selkirk, S.; Lorenzetti, B.B.; Ferreira, S.H. *Brit. J. Pharmac.* **1995**, 115, 684-688.
- (13) Cunha, F.Q., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H. *British Journal of Pharmacology*. **1999**, 127(3), 671-678.

- (14) Navarro, S.A.; Serafim, K.G.; Mizokami, S.S.; Hohmann, M.S.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2013**, *105*, 183–192.
- (15) Valério, D.A.; Georgetti, S.R.; Magro, D.A.; Casagrande, R.; Cunha, T.M.; Vicentini, F.T.M.C.; Vieira, S.M.; Fonseca, M.J.V.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A., Jr. *J. Nat. Prod.* **2009a**, *72(11)*, 1975-1979.
- (16) Valério, D.A.; Ferreira, F.I.; Cunha, T.M.; Alves-Filho, J.C.; Lima, F.O.; De Oliveira, J.R.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Queiroz, R.H.; Verri, W.A. , Jr. *Brit. J. Pharmacol.* **2009**, *158(2)*, 558-568.
- (17) Borghi, S.M.; Carvalho, T.T.; Staurengo-Ferrari, L.; Hohmann, M.S.N.; Pinge-Filho, P.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76(6)*, 1141-1149.
- (18) Verri, W.A., Jr; Vicentini, F.T.M.C.; Baracat, M.M.; Georgetti, S.R.; Cardoso, R.D.; Cunha, T.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Fonseca, M.J.V.; Casagrande, R. Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. In: Atta-ur-Rahman. (Org.). *Studies in Natural Products Chemistry- Bioactive Natural Products. Amsterdam: Elsevier B.V*, **2012**, *36*, 297-330.
- (19) Sachs D., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. *Proc. Nat. Acad. Science.* **2004**, *101(10)*, 3680-3685.
- (20) Cunha, T.M.; Roman-Campos, D.; Lotufo, C.M.; Duarte, H.L.; Souza, G.R.; Verri, W.A., Jr; Funez, M.I.; Dias, Q.M.; Schivo, I.R.; Domingues, A.C.; Sachs, D.; Chiavegatto, S.; Teixeira, M.M.; Hothersall, J.S.; Cruz, J.S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA.* **2010**, *107(9)*, 4442-4447.
- (21) Tonussi, C.R.; Ferreira, S.H. *Eur. J. Pharmacology.* **1994**, *251(2)*, 173-179.
- (22) Shilling, E.E.; Da Costa, F.B.; Lopes, N.P.; Heise, P.J. *Edinburgh Journal of Botany.* **2000**, *03(11)*, 323-332.
- (23) Ambrósio, S.R., Schorr, K., Da Costa, F.B. Ambrósio, S.R., Schorr, K., Da Costa, F.B. *Biochememical Systematics and Ecology.* **2004**, *32(2)*, 221–224.
- (24) Arakawa, N. S.; Schorr, K.; Ambrósio, S. R.; Merfort, I.; Da Costa, F. B. *Zeitschrift fur Naturforschung C.* **2008**, *63(7-8)*, 533-538.
- (25) Tirapelli, C.R.; Ambrosio, S.R.; da Costa, F.B.; Coutinho, S.T.; de Oliveira, D.C.R.; de Oliveira, A.M. *Journal Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57(8)*, 997-1004.

- (26) Ambrósio, S.R.; Tirapelli, C.R.; da Costa, F.B.; de Oliveira, A.M. *Life Sciences*, **2006**, 79 (10), 925-933.
- (27) Tirapelli, C.R.; Ambrosio, S.R.; da Costa, F.B.; de Oliveira, A.M. *European Journal of Pharmacology*, 2004,70 (1), 31-38.
- (28) Ambrósio, S.R., Furtado, N.A.J.C., De Oliveira, D.C.R., Da Costa, F.B., Martins, C.H.G., De Carvalho, T.C., Porto, T.S., Veneziani, R.C.S. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*. **2008**, 63(5), 326-330.
- (29) Rubio, J.; Calderón, J.S.; Flores, A.; Castro, C.; Céspedes, C.L. *Z Naturforsch C*. **2005**, 60, 711-716.
- (30) Kang, O.H.; Chae, H.S.; Choi, J.G.; Oh, Y.C.; Lee, Y.S.; Kim, J.H.; Seung, M.J.; Jang, H.J.; Bae, K.H.; Lee, J.H.; Shin, D.W.; Kwon, D.Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 601(1-3), 179-185.
- (31) Lim, H., Jung, H.A., Choi, J.S., Kim, Y.S., Kang, S.S., Kim, H.P. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, 32(9), 1237-1243.
- (32) Okuyama, E., Nishimura, S., and Yamazaki, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39(2), 405-407.
- (33) Mizokami, S.S.; Arakawa, N.S.; Ambrósio, S.R.; Zarpelon, A.C.; Casagrande, R.; Cunha, T.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A., Jr *Journal Natural Products*. **2012**, 75(5), 896–904.
- (34) Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. *Eur J Pharmacol.* **2000**, 387(1), 111-118.
- (35) Magro, D.A.C.; Hohmann, M.S.N.; Mizokami, S.S.; Cunha, T.M.; Alves-Filho, J.C.; Casagrande, R.; Ferreira, S.H.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A., Jr. *Braz. Jour. Med. Biol. Res.* **2013**, 46(7), 601-606.
- (36) Pavão-de-Souza, G.F.; Zarpelon, A.C.; Tedeschi, G.C.; Mizokami, S.S.; Sanson, J.S.; Cunha, T.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2012**, 101(3), 320-328.
- (37) Maioli, N.A.; Zarpelon, A.C.; Mizokami, S.S.; Calixto-Campos, C.; Guazelli, C.F.S.; Hohmann, M.S.N.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. manuscript in preparation.
- (38) Vale, M.L.; Rolim, D.E.; Cavalcante, I.F.; Ribeiro, R.A.; Souza, M.H.L.P. *Inflammation Research*. **2007**, 56(2), 83-88.

- (39) Hong, Y., Abbott, F.V. *Neuroscience*. **1994**, *63*(3), 827-836.
- (40) Chichorro, J.G.; Lorenzetti, B.B.; Zampronio, A.R. *British Journal of Pharmacology*. **2004**, *141*(7), 1175-1184.
- (41) Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Winter, J.; Wool, C.J. *British Journal of the Pharmacology*. **1995**, *115*(7), 1265-1275.
- (42) Batista, P.A.; Werner, M.F.P.; Oliveira, E.C.; Burgos, L.; Pereira, P.; Brum, L.F.S.; Story, G.M.; Santos, A.R.S. *The Journal of Pain*. **2010**, *11*(11), 1222-1229.
- (43) Cunha, T.M.; Verri, W.A., Jr.; Silva, J.S.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **2005**, *102*(5), 1755-1760.
- (44) Wang, Z.Q.; Porreca, F.; Cuzzocrea, S.; Galen, K.; Lightfoot, R.; Masini, E.; Muscoli, C.; Mollace, V.; Ndengele, M.; Ischiropoulos, H.; Salvemini, D. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *309*(3), 869–878.
- (45) Keeble, J.E.; Bodkin, J.V.; Liang, L.; Wodarski, R.; Davies, M.; Fernandes, E.S.; Coelho, C.F.; Russell, F.; Graepel, R.; Muscara, M.N.; Malcangio, M.; Brain, S.D. *Pain*. **2009**, *141*(1-2), 135–142.
- (46) Lambeth, J.D. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 181–189.
- (47) Drummond, G.R.; Selemidis, S.; Griendling, K.K.; Sobey, C.G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*(6), 453–471.
- (48) Verri, W.A., Jr; Guerrero, A.T.G.; Fukada, S.Y.; Valério, D.A.; Cunha, T.M.; Xu, D.; Ferreira, S.H.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA*. **2008**, *105*(7), 2723-2728.
- (49) Joosten, L.A.B.; Netea, M.G.; Kim, S.H.; Yoon, D.Y.; Oppers-Walgreen, B.; Radstake, T.R.D.; Barrera, P.; Van de Loo, F.A.J.; Dinarello, C.A.; Van den Berg, W.B. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2006**, *103*(9), 3298-3303.
- (50) Li, Q.; Verma, I.M. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*(10), 725–734.
- (51) Barnes, P.J. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 245–254.
- (52) Verri, W.A., Jr; Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Wei, X.Q.; Ferreira, S.H.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **2006b**, *103*(25), 9721-9725.
- (53) Staurengo-Ferrari, L.; Mizokami, S.S.; Silva, J.J.; Silva, F.O.N.; Sousa, E.H.S.; França, L.G.; Matuoka, M.L.; Georgetti, S.R.; Baracat, M.M.; Casagrande, R.;

- Pavanelli, W.R.; Verri, W.A.,Jr. *Journal Pharmacology Biochemistry Behavior*. **2013**, *105*, 157-165.
- (54) Zarpelon, A.C.; Souza, G.R.; Cunha, T.M.; Schivo, I.R.S.; Marchesi, M.; Casagrande, R.; Pinge-Filho, P.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H.; Miranda, K.M.; Verri, W.A.,Jr. *Neuropharmacology*. **2013**, *71*, 1-9.
- (55) Martinez, R.M.; Zarpelon, A.C.; Zimmermann, V.V.M.; Georgetti, S.R.; Baracat, M.M.; Fonseca, M.J.V.; Vicentini, F.T.M.C.; Moreira, I.C.; Andrei, C.C.; Verri, W.A.,Jr.; Casagrande, R. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2012**, *22*(3), 587-597.
- (56) Guazelli, C.F.S.; Fattori, V.; Colombo, B.B.; Georgetti, S.R.; Vicentini, F.T.M.C.; Casagrande, R.; Baracat, M.M.; Verri, W.A.,Jr. *Nat. Prod.* **2013**, *76*(2), 200–208.
- (57) Borghi, S.M.; Carvalho, T.T.; Staurengo-Ferrari, L.; Hohmann, M.S.N.; Pinge-Filho, P.; Casagrande, R.; Verri, W.A.,Jr. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*(6), 1141-1149.
- (58) Magro, D.A.C.; Hohmann, M.S.N.; Mizokami, S.S.; Cunha, T.M.; Alves-Filho, J.C.; Casagrande, R.; Ferreira, S.H.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A.,Jr. *Braz J Med Biol Res*. **2013**, *46*(7), 601-606.
- (59) Zaperlon, A.C.; Cunha, T.M.; Alves-Filho, J.C.; Pinto, L.G.; Ferreira, S.H.; McInnes, I.B.; Xu, D.; Liew, F.Y.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A ,Jr. *Br J Pharmacol*. **2013**, *169*(1), 90–101.
- (60) Campanini, M.Z.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Ivan, A.L.M.; Ferreira, V.S.; Vilela, F.M.P.; Vicentini, F.T.M.C.; Martinez, R.M.; Zarpelon, A.C.; Fonseca, M.J.V.; Faria, T.J.; Baracat, M.M.; Verri, W.A.,Jr.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R. *J. Photochem. Photobiol. B*. **2013**, *127C*, 153-160.
- (61) Bradley, P.P.; Priebat, D.A.; Christensen, R.D.; Rothstein, G.J. *Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206–209.
- (62) Chichorro, J.G.; Lorenzetti, B.B.; Zampronio, A.R. *Br. J. Pharmacol.* **2004**; *141*(7), 1175-1184.
- (63) Valério, D.A.; Cunha, T.M.; Arakawa, N.S.; Lemos, H.P.; Da Costa, F.B.; Parada, C.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Verri, W.A.,Jr. *Eur. J. Pharmac.* **2007**, *562*, 155-163.

Legends to Figures

Structure Sheet

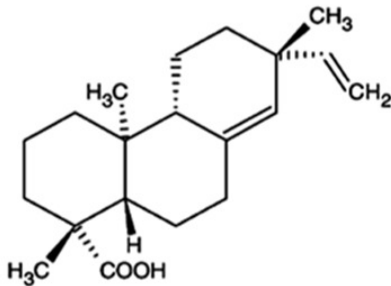


Figure – Pimaradienoic acid (**1**) - (ent-pimara-8 (14),15-dien-19-oic acid).

