



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de farmacologia e Terapêutica
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITO INIBITÓRIO DO ANETOL SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

TALITA PERDIGÃO DOMICIANO

Maringá
2011

TALITA PERDIGÃO DOMICIANO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ANETOL SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Maringá
2011

TALITA PERDIGÃO DOMICIANO

**EFEITO INIBITÓRIO DO ANETOL SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03 de março de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Maria Angélica Rafaini Covas Pereira da Silva
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Maria Helena Sarragiotto
Universidade Estadual de Maringá

Agradecimentos

À professora Ciomar Aparecida Bersani-Amado agradeço pela inestimável oportunidade a mim oferecida e também pela zelosa orientação e dedicação ao longo deste trabalho.

Ao professor Roberto Kenji Nakamura Cuman pela amizade, companhia e apoio em diversos momentos.

Aos funcionários Jailson Araújo Dantas e Célia Regina Miranda pela importante colaboração e pela amizade construída.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e apoio constante no dia-dia.

Ao professor Dr. Waldiceu Verri, e acadêmica Ana Carla Zarpelon pela oportunidade de realizar experimentos em seu laboratório.

À Dra. Renata Grespan pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

À minha família pelo amor e incentivo em todos os momentos de minha vida e em especial pela compreensão e apoio nas fases difíceis.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) à Fundação Araucária/PR pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Importância etnofarmacológica: O anetol (1-metoxi-4-(1 profenil) benzeno) ocorre naturalmente como componente principal do óleo essencial de anis estrelado (*Illicium verum*), sendo responsável por mais de 90% dos componentes voláteis. O anetol é amplamente utilizado como substância aromatizante em produtos de panificação, doces e bebidas alcoólicas. Também apresenta uma variedade de atividades farmacológicas como: antioxidante, fungicida, bactericida e inseticida.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiinflamatória do anetol na resposta inflamatória aguda experimental.

Materiais e métodos: Para tanto, foram utilizados os modelos de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e da pleurisia induzida pela carragenina. Os parâmetros investigados foram formação de edema, migração de leucócitos e avaliação dos mediadores inflamatórios.

Resultados: O tratamento com anetol reduziu o volume do exsudato inflamatório pleural, sendo que as doses de 250 e 500 mg/Kg reduziram de forma semelhante a intensidade da resposta e o número de leucócitos. Houve uma redução dos níveis de NO e PGE₂ no exsudato inflamatório, porém os níveis de TNF- α e IL-1 β não foram alterados. No edema de orelha o tratamento com anetol foi capaz de inibir a formação do edema quando administrado por via oral, mas não por via tópica.

Conclusão: No conjunto os resultados indicam que o efeito antiinflamatório do anetol pode estar relacionado a uma ação inibitória sobre a produção e/ou liberação de PGE₂ e NO.

Palavras-chave: Anetol, Óleo essencial, Inflamação, Óxido nítrico, Prostaglandinas, Citocinas.

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Anethole (1-methoxy-4-(1 propenyl) benzene) occurs naturally as a major component of star anise (*Illicium verum*) essential oil, accounting for more than 90% of volatile components. It is widely used as a flavoring substance in bakery products, sweets and beverages. It presents a variety of pharmacological activities such as antioxidant, fungicid, bactericid and insecticid actions.

Aim of the study: The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of anethole in acute experimental inflammatory response.

Materials and methods: We used the models of croton oil-induced ear edema and carrageenan-induced pleurisy. The investigated parameters were edema formation, leukocyte migration and inflammatory mediator evaluation.

Results: Treatment with anethole reduced the volume of pleural inflammatory exudate, with doses of 250 and 500 mg/kg similarly reducing the response intensity and number of leukocytes. There was a reduction in the levels of NO and PGE₂ in the inflammatory exudate, but levels of TNF- α and IL-1 β were not changed. In ear edema, the treatment with anethole was able to inhibit the formation of edema when administered orally, but not when administered topically.

Conclusion: Altogether, the results indicate that the anti-inflammatory effect of anethole may be related to an inhibitory action on production and/or release of PGE₂ and NO.

Keywords: Anethole, Essential oil, Inflammation, Nitric oxide, Prostaglandins, Cytokines.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1	Material vegetal e obtenção do óleo essencial	9
2.2	Análise do óleo essencial	9
2.3	Animais	9
2.4	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	10
2.5	Atividade da mieloperoxidase	10
2.6	Indução da pleurisia em rato	10
2.7	Determinação da concentração de NO _x (NO ³⁻ + NO ²⁻) no exsudato pleural	11
2.8	Determinação dos níveis de IL-1β, TNF-α e PGE ₂ no exsudato pleural	11
2.9	Análise estatística	12
3	RESULTADOS	13
3.1	Edema de orelha induzido por óleo de cróton	13
3.2	Atividade da mieloperoxidase	14
3.3	Efeito do anetol sobre a pleurisia induzida por carragenina	15
3.4	Determinação da concentração de NO _x (NO ³⁻ + NO ²⁻) no exsudato pleural	17
3.5	Determinação dos níveis de IL-1β, TNF-α e PGE ₂ no exsudato pleural	18
3.6	Análise do óleo de anis estrelado	20
3.6.1	Deslocamentos químicos de ¹³ C e ¹ H do anetol	21
4	DISCUSSÃO	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, metabólitos secundários de vegetais, têm sido amplamente empregados na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Porém, até o presente, apenas uma pequena porcentagem destes óleos foi estudada, e mesmo assim, somente para algum efeito específico.

