



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Jucélia Pizzetti Benincá

**Estudo da eficácia anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis* L.,
em camundongos, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela
carragenina.**

Florianópolis
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Jucélia Pizzetti Benincá

**Estudo da eficácia anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis* L.,
em camundongos, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela
carragenina.**

*Dissertação apresentada
ao curso de Pós-graduação em
Farmácia do Centro de
Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito
parcial para obtenção do título
de Mestre em Farmácia, sob a
orientação da Profa. Dra.
Tânia Silvia Fröde.*

Florianópolis
2010

A pedra

“O distraído nela tropeçou. O bruto a usou como projétil. O empreendedor, usando-a, construiu. O camponês, cansado da lida, dela fez assento. Para meninos, foi brinquedo. Drummond a poetizou. Já, David matou Golias e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura. E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem! Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio crescimento.”

(Autor desconhecido)

A Deus, por me proporcionar um momento tão especial.

A meus pais, Martinho e Olindina, por todo apoio e confiança depositada.

Ao Bruno, meus irmãos e amigos, pelo amor e pelos momentos de alegria, companheirismo e compreensão.

À professora Dra. Tânia Silvia Fröde pelos anos de dedicação, disponibilidade, amizade e grandiosa contribuição para minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e saúde para superar os obstáculos, não me deixando desistir e fazendo-me acreditar que tudo é possível.

Aos meus pais, Martinho e Olindina, que sempre acreditaram em mim e me deram incentivo para alcançar todos meus objetivos. Agradeço também por todo amor e confiança e por acreditarem que eu sou capaz de conquistar os meus sonhos. Pai, mãe, fico eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

Aos meus familiares e em especial aos meus irmãos, Alessandra e Alexandre, por todos os momentos de alegria, companheirismo e apoio.

Ao Bruno, por todo amor, companheirismo e incentivo. Também agradeço por toda felicidade que você traz a minha vida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Silvana Vigil, Rafael de Liz, Stella Goulart, Ziliani Buss, Álvaro Vargas, Robson Pereira, Ana Beatriz, Vanessa Elgelmann, Silvana Zucolotto, Janaína Koelzer, Diana Pereira, Patrícia Pozzatti, Eduardo Dalmarco, Juliana Dalmarco, Daniel Nunes, Gustavo dos Reis, Giliard Astolfi, Julia Salvan e Bárbara Alves, pelos momentos de descontração e alegria, pelo apoio e incentivo constantes, pelos muitos experimentos realizados juntos, pelos ensinamentos transmitidos, enfim, obrigada por tudo. Tenho certeza que sentirei muitas saudades.

Agradeço a todos os meus amigos de infância, de colégio, de graduação e de mestrado, que presentes ou não, sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Um agradecimento, em especial, à professora Dra. Tânia Silvia Fröde, por todos os anos de dedicação, orientação, e confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti e à Juliana Bastos Dalmarco, pela produção dos extratos estudados e pelo trabalho em equipe.

Enfim, a todos aqueles que acreditaram em mim e que de alguma maneira contribuíram para a realização e sucesso deste trabalho. A todos aqueles que fazem parte da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE ABREVIACÕES	6
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	13
1.2. GÊNERO <i>Rosmarinus</i>	14
1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO	15
1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO - FOOD CHEMISTRY	21
4. DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÕES	51
6. PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A: Protocolo de extração do extrato bruto, frações e compostos isolados da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	64
APÊNDICE B: Protocolo do estudo da atividade anti-inflamatória da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	66
ANEXO A: Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)	68

LISTA DE ABREVIações

A-549	Linhagem de células epiteliais de pulmão humanas
AcOEt	Fração acetato de etila obtida do extrato bruto da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
B1	Receptor B1 da bradicinina
B2	Receptor B2 da bradicinina
B16/F10	Linhagem de células de melanoma de camundongos
BA	Ácido betulínico
Caco 2	Linhagem de células de carcinoma de cólon humano
CAR	Carnosol
CE	Extrato bruto da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-Selectina	Molécula de adesão endothelial
ET	Fração etanólica obtida do extrato bruto da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
H1299	Linhagem de células de carcinoma de pulmão humano
HCT 116	Linhagem de células de carcinoma cólon humano
HEX	Fração hexano obtida do extrato bruto da <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
HUVEC	Linhagem de células endoteliais humanas de veia de cordão umbilical
i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intrapleural
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-1 β	Interleucina-1 beta
Jurkat	Linhagem leucêmica de linfócitos T
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos -1
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1- α
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2
MPO	Mieloperoxidase
MPP ⁺	Íon 1-metil-4fenilpiridínio
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NO _x	Concentrações de nitrato/nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
P-Selectina	Molécula de adesão epithelial
PC-3	Linhagem de células humanas de câncer de próstata
PC12	Linhagem de células de feocromocitoma de rato
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol-12-meristato-13-acetato
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos de camundongos
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF RI	Receptor do tipo I do fator de necrose tumora
TNF RII	Receptor do tipo II do fator de necrose tumor:
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
U937	Linhagem de células mononucleares humanas
UA	Ácido ursólico
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	14
Figura 2	Efeito anti-inflamatório proposto para a <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	52

RESUMO

Estudo da eficácia anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis* L., em camundongos, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina.

Introdução: A *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), conhecida como alecrim, é uma planta nativa da região mediterrânea, que atualmente é cultivada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Esta planta é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias como a asma brônquica. Além disso, estudos já demonstraram que seus constituintes possuem atividade anti-inflamatória. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto (CE) da *Rosmarinus officinalis* L., bem como de suas frações: hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e etanólica (ET), e dos compostos isolados: carnosol (CA), ácido betulínico (BA) e ácido ursólico (UA), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

Metodologia: As partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L. foram secas à temperatura ambiente e submetidas à maceração com etanol 96% por 15 dias para a obtenção do CE. A seguir, o CE foi submetido a uma filtração em sílica utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade resultando nas frações HEX, AcOEt e ET. A partir das frações AcOEt e HEX foram isolados três compostos: CA, BA e UA. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foi utilizado o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, e foram avaliados os seguintes parâmetros inflamatórios: influxo de leucócitos, atividade da mieloperoxidase (MPO), além das concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), exsudação, interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$). Nesse protocolo experimental, foram utilizados camundongos albinos suíços, os quais foram inicialmente distribuídos em diferentes grupos e tratados com CE (25 – 100 mg/kg), HEX (10 – 50 mg/kg), AcOEt (5 – 50 mg/kg), ET (10 – 50 mg/kg), CA (1 – 10 mg/kg), BA (1 – 10 mg/kg) ou UA (2,5 – 25 mg/kg), administrados por via intraperitoneal (i.p.), 0,5 h antes da administração da carragenina (1%, i.pl.). Os parâmetros inflamatórios (leucócitos e exsudação) foram avaliados 4 h após. Para avaliar a exsudação, os animais foram tratados previamente (10 min.) com solução Azul de Evans (25 mg/kg, i.v.). Para avaliar a atividade da MPO e as concentrações de NO_x , $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$, diferentes grupos de animais foram tratados com CE (50 mg/kg, i.p.), HEX (25 mg/kg, i.p.), AcOEt (10 mg/kg, i.p.), ET (50 mg/kg, i.p.), CA (2,5 mg/kg, i.p.), BA (2,5 mg/kg, i.p.) ou UA (25 mg/kg, i.p.) administrados 0,5 h antes da carragenina. A dexametasona e indometacina foram utilizadas como fármacos anti-inflamatórios de referência. Diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise dos testes de variância (ANOVA) e/ou t de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** O extrato bruto da *Rosmarinus officinalis* L. (50 – 100

mg/kg), as frações (10 – 50 mg/kg), assim como os compostos isolados (2,5 – 25 mg/kg) inibiram: influxo de leucócitos, neutrófilos, atividade da MPO, além das concentrações de NO_x , exsudação, IL-1 β e TNF- α ($P < 0,05$). A indometacina e a dexametasona inibiram todos os parâmetros inflamatórios estudados ($P < 0,05$).

Conclusão: O extrato bruto, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L. demonstraram importante atividade anti-inflamatória. Os compostos isolados: carnosol, ácido betulínico e ácido ursólico podem ser os responsáveis por este efeito anti-inflamatório.

Palavras-chaves: *Rosmarinus officinalis* L., atividade anti-inflamatória, pleurisia, mediadores da inflamação, carnosol, ácido betulínico, ácido ursólico.

ABSTRACT

Study of anti-inflammatory efficacy of *Rosmarinus officinalis* L., in the mouse pleurisy model induced by carrageenan

Introduction: *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), known as rosemary, is a native plant from Mediterranean area and it has been cultivated in many parts of the world, including Brazil. This plant is used in the folk medicine to treat inflammatory diseases such as bronchial asthma. Furthermore, studies have been demonstrated that some constituents of this plant have anti-inflammatory activity.

Objective: The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of crude extract (CE) of *Rosmarinus officinalis* L., as well as its fractions: hexane (HEX), ethyl acetate (AcOEt), and ethanolic (ET), and the isolated compounds: carnosol (CA), betulinic acid (BA) and ursolic acid (UA), in the mouse pleurisy model induced by carrageenan. **Methods:** The aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L. were dried at room temperature and subjected to maceration with ethanol 96% for fifteen days to give the CE. The CE was subjected to passage on short silica gel column using solvents in growing order of polarity resulting in HEX, AcOEt and ET fractions. From the AcOEt and HEX fractions were isolated three compounds: CA, BA and UA. To evaluate the anti-inflammatory activity, it was used the mouse model of pleurisy induced by carrageenan and the following inflammatory parameters were evaluated: leukocyte influx, myeloperoxidase activity (MPO), as well as nitrite/nitrate concentration (NO_x), exudation, interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels. In this experimental protocol, swiss mice were used in the *in vivo* experiments, which were initially distributed in different groups and treated 0,5 h before carrageenan (1%, i.pl.) with CE (25 – 100 mg/kg), HEX (10 – 50 mg/kg), AcOEt (5 – 50 mg/kg), ET (10 – 50 mg/kg), CA (1 – 10 mg/kg), BA (1 – 10 mg/kg) or UA (2.5 – 25 mg/kg). The inflammatory parameters (leukocytes and exudation) were evaluated 4 h after pleurisy induction. In order to evaluate the exudation, the animals were previously pretreated (10 min.) with Evans blue dye (25 mg/kg, i.v.). To evaluate the MPO activity and NO_x , $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ levels, different groups of animals were treated 0,5 h before carrageenan with CE (50 mg/kg, i.p.), HEX (25 mg/kg, i.p.), AcOEt (10 mg/kg, i.p.), ET (50 mg/kg, i.p.), CA (2.5 mg/kg, i.p.), BA (2.5 mg/kg, i.p.) or UA (25 mg/kg, i.p.). Dexamethasone and indomethacin were used as anti-inflammatory reference drugs. Statistical differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) and/or Student's t test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. **Results:** The crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. (50 – 100 mg/kg), its fractions (10 – 50 mg/kg), as well as its isolated compounds (2.5 – 25 mg/kg) inhibited: leukocytes influx, neutrophils, MPO activity, as well as NO_x , exudation, $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF-}\alpha$ levels (P

< 0.05). Indomethacin and dexamethasone inhibited all the studied inflammatory parameters ($P < 0.05$). **Conclusion:** The crude extract, fractions and isolated compounds from *Rosmarinus officinalis* L., demonstrated important anti-inflammatory activity. The isolated compounds: carnosol, betulinic acid and ursolic acid can be responsible for these anti-inflammatory effects.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., anti-inflammatory activity, pleurisy, mediators of inflammation, carnosol, betulinic acid, ursolic acid.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade as plantas têm sido utilizadas não somente na alimentação, mas também como uma fonte de substâncias biologicamente ativas. O uso das plantas com propósito medicinal foi documentado pela primeira vez em manuscritos sumérios há mais de 5000 anos (RASKIN; RIPOLL, 2004). Atualmente, os produtos naturais continuam sendo fontes significantes de medicamentos, sendo que mais de 50% dos novos fármacos registrados de 1981 a 2006 são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Os produtos naturais oferecem grande diversidade estrutural de compostos e, desta forma, constituem importante fonte para a descoberta e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (SAKLANI; KUTTY, 2008). O isolamento e a identificação estrutural de compostos farmacologicamente ativos têm sido facilitados pelo contínuo desenvolvimento de métodos de análise cromatográficos e espectroscópicos (PHILLIPSON, 2007; SCHMIDT et al., 2007). Assim, as modernas técnicas de triagem, separação e elucidação estrutural têm renovado o interesse das indústrias farmacêuticas por produtos naturais. Entretanto, apesar desse crescente interesse, poucas plantas já foram estudadas (TALHOUK et al., 2007; SAKLANI; KUTTY, 2008).

O Brasil apresenta potencial para a pesquisa de novos fármacos de origem natural, uma vez que possui grande diversidade vegetal, contando com mais de 56 mil espécies descritas (MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009). Além desta grande biodiversidade, a colonização do Brasil por diferentes grupos étnicos contribuiu para uma maior diversidade cultural e assim para o enriquecimento do conhecimento etnobotânico (GIORGETTI; NEGRI; RODRIGUES, 2007).

A etnobotânica e a etnofarmacologia são campos interdisciplinares de investigação que focam especificamente no conhecimento empírico das civilizações sobre substâncias utilizadas como medicamentos e os seus potenciais benefícios e riscos para a saúde (GURIB-FAKIM, 2006). Nos últimos anos, muitos estudos têm investigado o potencial efeito dessas plantas com base no seu uso na medicina popular. Esse fato é motivado por: 1) interesse em medicamentos a base de plantas; 2) preocupação com os possíveis efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos; e ainda 3) valor econômico agregado (TALHOUK et al., 2007).