Figure 1. Pimaradienoic acid (1) inhibits acetic acid-induced writhing response. Mice were treated po (Panel A), ip (Panel B) or sc (Panel C) with **1** (1-10 mg/kg) or vehicle (DMSO 2% diluted in saline) 30 min before acetic acid injection. The cumulative number of abdominal contortions (writhing score) was evaluated over 20 min and is presented at 2 min intervals. Results are provided as means \pm SEM of five mice per group per experiment and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared to the saline group; $\#p < 0.05$ compared to the vehicle group, $**p < 0.05$ compared to the vehicle group and the doses of 1 and 3 mg/kg of **1** (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 2. Pimaradienoic acid (1) inhibits paw flinch and time spent licking the paw induced by formalin and complete Freund's adjuvant (CFA). Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po, 30 min) or vehicle before the injection of formalin (25 μ L of 1.5% formalin in saline, Panels A and B) or CFA (10 μ L/paw, Panels C and D). The total number of flinches (Panels A and C) and time spent licking the paw (Panels B and D) were evaluated for 30 min and expressed in intervals (0-5 and 10-30 min) for the formalin test and entire period (30 min) for CFA test. Results are presented as means \pm SEM of five mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared with the saline group, $\#p < 0.05$ compared to the vehicle group (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 3. Pimaradienoic acid (1) inhibits carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, edema, and myeloperoxidase activity. Mice were treated with **1** (1–10 mg/kg, po, 30 min) or vehicle before carrageenan (300 µg/paw) injection. The intensity of mechanical hyperalgesia (Panel A) and edema (Panel B) were measured 1–5 h after carrageenan injection. The neutrophil migration (MPO activity) was measured 5 h after the carrageenan injection (Panel C). Results are presented as means ± SEM of five mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [*p < 0.05 compared to the saline group; #p < 0.05 compared to the carrageenan group; **p < 0.05 compared to the carrageenan group and with the doses of 1 and 3 mg/kg of **1** groups. (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 4. Treatment with Pimaradienoic acid (1) inhibits mechanical hyperalgesia, edema, and myeloperoxidase activity induced by CFA. Mice were treated daily with **1** (10 mg/kg, po) or vehicle during 7 days, starting 24 h after CFA (10 µL/paw) injection. The mechanical hyperalgesia (Panel A) and edema (Panel B) were measured 3 h after each daily treatment with **1** (1-7 days). On the seventh day, samples of the subcutaneous plantar tissue were collected for MPO activity evaluation (Panel C). Control groups were treated with indomethacin (2.5 mg/kg, po) after CFA (10 µL/paw) injection, once a day, starting at 24 h after stimuli. Results are presented as means ± SEM of eight mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [*p < 0.05 compared to the saline group; #p < 0.05 compared to the CFA group; **p < 0.05 compared to the CFA group and the indomethacin groups. (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 5. Pimaradienoic acid (1) inhibits carrageenan-induced decrease of reduced glutathione (GSH) levels, ferric-reducing ability potential (FRAP assay), and free-radical scavenging ability (ABTS assay), and superoxide anion production (NBT assay). Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po, 30 min) or vehicle before a carrageenan (300 µg/paw) or saline injection. Samples of subcutaneous plantar tissue were collected 3 h after the stimulus and were processed for GSH (Panel A), FRAP (Panel B), ABTS (Panel C) and NBT (Panel D) assays. Results are presented as means ± SEM of five mice per group per

experiment, and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared with the saline group, and $\#p < 0.05$ compared to the vehicle group (one-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 6. Pimaradienoic acid (1) inhibited carrageenan-induced TNF- α , IL-1 β , IL-33 and IL-10 production. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po, 30 min) or vehicle before the ipl injection of carrageenan. Three hours after carrageenan injection, mice were euthanized and cutaneous plantar skin samples were collected for measurement of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-33 (C), and IL-10 (D) levels. Results are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared with the saline group, and $\#p < 0.05$ compared to the vehicle group (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 7. Pimaradienoic acid (1) inhibits carrageena-induced NF κ B activation. Mice were treated with **1** (10 mg/kg, po, 30 min) or vehicle before the ipl injection of carrageenan. Three hours after carrageenan injection, mice were euthanized and paw skin samples were collected for the determination of NF κ B levels. Results are presented as means \pm SEM of six mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [$*p < 0.05$ compared with the saline group, and $\#p < 0.05$ compared to the vehicle group (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 8. Pimaradienoic acid (1) inhibits inflammatory pain by activating the NO – cyclic GMP – protein kinase G – ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. Mice were treated with L-NAME (NOS inhibitor, 90 mg/kg, ip) 60 min before treatment with **1** (10 mg/kg, po) (Panel A). After an additional 30 min, mice received an ipl injection of carrageenan (300 μ g/paw), and mechanical hyperalgesia was evaluated after 3 h (peak of hyperalgesia). Mice were treated with ODQ (Panel B, soluble cGMP inhibitor; 0.3 mg/kg, ip, diluted in 2% DMSO in saline), KT5823 (Panel C, PKG inhibitor; 0.5 μ g/mice, ip, diluted in 2% DMSO in saline, 5 min), glybenclamide (Panel D, ATP-sensitive potassium channel blocker; 0.3 mg/kg, ip, diluted in 5% of Tween 80 in saline, 45 min) or the respective vehicle before **1** (10 mg/kg, po). After an additional 30 min mice received an ipl injection of

carrageenan (300 µg/paw). Mechanical hyperalgesia was measured 1, 3, and 5 h after stimulus injection. Results are presented as means ± SEM of five mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [* p <0.05 compared with the saline group, # p <0.05 compared to the vehicle(s) group, ** p <0.05 compared to the groups treated with **1** and L-NAME, (Panel A), with **1** and ODQ (Panel B), with **1** and KT5823 (Panel C) and with **1** and Glybenclamide (Panel D) (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 9. Pimaradienoic acid (1) does not increase plasma levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotrasferase (ALT) and myeloperoxidase (MPO) activity in the stomach. Mice were treated daily (during 7 days) with **1** (10 mg/kg), vehicle (DMSO 2% diluted in saline or Tris/HCl buffer, pH 8.0), or indomethacin (2.5 mg/kg). After seven days of treatment, mice were terminally anesthetized and blood and stomach samples were collected for AST (A) and ALT (B) plasma level and gastric MPO activity (C) determination, respectively. Results are presented as means ± SEM of eight mice per group per experiment, and are representative of two separate experiments. [*p < 0.05 compared with the saline group or **1** groups (One-way ANOVA followed by Tukey's test)].

Figure 1

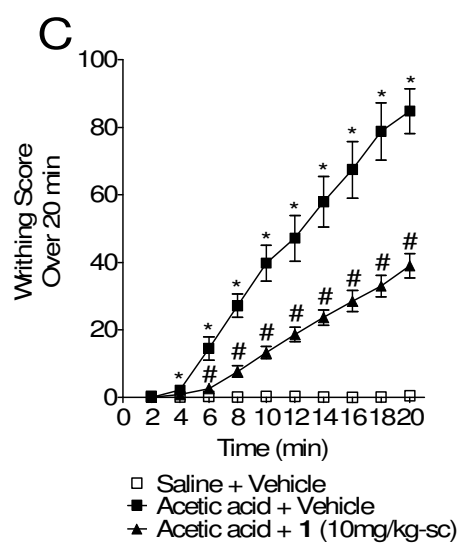
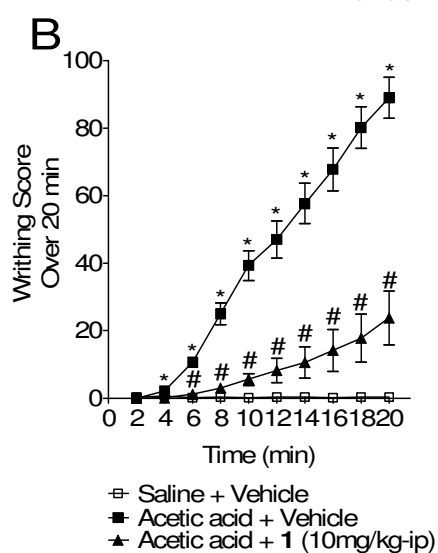
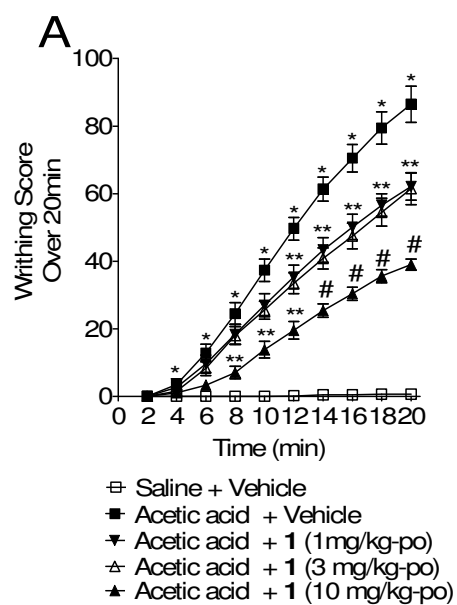


Figure 2

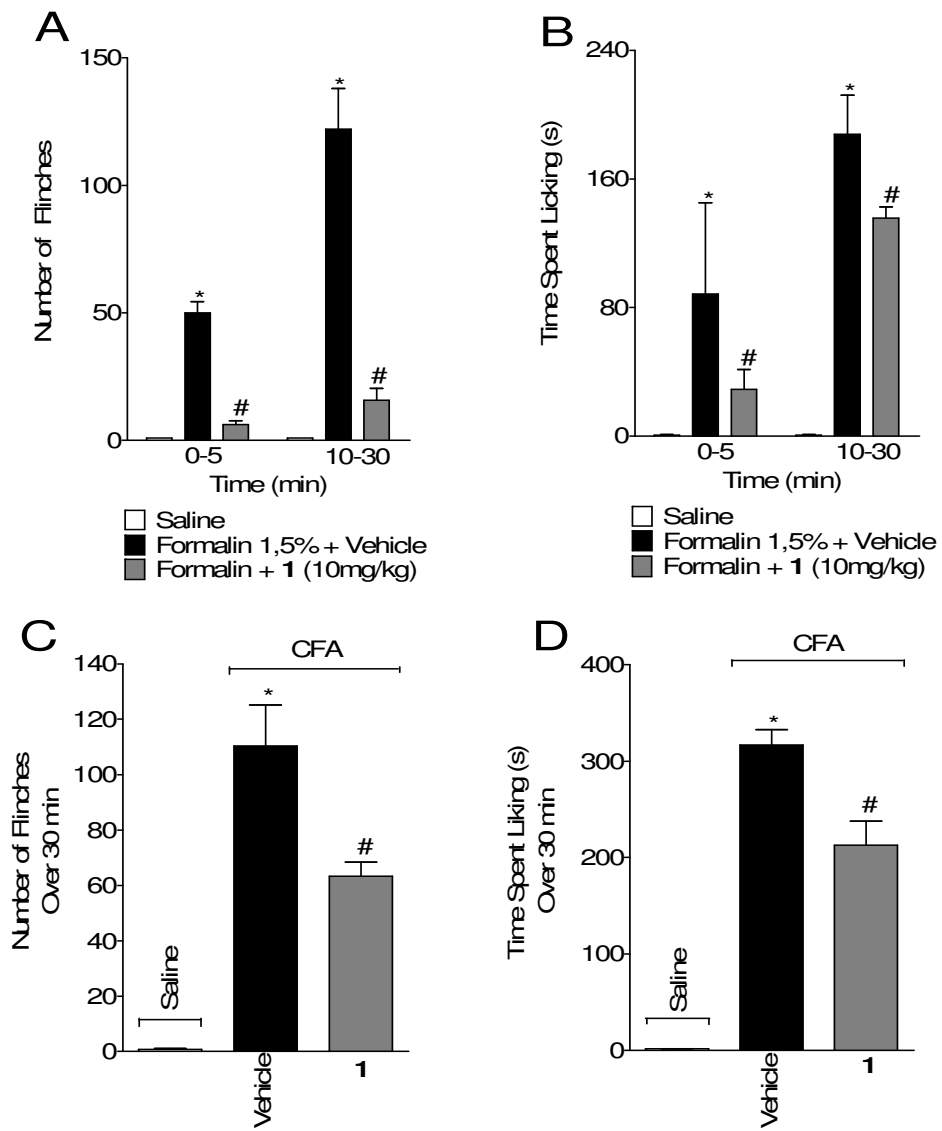


Figure 3.