O *Illicium verum* (Hook) conhecido popularmente como anis-estrelado é uma planta nativa do sudeste da China, Vietnã, Índia e Japão. O óleo essencial deste vegetal possui como componente majoritário o trans-anetol (cerca de 90%), além do metilchavicol e anisaldeído, e é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Alguns estudos têm demonstrado que o óleo essencial de anis estrelado apresenta atividades antioxidante, fungicida, bactericida e inseticida (Chantraine et al., 1998; Dzamic et al., 2009; Kosalec et al., 2005; Lima et al., 2008)

Particularmente, o anetol (1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno ocorre naturalmente como componente principal do óleo do anis estrelado (*Illicium verum*), do funcho (*Foeniculum vulgare*) e da cânfora (*Cinnamomum camphora*), sendo que sua concentração no funcho e no anis estrelado podem ser responsáveis por mais de 90% dos componentes voláteis. Ocorre ainda em concentrações menores no óleo de erva-cidreira (6,1%), coentro (0,5%) e manjeriço (0,08%) (Newberne, 1999; Shimoni et al., 2002; Yea et al., 2006).

Devido à sua ampla utilização como substância aromatizante em produtos de panificação, doces e bebidas alcoólicas o potencial tóxico do anetol foi estudado sendo considerado não-genotóxico e não-carcinogênico e, portanto, bastante seguro (Freire et al., 2005; Yea et al., 2006).

Alguns ensaios experimentais têm demonstrado que o anetol apresenta uma variedade de atividades farmacológicas como depressora do sistema nervoso central, sedativa e anestésica (Geronikaki e Gavalas, 2006). Também tem um estudo demonstrando que o anetol exibe um efeito inibitório sobre a permeabilidade vascular induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. Neste trabalho os autores sugerem que este efeito pode estar relacionado a uma ação antioxidante do composto (Freire et al., 2005).

Diante destas considerações o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória do anetol obtido do anis estrelado (*Illicium verum*), em dois modelos de inflamação aguda, pleurisia induzida pela carragenina em ratos e edema de orelha em camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e obtenção do óleo essencial

Os frutos de anis estrelado (*Illicium verum*) adquiridos comercialmente de um mesmo fornecedor foram selecionados, os folículos de melhor qualidade foram separados dos frutos e as sementes destes removidas. O óleo essencial de anis foi extraído a partir dos frutos sem sementes utilizando aparelho de Clevenger por 3 horas. O óleo obtido foi separado, seco com sulfato de sódio anidro e armazenado a 4°C para análise da composição química e utilização nos ensaios farmacológicos.

2.2 Análise do óleo essencial

A composição química do óleo de anis estrelado foi determinada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS). Os espectros uni e bidimensionais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C) foram analisados em espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, operando a 300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C . O solvente utilizado para dissolução das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos foram indicados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento(J) em Hertz (Hz).

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometrômetro de massas tipo quadrupolo marca Thermo Electron Corporation, modelo Focus GC, sob as seguintes condições: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,50 mm), temperatura inicial da coluna, 250°C; Tempo inicial 60°C (1 min.); e rampa de aquecimento 3°C/min. até 180°C; temperatura do injetor 220°C; Hélio como gás de arraste, a fluxo constante de 1,0 mL/min. Volume injetado: 1µL de amostra dissolvida em acetona (1:10). Energia de impacto de 70 e.V.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi determinada por meio da análise e comparação dos índices de retenção observados no Cromatograma com os índices descritos na literatura (Adams, 2007) e com amostras padrões (Sigma-Aldrich).

2.3 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (peso entre 190-220g) e camundongos da linhagem Swiss, machos (peso entre 25-30g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos sob temperatura

controlada 22 T (°C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEAE/UEM125/2010).

2.4 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O edema foi induzido pela aplicação de 20 µL de óleo de cróton (200 µg) diluído em solução de acetona/água (7:3), usada como veículo, na superfície interna da orelha esquerda do camundongo. A orelha direita recebeu apenas o veículo (20 µL). Imediatamente após a aplicação do agente flogístico, nos grupos de animais tratados, foram aplicados 20 µL de anetol nas concentrações de 2,5 ou 5 mg/orelha na orelha esquerda. No grupo controle, foi aplicado 20 µL do veículo na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram sacrificados, as orelhas foram seccionadas em discos de 6,0mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica.

Outros grupos de animais foram tratados por via oral (gavage) com água, anetol 250 ou 500 mg/Kg ou indometacina 10 mg/Kg uma hora antes da aplicação do óleo de cróton na orelha.

2.5 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO), indicativo de migração de células polimorfonucleares, foi avaliada 6 horas após o estímulo inflamatório. A atividade da MPO foi avaliada no sobrenadante dos homogenatos de secções das orelhas de acordo com a técnica descrita por Bradley et al. (1982). O tecido da orelha colocado em 50 mM tampão potássio, pH 6,0, contendo 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio em um homogenizador de Van Potter. O homogenato foi incubado por 1 hora a 60°C (para inibição da catalase) e centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. 10µL do sobrenadante obtido foram colocados em uma placa de 96 poços seguido pela adição de 200 µL de uma solução tampão contendo dihidroclorato de *O*-dianisidina (Sigma, 16.7mg), água bidestilada (90µL), tampão fosfato de potássio (10mL) e H₂O₂ (50µL). A atividade da enzima foi determinada pela medida da absorbância em leitor de ELISA (406nm).