1.2 GÊNERO ROSMARINUS

A *Rosmarinus officinalis* L. é uma espécie da família Lamiaceae conhecida como alecrim. Esta planta é uma erva perene, nativa da região mediterrânea, que atualmente é cultivada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2007; BOUSBIA et al., 2009). É uma planta arbustiva aromática, de verde intenso, que mede cerca de 0,8 a 2 metros de altura. As folhas são lineares e estreitas, de coloração verde-escura na parte superior e esbranquiçada na inferior e suas inflorescências são densas e de coloração violeta (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2007).



Fonte: www.sciencephotolibrary.com

Figura 1. *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim).

As folhas desta planta são comumente utilizadas como condimento aromatizante e como fonte de compostos antioxidantes empregados na conservação de alimentos (SASSE; COLINDRES; BREWER, 2009). A *Rosmarinus officinalis* L. é também amplamente utilizada com propósito medicinal. Na medicina popular brasileira esta planta é utilizada como sedativa, antiespasmódica e cardiotônica, para o tratamento de distúrbios menstruais, tosse, gripe, cólica, febre, dor, flatulência, problemas estomacais, intestinais e hepáticos, e para doenças de caráter inflamatório como a asma brônquica (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Alguns estudos utilizando modelos experimentais e/ou ensaios *in vitro* têm demonstrado efeitos biológicos importantes da *Rosmarinus officinalis* L. tais como antioxidante (BAKIREL et al., 2007), antimicrobiano (WECKESSER et al., 2007), hipoglicemiante (BAKIREL et al., 2007), analgésico (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2007, TAKAKI et al., 2008), antitumoral (PENG et al., 2007) e

anti-inflamatório (ALTINIER et al., 2007; PENG et al., 2007; TAKAKI et al., 2008; JUHÁS et al., 2009).

Estudos prévios relacionados aos constituintes químicos desta planta resultaram no isolamento de vários compostos, incluindo os terpenos: ácido betulínico, ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico e ácido ursólico (ALMELA et al., 2006; RAZBORSEK et al., 2008). Estudos também têm demonstrado que estes compostos possuem importante propriedade anti-inflamatória (LEE et al., 2006; ALTINIER et al., 2007; LEE et al., 2008; POECKEL et al., 2008; YOON et al., 2009; YU et al., 2009).

Uma vez que o trabalho envolve o estudo da atividade anti-inflamatória da *Rosmarinus officinalis* L., é pertinente comentar sobre o processo inflamatório.

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um mecanismo direcionado ao reparo tecidual após a lesão, e consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares que tem como objetivo a remoção de tecidos danificados e a geração de outros novos. Nessa cascata observa-se aumento da permeabilidade microvascular, seguido pela adesão e infiltração de células no local da lesão, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos sanguíneos. O processo inflamatório é também reconhecido pelos seus sinais clínicos clássicos de dor, calor, eritema, edema, perda da função, e eventualmente, de cicatrização tecidual (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Entre as células que participam do processo inflamatório estão os neutrófilos, que são os principais efetores da imunidade inata e representam a primeira linha de defesa contra micro-organismos patogênicos (NAUSEEF, 2007). Estas células reconhecem os micro-organismos e os destroem através da fagocitose e subsequente secreção, no fagossoma, de espécies reativas de oxigênio e de componentes citotóxicos que estão presentes nos seus grânulos. Os neutrófilos contêm quatro compartimentos intracelulares cujo conteúdo pode ser secretado durante a ativação celular: grânulos primários (azurófilos), grânulos secundários (específicos), grânulos terciários e vesículas secretoras. Nos grânulos primários encontram-se os principais componentes citotóxicos do sistema microbicida dos neutrófilos, entre esses, destaca-se a enzima mieloperoxidase (PLIYEV, 2008).

A mieloperoxidase (MPO) é expressa em grande quantidade nos neutrófilos e, em menor quantidade, nos monócitos e macrófagos. Ela participa do mecanismo de defesa imune inato pela formação de oxidantes microbicidas e de espécies reativas de oxigênio (MALLE et al., 2007). Durante o processo de fagocitose ocorre intenso consumo de oxigênio e ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que converte o oxigênio em radical ânion

superóxido (O_2^-). O O_2^- produzido pela oxidase sofre dismutação para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ao mesmo tempo, a MPO é liberada no fagossoma e catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl), a partir do H_2O_2 e de íons cloreto (Cl⁻). O HOCl tem propriedade microbicida e é considerado a principal substância oxidativa do neutrófilo (KLEBANOFF, 2005; WINTERBOURN et al., 2006; VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). No entanto, em algumas situações nas quais se observa a ativação persistente do sistema MPO- H_2O_2 , pode ocorrer também lesão tecidual, visto que o HOCl é capaz de iniciar reações do tipo halogenação e nitração em lipídeos, no ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas (MALLE et al., 2007). Estes agentes tóxicos gerados durante a ativação dos fagócitos podem, ainda, ser liberados para o exterior da célula e danificar tecidos adjacentes (KLEBANOFF, 2005).

Estudos têm demonstrado que a MPO é um importante componente do processo inflamatório, sendo utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008). Em doenças de caráter inflamatório, como na artrite reumatoide e na doença inflamatória intestinal, observa-se aumento da infiltração de neutrófilos juntamente com aumento da atividade da MPO. A MPO participa da fisiopatologia das doenças inflamatórias agudas e crônicas principalmente por meio da geração de oxidantes, que contribuem para a amplificação da resposta inflamatória (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). Concentrações elevadas de MPO são observadas também no lúpus eritematoso sistêmico (TELLES et al., 2009), esclerose múltipla (MINOHARA et al., 2006), asma (EKMEKCI et al., 2004), e doença de chagas (MAÇAO et al., 2007), entre outros.

Outras células envolvidas no processo inflamatório são os monócitos que possuem importante função regulatória e efetora, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (DALE; BOXER; LILES, 2008). Na inflamação, após a migração inicial dos neutrófilos, observa-se subsequente migração de monócitos, que ocorre horas após a lesão tecidual, e pode persistir por um longo período de tempo (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008). A infiltração de monócitos é, portanto, principalmente observada em condições inflamatórias crônicas, como na aterosclerose ou na retinopatia crônica (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Os monócitos, após migrarem para o tecido, diferenciam-se em macrófagos e fagocitam produtos de degradação, compostos tóxicos e células apoptóticas, além de possíveis micro-organismos invasores (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; AUFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Essas células possuem também capacidade de secretar citocinas como, por exemplo, interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon alfa ou

beta (INF- α/β), além de ativar a enzima óxido nítrico sintase, liberando o óxido nítrico (DALE; BOXER; LILES, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um mediador pleiotrópico de curta duração que participa de diversos processos biológicos, tais como: regulação do tônus das vias aéreas e dos vasos sanguíneos, inflamação, neurotransmissão e apoptose (NAGY et al., 2007). Esta molécula pode ser liberada por diversas células envolvidas na resposta imune como: células dendríticas, natural killer (NK), mastócitos, monócitos, macrófagos, microglia, células de Kupffer, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais, epiteliais e do músculo liso vascular, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos, células mesangiais e de Schwann (TRIPATHI et al., 2007; PERANZONI et al., 2008).

O NO é sintetizado pela conversão da L-arginina a L-citrulina e NO. Essa reação é catalisada por uma das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Duas destas isoformas, chamadas NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), são dependentes de cálcio, e liberam constitutivamente concentrações relativamente baixas de NO. A isoforma induzível (iNOS), quando expressa, é capaz de liberar grandes quantidades de NO. Essa isoforma pode ser ativada por vários fatores como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α , e IL-1 β) e lipopolissacarídeos (LPS) (NAGY et al., 2007; ABRAMSON, 2008), entre outros.

O NO está envolvido na imunidade específica por regular a apoptose e a função de células do sistema imunológico e na imunidade inata por agir como um agente tóxico para alguns organismos infecciosos (TRIPATHI et al., 2007). Além disso, o NO pode ser citostático e citotóxico também para as células que o produzem e para as células vizinhas. Esse efeito tóxico do NO pode ocorrer pela sua própria ação ou pela sua interação com radicais derivados do oxigênio, gerando moléculas com maior poder de citotoxicidade (TRIPATHI et al., 2007; PERANZONI et al., 2008).

Estudos têm também demonstrado que o NO é liberado em concentrações elevadas em doenças de caráter inflamatório, como a asma brônquica (PAREDI; BARNES, 2009). O NO também parece estar envolvido em outras doenças inflamatórias como na artrite reumatoide, osteoartrite, colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla e doença de chagas (MAÇAO et al., 2007; NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007; PERANZONI et al., 2008).

Outros mediadores importantes relacionados ao processo inflamatório são as citocinas, que constituem uma família de pequenas proteínas sinalizadoras (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Entre essas, pode-se citar a IL-1 β e o TNF- α .

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos (JOOSTEN; VAN DEN BERG, 2006; REN; TORRES, 2009). Ela pode ser liberada a partir de várias células como queratinócitos, fibroblastos, células

sinoviais, endotélio, células imunes como macrófagos e mastócitos, e células gliais como células de Schwann, microglia e astrócitos (REN; TORRES, 2009).

A IL-1 β possui importante função homeostática no organismo, como a regulação da alimentação, sono e temperatura (REN; TORRES, 2009). Essa citocina também está envolvida em vários eventos inflamatórios, entre eles, destacam-se: febre, hiperalgesia, liberação hepática de proteínas de fase aguda, ativação de linfócitos, degeneração das articulações, aumento na produção e liberação de células pela medula óssea e quimiotaxia de neutrófilos (OLIVEIRA et al., 2008). A liberação excessiva de IL-1 β está envolvida em diferentes doenças, como na artrite reumatoide, dor neuropática, doença inflamatória intestinal, osteoartrite, doença vascular, esclerose múltipla e na doença de Alzheimer (REN; TORRES, 2009).

O TNF- α é também um importante mediador da apoptose, bem como da imunidade inata e inflamação (IHNATKO; KUBEŠ, 2007). Ele é produzido principalmente por macrófagos em resposta a LPS e carboidratos da superfície de células bacterianas (BERRY et al., 2007). Embora os monócitos/macrófagos sejam a principal fonte de TNF- α na inflamação, várias células podem liberar essa citocina, incluindo os mastócitos, linfócitos T e B, natural killer (NK), neutrófilos, células endoteliais, células musculares cardíacas e lisas, fibroblastos e osteoclastos (BRADLEY, 2008).

O TNF- α interage com dois diferentes tipos de receptores, denominados TNF RI e TNF RII, os quais iniciam cascatas de sinalização que levam a diferentes respostas biológicas como: apoptose, sobrevivência, diferenciação, proliferação e/ou migração celular. Embora os receptores de TNF- α sejam expressos em várias células e tecidos, muitos dos efeitos pró-inflamatórios dessa citocina podem ser explicados com base nos seus efeitos no endotélio vascular e nas interações endotélio-leucócitos, como, por exemplo, aumento da adesão leucocitária, da migração transendotelial e da permeabilidade vascular (BRADLEY, 2008).

Uma das principais funções biológicas do TNF- α é a defesa contra infecções bacterianas, virais e parasitárias. No entanto, a liberação de TNF- α em grande quantidade pode ser prejudicial ao organismo e está envolvida em várias doenças como, por exemplo: câncer, osteoporose, sepse, diabetes, esclerose múltipla, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal (IHNATKO; KUBEŠ, 2007; BRADLEY, 2008).

1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório de diferentes fármacos e/ou plantas já foram descritos vários modelos, como a pleurisia, a bolsa de ar, o edema

de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; LEES, 1986).

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1989) e camundongos (HENRIQUES et al., 1990). Esse modelo possibilita a avaliação da exsudação, da migração celular, bem como a participação de diversos mediadores como citocinas e enzimas. Esse modelo de inflamação é caracterizado pelo aumento de leucócitos do tipo neutrófilos e da exsudação, 4 h após a administração da carragenina na cavidade pleural. No fluído da cavidade pleural de animais inflamados por carragenina ocorre a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios como citocinas, espécies reativas de oxigênio, bradicinina, substância P, e histamina, entre outros (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996, 1997, 1999; FRÖDE-SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999; DA CUNHA et al., 2001; FRÖDE; MEDEIROS, 2001; FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental de pleurisia, uma vez que essa técnica foi padronizada em nosso laboratório, é de fácil execução e é considerada um bom modelo para avaliar o mecanismo de ação de plantas que possuem propriedades anti-inflamatórias.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados das partes aéreas da *Rosmarinus officinalis* L., em camundongos, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a exsudação.

II. Investigar o efeito do material vegetal sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), bem como sobre as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$).

3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – FOOD CHEMISTRY

ANALYSIS OF THE ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. IN MICE.

Running title Anti-inflammatory Efficacy of *Rosmarinus officinalis* L.

Jucélia Pizzetti Benincá^a, Juliana Bastos Dalmarco^b, Moacir Geraldo Pizzolatti^b and Tânia Silvia Fröde^a *

^a*Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.*

^b*Department of Chemistry, Center of Physical and Mathematical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.*

* Corresponding author: Tel.: +55 48 99614846, Fax: +55 48 32440936.

E-mail address: saleh@ccs.ufsc.br (T. S. Fröde).