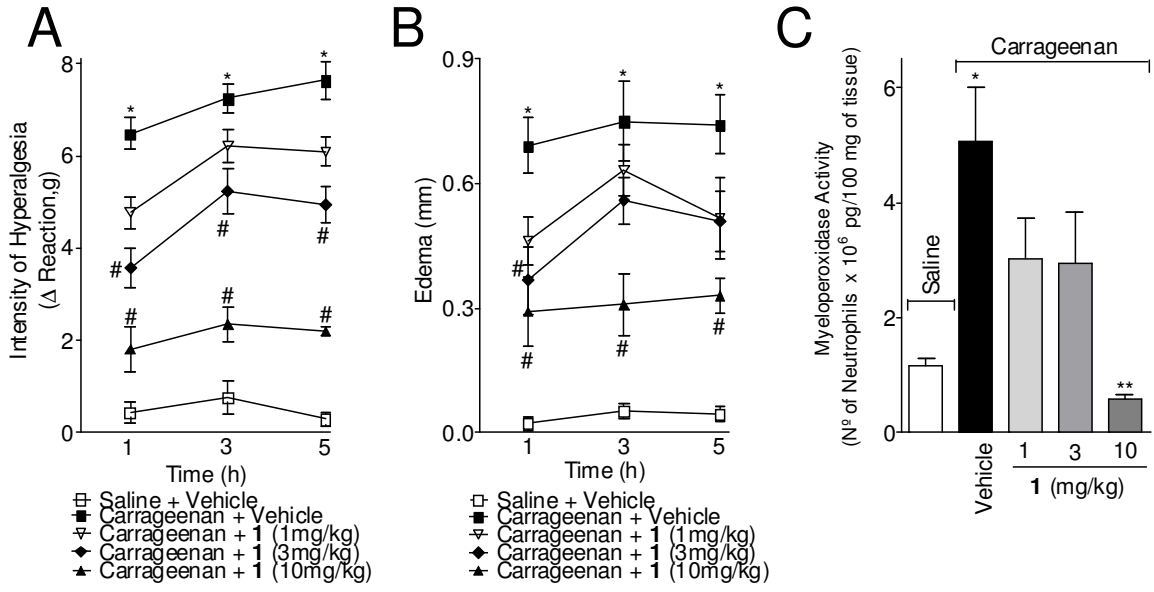


Figure 4.

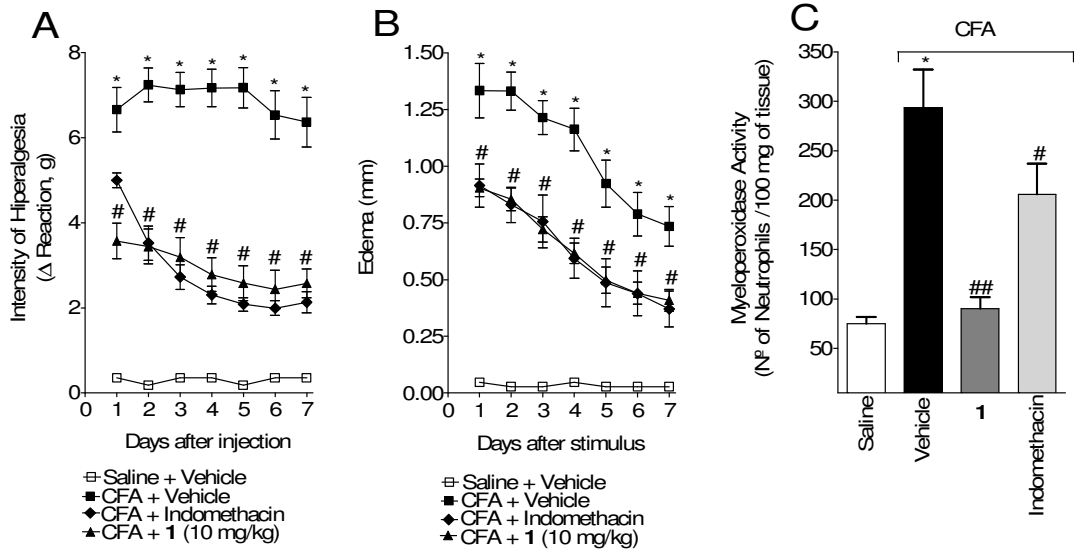


Figure 5.

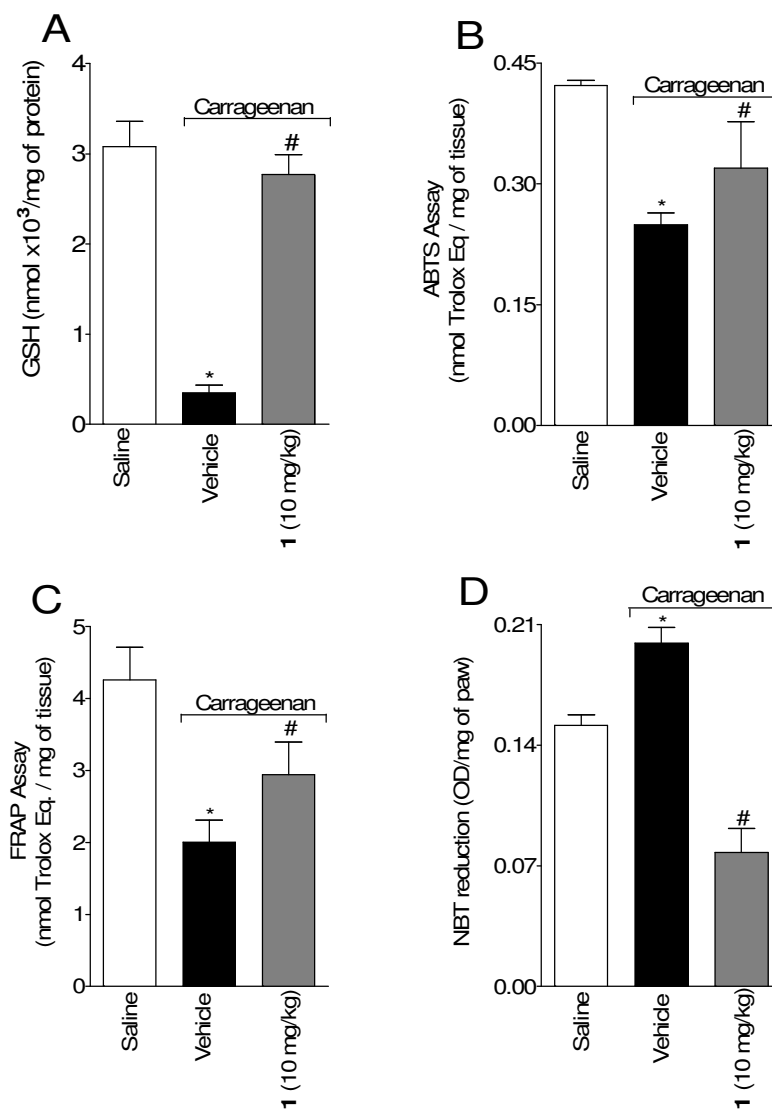


Figure 6.

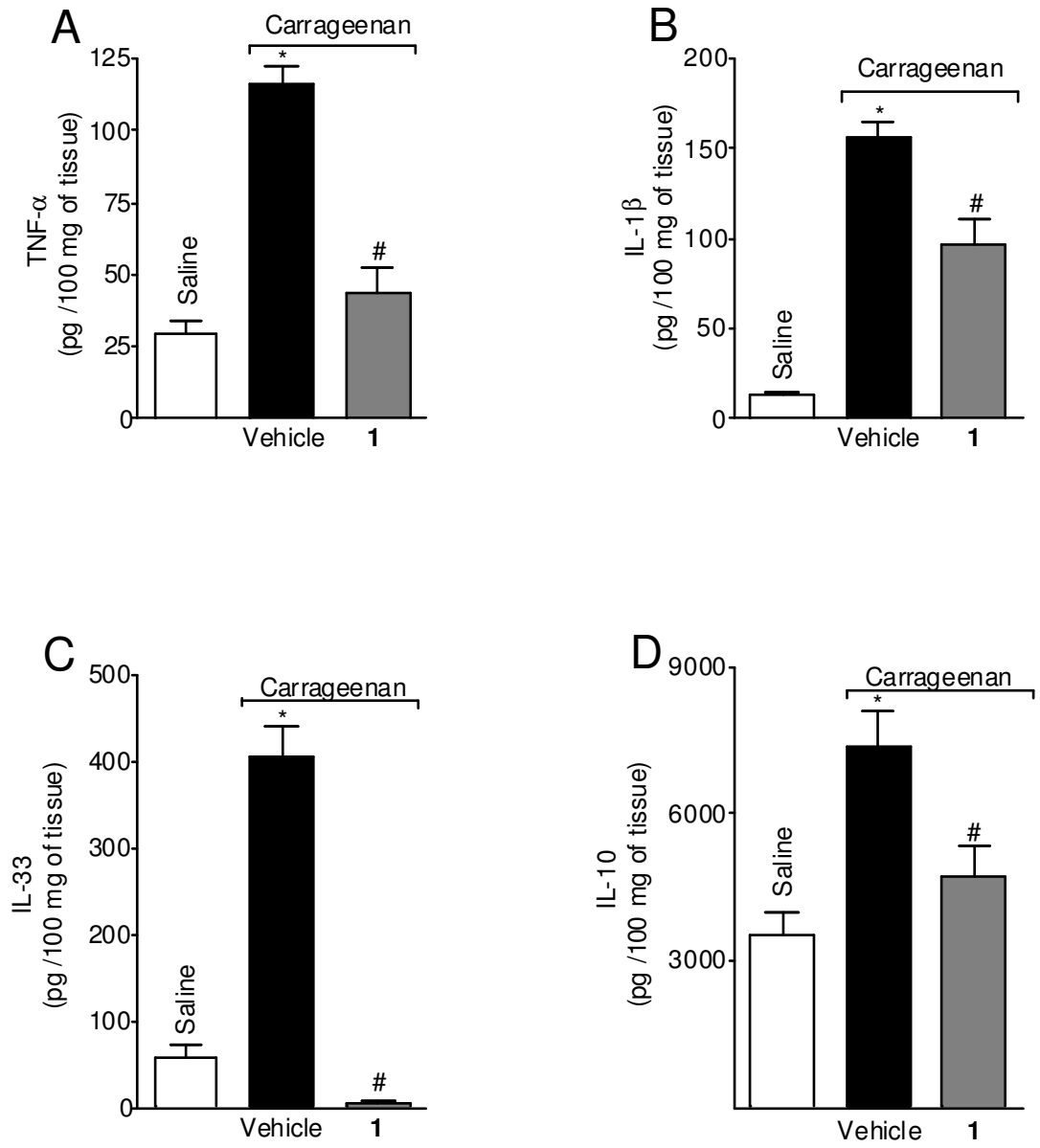


Figure 7.