2.6 Indução da pleurisia em rato

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar, pela injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carragenina (200 µg) na cavidade intra-pleural, na região do mediastino direito, entre a 3^a e

a 4ª costelas, de acordo com a técnica descrita por Vinegar et al., (1973). A carragenina foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS – pH=7,4). Após um intervalo de 4 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta do exsudato inflamatório intra-pleural.

O material coletado por aspiração foi transferido para tubos cônicos de centrífuga e o volume total do exsudato medido. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmaras de Neubauer, após diluição das amostras com líquido de Turk para lise das hemácias. O fluido remanescente foi centrifugado a 2500 rpm, durante 10 minutos, e as células ressuspendidas. As lâminas foram preparadas, secas, fixadas e coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa. O número de leucócitos, mononucleares e polimorfonucleares, presentes no exsudato foi determinado em microscópio óptico comum.

O anetol nas doses de 62,5; 125; 250 ou 500 mg/Kg, a indometacina na dose de 10 mg/Kg ou o veículo (água) foram administrados por via oral (gavage), em dose única, nos diferentes grupos de ratos sob jejum de 15 horas, uma hora antes da indução da pleurisia.

2.7 Determinação da concentração de NO_x (NO³⁻ + NO²⁻) no exsudato pleural

A concentração de NO_x, um indicador da síntese de óxido nítrico, foi determinada no exsudato pleural (Grisham et al., 1996). As amostras foram coletadas com 0,5mL de PBS, 4 horas após a indução da pleurisia pela injeção de carragenina. A determinação do NO_x foi realizada incubando-se 40 µL das amostras e da curva padrão (soluções aquosas de NaNO₃, com as concentrações variando de 3.125 a 200 µM), com 40 µL de um coquetel contendo: 500µL de NADPH (5 mg/mL), 1000 µL de tampão KH₂PO₄ (0,5 M, pH=7,5), 950 µL de água Milli-Q e 50 µL de nitrato redutase (20 U/mL) “*over night*”. Após esse período foram adicionados 80 µL do reagente de Griess (solução contendo sulfanilamida 2% + N-naftiletlenodiamina 0,2% em ácido fosfórico a 5%). As concentrações de NO_x foram determinadas no exsudato, pela medida da absorbância em 540 nm em leitor de ELISA.

2.8 Determinação dos níveis de IL-1β, TNF-α e PGE₂ no exsudato pleural

Os níveis de TNF-α, IL-1β e PGE₂ foram determinados no exsudato pleural, coletados com 1 mL de PBS. As amostras foram coletadas 4 horas após a indução da pleurisia pela injeção de carragenina e centrifugadas a 1.300 g durante 10 minutos, em temperatura de 4° C. O sobrenadante foi imediatamente separado para dosagem ou rapidamente congelado e estocado a -70°C para análise posterior. Foram utilizados Kits comerciais para ELISA

(técnica padrão de sanduíche), de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems[®], Cayman Chemical[®]).

2.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A comparação estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado como nível de significância.

3 RESULTADOS

3.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

A aplicação do óleo de cróton na orelha esquerda do camundongo induziu uma resposta inflamatória bastante evidente na 6^a hora. O anetol nas doses de 2,5 e 5,0 mg por orelha não foi capaz de inibir a intensidade do edema quando aplicado topicamente (Figura 1). No entanto, quando administrado por via oral (gavage) na dose de 250 e 500 mg/Kg, o anetol reduziu significativamente o edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton (Figura 2).

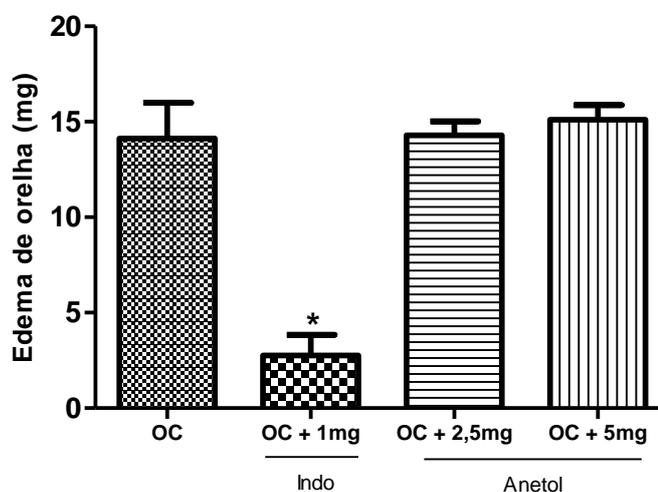


Figura 1. Efeito do anetol no Edema de orelha induzido por óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss machos. Os animais (n = 8 animais por grupo) foram tratados topicamente com anetol, nas concentrações indicadas, imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (200 µg) na orelha esquerda. A indometacina, 1mg por orelha, administrada topicamente, foi usada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Cada coluna representa a média de peso das orelhas ± E.P.M., 6 horas após aplicação do óleo de cróton. * P < 0.0001 comparado ao grupo controle. (ANOVA, Teste de Tukey)