List of abbreviations

AcOEt	Ethyl acetate fraction derived of <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
BA	Betulinic acid
CAR	Carnosol
CE	Crude extract of <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Cg	Carrageenan
CV	Variation coefficients
DPP	12-deoxyphorbol 13-phenylacetate
DPT	12-deoxyphorbol 13-tetradecanoate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ET	Ethanollic fraction derived of <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
HEX	Hexane fraction derived of <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
i.p.	Intraperitoneal route
i.pl.	Intrapleural route
i.v.	Intravenous route
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 beta
GOD	Glucose oxidase
LPS	Lipopolysaccharide
MPO	Myeloperoxidase
MPP ⁺	1-methyl-4-phenilpyridinium
NF- κ B	Transcription nuclear factor kappa B
NO _x	Nitrite/nitrate concentrations
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
PLA-2	Phospholipase A-2
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
TNF- α	Tumor necrosis factor – alpha
UA	Ursolic acid

Abstract

The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of the crude extract (CE) of *Rosmarinus officinalis* L., as well as its derived fractions: hexane (HEX), ethyl acetate (AcOEt), and ethanolic (ET), and the isolated compounds: carnosol, betulinic acid and ursolic acid, in the mouse pleurisy model induced by carrageenan. Swiss mice were used in the *in vivo* experiments. The CE and its derived fractions and isolated compounds inhibited leukocytes, exudation, interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels, myeloperoxidase activity (MPO) and nitrite/nitrate production (NO_x) ($p < 0.05$). *Rosmarinus officinalis* L. showed important anti-inflammatory activity by inhibition not only of leukocytes and exudation, but also of a pro-inflammatory enzyme and mediators (MPO, NO_x, IL-1 β , and TNF- α). The present study showed that carnosol, betulinic acid and ursolic acid compounds could be responsible for this anti-inflammatory effect.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., Anti-inflammatory Activity, Pleurisy, Cytokines, Myeloperoxidase, Nitric oxide.

1. Introduction

Plants are a good source of useful anti-inflammatory agents, and the continuing search for novel anti-inflammatory compounds, especially from plants with historically documented pharmacological effects, holds exciting pharmaceutical promise.

Rosmarinus officinalis L. is a species of the Lamiaceae family known as rosemary. It is a perennial herb native to the Mediterranean area and it has been cultivated in many parts of the world, including Brazil (Albuquerque et al., 2007; Bousbia, Vian, Ferhat, Petitcolas, Meklati & Chemat, 2009). The leaves of this plant are commonly used as a condiment for flavoring food and as a source of antioxidant compounds employed in food conservation (Nissen, Mansson, Bertelsen, Huynh-Ba & Skibsted, 2000).

Rosmarinus officinalis L. is also widely used for medicinal purposes. In traditional Brazilian folk medicine, this plant is used as a sedative, antispasmodic and cardiogenic, for treating menstrual disturbances, cough, influenza, colic, fever, pain, flatulence, stomachic, intestinal, hepatic and renal problems, and inflammatory diseases such as bronchial asthma (Albuquerque et al., 2007).

Some studies using experimental models and/or *in vitro* assays have also demonstrated important biological effects of *Rosmarinus officinalis* L., such as antioxidant (Bakirel, Bakirel, Keles, Ülgen & Yardibi, 2007), antimicrobial (Weckesser, Engel, Simon-Haarhaus, Wittmer, Pelz & Schempp, 2007), diuretic (Haloui, Louedec, Michel & Lyoussi, 2000), antidiabetic (Bakirel, Bakirel, Keles, Ülgen & Yardibi, 2007), antiulcerogenic (Dias, Foglio, Possenti & Carvalho, 2000) and antinociceptive (Takaki et al., 2008) properties. However, there are few studies concerning the anti-inflammatory effect of this species (Altinier, Sosa, Aquino, Mencherini, Loggia & Tubaro, 2007; Takaki et al., 2008; Juhás, Bukovská, Čikoš, Czikková, Fabian & Koppel, 2009).

Up to now several compounds have been identified from this herb including terpenes: carnosic acid, carnosol, ursolic acid and betulinic acid (Almela, Sánchez-Muñoz, Fernández-López, Roca & Rabe, 2006; Razborsek, Voncina, Dolecek & Voncina, 2008). Studies have also demonstrated that these compounds have important anti-inflammatory properties (Lo, Liang, Lin-Shiau, Ho & Lin, 2002; Takada & Aggarwal, 2003; Altinier, Sosa, Aquino, Mencherini, Loggia & Tubaro, 2007; Poeckel et al., 2008).

Motivated by the traditional use of *Rosmarinus officinalis* L. as an anti-inflammatory agent in respiratory disease such as bronchial asthma and based on the studies cited above, this work is part of our efforts to evaluate the anti-inflammatory activity of the crude extract and derived fractions of *Rosmarinus Officinalis* L. upon leukocytes and exudation levels, myeloperoxidase activity (MPO) and nitrite/nitrate concentrations (NO_x), as well as interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor-alpha levels ($\text{TNF-}\alpha$), in the inflammation induced by carrageenan in the mouse pleurisy model. We also isolated and identified the components from *Rosmarinus officinalis* L. responsible for the anti-inflammatory activity.

2. Material and Methods

2.1 Plant material and obtained crude extract

Rosmarinus officinalis L. was collected in Santo Amaro da Imperatriz, Santa Catarina, Brazil, and identified by Dr. Daniel de Barcelos Falkenberg from the Department of Botany, Federal University of Santa Catarina. A voucher specimen (Exsiccate number 34918) was deposited in the Botany Department Herbarium, Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil. The crude extract of aerial parts from *Rosmarinus officinalis* L. was obtained according to the methodologies described by Machado et al. (2009).

2.2 Isolation of compounds

The crude extract (61 g) was subjected to passage on a short silica gel column with hexane, ethyl acetate and ethanol to give the hexane (HEX: 13.3 g), ethyl acetate (AcOEt: 27.9 g) and ethanolic (ET: 13 g) fractions. The HEX fraction (9.37 g) was submitted to a chromatographic procedure on a silica gel column using hexane-ethyl acetate solutions with increasing polarity as eluents to afford 13 fractions. Fractions 8-9, which were eluted with hexane-ethyl acetate (75:25, v/v), were purified by crystallization in acetone to give carnosol (Compound 1) (76 mg) in the form of colorless crystals, m.p. 215–219 °C (Fig. 1A).

Further, the AcOEt fraction (8.83 g) was submitted to a silica gel column using hexane-ethyl acetate solution in increasing order of polarity as eluent, a procedure that afforded 33 fractions. The fractions (7-9) that were eluted with hexane-ethyl acetate (75:25, v/v) were purified by crystallization in ethanol yielding betulinic acid (Compound 2) (43 mg) as a

white powder, m.p. 296-298 °C (Fig 1B). Fractions 20-33 were further subjected to flash chromatographic columns and eluted with hexane-acetone solution (8:2 v/v), to give ursolic acid (Compound 3) (87 mg) as a white powder, m.p. 283-285 °C and carnosol (Compound 1) (52.5 mg) (Fig 1A and 1B). The structures of the known compounds were identified by measurement of their spectroscopic data (¹H NMR, ¹³C NMR (Varian AS-400 – Palo-Alto, CA, USA), and IR – Perkin Elmer FTIR 16 PC, Beaconsfield, England), and comparison with the spectral data obtained from the literature (Mahato & Kundu, 1994; Pukalskas, Van Beek & Waard, 2005), as well as co-TLC with authentic samples.

2.3 Animals

Swiss mice, weighing 18-25 g, were housed under standardized conditions (at constant room temperature (22 ± 2 °C) with alternating 12 h periods of light and darkness, humidity 50-60 %), and they were fed on a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the Federal University of Santa Catarina (License number – 23080.013659/2008-44), and the experiments were performed in accordance with the norms of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The number of animals used was the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatment.

2.4 Experimental protocol

Initially, for analysis of the dose-response curve, different animal groups were treated with different doses of crude extract (CE: 25 - 100 mg/kg) of *Rosmarinus officinalis* L. or its derived fractions: hexane fraction (HEX: 10 - 50 mg/kg), ethyl acetate fraction (AcOEt: 5 - 50 mg/kg), ethanolic fraction (ET: 10 - 50 mg/kg); or isolated compounds: carnosol (CAR: 1 - 10 mg/kg), betulinic acid (BA: 1 - 10 mg/kg), ursolic acid (UA: 2.5 - 25 mg/kg) administered by intraperitoneal route (i.p.) 0.5 h before pleurisy induction with carrageenan (Cg 1%), which was administered by intrapleural route (i.pl.). In parallel, some animals received an injection of either sterile saline (NaCl, 0.9%) (negative-control group) or carrageenan (positive-control group) administered by intrapleural (i.pl.) route. After 4 h the animals were killed with an overdose of pentobarbital, the thorax was opened, and the pleural cavity was washed with 1.0 mL of sterile phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6), composition: NaCl (130 mmol), Na₂HPO₄

(5 mmol), KH_2PO_4 (1 mmol) and distilled water (1000 ml) containing heparin (20 IU/mL). The leukocyte migration and exudation levels were then determined 4 h after pleurisy induction.

In another set of experiments employed to establish the time course profile, different animal groups were pre-treated with a single dose of CE (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), AcOEt (10 mg/kg), ET (50 mg/kg), CAR (2.5 mg/kg), BA (2.5 mg/kg) or UA (25 mg/kg) administered at different time points (0.5 - 4 h) and the same inflammatory parameters were examined 4 h after carrageenan administration.

The best pre-treatment dose and time of administration, which inhibited the leukocyte migration and exudation levels, was chosen for the crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions, as well as its isolated compounds. Different animal groups were then treated with CE (50 mg/kg), HEX (25 mg/kg), AcOEt (10 mg/kg), ET (50 mg/kg), CAR (2.5 mg/kg), BA (2.5 mg/kg) or UA (25 mg/kg) administered 0.5 h prior to pleurisy induction in order to analyze their effects upon the following: myeloperoxidase activity (MPO), nitrite/nitrate concentrations (NO_x), and interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels.

Dexamethasone (0.5 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg) administered by intraperitoneal route (i.p.) 0.5 h before pleurisy induction were used as reference anti-inflammatory drugs.

2.5 Quantification of leukocyte migration and exudation levels

After killing the animals, the fluid leakage samples from the mice pleural cavities were collected to determine the total and differential leukocyte contents and exudation levels. Total leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber, and cytospin preparations of the fluid leakage were stained with May-Grünwald-Giemsa for the differential count (Saleh, Calixto & Medeiros, 1996). The degree of exudation was determined by measuring the amount of Evans blue dye extravasation. Thus, in each experimental group animals received a solution of Evans blue dye (25 mg/kg) administered by intravenous route (i.v.) 0.5 h before the induction of inflammation. On the day of the analysis a batch of stored samples was thawed at room temperature and the amount of dye was estimated by colorimetry using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) at 620 nm, by interpolation from a standard curve of Evans blue dye in the range of 0.01 to 50 $\mu\text{g/mL}$.

2.6 Quantification of MPO activity and NO_x concentrations

In-house assays of both MPO activity and NO_x concentrations were employed according to methods described in the literature (Green, Wagner, Glowski, Skipper, Wishnok & Tannenbaum, 1982; Rao, Curie, Shaffer & Isakson, 1993).

The MPO activity, as well as the NO_x concentrations were estimated by means of colorimetric measurements (absorbance at 520 nm and 450 nm, respectively) on an ELISA plate reader (Organon Tecknica, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve. Results were expressed as mU/mL for MPO activity and μM for NO_x concentrations.

2.7 Quantification of IL-1β and TNF-α levels

For cytokine analysis, the fluid leakage samples were collected and immediately prepared to quantify cytokine levels. In this protocol, commercially available ELISA kits were used in accordance with the manufacturer's instructions. The ranges of values detected by these assays were: IL-1β = 11.72 - 750 pg/mL, and TNF-α = 5 - 2000 pg/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for IL-1β and TNF-α were as follows: intra CV: IL-1β = 3.6 ± 0.5%, and TNF-α = 7.8 ± 0.9%, and inter CV: IL-1β = 9.0 ± 1.7%, and TNF-α = 9.6 ± 2.1% with sensitivity values for IL-1β = 1.67 pg/mL, and TNF-α = 5.0 pg/mL. All cytokine levels were estimated by means of colorimetric measurements at 450 nm on an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve.

2.8 Drugs

The following drugs and reagents were used: carrageenan (degree IV); human neutrophil myeloperoxidase, indomethacin, ortho-dianisidine dihydrochloride (3,3'-dimethoxybenzidine), sodium azide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); dexamethasone (Ache Pharmaceutical Laboratories S.A., São Paulo, SP, Brazil); sodium hydrogen phosphate, zinc sulfate, hydrogen peroxide (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); sodium hydroxide (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); Türk, May-Grünwald dye (Newprov, Pinhais, PR, Brazil); Giemsa dye (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil); Evans blue dye (Acros-Organics, New Jersey, USA); n-(1-

naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany); vanadium, sulfanilamide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and ELISA kits for the quantitative determination of mouse IL-1 β (IBL Immuno Biological Laboratories Co. Ltd, Fujioka-city, Gunma, Japan, Cat n $^{\circ}$ 27193), and TNF- α (BD-Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA, Cat n $^{\circ}$ 559732). The solvents such as hydrochloric acid, acetone, chloroform, n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, methanol, and ethanol, all of analytical grade, were purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). Other reagents used were also of analytical grade and obtained from different commercial sources.