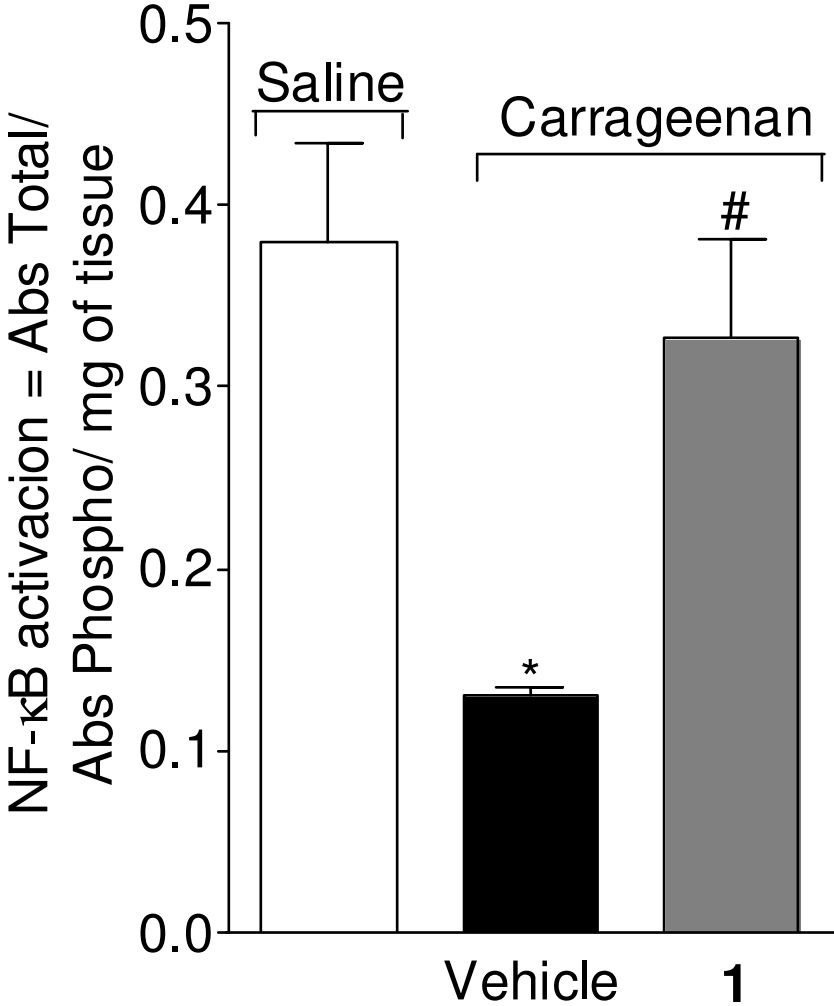


Figure 8

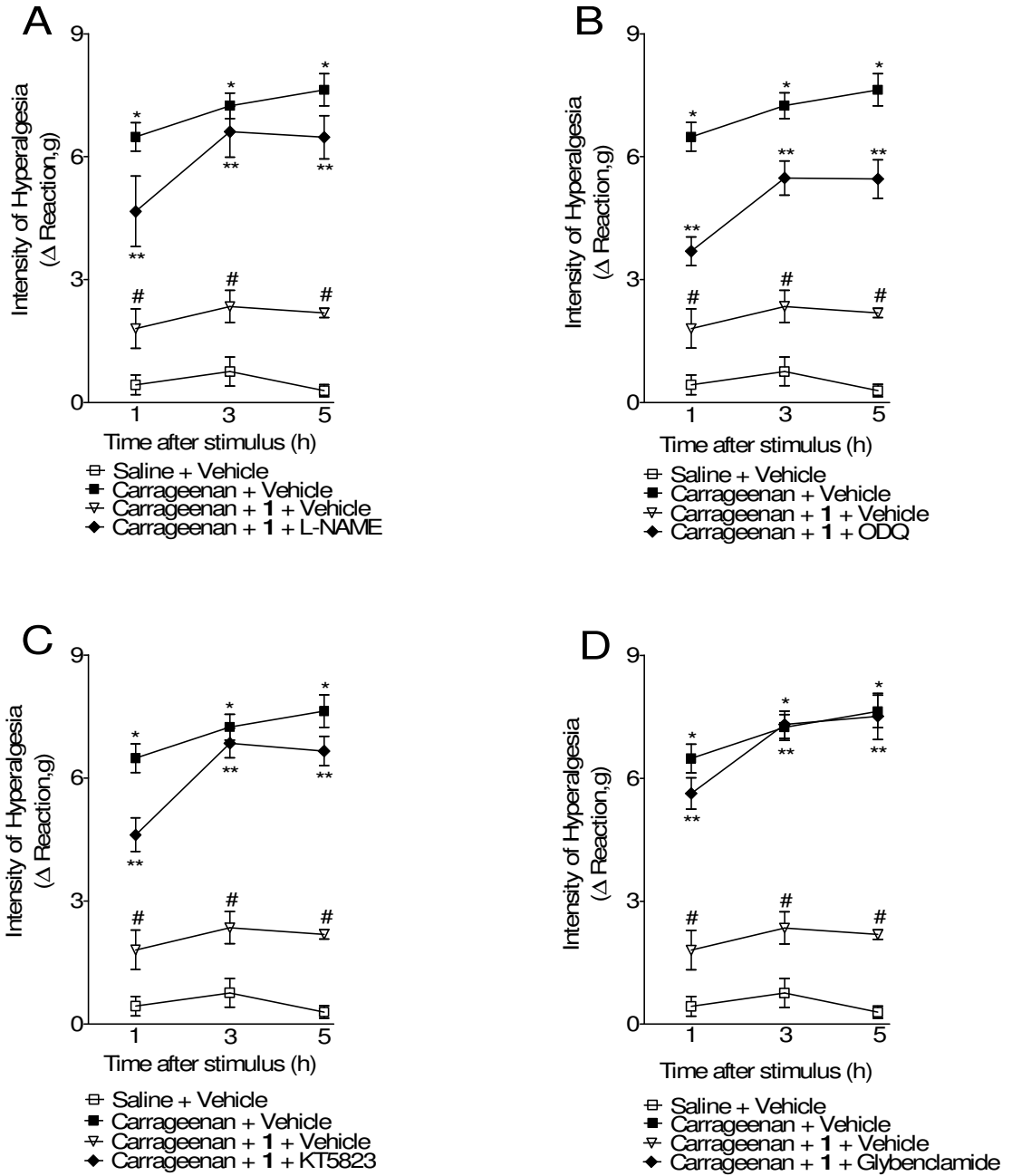
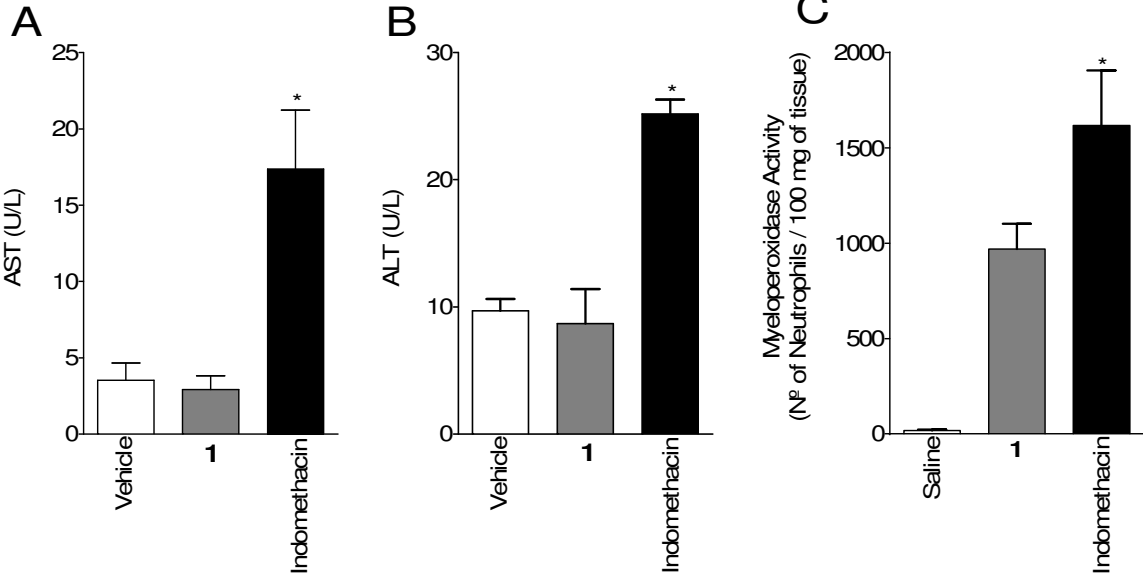
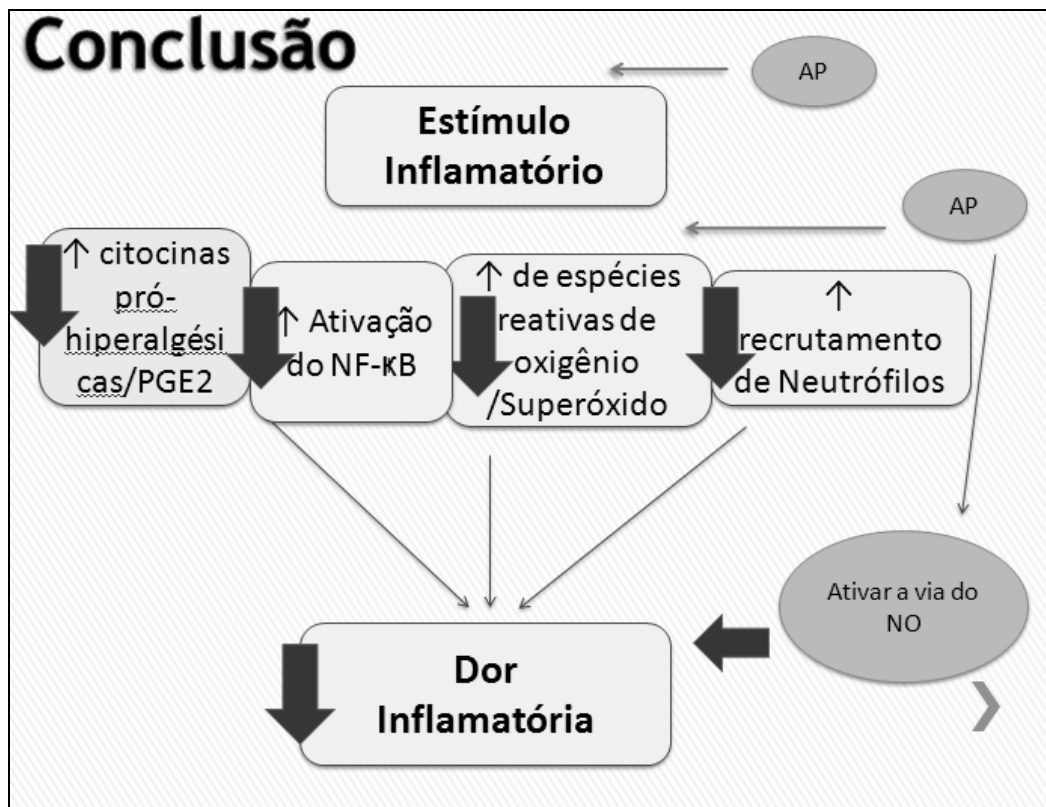


Figure 9.



6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o AP apresenta atividade analgésica e anti-inflamatória em diferentes modelos *in vivo* e os mecanismos de ação envolvem ativação da via do NO-GMPc-PKG-ATP sensíveis a sinalização dos canais de potássio, inibição da fosforilação do NF- κ B, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e atividade antioxidante.



7 REFERÊNCIAS

Aggarwal, B.B.; Sung, B.; Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Cel**, vol.30, n.2, p.85-94, 2008.

Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v.357, p.593-615, 2001.

Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p. 40-56, 2004.

Alves-Filho, J.C.; Sônego, F.; Souto, F.O.; et al., Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v.16, n 6, p.708-713, 2010.

Ambrósio, S.R.; Tirapelli, C.R.; Bonaventura, D.; De Oliveira, A.M.; Da Costa, F.B. Pimarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v 73, p.484–489, 2002.

Ambrósio, S.R., Schorr, K., Da Costa, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochememical Systematics and Ecology**. v.32, p 221–224, 2004a.

Ambrósio, S. R.; Furtado, N. J. C.; Oliveira, D.C.R.; da Costa, F.B.; Martinsa, C.H.G ; Carvalho, T.C.; Porto, T. S.; Veneziana, R.C.S. Trypanocidal Activity of Pimarane Diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Z. Naturforsch.** V.63c, p.326-330, 2008.