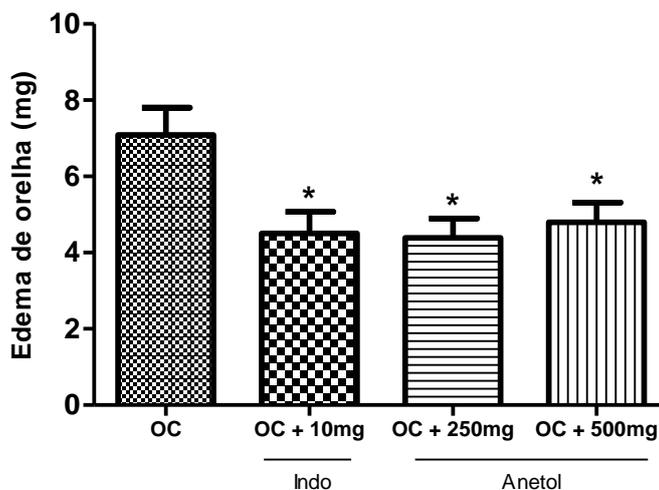


Figura 2. Efeito do anetol no Edema de orelha induzido por óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss machos. Os animais ($n = 6$ animais por grupo) foram tratados oralmente com anetol 250 e 500 mg/Kg, indometacina (10 mg/Kg) ou água, 1 hora antes da aplicação do óleo de cróton (200 μ g) em cada orelha. A indometacina foi usada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Cada coluna representa a média de peso das orelhas \pm E.P.M., 6 horas após aplicação do óleo de cróton. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (ANOVA, Teste de Tukey).

3.2 Atividade da mieloperoxidase

A MPO é uma enzima presente nos grânulos intracelulares de neutrófilos, e pode ser usada como marcador do influxo de leucócitos polimorfonucleares para os tecidos inflamados (Faurichou e Borregaard, 2003). O anetol nas doses de 250 e 500 mg/Kg inibiu significativamente a atividade da enzima (Figura 3).

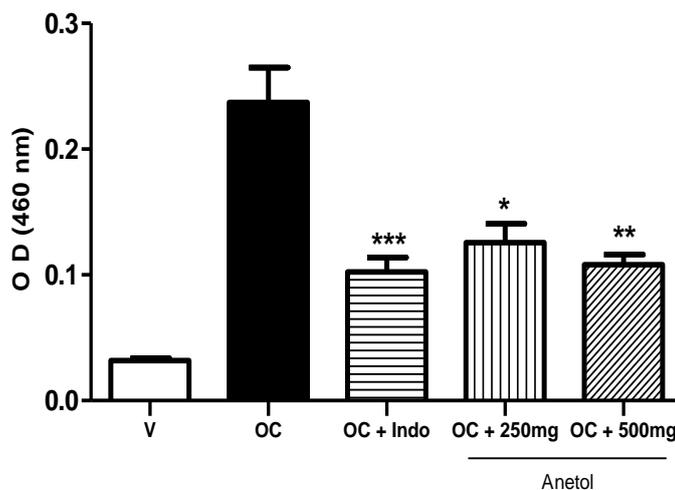


Figura 3. Efeito do anetol sobre a atividade da enzima MPO no tecido da orelha de camundongos Swiss machos. Os animais ($n = 6$ animais por grupo) foram tratados oralmente com anetol 250 e 500 mg/Kg, indometacina (10 mg/Kg) ou água, 1 horas antes da aplicação do óleo de cróton (200 μ g) em cada orelha. A indometacina foi usada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). V = Orelhas que receberam apenas veículo. Cada coluna representa a média da atividade da MPO \pm E.P.M., 6 horas após aplicação do óleo de cróton. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle, ** $P < 0,005$ comparado com o grupo controle, *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (ANOVA, Teste de Tukey).

3.3 Efeito do anetol sobre a pleurisia induzida por carragenina

A injeção intra-pleural de carragenina em ratos (Cg), induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pelo aumento significativo do volume de exsudato pleural e das células que migram para a cavidade quando comparados aos animais controle (C). O tratamento dos animais com o anetol reduziu a intensidade da resposta inflamatória (Figura 4), reduzindo tanto o volume do exsudato inflamatório pleural como o número de leucócitos migrados. A diminuição do número de leucócitos, nas doses de 250 e 500mg/Kg (48,78%), foi devido principalmente a uma redução do número de leucócitos polimorfonucleares uma vez que o número de leucócitos mononucleares não foi modificado (Tabela 1). O tratamento com indometacina (10 mg/Kg), fármaco antiinflamatório de referência, causou uma redução intensa do volume de exsudato (57,36%) sem alterar o número de leucócitos totais migrados (Figura 5).