2.9 Statistical analysis

The data are reported as the mean \pm SEM of five animals. The GraphPad Prism software version 3.0 was used to determine the differences between groups by using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc analysis using Student's and Newman-Keuls tests. *P*-values of less than 0.05 were considered to be significant.

3. Results

3.1 Phytochemical analysis

In this study, the phytochemical analysis of HEX and AcOEt fractions using chromatographic procedures resulted in the isolation of three compounds. The diterpene carnosol was isolated from both HEX and AcOEt fractions. Carnosol (Compound 1) represented 0.81% of the HEX and 0.59% of the AcOEt fractions (Fig 1A). In addition, both betulinic acid (Compound 2) and ursolic acid (Compound 3) were isolated from the AcOEt fraction. Betulinic acid and ursolic acid represented 0.98% and 0.48%, respectively, of the latter fraction (Fig 1B and C).

3.2 Effects of *Rosmarinus officinalis* L. upon leukocytes and exudate levels

The CE at doses of 50 and 100 mg/kg significantly decreased leukocyte numbers by 36.31 ± 5.34 and 35.68 ± 3.87 % ($p < 0.01$), those of neutrophils by 40.45 ± 7.23 and 42.56 ± 6.84 % ($p < 0.01$) and exudation by 14.98 ± 4.47 and 15.57 ± 5.38 % ($p < 0.05$). CE at all studied doses did not inhibit mononuclears ($p > 0.05$) (Table 1).

The hexane fraction (HEX: 10 - 50 mg/kg) also significantly suppressed leukocytes from 34.37 ± 4.77 to 46.53 ± 5.56 % ($p < 0.01$), neutrophils from 36.24 ± 4.13 to 52.72 ± 4.83 % ($p < 0.01$) and exudation from 19.63 ± 4.90 to 19.73 ± 7.23 % ($p < 0.05$), but only at the dose of 25 mg/kg did this fraction inhibit mononuclears by 39.46 ± 14.69 % ($p < 0.05$). The HEX (10 mg/kg) treatment did not alter the levels of exudation ($p > 0.05$) (Table 1).

The ethyl acetate fraction (AcOEt: 10 to 50 mg/kg) produced a significant inhibition of leukocytes from 35.21 ± 4.96 to 58.86 ± 5.29 % ($p < 0.01$), neutrophils from 40.88 ± 4.34 to 64.64 ± 8.03 % ($p < 0.01$) and exudation from 25.84 ± 7.17 to 29.55 ± 8.94 % ($p < 0.01$). The AcOEt fraction (25 and 50 mg/kg) also inhibited mononuclears by 24.55 ± 7.74 and 29.05 ± 12.55 % ($p < 0.05$), although at the lower dose of 10 mg/kg this fraction did not modify the studied inflammatory parameters ($p > 0.05$) (Table 1).

The ethanolic fraction (ET: 50 mg/kg) significantly decreased leukocyte numbers by 61.04 ± 5.52 % ($p < 0.01$), those of neutrophils by 64.34 ± 5.18 % ($p < 0.01$), mononuclears by 44.86 ± 8.34 % ($p < 0.01$) and exudation by 34.78 ± 3.69 % ($p < 0.01$). At the dose of 25 mg/kg the ET fraction only inhibited exudation by 21.03 ± 1.52 % ($p < 0.01$). Also, this fraction at the dose of 10 mg/kg did not modify these parameters ($p > 0.05$) (Table 1).

Since the CE and its derived fractions demonstrated important anti-inflammatory effects, and also the HEX and AcOEt fractions presented more pronounced inhibitory effects on studied inflammatory parameters than the ET fraction, we speculated on which compounds isolated from these later fractions could be responsible for these inhibitory properties.

The results showed that carnosol (CAR: 2.5 - 10 mg/kg) isolated from hexane and ethyl acetate fractions significantly inhibited leukocytes from 19.49 ± 3.56 to 58.08 ± 4.38 % ($p < 0.01$), neutrophils from 15.54 ± 3.91 to 59.82 ± 4.94 % ($p < 0.05$), mononuclears from 45.75 ± 7.70 to 59.46 ± 3.86 % ($p < 0.01$) and exudation from 28.54 ± 3.78 to 34.03 ± 6.88 % ($p < 0.01$). The dose of 1 mg/kg of this compound did not inhibit the inflammatory process caused by carrageenan ($p > 0.05$) (Table 2).

The betulinic acid (BA: 2.5 - 10 mg/kg) isolated from the ethyl acetate fraction also significantly suppressed leukocytes from 18.49 ± 6.89 to 32.64 ± 7.74 % ($p < 0.05$), neutrophils from 16.55 ± 6.59 to 28.66 ± 8.61 % ($p < 0.05$), mononuclears from 33.62 ± 11.15 to 58.33 ± 3.73 % ($p < 0.05$) and exudation from 43.89 ± 3.04 to 46.47 ± 7.65 % ($p < 0.01$). The

lower dose of BA (1 mg/kg) only decreased exudation levels by 27.57 ± 3.48 % ($p < 0.01$) (Table 2).

The ursolic acid (UA: 25 mg/kg) isolated from the ethyl acetate fraction also significantly decreased leukocytes by 72.71 ± 2.58 % ($p < 0.01$), neutrophils by 78.49 ± 1.98 % ($p < 0.01$), mononuclears by 42.16 ± 6.50 % ($p < 0.01$) and exudation by 50.29 ± 4.25 % ($p < 0.01$). The doses of 2.5 and 5 mg/kg of UA only inhibited mononuclears by 33.79 ± 14.77 and 34.33 ± 9.79 % ($p < 0.05$). On the other hand, the dose of 10 mg/kg decreased the numbers of mononuclear cells by 47.30 ± 7.68 % ($p < 0.01$) and exudation by 17.94 ± 5.43 % ($p < 0.05$) (Table 2).

The time course profiles for the crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions, as well as its isolated compounds, showed that they were effective in inhibiting the studied inflammatory parameters when they were administered only at 0.5 h before carrageenan, except for the CE (50 mg/kg), which demonstrated a long-lasting anti-inflammatory effect since it was able to reduce the inflammation caused by carrageenan at up to 2 h of pre-treatment (results not shown).

As expected, dexamethasone and indomethacin also inhibited all these inflammatory parameters ($p < 0.05$) (Tables 1 and 2).

3.3 *Rosmarinus officinalis* L. effects upon MPO activity and NO_x concentrations.

The pre-treatment (0.5 h) of animals with CE, its derived fractions and isolated compounds caused a significant decrease in MPO activity compared to control (% of inhibition: CE (50 mg/kg): 52.09 ± 12.49 %, HEX (25 mg/kg): 36.24 ± 5.47 %, AcOEt (10 mg/kg): 38.70 ± 8.30 %, ET (50 mg/kg): 29.77 ± 9.65 %, CAR (2.5 mg/kg): 43.86 ± 12.15 %, BA (2.5 mg/kg): 50.45 ± 3.91 % and UA (25 mg/kg): 52.07 ± 5.80 %) ($p < 0.05$). NO_x concentrations were also significantly decreased (% of inhibition: CE (50 mg/kg): 53.84 ± 7.4 %, HEX (25 mg/kg): 30.33 ± 10.85 %, AcOEt (10 mg/kg): 57.81 ± 6.19 %, ET (50 mg/kg): 67.15 ± 4.57 %, CAR (2.5 mg/kg): 46.50 ± 5.77 %, BA (2.5 mg/kg): 29.69 ± 8.60 % and UA (25 mg/kg): 31.13 ± 6.49 %) ($p < 0.05$) (Table 3).

Dexamethasone and indomethacin were effective in inhibiting the MPO activity and NO_x concentrations ($p < 0.01$) (Table 3).

3.4 *Rosmarinus officinalis* L. effects upon IL-1 β and TNF- α levels

The CE, its derived fractions and isolated compounds also caused a significant decrease in levels of IL-1 β compared to control (% of inhibition: CE (50 mg/kg): 59.66 \pm 4.99 %, HEX (25 mg/kg): 46.49 \pm 7.38 %, AcOEt (10 mg/kg): 51.12 \pm 5.87 %, ET (50 mg/kg): 36.61 \pm 5.61 %, CAR (2.5 mg/kg): 38.82 \pm 4.99 %, BA (2.5 mg/kg): 57.88 \pm 7.49 % and UA (25 mg/kg): 45.83 \pm 4.99 %) ($p < 0.05$). Likewise, treatments resulted in decreased levels of TNF- α compared to control (% of inhibition: CE (50 mg/kg): 80.40 \pm 2.14 %, HEX (25 mg/kg): 72.42 \pm 3.77 %, AcOEt (10 mg/kg): 72.84 \pm 2.99 %, ET (50 mg/kg): 36.90 \pm 7.38 %, CAR (2.5 mg/kg): 67.63 \pm 7.12 %, BA (2.5 mg/kg): 77.27 \pm 1.60 % and UA (25 mg/kg): 64.97 \pm 0.82 %) ($p < 0.05$) (Table 4).

Dexamethasone and indomethacin were also effective in inhibiting these pro-inflammatory cytokines ($p < 0.05$) (Table 4).

4. Discussion

Excessive synthesis and release of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines is a common feature of chronic inflammatory diseases (Bradley, 2008; Ren & Torres, 2009). Despite the vast array of commercially available drugs, continued efforts are in progress with the aim of developing a 'perfect' anti-inflammatory drug. Both natural and synthetic compounds with a broad spectrum of structures have been tested *in vitro* and *in vivo* in order to develop new and more selective drugs.

Data from our study indicate that the crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions had a marked anti-inflammatory effect in a murine pleurisy model by significantly inhibiting the release of pro-inflammatory mediators, including NO_x, IL-1 β and TNF- α , as well as decreasing leukocyte activation at the site of inflammation in response to carrageenan.

The inhibitory effect upon leukocytes found here was also associated with a significant decrease in the activity of myeloperoxidase, which is a key enzyme for oxygen-dependent microbicidal activity and is released by activated neutrophils during the respiratory burst (Van Der Veen et al., 2009). Our results have revealed that *Rosmarinus Officinalis* L. inhibits not only leukocyte influx to the inflammatory site, but also leukocyte activation (Fröde & Medeiros, 2001). For this studied parameter of inflammation the crude extract of this herb exhibited a similar anti-inflammatory pattern to that of the reference drugs.

Nitric oxide is another important pro-inflammatory mediator involved in exudation and leukocyte influx in the inflammatory process (Cuzzocrea et al., 2000). Our results also showed that *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions significantly decreased the nitrite/nitrate concentrations. Moreover, CE presented the same pattern of inhibitory effect on NO_x as reference drugs.

The pro-inflammatory properties of IL-1 β and TNF- α in the acute, as well as chronic inflammatory diseases are well known (Bradley, 2008; Ren & Torres, 2009); consequently, our study also focused on these pro-inflammatory mediators. The crude extract of *Rosmarinus officinalis* L. was found not only to inhibit IL-1 β and TNF- α , but it was also more effective than the reference drugs in decreasing levels of these pro-inflammatory cytokines, since CE (50 mg/kg) was 1.6-fold and 2.7-fold more effective in inhibiting IL-1 β and TNF- α levels than indomethacin, and 2.3-fold more competent in decreasing TNF- α levels than dexamethasone ($p < 0.05$).

Although the studied fractions isolated from *Rosmarinus officinalis* L. demonstrated important anti-inflammatory effects, the pattern of these effects was different. Such distinct biological effects may be linked to the differences in chemical composition of each fraction. Consequently, we performed a phytochemical analysis of the HEX and AcOEt fractions since they exhibited the most pronounced anti-inflammatory actions, with lower doses (HEX: 25 mg/kg and AcET: 10 mg/kg) of these fractions inhibiting inflammatory parameters to the same extent as the ethanolic fraction at a dose of 50 mg/kg.

In an attempt to evaluate the anti-inflammatory potential of the isolated compounds from these former fractions, we isolated betulinic acid and ursolic acid from the AcOEt fraction and carnosol from the HEX and AcOEt fractions. Then, we tested the effects of these compounds upon the same studied inflammatory parameters. Our results revealed that all compounds inhibited leukocytes, neutrophils, exudation, and MPO activity, as well as decreasing NO_x concentrations and IL-1 β and TNF- α levels. Although all the isolated compounds demonstrated important anti-inflammatory effects upon leukocytes, exudation and pro-inflammatory mediators that are involved in the inflammatory response, carnosol and betulinic acid showed more pronounced anti-inflammatory effects than ursolic acid since these compounds were effective in inhibiting the inflammation caused by carrageenan at lower doses (2.5 mg/kg) compared to ursolic acid (25 mg/kg). Also, the isolated compounds demonstrated even better anti-inflammatory actions than the reference drugs. For example, betulinic acid (2.5 mg/kg) was 1.2-fold, 1.6-fold and 2.3-fold more potent

than indomethacin in decreasing exudation, IL-1 β and TNF- α levels, respectively, and twice as potent as dexamethasone in inhibiting TNF- α release ($p < 0.05$). Further, ursolic acid (25 mg/kg) was 1.4-fold, 1.5-fold, 1.7-fold, and 2.0-fold more potent than indomethacin in inhibiting exudation, TNF- α , leukocytes, and neutrophil levels, respectively ($p < 0.05$).