Arakawa, N. S.; Schorr, Karin; Ambrósio, S. R. ; Merfort, Irmgard ; Da Costa, F. B. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v. 63c, p. 533-538, 2008.

Basbaum, Al.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular

mechanisms of pain. **Cell**, v.139, n.2, p.267-284, 2009.

Bereta, M.E.; Fernandes, A.C.; Schneider, A.A.; Ritter, M.R. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, n.3, p. 189-216, 2008.

Bodera, P. et.al. Changes in antioxidant capacity of blood due to mutual action of electromagnetic field and opioid drug in animal model of persistent inflammatory state. **Pharmacological Reports**, n.65, p.421-428, 2013.

Borghi, S.M.; Carvalho, T.T.; Staurengo-Ferrari, L.; Hohmann, M.S.N.; Pinge-Filho, P.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines **Journal of Natural Products**, v.76, n.6, p 1141-1149, **2013**.

Borish, L.; Steinke, J.W. Interleukin-33 in Asthma: How Big of a Role Does It Play? **Current Allergy and Asthma Reports**, v.11, n.1, p 7–11, 2011.

Calixto, J.B. Anti-inflammatory Compound of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxid and Nuclear Factor kB (NF-kB). **Planta Medica**, v.69, p.9973-983, 2003.

Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. **Planta Medica**, v.70, n.2, p.93-103, 2004.

Casagrande, R.; Georgetti, S.R.; Verri Jr., W.A.; Dorta, D.J.; Santos, A.C.; Fonseca, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.84, n.1, p.21-27, 2006.

Castrillo, A.; de Las Heras, B.; Hortelano, S.; Rodriguez, B.; Villar, A.; Bosca, L. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity

and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.19, p.15854-15860, 2001.

Cavalcanti, C.; Costa-otuf, L.V.; Moraes, M.O.; Burbano, R.R.; Silveira, E.R.; Cunha, K.M.; Rao, V.S.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Henriques, J.A.; Pessoa, C.; Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, abioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicology**, v.44, p.388–392, 2006.

Cechinel Filho, V.; Da Silva, K.L. Plantas do gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Química Nova**, v.25, n. 3, p.449-454, 2002.

Chackerian, A.A.; Oldham, E.R.; Murphy, E.E.; Schmitz, J.; Pflanz, S.; Astele, R.A. IL-1 Receptor Accessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex, **The Journal of Immunology**; v.179, p.2551-2555, 2007.

Chapman, S., Cancer pain part 1: causes and classification. **Nursing Standard**, v.26, n.47, p.42-46, 2012.

Chapman C.R. Pain perception and assessment. **Minerva Anestesiologica**; v.71, n.7-8, p.413-417, 2005.

Chapman C.R., Opioid Pharmacotherapy for Chronic Noncancer Pain: The American Experience. **Korean Journal Pain**. v.26, n.1, p.3-13, 2013.

Cheung, H.T.; Fu, S.L.; Smal, M.A. Inhibition of platelet aggregation by diterpenes acids from Pinus massoniana resin. **Arzneimittelforschung**, v.44, n.1, p.17-25, 1994.

Choi, R.J.; Shin, E.M.; Jung, H.A.; Choi, J.S.; Kim, Y.S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v.18, n.8, p.677-682, 2011.

Chung, J.M. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Persistent Pain.

Molecular Interventions, v.4, n.5, p.248-250, 2004.

Cotran, R.S.; Kumar, K.; Robbins, S.L.; Collins, T. Robbins and Cotran. **Pathologic basis of diseases**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. 1450p.

Coutaux A., Adam F., Willer J.C., AND Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**,v.72, n.5, p. 359–371, 2005.

Cunha,T.M.; Verri, W. A Jr.; Silva, J. S.; Poole, S., Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Pharmacology National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5 p.1755–1760, 2005.

Cunha, T.M.;Verri, W. A Jr. Neutrophils: are they hyperalgesic or anti-hyperalgesic? **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, p 727-728, 2006.

Cunha, T.M.; Verri, W.A.Jr.; Schivo, I.R.; Napimoga, M.H.; Parada; C.A.; Poole, S.; Teixeira, M.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, n.4, p.824-832, 2008.

Cunha, T.M.; Talbot, J.; Pinto, L.G.; Vieira, S.M.; Souza, G.R.et al., Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1b maturation. **Molecular Pain**, v 6 n.63, p.1-10, 2010.

Dal Secco, D.; Paron, J.A.; de Oliveira, S.H.; Ferreira, S.H.; Silva, J.S.; Cunha, F.de Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.9, n.3, p.153-164, 2003.

Dal Secco, D.; Moreira, A.P.; Freitas, A.; Silva, J.S.; Rossi, M.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.15, n.1, p.77-86, 2006.

Dal-Secco D.; et al. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Immunology**, v.181, n.6, p.4287-4298, 2008.

Dang, N.H.; Zhang, X.F.; Zheng, M.K.; Son H.;Chang, H.W.; Kim, H.P.;Bae, K.; Kang, S.S. Inhibitory Constituents against Cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb **Archives Pharmacal Research**. v. 28, n.1, p.28-33, 2005.

De Las Heras, B.; Navarro, A.; Díaz-Guerra, M.J.; Bermejo, P.; Castrillo, A.; Boscá, L.; Villar, A. Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-kappaB by andalusol. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.3, p.605-612, 1999.

Dessauer, C.W.; Scully, T.T.; Gilman; A.G. Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.35, p.22272-22277, 1997

Dewick, P M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v.14, n.2, p.111-44,1997.

Dinarelli, C. A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Survey of Immunologic Research**, v.3, n.1, p.29–33, 1984.

Dinarelli, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **International Reviews of Immunology**, v.16, n.5-6, p.457–499, 1998

Dinarelli, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v.117, n.14, 2011.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Map kinases in the immune response. **Annual Review Immunology**, v.20, p.55–72, 2002.

Duarte I.D., Nakamura M., Ferreira S.H. Participacion of the sympathetic system in

acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.341-343, 1988.

Dusse, L.M.S., Vieira, L.M., Carvalho, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

Ferreira, S.H.; Nakamura, M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v.18, n.2, p.179–190, 1979a

Ferreira, S.H.; Lorenzetti, B.B.; Bristow, A.F.; Poole, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, n.6184, p.698–700, 1988.

Ferreira, S.H.; Lorenzetti, B.B.; Poole, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.100, n.3, p.1227-1231, 1993.

Gattorno, M.; Tassi, S.; Carta, S.; et al. A. Pattern of interleukin-1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. **Arthritis & Rheumatism**, v.56, n.9, p.3138–3148, 2007.

Gold, M.S.; Reichling, D.B.; Shuster, M.J.; Levine, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.93, p.1108-1112, 1996

Greten, F.R.; Arkan, M.C.; Bollrath, Hsu, J Li-Chung ; Goode, J. et al. NF- κ B is a Negative Regulator of IL-1 β Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK β , **Cell**, v.130, p.918–931, 2007

Guazelli, C.F., Fattori, V., Colombo, B.B., Georgetti, S.R., Vicentini, F.T.M., Casagrande, R., Baracat, M.M. and Verri, W.A., Jr. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms, **Journal of Natural Products**, v.76 n.2, p 200–208, 2013.

Gupta, S.; Prakash, J. Studies on Indian Green Leafy Vegetables for Their Antioxidant Activity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v 64, p.39–45, 2009.

Halliwell, B., Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**; v.54, p.505-510, 1995.

Hipólito, U.V., Rodrigues, G.J., Lunardi, et al. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3beta-ol in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**. v.616, n.1-3, p.183–191, 2009.

Hipólito U.V.; Rocha, J.T.Palazzin, N.B.; Rodrigues, G.J., Crestani, C.C.; Corrêa, F.M., Bonaventura D.; Ambrosio, S.R.; Bendhack, L.M.; Resstel, L.B., Carlos R. Tirapelli, C.R.; **European Journal of Pharmacology**. v.660 p.402–410, 2011.

Huttenlocher, A.; Sandborg, R.R.; Horwitz, A.F. Adhesion in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v 7, p.697-706, 1995.

Johansson, A.C.; Hansson, A.S.; Nandakumar, K.S.; Backlund, J.; Holmdahl, R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with antitype II collagen antibodies. **Journal of Immunology**, v.167, n.6, p.3505–3512, 2001.

Jung, H.A.; Lee, E.J.; Kim, J.S.; Kang, S.S.; Lee, J.H.; Min, B.S.; Choi, J.S. Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*. **Archives of Pharmacal Research**, v.32, n.10, p.1399-1408, 2009.

Kakkar, R.; Hei, H.; Dobner, S.; Lee, R.T. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. **The Journal of the Biological Chemistry**, v.287, n.9, p.6941-6948, 2012.

Kang, O.-H.; Chae, H.-S.; Choi, et al. Ent-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid isolated from the roots of *Aralia cordata* inhibits induction of inflammatory mediators by blocking NF- κ B activation and mitogen-activated protein kinase pathways. **European Journal of Pharmacology** v.601, p. 179–185, 2008.

Kassuya, C.; Ferreira, J ; Claudino, R.F.; Calixto, J.B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology**. V.150, p.727–737, 2007.

Klauman, P. R.; Wouk, A. F. P. F.; Sillas, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p. 1-12, 2008.

Kopinová, J.; Púzserová, A.; Bernátová, I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. **Toxicology**; v 4,n.2, p.63–68, 2011.

Lehoux, G.; Le Gouill, C.; Stankova, J.; Rola-Pleszczynski, M. Upregulation of expression of the chemokine receptor CCR5 by hydrogen peroxide in human monocytes. **Mediators of Inflammation**, v.12, n.1, p.29-35, 2003.

Limón-Pacheco,J.; Gonsebatt , M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, n.674, p.137–147, 2009

Leung, C.H.; Grill, S.P.; Lam, W.; Han, Q.; Sun, H.D.; Cheng, Y.C. Novel mechanism of inhibition of nuclear factor-kappa B DNA-binding activity by diterpenoids isolated from *Isodon rubescens*. **Molecular Pharmacology**, v.68, n.2, p. 286-297, 2005.

Lim, H.; Jung, H.A.; Choi, J.S.; Kim, Y.S.; Kang, S.S.; Kim, H.P. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.32, n.9, p.1237-1243, 2009.

Loeser, J.D.; Melzack, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v.353, n.9164, p.1607-1609, 1999.

Loram, L.C.; Fuller, A.; Cartmell, T.; Mitchell, B.; Mitchell, D. Behavioural, histological and cytokine responses during hyperalgesia induced by carrageenan injection in the rat tail. **Physiology & Behavior**, v.92, n.5, p.873-880, 2007.

Lorenzetti, B.B.; Veiga, F.H.; Canetti, C.A.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **European Cytokine Network**, v.13, n.4, p.456–461, 2002.

Lozoya, X.; Enriquez, R.G.; Bejar, E. et al. The zooplate V. The effect of kauradienoic acid upon uterine contractility. **Contraception**, v.258,p.297-301, 1983.

Maciel, M. A. M. et al.; Plantas Medicinai: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.429 – 438, 2002.

May, M.J., Ghosh,S. Signal transduction through NF- κ B. **Immunology Today**, v.19, n.2, p.80 –88,1998.

Magro, D.A.C ; Hohmann, M.S.N.; Mizokami, S.S.; Cunha, T.M., et al., An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.46, n.7, p.601-606, 2013.

Marchand, F.; Perretti, M.; McMahon, S.B. Role of the Immune System in Chronic Pain. **Neuroscience**, v.6, p.520-532, 2005.

McGarvey, D. J. e Croteau, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, vol.7, p.1015-1026, 1995.

Merskey, H. Some Features of The History of The Idea of Pain. **Pain**. v.9, n.1, p.3-8, 1980.

Michael J. Docherty, MD, R. Carter W. Jones III, MD, PhD, and Mark S. Wallace, MD. Managing Pain in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v.7, n.9, p.592-601, 2011.