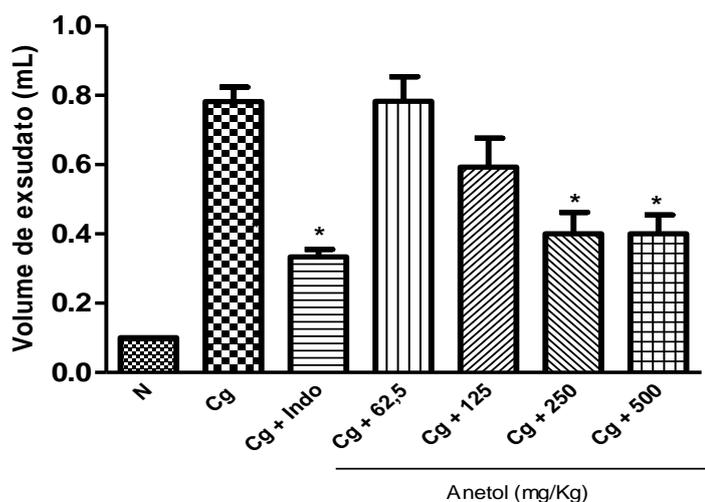


Figura 4. Efeito do anetol na pleurisia induzida por injeção intra-pleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar machos. Os animais ($n = 6 - 11$ animais) foram tratados oralmente com anetol nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção intra-pleural de carragenina (200 μ g). A indometacina (Indo), administrada oralmente na dose de 10 mg/Kg, foi usada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Cada ponto representa a média do volume de exsudato \pm E.P.M., 4 horas após a injeção de carragenina. * $P < 0.0001$ comparado com o grupo controle (Cg) (ANOVA, Teste de Tukey).

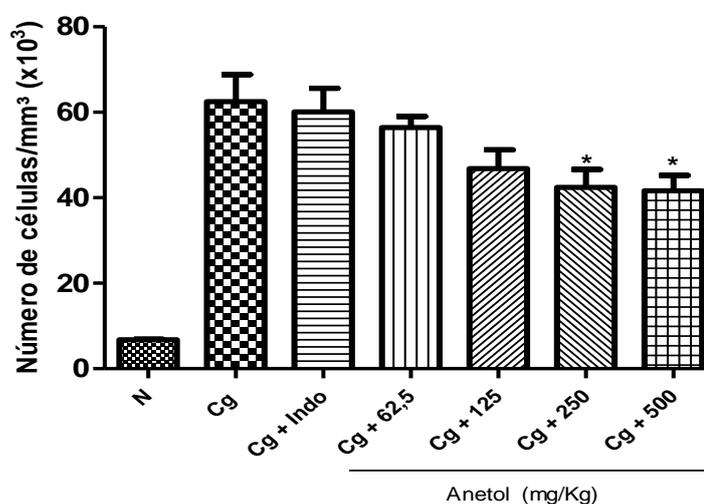


Figura 5. Número de leucócitos totais no exsudato pleural inflamatório em ratos Wistar machos. Os animais ($n = 6 - 11$ animais) foram tratados oralmente com anetol nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção intra-pleural de carragenina (200 μ g). A indometacina (Indo), administrada oralmente na dose de 10 mg/Kg, foi usada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Cada ponto representa a média do número total de células \pm E.P.M., 4 horas após a injeção de carragenina. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (Cg) (ANOVA, Teste de Tukey).

Tabela 1. Número de leucócitos total e diferencial no exsudato inflamatório pleural de ratos

Grupo de animais	Leucócitos/mm ³			
	N	LT	PMN	MN
Normais	6	6700 ± 450	1800 ± 160	4900 ± 390
Cg	11	62477 ± 6363	47187 ± 5661	15290 ± 1038
Indo 10	9	60083 ± 5536	47461 ± 6316	12623 ± 1606
Anetol 62,5	6	56458 ± 2586	36496 ± 2863	19963 ± 1425
Anetol 125	7	46840 ± 9798	29340 ± 2784*	17500 ± 8344
Anetol 250	7	42421 ± 4440*	27396 ± 4013*	15025 ± 1282
Anetol 500	7	41643 ± 3596*	28392 ± 3168*	13251 ± 1940

Cada valor representa a média do número de leucócitos ± E.P.M. no exsudato inflamatório dos animais, 4 horas após a injeção de carragenina na cavidade intra-pleural. N = Número de animais por grupo. LT = Leucócitos totais. PMN = Leucócitos polimorfonucleares. MN = Leucócitos mononucleares. Os tratamentos dos animais com água (Cg), indometacina (Indo) 10mg/Kg e anetol nas doses 62,5; 125; 250 e 500 mg/Kg, foram administrados oralmente, 1 hora antes da injeção de carragenina. *P < 0,05 comparado com o grupo controle (Cg) (ANOVA, teste de Tukey)

3.4 Determinação da concentração de NO_x (NO³⁻ + NO²⁻) no exsudato pleural

A injeção de carragenina na cavidade intra-pleural dos animais aumentou significativamente os níveis de NO no exsudato inflamatório. O tratamento dos animais com anetol nas doses de 250 e 500 mg/Kg, por via oral, reduziu significativamente os níveis de NO no exsudato dos animais tratados quando comparado com os animais controles sem tratamento. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