Similar results have been observed by Lo, Liang, Lin-Shiau, Ho and Lin (2002), who reported that carnosol suppressed nitric oxide production and iNOS gene expression by inhibiting the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) activation in LPS-activated mouse macrophages, and also by Paur, Austenaa and Blomhoff (2008), who showed that the same compound also decreased LPS-induced NF- κ B activity in a human monocytic cell line. Furthermore, carnosol inhibited the formation of proinflammatory leukotrienes in human polymorphonuclear leukocytes, as well as attenuating the formation of reactive oxygen species and the human leukocyte elastase secretion (Poeckel et al., 2008).

In relation to betulinic acid, a study has shown that this compound suppressed NF- κ B activation induced by TNF, phorbol myristate acetate (PMA), cigarette smoke, okadaic acid, IL-1, and hydrogen peroxide in different cell lines (Takada & Aggarwal, 2003). Another study demonstrated that betulinic acid was effective in decreasing skin inflammation induced by glucose oxidase (GOD), paw edema induced by bradykinin and ear edema induced by mezerein, DPT (12-deoxyphorbol-13-tetradecanoate), DPP (12-deoxyphorbol-13-phenylacetate) or bryostatin (Huguet, Recio, Mnez, Giner & Ríos, 2000). Studies *in vitro* showed that betulinic acid also inhibited phospholipase A2 (PLA2) (Bernard, Scior, Didier, Hibert & Berthon, 2001).

With respect to ursolic acid, studies have demonstrated important anti-inflammatory activity by significantly inhibiting the edematous response in the croton oil-induced ear edema model in mice (Altinier, Sosa, Aquino, Mencherini, Loggia & Tubaro, 2007). This compound also significantly attenuated the release of IL-6 and TNF- α induced in a rat adrenal gland pheochromocytoma cell line by hydrogen peroxide (H₂O₂) or the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) (Tsai & Yin, 2008).

In conclusion, *Rosmarinus officinalis* L. showed important anti-inflammatory properties, and its constituents carnosol, betulinic acid and ursolic acid may well account for this. These compounds have potential as new leads for the development of future therapeutic interventions in the treatment of patients with inflammatory disorders.

Acknowledgement

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento Docente (CAPES), Brazil, for financial support.

References

Albuquerque, U. P., Medeiros, P. M., Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Neto, E. M. F. L., Melo, J. G., & Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 325–354.

Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J., Roca, M., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography*, 1120(1-2), 221-229.

Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R. P., Mencherini, T., Loggia, R. D., & Tubaro, A. (2007). Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1718-1723.

Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, U. B., Ülgen, S. G., & Yardibi, H. (2007). *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 64-73.

Bernard, P., Scior, P., Didier, B., Hibert, M., & Berthon, J. Y. (2001). Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. *Phytochemistry*, 58(6), 865-874.

Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114(1), 355–362.

Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214(2), 149–160.

Cuzzocrea, S., Mazzone, E., Calabro, G., Dugo, L., Sarro, A., Loo, F. A. J. V., & Caputi, A. P. (2000). Inducible nitric oxide synthase—knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(5), 1859–1866.

Dias, P. C., Foglio, M. A., Possenti, A., & Carvalho, J. E. (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), 57-62.

Fröde, T. S., & Medeiros, Y. S. (2001). Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by

carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, 10(4), 223–227.

Green, I. C., Wagner, D. A., Glowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. B. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131-138.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J. B., & Lyoussi, B. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 465-472.

Huguet A. I., Recio, M. C., Máñez, S., Giner, R. M., & Ríos, J. L. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, 410(1), 69–81.

Juhás, Š., Bukovská, A., Čikoš, S., Czikková, S., Fabian, D., & Koppel, J. (2009). Anti-Inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno*, 78(4), 121–127.

Lo, A-H., Liang Y. C., Lin-Shiau S -Y, Ho, C-T., & Lin, J-K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), 983-991.

Machado, D. G., Bettio, I. E. B., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33(4), 642-650.

Mahato, S. B., & Kundu, A. (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6), 1517-1575.

Nissen, L. R., Mansson, L., Bertelsen, G., Huynh-Ba, T., & Skibsted, L.H. (2000). Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5548-5556.

Paur, I., Austenaa, L. M., & Blomhoff, R. (2008). Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1288–1297.

PoECKel, D., Greiner, C., Verhoff, M., Rau, O., Tausch, L., Hörnig, C., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz M., & Werz, O. (2008). Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human

polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, 76(1), 91-97.

Pukalskas, A., Van Beek, T. A., & Waard, P. (2005). Development of a triple hyphenated HPLC–radical scavenging detection–DAD–SPE–NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *Journal of Chromatographic A*, 1074(1-2), 81-88.

Rao, T. S., Curie, J. L., Shaffer, A. F., & Isakson, P. C. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetraacetylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. *Inflammation*, 17(6), 723-741.

Razborssek, M. I., Voncina, D. B., Dolecek, V., & Voncina, E. (2008). Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, 67(5-6), 433-440.

Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57 – 64.

Saleh, T. S. F., Calixto, J. B., & Medeiros, Y. S. (1996). Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, 118(3), 811-819.

Takada, Y., & Aggarwal, B.B. (2003). Betulinic Acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *The Journal of Immunology*, 171(6), 3278–3286.

Takaki, I., Bersani-Amado, L. E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S. M., Diniz, S. P., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. (2008). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. *Journal of Medicinal Food*, 11(4), 741-746.

Tsai, S. J., & Yin, M. C. (2008). Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *Journal of Food Science*, 73(7), 174-178.

Van Der Veen, B. S., Winther, M. P. J., Heeringa, P., Augusto, O., Chen, J. W., Davies, M., Ma, X. L., Malle, E., Pignatelli, P., & Rudolph, T. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 1-39.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., & Schempp, C. M. (2007). Screening of plant extracts for

antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 14(7-8), 508-516.

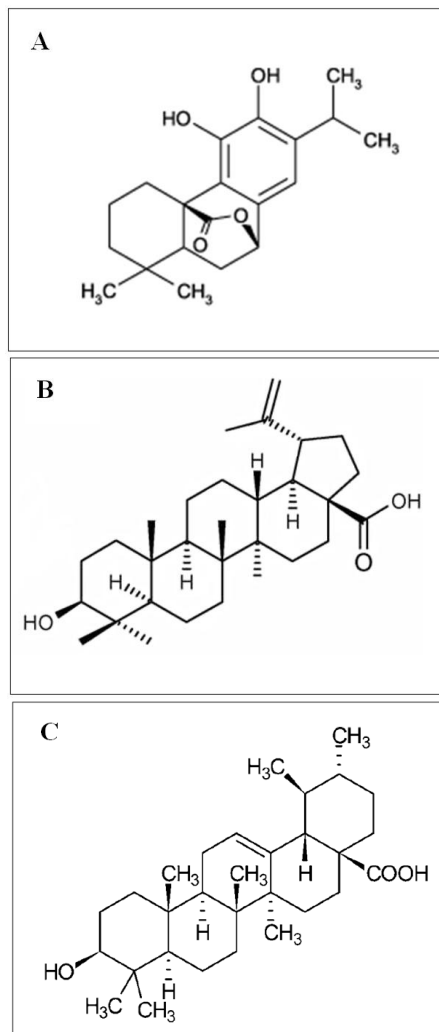


Fig. 1 – The chemical structure of compounds isolated from derived fractions of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts (A) Compound 1 (carnosol) isolated from hexane and ethyl acetate fractions. (B) Compound 2 (betulinic acid) isolated from the ethyl acetate fraction. (C) Compound 3 (ursolic acid) isolated from the ethyl acetate fraction.

Table 1 – The effects of *Rosmarinus officinalis* L. crude extract and its derived fractions upon leukocytes and exudate levels in the inflammation induced by carrageenan in the murine pleurisy model.

Groups/Doses (mg/kg)	Leukocytes (x10 ⁶)	Neutrophils (x10 ⁶)	Mononuclear cells (x10 ⁶)	Exudation (µg/mL)
C ^a	4.80 ± 0.17	4.06 ± 0.15	0.74 ± 0.06	11.61 ± 0.53
CE 25 ^b	4.47 ± 0.25	3.65 ± 0.23	0.82 ± 0.11	12.38 ± 0.54
CE 50 ^b	3.06 ± 0.26**	2.44 ± 0.30**	0.61 ± 0.06	9.86 ± 0.52*
CE 100 ^b	3.09 ± 0.23**	2.36 ± 0.28**	0.73 ± 0.15	9.79 ± 0.62*
HEX 10 ^b	3.15 ± 0.23**	2.61 ± 0.17**	0.54 ± 0.10	11.64 ± 0.69
HEX 25 ^b	2.82 ± 0.40**	2.37 ± 0.31**	0.45 ± 0.11*	9.31 ± 0.84*
HEX 50 ^b	2.57 ± 0.27**	1.94 ± 0.20**	0.63 ± 0.09	9.32 ± 0.57*
AcOEt 5 ^b	4.90 ± 0.16	4.24 ± 0.10	0.66 ± 0.09	11.73 ± 1.05
AcOEt 10 ^b	3.11 ± 0.24**	2.42 ± 0.18**	0.69 ± 0.08	8.17 ± 1.04**
AcOEt 25 ^b	2.83 ± 0.16**	2.28 ± 0.18**	0.55 ± 0.06*	8.60 ± 0.83**
AcOEt 50 ^b	1.97 ± 0.40**	1.45 ± 0.33**	0.52 ± 0.09*	8.33 ± 0.66**
ET 10 ^b	5.00 ± 0.62	4.31 ± 0.56	0.69 ± 0.07	11.76 ± 0.59
ET 25 ^b	3.86 ± 0.64	3.10 ± 0.54	0.76 ± 0.14	9.16 ± 0.18**
ET 50 ^b	1.87 ± 0.26**	1.46 ± 0.21**	0.41 ± 0.06**	7.56 ± 0.43**
Dex 0.5 ^b	1.75 ± 0.29**	1.33 ± 0.21**	0.42 ± 0.12*	6.51 ± 0.49**
Indo 5 ^b	2.26 ± 0.32**	1.78 ± 0.25**	0.48 ± 0.12*	7.93 ± 0.56**

Crude extract (CE: 25 - 100 mg/kg) of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions: hexane fraction (HEX: 10 - 50 mg/kg), ethyl acetate fraction (AcOEt: 5 - 50 mg/kg) and ethanolic fraction (ET: 10 - 50 mg/kg) administered 0.5 h before pleurisy induction by carrageenan (1%). C = positive control group = response in animals treated only with carrageenan. Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. The data are reported as the mean ± sem. a = administered by intrapleural route, b = administered by intraperitoneal route. N = 5 animals.

Table 2 – The effects of *Rosmarinus officinalis* L. isolated compounds upon leukocytes and exudate levels in the inflammation induced by carrageenan in the murine pleurisy model.

Groups/Doses (mg/kg)	Leukocytes (x10 ⁶)	Neutrophils (x10 ⁶)	Mononuclear cells (x10 ⁶)	Exudation (µg/mL)
C ^a	4.80 ± 0.17	4.06 ± 0.15	0.74 ± 0.06	11.61 ± 0.53
Carnosol 1 ^b	4.82 ± 0.35	4.15 ± 0.31	0.67 ± 0.08	10.25 ± 0.79
Carnosol 2.5 ^b	3.86 ± 0.17 **	3.46 ± 0.16 *	0.40 ± 0.06 **	8.29 ± 0.44 **
Carnosol 5 ^b	2.01 ± 0.21 **	1.65 ± 0.20 **	0.36 ± 0.06 **	7.72 ± 0.66 **
Carnosol 10 ^b	2.40 ± 0.49 **	2.10 ± 0.47 **	0.30 ± 0.03 **	7.65 ± 0.80 **
Betulinic acid 1 ^b	4.73 ± 0.54	4.12 ± 0.47	0.61 ± 0.08	8.40 ± 0.40 **
Betulinic acid 2.5 ^b	3.91 ± 0.33 *	3.42 ± 0.27 *	0.49 ± 0.08 *	6.51 ± 0.35 **
Betulinic acid 5 ^b	3.88 ± 0.17 *	3.41 ± 0.13 *	0.47 ± 0.06 *	6.21 ± 0.89 **
Betulinic acid 10 ^b	3.23 ± 0.37 **	2.92 ± 0.35 **	0.31 ± 0.03 **	6.29 ± 0.54 **
Ursolic acid 2.5 ^b	4.57 ± 0.51	4.08 ± 0.54	0.49 ± 0.11 *	10.66 ± 1.12
Ursolic acid 5 ^b	4.52 ± 0.32	4.03 ± 0.29	0.49 ± 0.07 *	9.96 ± 0.86
Ursolic acid 10 ^b	4.21 ± 0.36	3.82 ± 0.37	0.39 ± 0.06 **	9.52 ± 0.63 *
Ursolic acid 25 ^b	1.31 ± 0.12 **	0.88 ± 0.08 **	0.43 ± 0.05 **	5.77 ± 0.49 **
Dex 0.5 ^b	1.75 ± 0.29 **	1.33 ± 0.21 **	0.42 ± 0.12 *	6.51 ± 0.49 **
Indo 5 ^b	2.26 ± 0.32 **	1.78 ± 0.25 **	0.48 ± 0.12 *	7.93 ± 0.56 **

Carnosol (CAR: 1 - 10 mg/kg), Betulinic acid (BA: 1 - 10 mg/kg) and Ursolic acid (UA: 2.5 - 25 mg/kg) isolated from *Rosmarinus officinalis* L. administered 0.5 h before pleurisy induction by carrageenan (1%). C = positive control group = response in animals treated only with carrageenan. Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. The data are reported as the mean ± sem. a = administered by intrapleural route, b = administered by intraperitoneal route. N = 5 animals.