Michaela, K. Nociceptor Sensitization by Proinflammatory Cytokines And Chemokines. **The Open Pain Journal**, v.3, p.97-107, 2010.

Miller, A.M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, v.8, n.22, p.1-12, 2011.

Mizokami, S.S.; Arakawa, N.S.; Ambrosio, S.R.; Zarpelon, A.C.; Casagrande, R.; Cunha, T.M.; et al. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Journal Natural Products**; v.75, n.5, p.896–904, 2012.

Mon, M.M.; Maw, S.S.; Oo, Z.K. Quantitative Determination of Free Radical Scavenging Activity and Anti-tumor Activity of Some Myanmar Herbal Plants. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.51, p.523-529, 2011.

Moncada, S.; Higgs, E.A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p.2002-2012, 1993.

Monga, T.N.; Grabois, M. Conceptual Models of Pain and Its Management. In _____ **Pain Management in Rehabilitation**. New York: Demos Medical publishing, p.1-21, 2002.

Monga, T.N.; Grabois, M. The Evaluation of Pain Complicating Primary Disabling Disease. In _____ **Pain Management in Rehabilitation**. Bloodworth, D.M. New York: Demos Medical publishing, p.23-34, 2002.

Nakamura, M., Lico M.C. Mechanism of peripheral pain in the conscious guinea pig: effect of propranolol. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, n.3, p. 451-453, 1986.

Nakamura M., Ferreira, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, n.2, p.145-153, 1987.

Oeckinghaus, A.; Hayden, M.S.; Ghosh, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, v.12, n.8, p. 695-708, 2011.

Okuyama, E.; Nishimura, S.; Yamazaki, M. Analgesic Principles from *Aralia Cordata* Thunb. **Chemical. Pharmaceutical. Bulletin**, v.39, p.405–407, 1991.

Pavanelli, W.R.; Silva, J.J.N. The Role of Nitric Oxide in Immune Response Against *Trypanosoma Cruzi* Infection. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 2, p.1-6, 2010.

Poole, S., Cunha, F. Q., Selkirk, S., Lorenzetti, B. B., & Ferreira, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **British Journal of the Pharmacology**, v.115, n.4, p.684–688,1995.

Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. **Cytokines and Pain**, p.59-87, 1999.

Porto, T.S.; 1, Rangel, R.; et al. Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial Activity against Oral Pathogens. **Molecules**, v.14, n.1, p. 191-199, 2009.

Queiroz, S.L.; Batista, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v.22, n.4, p.584-590, 1999.

Radomski, M.W ; Palmer, R.M.J ; Moncada, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **British. Journal. Pharmacology.**, v.92, p.181-187, 1987.

Rahimi, R.; Mozaffari, S.; Abdollahi, M. On the use of herbal medicines in management of inflammatory bowel diseases: a systematic review of animal and human studies. **Digestive Diseases and Sciences**, v.54, n.3, p.471-480, 2009.

Ramos, D.F.; Leitão, G.G.; Costa, F.N.; Abreu, L.; Villarreal, J.V.; Leitão, S.G.; Fernández, S.L.S.; Silva, P.E.A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.669-674, 2008.

Ribeiro, R. A.; Vale, M. L.; Ferreira, S. H.; & Cunha, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal Pharmacology**, v.391, n.1–2,

p.97–103, 2000a.

Saade, N. E.; Nasr, I.W.; Massaad, C. A.; Safieh-Garabedian, B.; Jabbur, S. J.; Kanaan, S. A. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and cytokine upregulation by interleukins 10 and 13. **British Journal of the Pharmacology**, v.131, n.7, p.1317–1324, 2000.

Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Allchorne, A.; Winter, J.; Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of the Pharmacology**. V.115, n.7, p.1265-1275, 1995.

Schaible, H.G.; Ebersberger, A.; Natural, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research & Therapy**, v.13, n.210, p.1-8, 2011.

Schmitz, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v.23, n.5, p.479-490, 2005.

Schilling, E.E., Da Costa, F.B., Lopes, N.P., Heise, P.J.,. Brazilian species of *Viguiera* (Asteraceae) exhibit low levels of its sequence variation. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 3, p.323–332, 2000.

Seal, T.; Gupta, S.; Sarma, S.; Mao, A.A. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v 5, n.4, p.33-40, 2013

Silva, J.J.; Osakabe, A.L.; Pavanelli, W.R.; Silva, J.S.; Franco, D.W. In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors. **British Journal of Pharmacology**, v.152, n.1, p.112-121, 2007.

Staurengo-Ferrari, L.; et al., The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)₂(NO)SO₃](PF₆), inhibits inflammatory pain: Involvement of TRPV1 and cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway **Journal. Pharmacology Biochemistry**

Behavior,v.105, p.157-165, 2013

Sunder A.S., Dhulipala S., Thota S., Yerra R., Balzarini J., De Clercq E. Antinociceptive and antitumor activity of novel synthetic mononuclear Ruthenium (II) compounds. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v.18, n.3, p.215-221, 2013.

Teixeira, M.J.; Teixeira, W.G.J.; Santos, F.P.S.; et al. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. **Revista de Medicina**, v.80 (ed.esp.,pt.1), p.1-21, 2001.

Tirapelli, C. R., Ambrosio, S. R., Da Costa, F. B., Coutinho, S. T., de Oliveira, D. C., de Oliveira, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology** .n. 492, p. 233–241, 2004b.

Tirapelli, C. R., Ambrosio, S. R., da Costa, F. B., Coutinho, S. T., de Oliveira, D. C. R., de Oliveira, A. M. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoicacid. **Journal. Pharmacy. Pharmacology**. p. 57: 997–1004, 2005.

Tirapelli, C.R.; Ambrosio, S.R.; da Costa, F.B.; de Oliveira, A.M. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v.3, n.1, p.1-8, 2008.

Tirapelli, C.R.; Ambrosio, S.R.; de Oliveira, A.M.; Tostes, R.C. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v.81, n.7, p.690-702, 2010.

Toohey, N.; Klein, M.T.; Knight, J.; Smith, C.; Teitler, M. Human 5HT₇ Receptor-Induced Inactivation of Forskolin-Simulated Adenylate Ciclase by Risperdone, 9-OH-Risperdone and Other “Inactivating Antagonists”. **Molecular Pharmacology**, v.76, n.3, p.552-559, 2009.

Umera Begam, A.K.; Manoharan,N.; Sirajudeen, J.; Abdul Jameel, A. Effect of some indian traditional plants on few common pathogens. **Advances in Applied Sciences Research**, v.1,n.3, p. 205-211, 2010.

Valério, D.A.; Georgetti, S.R.; Magro, D.A.; et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal Natural Products**, v.72, n.11, p.1975-1979, 2009.

Verri, W.A.Jr., Molina, R.O; Schivo, I.R; Cunha, T.M; Parada, C.A; Poole, S; Ferreira, S.H; Cunha, F.Q. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats. **Journal Pharmacology & Experimental Therapeutics**; v.315, n.2, p.609-615, 2005.

Verri, W.A.Jr., Cunha, T.M.; Parada, C.A.; Poole, S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116–138, 2006b.

Verri, W.A.Jr.; et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.105, n.7, p.2723-2728, 2008.

Verri, W.A Jr; Souto, F.O; Vieira, S.M; Almeida, S.C.; Fukada, S.Y.; Xu, D. et al., IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.69,n.9, p.1697-703, 2010.

Zarpelon, A. C.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C.; Pinto, L. G.; Ferreira, S. H.; McInnes, I. B.; Xu, D.; Liew, F. Y.; Cunha, F. Q.; Verri, W. A., Jr. Interleukin-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E(2).**British Journal of Pharmacology**, v.169, p.90-101, 2013.

8 ANEXO

ANEXO A - Normas do Periódico Journal of Natural Products
Preparation and Submission of Manuscripts
(Revised Jan 2014)

Contents (click on the topic) Preparation and Submission of Manuscripts – Title Page – Abstract – Introduction – Results and Discussion – Experimental Section – Acknowledgment – References and Notes – Nomenclature – Abbreviations – Graphics – Chemical Structures – Tables – Figures – Table of Contents Graphic Recommendations for Crystal Structure Papers – **Published Manuscript – Reviewer’s Material | Supporting Information | Journal Publishing Agreement | Author List | Professional Ethics | Manuscript Submission** – Web Submission – General File Preparation – Currently Acceptable Word Processing Packages | **ACS Policies for E-prints and Reprints | Galley Proofs | Corrections**

Title Page

The title should appear on a separate page and should be followed by the author names and the institution name and address. The title, author name(s), and affiliations should all appear on their own respective line of text. Place an asterisk after the name of the author to whom enquiries regarding the paper should be directed and include that author’s telephone and fax numbers and e-mail address. Author affiliations must be footnoted using the following symbols in order (which should be used as superscripts): †, ‡, §, ⊥, ||, ∇, O. In article titles, the words “new” or “novel” (with the latter referring specifically to a compound based on an unprecedented carbon skeleton) should not be included, and the number of new substances obtained should not be specified.

Abstract

The abstract, detailing, in one paragraph, the problem, experimental approach, major findings, and conclusions, should appear on the second page. It should be double spaced and should not exceed 200 words for Full Articles and Reviews or 100 words for Notes and Rapid Communications. Compounds mentioned in the abstract, and given as specific Arabic numerals that are bolded in the text, should also be accompanied in the abstract by the same bolded numerals. The abstract should be on a separate page and should be provided with the bolded and capitalized heading “ABSTRACT”.

Introduction

The manuscript should include an untitled introduction stating the purpose of the investigation and relating the manuscript to similar research.

Results and Discussion

The “Results and Discussion” should be presented as a coherent whole section, in which the results are presented concisely. The discussion should interpret the results and relate them to existing knowledge in the field in as clear and brief a fashion as possible. Tables and figures should be designed to maximize the presentation and comprehension of the experimental data. Authors submitting a manuscript as a Note should omit the heading “Results and Discussion”. For Full Articles of unusual length, subheadings may be included within the “Results and Discussion” section. The major heading “RESULTS AND DISCUSSION” should be bolded and capitalized, with the text starting on the line following. Subheadings are indented, followed by a period, and are a mix of uppercase and lowercase letters. The text follows on the same line as the subheading.

Bolded structural code numbers should only be used for new compounds and for those known compounds for which new biological data or spectroscopic values are being reported. Other known compounds should be referred to in the text by name, wherever necessary. Sugar units in glycosides should not be inferred as D or L based solely on NMR data analysis, but should be determined by supporting experimental work such as measurement of their optical rotations following acid hydrolysis or by the preparation of chiral derivatives and comparison with standards using a chromatographic analytical method. If the aglycone of a glycoside is also a new compound, then it should be isolated and its physical constants and spectroscopic parameters stated. Authors are advised to use correctly the terms “relative and absolute configuration” instead of “relative and absolute stereochemistry”. In, for example, a carbocyclic compound, only a stereogenic carbon or a stereogenic element, such as an axis, possesses configuration. Substituents such as methyl groups

are either alpha or beta oriented and are not alpha or beta configured. Care should be taken not to make erroneous configurational conclusions via NMR NOE associations from ring to side-chain protons of, for example, sterols and tetracyclic triterpenoids. The term “spectral” should be avoided in a structure elucidation discussion, when “spectroscopic” or “spectrometric” are meant instead.

In manuscripts that present results of biological studies with tumor cell lines or animal-based tumor models, authors should pay special attention to the U.S. National Cancer Institute (NIH) guidelines for cancer drug discovery studies. Compounds that suppress the growth of, or kill, isolated tumor cell lines grown in culture should be referred to as either “cytostatic” or “cytotoxic”, as appropriate. Only compounds that inhibit the growth of tumors in animal-based models should be called “antitumor”. The term “anticancer” should be reserved for compounds that show specific activity in human-based clinical studies (see Suffness, M.; Douros, J. J. *Nat. Prod.* 1982, 45, 1–14). Some flexibility in this system is afforded in the description of compounds that show activity in molecular-targeted antitumor assays. Compounds should be compared against a suitable positive control substance and follow accepted guidelines when represented as “active”. For example, a cytotoxic pure substance when tested against a cancer cell line would exhibit an IC₅₀ value of <10 μM (or 4–5 μg/mL).