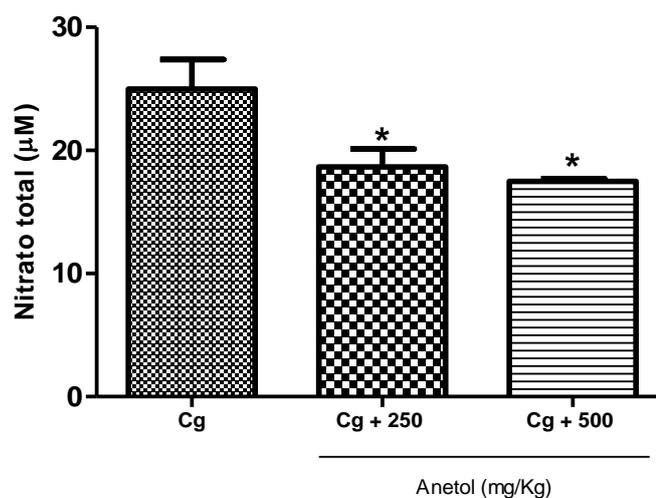


Figura 6. Efeito do anetol sobre a concentração de nitrato total no exsudato pleural inflamatório de ratos Wistar machos. Os animais ($n = 6$ por grupo) foram tratados oralmente com água ou anetol 250 ou 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção de carragenina. Cada ponto representa a média da concentração de nitrato \pm E.P.M., 4 horas após a injeção de carragenina. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle (Cg). (ANOVA, Teste de Tukey).

3.5 Determinação dos níveis de IL-1 β , TNF- α e PGE₂ no exsudato pleural

Os níveis de IL-1 β e TNF- α estavam significativamente elevados no exsudato inflamatório dos ratos que receberam injeção intra-pleural de carragenina quando comparados com os animais controles (que receberam apenas injeção de PBS na cavidade pleural). De acordo com os dados o aumento ocorreu tanto na segunda como na quarta hora após a aplicação do agente flogístico sendo que na segunda hora este aumento foi mais pronunciado. O tratamento dos animais com anetol nas doses de 250 e 500 mg/Kg não alterou os níveis de IL-1 β e TNF- α no exsudato. Os resultados estão apresentados nas Figura 7 e Figura 8.

Por outro lado, o tratamento dos animais com anetol nas doses de 250 e 500 mg/Kg reduziu os níveis de PGE₂ no exsudato inflamatório pleural tanto na segunda como na quarta hora após a injeção intra-pleural de carragenina. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

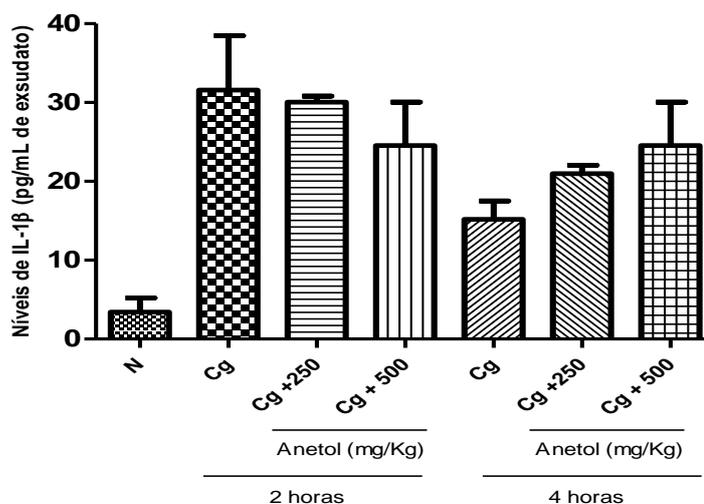


Figura 7. Efeito do anetol sobre os níveis de IL-1 β no exsudato pleural de ratos Wistar machos. Os animais (n = 5 por grupo) foram tratados oralmente com água ou anetol 250 e 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção de carragenina. Um grupo recebeu injeção intra-pleural de PBS (basal). Cada ponto representa a média da concentração de IL-1 β \pm E.P.M., 2 e 4 horas após a injeção de carragenina. (ANOVA, Teste de Tukey).

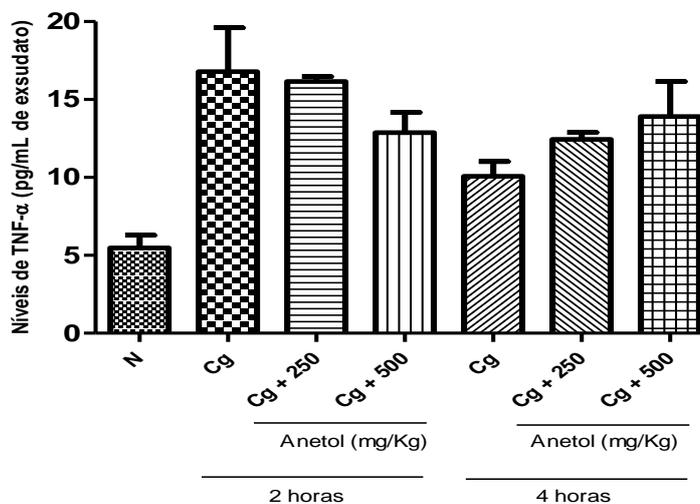


Figura 8. Efeito do anetol sobre os níveis de TNF- α no exsudato pleural de ratos Wistar machos. Os animais (n = 5 por grupo) foram tratados oralmente com água ou anetol 250 e 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção de carragenina. Um grupo recebeu injeção intra-pleural de PBS (basal). Cada ponto representa a média da concentração de TNF- α \pm E.P.M., 2 e 4 horas após a injeção de carragenina. (ANOVA, Teste de Tukey).