Table 3 – The effects of *Rosmarinus officinalis* L. crude extract, its derived fractions and isolated compounds upon MPO activity and NO_x concentration in the inflammation induced by carrageenan in the murine pleurisy model.

Groups/Doses (mg/kg)	MPO (mU/mL)	NO _x (μM)
C ^a	408.10 ± 50.96	14.88 ± 1.15
CE 50 ^b	195.50 ± 50.97 *	6.87 ± 1.10 **
HEX 25 ^b	260.20 ± 22.33 *	10.37 ± 1.61 *
AcOEt 10 ^b	250.20 ± 33.89 *	6.28 ± 0.92 **
ET 50 ^b	286.60 ± 39.40 *	4.88 ± 0.68 **
Carnosol 2.5 ^b	229.10 ± 49.60 *	7.96 ± 0.86 **
Betulinic acid 2.5 ^b	202.20 ± 15.97 **	10.46 ± 1.28 *
Ursolic acid 25 ^b	195.60 ± 23.69 **	10.25 ± 0.96 *
Dex 0.5 ^b	135.80 ± 5.65 **	5.80 ± 1.20 **
Indo 5 ^b	120.10 ± 13.70 **	7.40 ± 0.90 **

Crude extract (CE: 50 mg/kg) of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions: hexane fraction (HEX: 25 mg/kg), ethyl acetate fraction (AcOEt: 10 mg/kg) or ethanolic fraction (ET: 50 mg/kg), and isolated compounds: Carnosol (CAR: 2.5 mg/kg), Betulinic acid (BA: 2.5 mg/kg) or Ursolic acid (UA: 25 mg/kg) administered 0.5 h before inflammation induction by carrageenan (1%). C = positive control group = response in animals treated only with carrageenan. Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. The data are reported as the mean ± SEM. a = administered by intrapleural route, b = administered by intraperitoneal route. N = 5 animals.

Table 4 – The effects of *Rosmarinus officinalis* L. crude extract, its derived fractions and isolated compounds upon IL-1 β and TNF- α levels in the inflammation induced by carrageenan in the murine pleurisy model.

Groups/Doses (mg/kg)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
C ^a	1156.00 \pm 118.90	2944.88 \pm 378.71
CE 50 ^b	466.40 \pm 57.74 **	577.20 \pm 62.92 **
HEX 25 ^b	618.50 \pm 85.39 *	812.30 \pm 110.90 **
AcOEt 10 ^b	565.00 \pm 67.87 **	800.00 \pm 88.19 **
ET 50 ^b	732.80 \pm 64.83 *	1858.00 \pm 217.50 *
Carnosol 2.5 ^b	707.30 \pm 57.74 *	953.40 \pm 209.80 **
Betulinic acid 2.5 ^b	487.00 \pm 86.60 **	669.50 \pm 47.19 **
Ursolic acid 25 ^b	626.20 \pm 57.74 *	1032.00 \pm 24.23 **
Dex 0,5 ^b	516.00 \pm 33.42 **	1375.66 \pm 270.28 *
Indo 5 ^b	763.50 \pm 72.17 *	1553.13 \pm 140.30 *

Crude extract (CE: 50 mg/kg) of *Rosmarinus officinalis* L. and its derived fractions: hexane fraction (HEX: 25 mg/kg), ethyl acetate fraction (AcOEt: 10 mg/kg) or ethanolic fraction (ET: 50 mg/kg), and isolated compounds: Carnosol (CAR: 2.5 mg/kg), Betulinic acid (BA: 2.5 mg/kg) or Ursolic acid (UA: 25 mg/kg) administered 0.5 h before inflammation induction by carrageenan (1%). C = positive control group = response in animals treated only with carrageenan. Dex = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. The data are reported as the mean \pm SEM. a = administered by intrapleural route, b = administered by intraperitoneal route. N = 5 animals.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito do extrato bruto hidroalcoólico (CE), obtido das partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L., bem como de suas frações: hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e etanólica (ET), e compostos isolados: carnosol (CAR), ácido betulínico (BA) e ácido ursólico (UA), administrados por via intraperitoneal (i.p.), no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.

Estes resultados demonstraram que o extrato bruto hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* L. e suas frações apresentaram importante atividade anti-inflamatória, caracterizada pela diminuição da exsudação e da quimiotaxia de leucócitos, bem como, pela redução da atividade da enzima MPO e das concentrações dos mediadores pró-inflamatórios: NO, TNF- α e IL-1 β . Resultados semelhantes foram observados com o tratamento dos animais com dexametasona ou indometacina.

O extrato bruto hidroalcoólico da *Rosmarinus officinalis* L. e suas frações foram efetivos em inibir a migração leucocitária, principalmente às custas de neutrófilos, células envolvidas na resposta inflamatória aguda (NAUSEEF, 2007). Esse efeito sobre o influxo de leucócitos foi associado com a diminuição da atividade da MPO. A MPO é uma enzima liberada por neutrófilos ativadas e é utilizada como marcador do recrutamento e ativação de leucócitos, uma vez que consiste na sua principal fonte enzimática de oxidantes (VAN DER VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009). Assim, a redução da atividade da enzima MPO revela que a *Rosmarinus officinalis* L. não somente inibiu o influxo de leucócitos no local da resposta inflamatória, mas também a ativação dessas células.

Estudos já demonstraram a participação da MPO no processo inflamatório, inclusive no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, bem como no modelo de inflamação duodenal induzida por turpentina, em camundongos (FAITH et al., 2008; KOELZER et al., 2009).

Além disso, estudos clínicos demonstraram atividade ou concentrações de MPO significativamente elevadas no plasma de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (TELLES et al., 2009), esclerose múltipla (MINOHARA et al., 2006), artrite reumatoide (BASKOL et al., 2006) e asma (EKMEKCI et al., 2004), no fluido sinovial de pacientes com osteoartrite (STEINBECK et al., 2007), e na mucosa retal de pacientes com colite ulcerativa (KRISTJÁNSSON et al., 2004).

O extrato bruto hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* L. e suas frações reduziram também as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x).

A inibição da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) tem mostrado ser efetiva em reduzir o dano tecidual em vários modelos de inflamação. Dentre eles, destaca-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em ratos, no qual

o inibidor seletivo da iNOS GW274150 inibiu a exsudação e a migração de neutrófilos, bem como, as concentrações de NO_x , TNF- α e IL-1 β no exsudato pleural (DUGO et al., 2004). Já no modelo da pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), em ratos, McCluskie et al. (2004) demonstraram inibição importante de neutrófilos no lavado broncoalveolar e da concentração de NO exalado, utilizando inibidores de iNOS seletivos e não seletivos. Em outro estudo, a administração do inibidor da NOS aminoguanidina reduziu as concentrações séricas de NO e TNF- α no modelo de lesão pulmonar induzida por ácido oleico, em ratos (YEH et al., 2008).

Outros estudos têm demonstrado também que o NO está envolvido na exsudação, entre esses, Sakaguchi et al. (2006) demonstraram que a administração do inibidor da NOS, L-NAME, reduziu as concentrações de NO_x e exsudação no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em ratos. Jang et al. (2004) demonstraram ainda que a inflamação e o edema pulmonar induzidos por bleomicina, em ratos, estão associados com o aumento da expressão de iNOS no pulmão. Em nosso estudo, a inibição da concentração de NO_x também foi acompanhada de redução da exsudação. Nas vias aéreas, a exsudação possui papel fundamental na resposta inflamatória, uma vez que auxilia no extravasamento de substâncias pró-inflamatórias. Além disso, a exsudação reflete também a gravidade da lesão da mucosa das vias aéreas (GREIFF et al., 2003).

Estudos clínicos têm também demonstrado concentrações elevadas de NO no ar exalado de pacientes com asma (BERRY et al., 2006), bem como, no plasma e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide ou osteoartrite (SHAO et al., 2009). Já Ortiz et al. (2009) observaram concentrações séricas elevadas de NO_x em pacientes com esclerose múltipla recorrente. Além disso, Cirillo et al. (2009) demonstraram ainda aumento da expressão de iNOS na mucosa retal de pacientes com colite ulcerativa.

Nosso trabalho demonstrou ainda que o extrato bruto hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* L. e suas frações inibiram as concentrações de IL-1 β e TNF- α . Além disso, o extrato bruto hidroalcoólico (50 mg/kg) foi 1,6 e 2,7 vezes mais efetivo em inibir as concentrações de IL-1 β e TNF- α , quando comparado à indometacina e 2,3 vezes mais efetivo em inibir a concentração de TNF- α , quando comparado à dexametasona ($p < 0,05$). Já as frações AcoEt e HEX inibiram 1,9 vezes mais a concentração de TNF- α quando comparadas a indometacina ($p < 0,01$).

Vários estudos têm demonstrado a participação das citocinas IL-1 β e TNF- α no processo inflamatório. Dentre esses, Baluk et al. (2009) observaram diminuição significativa no remodelamento vascular de camundongos infectados por *Mycoplasma pulmonis*, quando tratados com anticorpo anti-TNF- α , ou utilizando animais *knockout* para o receptor TNF RI dessa citocina. Já Zhang,

Adner e Cardell (2007) demonstraram que a IL-1 β induziu, *in vitro*, a expressão de receptores de bradicinina B1 e B2 no músculo liso da traqueia de camundongos após estimulação elétrica. Ainda, o uso de anticorpo anti-TNF- α (Remicade) suprimiu a expressão desses receptores neste experimento. Esses resultados indicam que a IL-1 β e o TNF- α participam da hiperresponsividade brônquica no processo inflamatório das vias aéreas.

Bressan, Cunha e Tonussi (2006) demonstraram também que a injeção intra-articular de anticorpo anti-IL-1 β ou anti-TNF- α reduziu o edema e a infiltração celular na articulação do joelho, no modelo experimental de artrite induzida por LPS, em ratos. Já, Nakae et al. (2007) demonstraram em animais deficientes de TNF- α , diminuição da infiltração de neutrófilos, da atividade da MPO e das concentrações das citocinas pró-inflamatórias interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-17 (IL-17) no lavado broncoalveolar, no modelo de alergia induzida por ovalbumina, em camundongos. De forma semelhante, Mazon et al. (2008) observaram em animais *knockout* para o receptor TNF RI do TNF- α , redução significativa da exsudação, da infiltração de leucócitos, das concentrações de NO $_x$, TNF- α e IL-1 β , e da expressão pulmonar de iNOS e das moléculas de adesão P-selectina e molécula de adesão intercelular (ICAM-1), no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

Em outro estudo, Saperstein et al. (2009) observaram, em camundongos *knockout* para IL-1 β , redução da infiltração de neutrófilos e da concentração da quemocina denominada proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) no fluido do lavado broncoalveolar após instilação oral de TNF- α . Esse resultado sugere que a IL-1 β contribui, ao menos em parte, com a liberação de quemocinas e com o recrutamento de neutrófilos mediado por TNF- α .

As citocinas IL-1 β e TNF- α são também potentes mediadores que desempenham importante papel nas doenças inflamatórias agudas e crônicas, como, por exemplo, na doença inflamatória intestinal, na artrite reumatóide, na osteoartrite e na esclerose múltipla (BRADLEY, 2008; REN; TORRES, 2009). Neste contexto, Goleva et al. (2008) demonstraram concentrações elevadas de RNAm para IL-1 β e TNF- α no fluido do lavado broncoalveolar de pacientes com asma brônquica resistente a corticosteróides. Além disso, o tratamento de pacientes asmáticos com etanercept, antagonista de TNF- α , foi associado com a redução da hiperresponsividade brônquica e melhora na função pulmonar (HOWARTH et al., 2005). O TNF- α tem sido detectado também nas articulações sacroilíacas de pacientes com espondilite anquilosante, principalmente na fase inicial da doença (FRANÇOIS et al., 2006). Petrovic-Rackov e Pejnovic (2006) demonstraram ainda concentrações elevadas de TNF- α no soro e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide. Além disso, foi observado melhora clínica em

pacientes com artrite idiopática juvenil por meio do tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 β Anakinra (PASCUAL et al., 2005).

Os nossos resultados também estão de acordo com aqueles relatados por Altinier et al. (2007), que observaram importante atividade anti-inflamatória do extrato clorofórmico de *Rosmarinus officinalis* reduzindo a resposta edematogênica, no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, em camundongos. Além disso, a fração enriquecida com triterpenos demonstrou efeito similar, revelando que a atividade da *Rosmarinus officinalis* pode estar relacionada com a presença de triterpenos.

Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, como o desenvolvido por Juhás et al. (2009) que demonstraram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* inibiu a resposta edematogênica no modelo de edema de pata induzido por carragenina, em camundongos. Ainda, esse mesmo trabalho demonstrou que amostras do cólon de animais tratados com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentaram redução da atividade da MPO e das concentrações da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6), no modelo de colite induzida por trinitrobenzeno sulfônico, em camundongos (JUHÁS et al., 2009). Além disso, outro estudo utilizando óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* também demonstrou atividade anti-inflamatória por inibir: 1) o influxo de leucócitos e a exsudação, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em ratos e 2) a resposta edematogênica, no modelo do edema de pata induzido por carragenina, em ratos (TAKAKI et al., 2008).