Experimental Section

The presentation of specific details about instruments used, sources of specialized chemicals, and related experimental details should be incorporated into the text of the Experimental Section as a paragraph headed General Experimental Procedures. The general order for inclusion should be as follows: melting points; optical rotations; UV spectra; ECD and/or VCD spectra; IR spectra; NMR spectra; mass spectra; and chromatographic and other techniques.

In a separate paragraph, experimental biological material should be reported as authenticated if cultivated or from a natural habitat, and the herbarium deposit site and voucher number should be recorded. The month and year when the organisms were collected should be stated, and it is recommended that the exact collection location be provided using a GPS navigation tool. All microorganisms used experimentally should bear a strain designation number and the culture collection in which they are deposited. The scientific name (genus, species, authority citation, and family) should be presented when first mentioned in the body of the manuscript. Thereafter, the authority should be eliminated, and the generic name should be reduced (except in tables and figure legends) to the first capital letter of the name (but avoid ambiguity, if two or more generic names have the same first letter).

If the biological material has not been identified as to species, the manuscript will not be considered for publication unless a special protocol has been followed. Thus, a voucher specimen of the organism should be deposited with a recognized taxonomist for the particular group of organisms in question. The taxonomist should then assign to the specimen an identifying number unique to the organism so that any additional collections of the same organism would bear this same number. The number will be retained until the organism is completely identified. The taxonomist should write a brief taxonomic description to be included in the manuscript, which should state how the organism in question relates morphologically to known species. Contributors should use DNA sequence analysis to assist with the taxonomic identification of unknown microorganisms, and to deposit these data in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Photographs of incompletely identified organisms may be included as Supporting Information. Authors should be aware of the fact that the large-scale collection of marine or terrestrial organisms may have negative ecological effects. Authors describing an investigation derived from large-scale collections should thus include a statement in their manuscript (in the “Biological Material” paragraph of the Experimental Section) explaining why the collection had no significant adverse ecological effect or justifying such effect in terms of the benefit from the resulting work.

Authors who purchase dried “herbal remedies” or other materials from companies must make provision for their proper deposit in a herbarium, for access by future workers. When a commercially available extract is obtained, the extraction procedure from the organism of origin must be specified. The identification of the extract should be supported by an HPLC trace of known secondary metabolite constituents of the organism, which should be included with the manuscript as Supporting Information.

The correct format to present elemental analysis data is: anal. C 72.87, H 11.13%, calcd for C₃₇H₆₈O₆, C 73.02, H 11.18%. The structures of compounds are expected to be supported by high-resolution mass spectrometry or elemental analysis. Melting point determinations should not be provided for compounds described as “amorphous solids”. The unit of concentration to be used for optical rotation measurements is grams per 100 mL. UV extinction coefficient data should be provided as log ε values, to two places of decimals. In reporting ¹H NMR data of diastereotopic

methylene protons, the one at lower field should be listed as the “a” proton and that at the higher field as the “b” proton, as in “H-10a” and “H-10b”, respectively. If two proton or carbon signals in an NMR spectrum appear at the same chemical shift but are still distinguishable, an additional decimal place (three for ^1H NMR data and two for ^{13}C NMR data) may be used to designate the resonance in question. Carbon-13 NMR data should be reported to the nearest 0.1 ppm with the number of attached protons designated using the C, CH, CH₂, and CH₃ notation.

Acknowledgment

The Acknowledgments section should include credits [initial(s) and last name] for technical assistance, financial support, and other appropriate recognition. During manuscript submission, the submitting author is asked to select funding sources from the list of agencies included in the FundRef Registry <http://www.crossref.org/fundref/>.

References

References to the literature and all notes, regardless of their nature, should be numbered in order of appearance in the manuscript and cited in the text with superscript numbers. Each reference may have its own citation number, or alternatively, references referring to the same topic may be grouped under a common number using alphabetical subdesignations (e.g., 1a, 1b, 1c, etc.). Each note should be assigned its own number. References and notes should follow the format shown:

- (1) Dumdei, E.; Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 792–794.
- (2) Cordell, G. A. *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*; John Wiley & Sons: New York, 1981; p 43.
- (3) Pelletier, S. W.; Mody, N. V. In *The Alkaloids*; Rodrigo, R. G. A., Ed.; Academic Press: New York, 1981; Vol. 18, Chapter 2, pp 100–216.
- (4) Zheng, G.; Kakisawa, H. *Chin. Sci. Bull.* 1990, 35, 1406–1407; *Chem. Abstr.* 1991, 114, 43213m.
- (5) Meyer, B. N. *Brine Shrimp Toxicity: Certain Components of Stapelia, Coryphantha, Lupinus, and Quinoa*. Ph.D. Thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, 1983, p 35.
- (6) Davis, R. U.S. Patent 5,708,591, 1998.
- (7) The biogeographic zone comprising Madiera, the Canary Islands, the Cape Verde Islands, and the Azores.

For additional information on the reference and note format to use, see *The ACS Style Guide*, 3rd ed. (2006) (<http://pubs.acs.org/books>), available from Oxford University Press, Order Department, 2001 Evans Road, Cary, NC 27513 (<http://www.oup.com>).

The author is responsible for the accuracy and completeness of all references. In particular, authors must cite all of the references from their own work on a particular topic, such as all papers published or submitted on the constituents of a given organism under consideration.

Because subscribers to the Web edition are now able to click on the “CAS” tag following each reference to retrieve the corresponding CAS abstract, reference accuracy is critical. Journal abbreviations should be those used by Chemical Abstracts [see *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1907–2004*].

The author should supply the Editor with copies of related manuscripts that are cited as “in press” or “submitted” for use by the editors and the reviewers in evaluating the manuscript under consideration.

Nomenclature

It is the responsibility of the authors to provide correct nomenclature. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform with current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the *Chemical Abstracts Index Guide*. A list of ring systems, including names and numbering systems, is found in the *Ring Systems Handbook*, American Chemical Society, Columbus, OH, 2003, and its latest cumulative supplement. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334; tel: (614) 447-3870; fax: (614) 447-3747; or e-mail: answers@cas.org.

For IUPAC rules, see:

- *Nomenclature of Inorganic Chemistry, Recommendations*, 1990; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1990.

- A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations, 1993; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1993.
- Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A–F and H; Pergamon Press: Elmsford, NY, 1979.
- Compendium of Macromolecular Nomenclature; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1991.
- Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd ed.; Portland Press, Ltd.: London, England, 1992.
- Selected IUPAC recommendations can be found on the Web at <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/iupac.html>.
- The ACS Web site has links to nomenclature recommendations: <http://chemistry.org>.

Abbreviations

Abbreviations are used without periods. Standard abbreviations should be used throughout the manuscript. All nonstandard abbreviations should be kept to a minimum and must be defined in the text following their first use. The preferred forms of some of the more commonly used abbreviations are mp, bp, °C, K, s, min, h, mL, µL, kg, g, mg, µg, cm, mm, nm, mol, mmol, µmol, ppm, TLC, GC, NMR, MS, UV, CD, and IR. For further information, refer to The ACS Style Guide (2006).

Graphics

Figures, Schemes, and Charts are numbered with Arabic numerals. Blocks of chemical structures should not be designated as “Figures”. Each graphic must be identified outside the frame of the graphic. The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Graphics cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file and are used in the production of the Journal (material deposited as Supporting Information will not be published in the print edition). The preferred submission procedure is to embed graphics in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible.

Graphics

Figures, Schemes, and Charts are numbered with Arabic numerals. Blocks of chemical structures should not be designated as “Figures”. Each graphic must be identified outside the frame of the graphic. The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Graphics cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file and are used in the production of the Journal (material deposited as Supporting Information will not be published in the print edition). The preferred submission procedure is to embed graphics in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible.

Additional acceptable file formats are TIFF, PDF, EPS (vector artwork), or CDX (ChemDraw file). Labeling of all figure parts should be present, and the parts should be assembled into a single graphic. (For EPS files, ensure all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document settings should be in RGB mode.)

TIFF files should have the following minimum resolution requirements:

Black and white line art 1200 dpi

Grayscale art 600 dpi

Color art (RGB mode) 300 dpi

Color graphics submitted in CMYK or at lower resolution may result in poor-quality images. Save graphic files at the final resolution and size using the program used to create the graphic. The inclusion of a color photograph is particularly recommended for manuscripts based on the constituents of organisms that are not identified beyond the genus level. Digital photographs are accepted. Photographs that are single or double column width so that they will not have to be reduced work best.

Layout. In preparing structures for publication, layout is critical. Figures, Schemes, Charts, and blocks of structures are presented in the Journal either in one-column or two-column format.

For efficient use of journal space, single-column illustrations are preferred.

	single (preferred)	double
width		

minimum		300 pts (4.16 in.)
maximum	240 pts (3.33 in.)	504 pts (7 in.)
maximum depth	660 pts (9.16 in.)	660 pts (9.16 in.)

Authors are advised that structural material labeled as a "Figure" is placed at the top or bottom of a page, as is all two-column material. All structural material that should immediately follow certain text must be designed to fit the one-column format, and its location in the text must be indicated in the manuscript. Structures, arrows, and compound designators should be arranged so as to make maximum use of the width afforded by the one-column or two-column format.

For best results, illustrations should be submitted in the actual size at which they should appear in the Journal. Consistently sized letters and labels in graphics throughout the manuscript will help ensure consistent graphic presentation for publication. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density. If artwork that should be reduced must be submitted, larger lettering and thicker lines should be used so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect should be avoided. To show a pattern, a simple cross-hatch design should be used.

Content. Abbreviations such as Me for CH₃, Et for C₂H₅, and Ph (but not ϕ) for C₆H₅ are acceptable. Make liberal use of "R and X groups" in equations, schemes, and structure blocks to avoid the repetition of similar structures. Do not repeat a structure; the number alone of an earlier structure can be used if a compound occurs several times. Within graphics, structures should be numbered with boldface Arabic numerals, consecutively from left to right, top to bottom, regardless of the order in which the compounds are discussed in the text. It is not necessary to give reagents and conditions in complete detail, since this detail is contained in the Experimental Section. Where needed, numbers such as NMR chemical shifts may be included directly on structural formulas.

Chemical Structures

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

(1) As drawing settings select:

chain angle	120°
bond spacing	18% of width
fixed length	14.4 pt (0.508 cm, 0.2 in.)
bold width	2.0 pt (0.071 cm, 0.0278 in.)
line width	0.6 pt (0.021 cm, 0.0084 in.)
margin width	1.6 pt (0.056 cm, 0.0222 in.)
hash spacing	2.5 pt (0.088 cm, 0.0347 in.)

(2) As text settings select:

font Arial/Helvetica
size 10 pt

(3) Under the preferences choose:

units points
tolerances 5 pixels

(4) Under page setup choose:

Paper US Letter
Scale 100%

(5) Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. ChemDraw graphics will be reduced to 75% during production.

(6) Embolden compound numbers, but not atom labels or captions.

(7) Authors are urged to use only a single configurational descriptor (heavy line or dashed line, but not both) when defining a stereocenter in a chemical structure. Atoms should be kept outside of rings wherever possible. Rather than rectangular solid and dashed lines, authors should use solid and dashed wedges to indicate configurations, as shown below. Dots at ring junctions intended to represent hydrogen atoms should not be used.

Structures should be drawn in a neat manner ready for direct reproduction, and should not be cluttered or overlapping. Any arrows and numbering used for atoms in figures should not come into contact with bonds or ring systems. See an example of a prepared structure using ChemDraw with the specified preferences below. In molecules containing a chiral biphenyl axis, it is recommended that one of the aromatic rings be drawn in the plane of the paper and the second one be rotated out of the plane of the paper, to reflect the P or M conformation about the biphenyl bond.