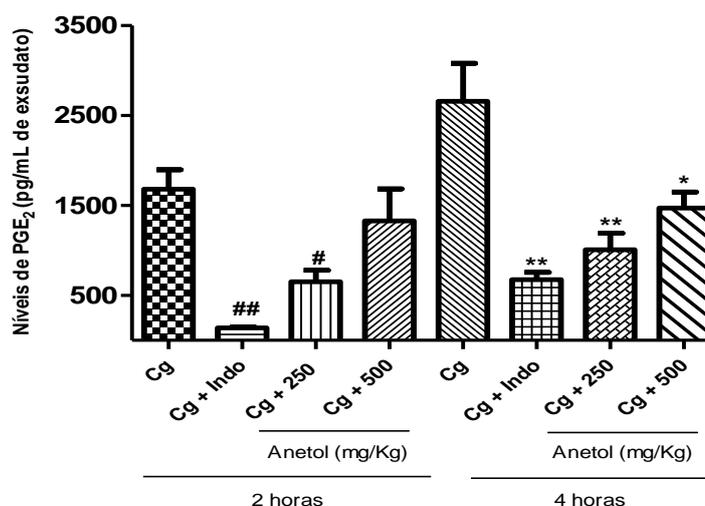


Figura 9. Efeito do anetol sobre os níveis de PGE₂ no exsudato plural de ratos Wistar machos. Os animais (n = 5 – 6 animais por grupo) foram tratados oralmente com água ou anetol 250 e 500 mg/Kg, 1 hora antes da injeção de carragenina. Cada ponto representa a média da concentração de PGE₂ ± E.P.M., 2 e 4 horas após a injeção de carragenina. (ANOVA, Teste de Tukey). # P < 0,05 comparado com o grupo controle 2h (Cg); ## P < 0,001 comparado com o grupo controle 2h; * P < 0,05 comparado com o grupo controle 4h (Cg), ** P < 0,0001 comparado com o grupo controle 4h (Cg) (ANOVA, Teste de Tukey).

3.6 Análise do óleo de anis estrelado

A análise da composição do óleo essencial de anis estrelado por CG-MS mostrou predominância de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos). Os constituintes encontrados foram: anetol (98.1%), estragol (0,7%), linalol (0,4%), metil-eugenol (0,3%), β-cariofileno (0,3%), limoneno (0,1%) e anisaldeído (0,1%) (Figura 10).

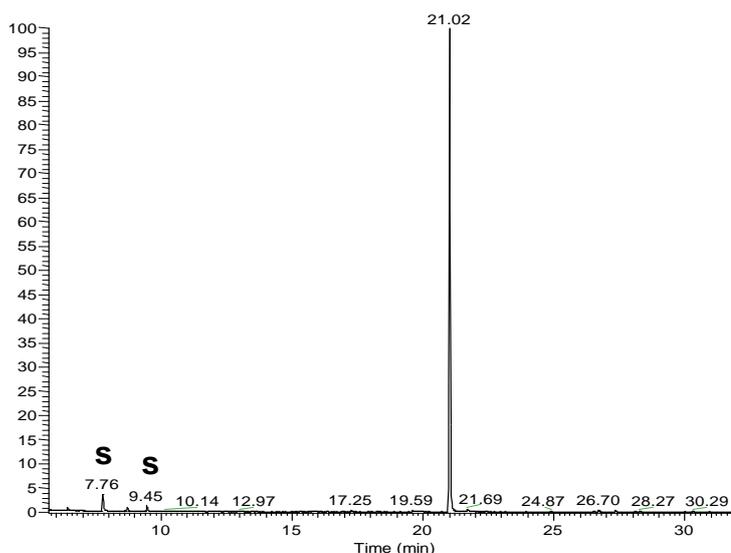


Figura 10. Cromatograma (CG) do óleo essencial obtido do anis estrelado. Tempo de retenção em minutos: 10,14 = limoneno (0,1%), 12,97 = linalol (0,4%), 17,25 = estragol (0,7%), 19,59 = anisaldeído (0,1%), 21,02 = anetol (98,1%), 24,87 = metil-eugenol (0,3%), 26,70 = β -cariofileno (0,3%) S = Solvente.

3.6.1 Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H do anetol

A análise espectrofotométrica do anetol obtido do óleo essencial de anis estrelado mostrou dados de deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H concordantes com a literatura.

trans-Anetol. *1-methoxy-4-(1-propenyl)benzene*, líquido incolor, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ (M 148.2).
 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): 7,27 (dt, 2H, H-3 e H-5, $^3\text{J}_{\text{H}_3,\text{H}_2}$ e $^3\text{J}_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 8,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_3,\text{H}_5}$ e $^4\text{J}_{\text{H}_5,\text{H}_3} = 3,0$ Hz), 6,84 (dt, 2H, H-2 e H-6, $^3\text{J}_{\text{H}_2,\text{H}_3}$ e $^3\text{J}_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 8,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_2,\text{H}_6}$ e $^4\text{J}_{\text{H}_6,\text{H}_2} = 3,0$ Hz), 6,35 (dq, 1H, H_a , $^3\text{J}_{\text{H}_a,\text{H}_b} = 15,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_a,\text{H}_c} = 1,6$ Hz), 6,10 (dq, 1H, H_b , $^3\text{J}_{\text{H}_b,\text{H}_a} = 15,7$ Hz, $^3\text{J}_{\text{H}_b,\text{H}_c} = 6,6$ Hz), 3,79 (s, 3H, H_d), 1,86 (dd, 3H, H_c , $^3\text{J}_{\text{H}_c,\text{H}_b} = 6,5$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_c,\text{H}_a} = 1,5$ Hz).
 RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 158,7 (C-1), 131,0 (C-4), 130,5 (C-8), 127,0 (C-3 e C-5), 123,6 (C-9) 114,0 (C-2 e C-6) 55,4 (C-7), 18,6 (C-10).