Outro estudo demonstrou que o tratamento dos animais com extrato de *Rosmarinus officinalis* inibiu a infiltração de leucócitos, às custas de neutrófilos e de eosinófilos, no fluido do lavado brocoalveolar e reduziu a expressão pulmonar das citocinas quimiotáticas: proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), proteína quimiotática de macrófagos-1 (MCP-1) e quimiocina derivada de queratinócitos (KC), no modelo de inflamação pulmonar induzida por exposição a partículas de diesel, em camundongos (INOUE et al., 2006). Além disso, Peng et al. (2007) observaram que o extrato de *Rosmarinus officinalis* promoveu redução significativa na produção de NO em cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) estimulados com LPS. Tsai et al. (2007) observaram ainda que esta redução da concentração de NO foi associada a inibição da expressão de iNOS. Já Cheung e Tai (2007) demonstraram que o extrato de *Rosmarinus officinalis* também reduziu a expressão de RNAm para IL-1 β e ciclooxigenase-2 (COX-2) em cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) estimulados com LPS.

É importante salientar que, em nosso estudo, as frações HEX e AcOEt demonstraram melhor efeito anti-inflamatório comparadas a fração ET, tendo em vista que doses inferiores (HEX: 25 mg/kg and AcOET: 10 mg/kg) foram efetivas em inibir todos os parâmetros inflamatórios estudados quando comparadas a

fração ET, a qual também inibiu estes parâmetros, mas em dose superior (50 mg/kg). Estes distintos padrões de efeito anti-inflamatório podem ser relacionados às diferenças entre a composição química de cada fração. Desta forma, nós realizamos análise fitoquímica das frações HEX e AcOEt, uma vez que estas frações apresentaram melhor resposta anti-inflamatória.

Neste contexto, nós isolamos o ácido betulínico e o ácido ursólico da fração AcOEt e o carnosol das frações HEX e AcOEt. Da mesma forma, nós testamos os efeitos destes compostos sobre os mesmos parâmetros inflamatórios estudados.

Nossos resultados demonstraram que todos estes compostos inibiram a migração leucocitária, exsudação, atividade da enzima MPO, bem como, as concentrações de NO_x , IL-1 β e TNF- α . Nas mesmas condições experimentais, os compostos isolados foram, algumas vezes, mais potentes em inibir esses parâmetros avaliados quando comparados à dexametasona e à indometacina. Neste contexto, o ácido betulínico (2,5 mg/kg) foi 1,2; 1,6 e 2,3 vezes mais potente que a indometacina em reduzir as concentrações de exsudato, IL-1 β e TNF- α , respectivamente, e 2,0 vezes mais potente em inibir a concentração de TNF- α que a dexametasona ($p < 0,05$). Da mesma forma, o ácido ursólico (25 mg/kg) inibiu 1,4; 1,5; 1,7; e 2,0 vezes mais as concentrações de exsudato e TNF- α , e a infiltração de leucócitos e neutrófilos, respectivamente, quando comparado a indometacina ($p < 0,05$).

Resultados similares foram observados em outros estudos que demonstraram que o carnosol reduziu: 1) as concentrações séricas de IL-6, a atividade da MPO, e a expressão de ICAM-1 e do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B) em tecido hepático, no modelo de isquemia/reperfusão intestinal, em ratos (YAO et al., 2009); 2) a ativação do NF- κ B em cultura de células mononucleares humanas (U937) estimuladas com LPS (PAUR; AUSTENAA; BLOMHOFF, 2008); 3) a concentração de NO e a expressão de iNOS por meio da inibição da ativação do NF- κ B em cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264,7) estimulados com LPS (LO et al., 2002); e 4) a formação de espécies reativas de oxigênio e a secreção de elastase leucocitária humana em neutrófilos estimulados com n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), bem como a formação de leucotrienos em neutrófilos humanos estimulados com cálcio ionóforo A23187 na presença de ácido araquidônico (POECKEL et al., 2008).

Com relação ao ácido betulínico, estudos demonstraram que este composto: 1) inibiu a produção de interferon gama (IFN- γ) e aumentou a produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), em leucócitos humanos estimulados com fitohemaglutinina (PHA) e LPS (ZDZISIŃSKA et al., 2003); 2) inibiu a expressão das moléculas de adesão ICAM-1, E-selectina e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), em cultura de células endoteliais humanas de veia

de cordão umbilical (HUVEC) estimuladas com TNF- α (YOON et al., 2009), bem como de ICAM-1 em cultura de células humanas de carcinoma de pulmão (A-549) estimuladas com IL-1 β (FU et al, 2005); 3) inibiu a ativação do NF- κ B induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), forbol-12-meristato-13-acetato (PMA), fumaça de cigarro, ácido ocaídoico, IL-1 β e/ou TNF- α em cultura de diferentes tipos de células humanas tais como: células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC); de carcinoma de cólon (HCT 116, Caco 2), de pulmão (H1299), e de próstata (PC-3) (TAKADA; AGGARWAL, 2003; RABI; SHUKLA; GUPTA, 2008; YOON et al., 2009).

Para o ácido ursólico, estudos demonstraram importante atividade anti-inflamatória desse composto por inibir: 1) a liberação de IL-6 e TNF- α induzida por H₂O₂ ou íon 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+), em cultura de células de feocromocitoma de glândula adrenal de rato (PC12) (TSAI; YIN, 2008); 2) a formação de NO em macrófagos de camundongos (RAW 264,7) estimulados com LPS (LO et al., 2002; KWON et al., 2009); 3) a resposta edematogênica no modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ou óleo de croton, em camundongos (BANNO et al., 2004; ALTINIER et al., 2007), e no modelo de edema de pata induzido por dextran ou carragenina, em ratos (CHATTOPADHYAY et al., 2002; MICELI et al., 2005); 4) a atividade da MPO, no modelo de edema de orelha induzido por TPA, em camundongos (FAN, et al. 2004); 5) as concentrações e a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em células de melanoma de camundongos (B16/F10) (MANU; KUTTAN, 2008); 6) a expressão de COX-2 e iNOS, bem como produção de interleucina-8 (IL-8) induzida por LPS em cultura de células epiteliais de pulmão humanas (A-549) (LEE et al., 2008); e 7) a ativação do NF- κ B induzido por TNF, PMA, ácido ocaídoico, H₂O₂ e fumaça de cigarro ou LPS em cultura de células leucêmicas de linfócitos T humanas (Jurkat) e células epiteliais de pulmão humanas (A-549) (SHISHODIA et al., 2003; LEE et al., 2008).

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que o tratamento prévio de camundongos inflamados com carragenina com *Rosmarinus officinalis* L. demonstrou importante atividade anti-inflamatória, e seus constituintes, carnosol, ácido betulínico e ácido ursólico, podem ser os responsáveis por essa atividade.

5. CONCLUSÕES

I. O mecanismo de ação anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. parece estar relacionado à inibição da infiltração de leucócitos, bem como à diminuição da MPO, NO, IL-1 β e TNF- α ;

II. Tanto o extrato bruto hidroalcoólico como as frações derivadas e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L., inibiram os parâmetros avaliados de forma semelhante à dexametasona e à indometacina;

III. Os compostos carnosol, ácido betulínico e ácido ursólico parecem ser os responsáveis pelo efeito anti-inflamatório apresentado pela *Rosmarinus officinalis* L.;

IV. Os compostos, carnosol, ácido betulínico e ácido ursólico, podem ser importantes candidatos ao desenvolvimento de fármacos com potencial atividade anti-inflamatória.

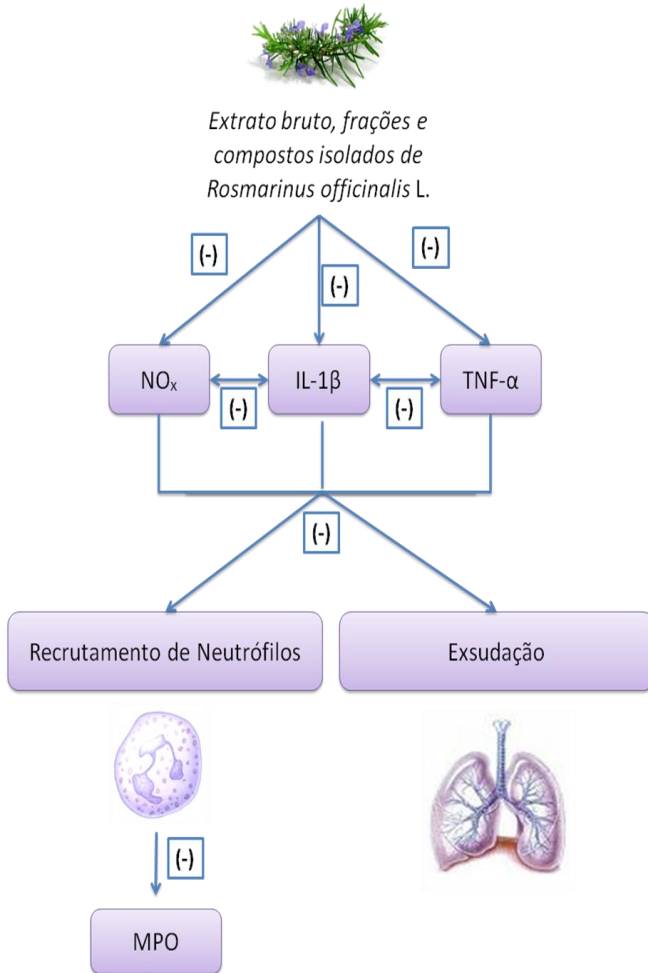


Figura 2: Efeito anti-inflamatório proposto para a *Rosmarinus officinalis* L. MPO: Mieloperoxidase, IL-1 β : Interleucina-1 beta, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, NO: óxido nítrico, (-): efeito de inibição.

6. PERSPECTIVAS

- I. Verificar se o efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. está relacionado à inibição de outros mediadores inflamatórios como a bradicinina, substância P e histamina;
- II. Avaliar se o efeito anti-inflamatório da *Rosmarinus officinalis* L. está associado à inibição da expressão de RNAm para os mediadores e as citocinas pró-inflamatórias estudadas
- III. Realizar modificações estruturais no carnosol, ácido betulínico e ácido ursólico para verificar se ocorre aumento da atividade anti-inflamatória.
- IV. Avaliar a toxicidade do extrato bruto da *Rosmarinus officinalis* L. *in vivo*;

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, London, v. 10, p. 1-7, 2008. Suplemento n. 2.
- ALBUQUERQUE, U.P., et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ALMELA, L. et al. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 1120, n. 1-2, p. 221-229, 2006.
- ALTINIER, G. et al. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 55, n. 5, p. 1718-1723, 2007.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, California, v. 27, p. 669–692, 2009.
- BAKIREL, T. et al. *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 116, n. 1, p. 64-73, 2007.
- BALUK, P. et al. TNF- α drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, Ann arbor, v. 119, n. 10, p. 2954–2964, 2009.
- BANNO, N. et al. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 85-90, 2004.
- BASKOL, G. et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochemistry and Function*, Chichester, v. 24, n. 4, p. 307–311, 2006.
- BERRY, M. et al. TNF- α in asthma. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v. 7, n. 3, p. 279–282, 2007.
- BERRY, M.A. et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor α in refractory asthma. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 354, n.7, p. 697-708, 2006.

- BOUSBIA, N. et al. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, Barking , v. 114, n. 1, p. 355–362, 2009.
- BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, Chichester, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.
- BRESSAN, E.; CUNHA, F.Q.; TONUSSI, C.R. Contribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS induced reactive arthritis. *Cytokine*, San Diego, v. 36, n. 1-2, p. 83-89, 2006.
- CHATTOPADHYAY, D. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 82, n. 2-3, p. 229-237, 2002.
- CHEUNG, S.; TAI, J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*, Athens, v. 17, n. 6, p. 1525-1531, 2007.
- CIRILLO, C. et al. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterology and Motility*, Oxford, v. 21, n. 11, p. 1209–e112, 2009
- DA CUNHA, F.M. et al. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 159-169, 2001.
- DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, New York, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.
- DUGO, L. et al. Effects of GW274150, a novel and selective inhibitor of iNOS activity, in acute lung inflammation. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 141, n. 6, p. 979–987, 2004.
- EKMEKCI, O.B. et al. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. *Biochemistry*, Moscow, v. 69, n. 4, p. 462-467, 2004.
- FAITH, M. et al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity?. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 396, n. 1-2, p. 23-25, 2008.
- FAN, Y.M. et al. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 75, n. 3-4, p. 253–260, 2004.

FRANÇOIS, R.J. et al. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumour necrosis factor α in two patients with early disease and transforming growth factor β in three more advanced cases. *Annals of Rheumatic Diseases*; London, v. 65, n. 6, p.713–720, 2006.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, Sylvania, v. 10, n. 4, p. 223-227, 2001.

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, San Diego, v. 13, n. 3, p. 162-168, 2001.

FRÖDE-SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*, New York, v. 20, n. 2, p. 259-265, 1999.

FU, L. et al. Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 68, n. 2, p. 198-206, 2005.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 109, n. 2, p. 338–347, 2007.

GOLEVA, E. et al. Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, St Louis, v. 122, n. 3, p. 550-559e3, 2008.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E. et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 111, n. 3, p. 476-482, 2007.