When the structure of a chiral compound is flipped horizontally, the stereodescriptors should be changed at every stereogenic carbon, otherwise the enantiomer of the relevant compound would be depicted. This is depicted below for the β -D glucopyranoside of phenol. The 1 to 2 horizontal flip is incorrect since the depicted glucopyranosyl moiety belongs to the L-series of glucopyranoses. The 1 to 3 horizontal rotation through 180°/adjustment of the tetrahydropyran ring is correct and shows the descriptor changes required to retain the D-configuration of the glucopyranose moiety. Alternatively, in the "planar" presentations the 4 to 5 horizontal flip is incorrect and the 4 to 6 horizontal rotation is correct, showing the proper descriptor changes. Please note that presentations 4 and 6 are InChI (International Chemical Identifier) compliant, while 1 and 3 are not.

Authors using other drawing packages should, in as far as possible, modify their program's parameters so that they reflect the above guidelines.

Tables

These should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be placed as they should appear in the paper. Footnotes in tables should be given lowercase letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by line rather than by column. If a footnote is cited both in the text and in a table, insert a lettered footnote in the table to refer to the numbered footnote in the text. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm) and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided.

Table of Contents/Abstract Graphic

A graphic must be included with each manuscript that will be used for both the abstract and the Table of Contents (TOC) of the Web edition of the Journal issue in which the Communication, Review, Full Article, or Note will appear. This graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript's title, should give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described and/or the biological results obtained. Structures in the TOC graphic should be constructed as specified in the 'Chemical Structures' section above. The TOC graphic should be submitted at the actual size to be used and should be no larger than 3.25 in. (8.5 cm) wide and 1.75 in. (4.75 cm) tall. (See detailed instructions at <http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/howtosubmit.html>.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is highly encouraged. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. The title and author list will be added during production.

Recommendations for Crystal Structure Papers

Although the results of crystal structure determinations are frequently of interest to readers of the Journal, details of crystal structure experiments are generally not. Results appropriate for the Journal are not, however, sufficient to allow referees to assess the quality of an X-ray structure determination. Thus, it is recommended that manuscripts involving such determinations be accompanied by material provided for the benefit of the reviewers only. Authors should submit the following minimum materials, in tabular form where possible, for each compound for which X-ray crystallographic supplementary data are available.

Published Manuscript:

- (1) Crystal data, including chemical formula, formula weight, crystal system and space group, cell dimensions (with uncertainties), number of formulas per unit cell, calculated density, radiation used, and wavelength.
- (2) Final fractional atomic coordinates. Hydrogen atom coordinates should be included only if they have been experimentally determined or refined. Calculated coordinates should be provided as reviewer's material.
- (3) A brief outline of procedures used for data collection and refinement, including the method used for intensity measurement, θ limits, portion of the full sphere collected, handling of absorption (if applicable), method of refinement, number of reflections used in the refinement and criteria for their choice, treatment of hydrogen atoms, and final R factor.
- (4) A perspective diagram (perhaps prepared by ORTEP, PLUTO, or similar programs) that gives the atom-numbering scheme if it is not unambiguous from the remainder of the paper. If the figure is a stereoview, it should be provided reduced to correct size, about 55–60 mm between images.

Besides a description of the structure, other information (i.e., important distances, torsion angles, results of best plane calculations, etc.) may be included if appropriate. A note should be cited at an appropriate place in the manuscript and included in the References and Notes Section: "Crystallographic data for the structure(s) reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)."

Conflict of Interest Disclosure. A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the ACS Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: "The authors declare no competing financial interest."

Reviewer's Material:

- (1) Any calculated coordinate (e.g., hydrogen atoms).
 - (2) A full list of bond distances (and their uncertainties).
 - (3) A full list of bond angles (and their uncertainties).
- All tables should be clearly legible, the contents nonredundant, and their interpretation immediately obvious. Authors must provide this information in the form of a Crystallographic Information File (CIF) for each compound for which X-ray crystallographic data are determined, with each CIF being separated from any other Supporting Information files.
- Authors will deposit the tables of final fractional atomic coordinates and the full list of bond lengths and angles at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) prior to the submission of their paper. The CCDC deposition number must be included in the submitted manuscript. A checklist of data items for deposition is available at <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Supporting Information

Authors are encouraged to provide Supporting Information in order to keep their manuscripts to a reasonable length. The Web edition of this journal can accommodate almost any type of supplementary data (e.g., reproductions of spectra, experimental procedures, tabulated spectroscopic/spectrometric data, expanded discussion of peripheral findings, calculational data). Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A list of acceptable file types is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file (rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file. The title page information (title, authors, institutions) should be presented in the same manner as on the title (face) page of the manuscript. It is a mandatory requirement for authors to deposit copies of NMR spectra for all new compounds in the Supporting Information with at least the ^1H and ^{13}C . NMR spectra included. A typical caption for a spectrum would be: "S1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of the new compound **xx**". A short "Supporting Information Available" paragraph that describes the material must be placed at the end of the manuscript text.

Supporting Information pages should be consecutively numbered.

When submitting spectra, please consider the following guidelines:

A caption should be included on the spectrum, noting the nucleus being measured, the solvent (formula preferred, e.g., CDCl_3), and the field strength. A representation of the compound should be included on the spectrum; please use ChemDraw or a related program. The compound identifier used in the manuscript should be included. The largest peak in the ^1H NMR spectrum should normally arise from the compound, not the solvent. All peaks in the ^1H NMR spectrum should be integrated. Chemical shift values should be included. The solvent peak should be clearly labeled on the spectrum. All peaks should be visible on the spectrum. Insets are encouraged to show expanded regions. At minimum, the spectral window should be -1 ppm to 9 ppm for ^1H NMR and -10 ppm to 180 ppm for ^{13}C NMR. The font should be clear and large enough to read (minimum of 10 point). Horizontal orientation is preferred for spectra.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE.

Relevant compounds reported in Supporting Information are indexed for Chemical Abstracts and assigned Registry Numbers, even if they are not mentioned in the published paper. The Supporting Information is available free of charge at <http://pubs.acs.org>.

Journal Publishing Agreement

A properly completed and signed Journal Publishing Agreement must be submitted for each manuscript. ACS Paragon Plus provides an electronic version of the Agreement that will be available on the My Authoring Activity tab of the Corresponding Author's Home page once the manuscript has been assigned to an Editor. A PDF version of the Agreement is also available, but Authors must use the electronic Journal Publishing Agreement. If the PDF version is used, all pages of the signed PDF Agreement must be submitted. If the Corresponding Author cannot or should not complete either the electronic or PDF version for any reason, another Author should complete and sign the PDF version of the form. Forms and complete instructions are available at <http://pubs.acs.org/page/copyright/journals/index.html>.

Author List

During manuscript submission, the submitting author must provide contact information (full name, e-mail address, institutional affiliation, and mailing address) for all of the co-authors. Because all of the author names are automatically imported into the electronic Journal Publishing Agreement, the names must be entered into ACS Paragon Plus in the same sequence as they appear on the first page of the manuscript. (Note that co-authors are not required to register in ACS Paragon Plus.) The author who submits the manuscript for publication accepts the responsibility of notifying all co-authors that the manuscript is being submitted. Deletion of an author after the manuscript has been submitted requires a confirming letter to the Editor-in-Chief from the author whose name is being deleted. For more information on ethical responsibilities of authors, see the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

Professional Ethics

In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to screen submitted manuscripts for similarity to published material. Note that your manuscript may be screened during the submission process. Further information about plagiarism can be found in Part B of the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

Manuscript Submission

Web Submission

Manuscripts must be submitted via the Web using the ACS Paragon Plus environment (<http://paragonplus.acs.org/login>). Complete instructions and an overview of the electronic online (Web) submission process are available through the secure ACS Paragon Plus Web site. Authors must also submit all revisions of manuscripts via the ACS Paragon Plus environment. The web submission site employs state-of-the-art security mechanisms to ensure that all electronically submitted papers are secure. These same security mechanisms are also utilized throughout the peer-review process, permitting access only to editors and reviewers who are assigned to a particular paper. Hard copy manuscript submission is no longer applicable for the Journal of Natural Products.

Use of the word-processing template is strongly encouraged, but not required. It is essential that only the fonts specified in the ACS manuscript templates be used. If you choose not to use an ACS

template, Times and Symbol fonts should be used. Use of other fonts may cause problems during peer review and Journal production.

Authors may now choose to submit their own manuscript PDF file along with a word processing or zipped archive file of their manuscript documents for use during the peer review process, or allow ACS Paragon Plus to generate a PDF automatically.

General File Preparation

When preparing a manuscript, use the document mode or its equivalent in the word-processing program; i.e., do not save files in "Text Only" (ASCII) mode. If a non-Western version of the word-processing software was used to prepare the manuscript, save the file in rich-text format (RTF). Do not include any page-layout instructions such as placement information for graphics in the file. The text should be left justified, and automatic end-of-line hyphenation should be turned off. Use carriage returns only to end headings and paragraphs, not to break lines of text. Do not insert spaces before punctuation. References must conform to the format printed in the Journal. Ensure that all characters are correctly represented throughout the manuscript: for example, 1 (one) and l (ell), 0 (zero) and O (oh), x (ex) and × (times sign). Check the final copy carefully for consistent notation and correct spelling.

The manuscript should be assembled in the following order and should consist of one file: Title page; abstract; all sections of the body of the paper, including figures, schemes, charts, and tables; acknowledgments; Supporting Information paragraph (if needed); references; TOC graphic. Supporting information should be provided in a separate file. It is best to use the fonts "Times" and "Symbol". Other fonts, particularly those that do not come bundled with the system software, may not translate properly. Ensure that all special characters (e.g., Greek characters, math symbols, etc.) are present in the body of the text as characters and not as graphic representations. Consult the documentation for the specific software package being used on how to detect the presence of graphics in the files, and replace them with the appropriate text characters. Tables may be created using a word processor's text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (return) at the end of each row.

Currently Acceptable Word Processing Packages

Macintosh: WordPerfect 3.5, Microsoft Word, 98 and higher.

IBM and compatibles: WordPerfect, up to version 9.0, Microsoft Word, 97 and higher.

LaTeX users should follow the guidelines given at the Author & Reviewer Resource Center (<http://pubs.acs.org/4authors>).

ACS Policies for E-prints and Reprints

Under the ACS Articles on Request policy, the Society will provide (free of charge) to all contributing authors a unique URL within the ACS Web site that they may e-mail to colleagues or post on external Web sites. These author-directed links are designed to facilitate distribution of an author's published work to interested colleagues in lieu of direct distribution of the PDF file by the author. The ACS Articles on Request policy allows 50 downloads within the first year after Web publication and unlimited access via the same author-directed links 12 months after Web publication.

The ACS AuthorChoice option establishes a fee-based mechanism for authors or their research funding agencies to sponsor the open availability of their articles on the Web at the time of online publication. Effective January 1, 2014, ACS AuthorChoice will be expanded to offer authors a wider range of open access license options, such as Creative Commons licenses and provisions for immediate or 12-month embargoed open access, both coupled with a new ACS Certified Deposit service. For complete details see <http://acsopenaccess.org/>.

When authors are sent the proof of their paper, they will receive a link to a website where they may order author reprints. They may also call Cierant Corporation (866-305-0111) from 9:00 A.M. to 5:00 P.M. EST. Reprints will be shipped within two weeks after the issue publication date. Neither the Editors nor the Washington ACS Office keeps a supply of reprints; requests for single copies of papers should be addressed to the corresponding author of the paper concerned.

Galley Proofs

The corresponding author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via a secure Web site. Authors will access the secure site through ACS ChemWorx and will need an ACS ID. To obtain an ACS ID or to reset your password, go to www.acschemworx.org. Routine rephrasing of sentences or additions are not

permitted at the page proof stage. Alterations should be restricted to serious changes in interpretation or corrections of data. Extensive or important changes on page proofs, including changes to the title or list of authors, are subject to Editorial review.

It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 48 hours of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

The ASAP date is the recorded publication date. All intellectual property and patent details must be resolved prior to ASAP publication.

Corrections

If errors of consequence are detected in a published paper, the author should send a correction to the Editor-in-Chief for publication as an "Addition and Correction".