GREIFF, L. et al. Airway microvascular extravasation and luminal entry of plasma. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, Oxford, v. 23, n. 6, p. 301–306, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Oxford, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

- HENRIQUES, M.G. et al. Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 99, n. 1, p. 164–168, 1990.
- HOWARTH, P.H. et al. Tumour necrosis factor (TNF- α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*, London, v. 60, n. 12, p.1012–1018, 2005.
- IHNATKO, R.; KUBEŠ, M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *General Physiology Biophysics*, Bratislava, v. 26, n. 3, p. 159–167, 2007.
- INOUE, K. et al. Effects of volatile constituents of rosemary extract on lung inflammation induced by diesel exhaust particles. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Copenhagen, v. 99, n. 1, p. 52–57, 2006.
- JANG, A.S. et al. Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation. *Intensive Care Medicine*, New York, v. 30, n. 3, p. 489–495, 2004.
- JOOSTEN, L.A.B.; VAN DEN BERG, W.B. IL-1 in chronic arthritis, lessons from animal models. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, Oxford, v. 3, n. 2, p. 169-175, 2006.
- JUHÁS, Š. et al. Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. *Acta Veterinaria*, Brno, v. 78, p. 121–127, 2009.
- KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend ou foe. *Journal of Leukocyte Biology*, New York, v. 77, n. 5, p. 1-28, 2005.
- KOELZER, J. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*, Barking, v. 117, n. 3, p. 444–450, 2009.
- KRISTJÁNSSON, G. et al. Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut*, London, v. 53, n. 12, p.1806–1812, 2004.
- KWON, T.H. et al. Synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Seoul, v. 30, n. 1, p. 119-123, 2009.
- LEE, C.H. et al. *Eriobotrya japonica* leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme production via the nuclear factor- κ B signaling pathway in lung epithelial cells. *The*

American Journal of Chinese Medicine, Singapore, v. 36, n. 6, p. 1185–1198, 2008.

LEE, J. et al. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK- β in TNF- α -induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 148, n. 3, p. 366–375, 2006.

LO, A.H. et al. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 23, n. 6, p. 983-991, 2002.

MAÇAO, L. B. et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas'disease. *International Journal of Cardiology*, Dublin, v. 123, n. 3, p. 43-49, 2007.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, London, v. 152, n. 6, p. 838–854, 2007.

MANU, K.A.; KUTTAN, G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- κ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *International Immunopharmacology*, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 974–981, 2008.

MAZON, E. et al. Effect of tumour necrosis factor- α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 153, n. 1, p. 136–149, 2008.

McCLUSKIE, K. et al. Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide-induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Bethesda, v. 311, n. 2, p. 625–633, 2004.

MELO, J.G.; AMORIM, E.L.C; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environmental Monitoring Assessment*, Dordrecht, v. 156, n. 1-4, p. 567-80, 2009

MICELI, N. et al. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v. 97, n. 2, p. 261–266, 2005.

MINOHARA, M. et al. Upregulation of myeloperoxidase in patients with opticospinal multiple sclerosis: Positive correlation with disease severity. *Journal of Neuroimmunology*, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 156–160, 2006.

- NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters*, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 1–5, 2007.
- NAKAE, S. et al. TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, St Louis, v. 119, n. 3, p. 680–686, 2007.
- NAUSEEF, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 219, p. 88–102, 2007.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.
- OLIVEIRA, S.H.P. et al. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. *Inflammation*, New York, v. 31, n. 1, p. 36–46, 2008.
- ORTIZ, G.G. et al. Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Disease Markers*, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 35–39, 2009.
- PAREDI, P.; BARNES, P.J. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. *Thorax*, London, v. 64, n. 5, p. 444–450, 2009.
- PASCUAL, V. et al. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 201, n. 9, p. 1479–1486, 2005.
- PAUR, I.; AUSTENAA, L.M.; BLOMHOFF, R. Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v. 46, n. 4, p. 1288–1297, 2008.
- PENG, C.H. et al. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 71, n. 9, p. 2223–2232, 2007.
- PERANZONI, E. et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology*, New York, v. 212, n. 9–10, p. 795–812, 2008.
- PETROVIC-RACKOV, L.; PEJNOVIC, N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF- α measurement in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, Heidelberg, v. 25, n. 4, p. 448–452, 2006.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, New York, v. 68, n. 22-24, p. 2960–2972, 2007.

PLIYEV, B.K. Chemotactically active proteins of neutrophils. *Biochemistry*, Moscow, v. 73, n. 9, p. 970-984, 2008.

POECKEL, D. et al. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 76, n. 1, p. 91-97, 2008.

RABI, T.; SHUKLA, S.; GUPTA, S. Betulinic acid suppresses constitutive and TNF α -induced NF- κ B activation and induces apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Molecular Carcinogenesis*, New York, v. 47, n. 12, p.964–973, 2008.

RASKIN, I.; RIPOLL, C. Can an apple a day keep the doctor away? *Current Pharmaceutical Design*, Schiphol, v. 10, n. 27, p. 1-11, 2004.

RAZBORSEK, M I. et al. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 67, n. 5-6, p. 433-440, 2008.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 57-64, 2009.

SAKAGUCHI, Y. et al. Effect of combination of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Life Sciences*, Amsterdam, v. 79, n. 5, p. 442–447, 2006.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, Oxford, v. 13, n. 3-4, p. 161-171, 2008.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 118, n. 3, p. 811-819, 1996.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 331, n. 1, p. 43-52, 1997.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse

pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, New York, v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SAPERSTEIN, S. et al. The effects of interleukin-1 β in tumor necrosis factor- α -induced acute pulmonary inflammation in mice. *Mediators of Inflammation*, Sylvania, Doi:10.1155/2009/958658, 2009.

SASSE, A.; COLINDRES, P.; BREWER, M.S. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of cooked, frozen pork patties. *Journal of food science*, Champaign, v. 74, n. 1, p. 30-35, 2009.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Palo Alto, v. 8, p. 93-151, 2006.

SCHMIDT, B.M. et al. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nature Chemical Biology*, New York, v. 3, n. 7, p. 360-366, 2007.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents and Actions*, Basel, v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: *Textbook of immunopharmacology*. New York, 1989. p. 253-261

SHAO, X.T. et al. Expression of interleukin-18, IL-18BP, and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Medicine*, Milano, v. 9, n. 3, p. 215-221, 2009.

SHISHODIA, S. et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of κ B α kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research*, Baltimore, v. 63, n. 15, p. 4375-4383, 2003.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *Journal of Pathology and Bacteriology*, London, v. 72, p. 367-380, 1956.

STEINBECK, M.J. et al. Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *Journal of Orthopaedic Research*, Hoboken, v. 25, n. 9, p. 1128-1135, 2007.

TAKADA, Y.; AGGARWAL, B.B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation through inhibition of κ B α kinase and p65

phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 171, n. 6, p. 3278–3286, 2003.

TAKAKI, I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 741-746, 2008.

TALHOUK, R.S. et al. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of medicinal food*, Larchmont, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2007.

TELLES, R.W. et al. Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*, Berlin, Doi: 10.1007/s00296-009-1067-4, 2009.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammation reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 443-452, 2007.

TSAI, P.J. et al. Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v. 45, n. 3, p. 440–447, 2007

TSAI, S.J.; YIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *Journal of Food Science*, Champaign, v. 73, n. 7, p. 174-178, 2008.

VAN DER VEEN, B.S.; WINTHER, M.P.J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, Larchmont, v. 11, n. 11, p. 1-39, 2009.

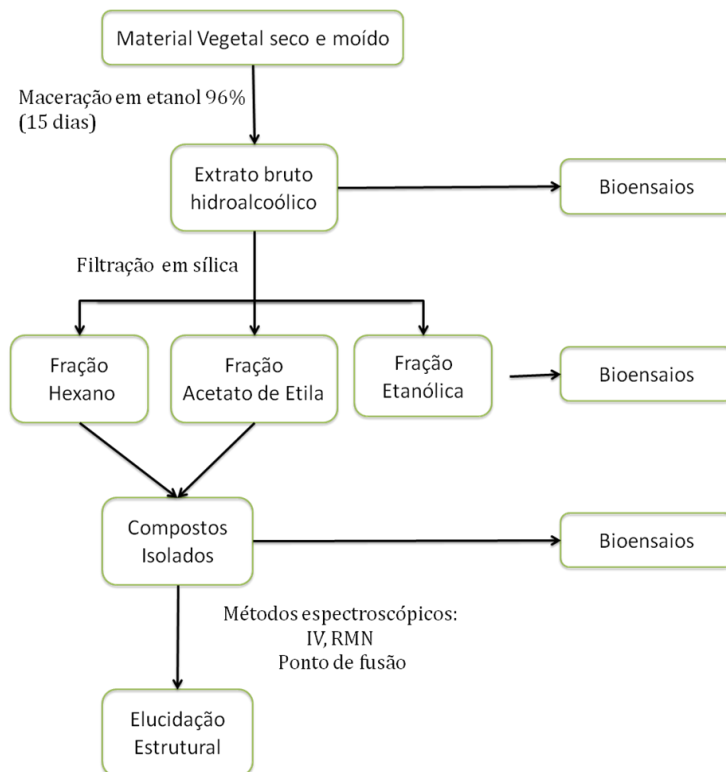
WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, Stuttgart, v. 14, n. 7-8, p. 508-516, 2007.

WINTERBOURN, C.C. et al. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 281, n. 2, p. 39860-39869, 2006.

YAO, J.H. et al. Prophylaxis with carnosol attenuates liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v.15, n. 26, p. 3240-3245, 2009.

- YEH, D.Y.W. et al. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. *Transplantation Proceedings*, New York, v. 40, n. 7, p. 2178–2181, 2008.
- YOON. J.J. et al. Protective role of betulinic acid on TNF- α -induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, Doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.009, 2009.
- YU, Y.M. et al. Carnosic acid reduces cytokine-induced adhesion molecules expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, Darmstadt, v. 48, n. 2, p. 101-106, 2009.
- ZDZISIŃSKA, B. et al. Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Polish Journal of Pharmacology*, Krakón, v. 55, n.2, p. 235-238, 2003
- ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.O. IL-1 β -induced transcriptional up-regulation of bradykinin B1 and B2 receptors in murine airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, New York, v. 36, n. 6, p. 697–705, 2007.

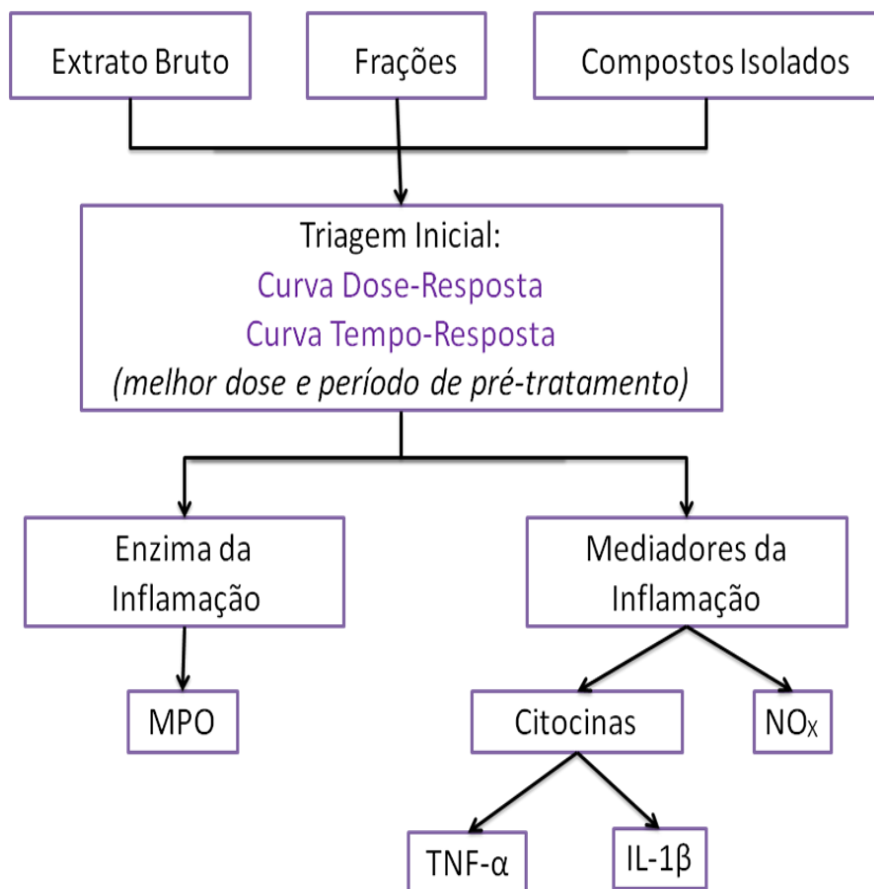
APÊNDICE A
Protocolo de extração do extrato bruto, frações e compostos isolados da
***Rosmarinus officinalis* L.**



Apêndice A: Fracionamento da espécie *Rosmarinus officinalis* L. IV: Infravermelho, RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

APÊNDICE B

Protocolo do estudo da atividade anti-inflamatória do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos



Apêndice B - Protocolo do estudo do extrato bruto, frações e compostos isolados da *Rosmarinus officinalis* L., no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. MPO: Mieloperoxidase, IL-1β: Interleucina-1 beta, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa, NO_x: concentrações de nitrato/nitrito

ANEXO A
Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00197

Título

Estudo farmacológico da Rosmarinus officinalis L. no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos

Data de Entrada

01/04/2008

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

09/05/2008

Considerações

Ofício nº 060/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Silvia Frode, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 1757 camundongos (Mus musculus).

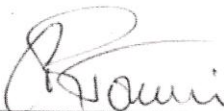
- Processo cadastrado sob o número: 23080.013659/2008-44

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 15/08/2010

Data 19/05/2008

Parecer(es):

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Comitê de Ética Para o Uso de Animais – PRPE - UFSC
Presidente

[Abrir Solicitação](#)[Criar Relatório](#)[Parecer01PP00197.pdf](#)