4 DISCUSSÃO

A busca de novos agentes terapêuticos que efetivamente interferem no processo inflamatório é de grande importância. Para a maioria das plantas medicinais usadas popularmente, o mecanismo de suas ações farmacológicas, seus efeitos tóxicos e a identidade de seus componentes ativos, permanecem desconhecidos. Os óleos essenciais, metabólitos secundários de vegetais, têm sido amplamente empregados na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. No entanto, até hoje, apenas uma pequena porcentagem destes óleos foi estudada, e mesmo assim, somente para algum efeito específico. Neste estudo o anetol, extraído do óleo essencial do anis estrelado (*Illicium verum*), foi identificado a fim de investigar sua propriedade antiinflamatória e seu provável mecanismo de ação.

O edema de orelha é comumente utilizado para avaliar propriedades antiinflamatórias de moléculas sintéticas e extratos vegetais e foi empregado neste estudo como um dos modelos para avaliar a atividade antiinflamatória do anetol. O óleo de cróton, usado como agente flogístico, induz uma resposta inflamatória caracterizada por formação de edema e infiltração de leucócitos através da ativação da enzima fosfolipase A₂ e conseqüentemente da biossíntese de leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e produção de citocinas (Otuki et al., 2005). Neste trabalho ficou claramente demonstrado que o efeito inibitório do anetol sobre a resposta inflamatória neste modelo é dependente da via de administração. Somente o tratamento com anetol por via oral reduziu o edema e o número de leucócitos migrados para o local de lesão, como observado pela redução da atividade da enzima MPO. Por outro lado, a aplicação tópica do anetol não provocou efeito inibitório. Isto pode ser explicado por uma farmacocinética desfavorável para a absorção tópica do anetol utilizado, ou ainda, pela possibilidade do efeito inibitório ser causado pelos derivados metabólicos originados após a biotransformação hepática do anetol. Esta hipótese está amparada nos estudos de Freire et al. (2005) os quais verificaram que os derivados metabólicos do anetol apresentavam maior atividade inibitória sobre a permeabilidade vascular quando comparada ao próprio anetol.

Numa segunda etapa de ensaios o efeito do anetol foi investigado no modelo de pleurisia induzida pela carragenina. Este modelo experimental de inflamação aguda é bem caracterizado e permite a quantificação e a correlação entre a migração celular e a formação de exsudato, além da determinação de mediadores inflamatórios envolvidos no processo (Moore et al., 2003; Iwata et al., 2010). A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma fase inicial que é dependente da liberação de histamina, serotonina e bradicinina, seguida por uma fase posterior que é mantida pela liberação de mediadores

derivados do ácido araquidônico, do óxido nítrico e das citocinas (Gilroy et al., 1999; Harada et al., 1996; Iwata et al., 2010; Moore et al., 2003; Paul-Clark et al., 2001; Tomlinson et al., 1994). Todos estes mediadores têm um papel importante nos fenômenos vasculares e celulares da resposta inflamatória, induzindo vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (Goodman et al., 1993, Iwata et al., 2010). Portanto, espera-se que agentes inibidores destes mediadores apresentem atividade antiinflamatória.

Nossos resultados demonstraram uma atividade antiinflamatória significativa do anetol neste modelo, uma vez que o tratamento reduziu tanto a formação de exsudato como a migração de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade pleural. Esta última ação é muito importante uma vez que a maioria dos antiinflamatórios não-esteroidais tradicionais tem efeito reduzido sobre a migração celular. É sabido que a migração de neutrófilos para o local da inflamação é um passo crucial na defesa do organismo, no entanto, se esta mobilização é intensificada o acúmulo destas células pode causar danos aos tecidos, através da liberação de enzimas proteolíticas lisossomais, metaloproteases e espécies reativas derivadas de oxigênio/nitrogênio. Assim, estratégias para limitar a migração de neutrófilos para o foco da lesão são muitas vezes necessárias para o benefício clínico de agentes utilizados em doenças inflamatórias (O`Dell, 2004).

O pronunciado efeito do anetol observado encorajou-nos a investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Como já comentado a injeção intra-pleural de carragenina em ratos resulta em um aumento na produção/liberação de NO e PGE₂ além de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no tecido inflamado (Passos et al., 2007; Pinheiro e Calixto, 2002; Portanova et al., 1996). Então, o efeito do tratamento com o anetol sobre a produção/liberação desses mediadores após a injeção de carragenina foi avaliado. Os resultados indicaram que o anetol foi efetivo para inibir os níveis de NO e PGE₂, mas não os de IL-1 β e TNF- α . Esses resultados indicam portanto, que o anetol possui um mecanismo de ação similar aos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, uma vez que as isoformas de COX são os primeiros alvos desta classe de fármacos (Murakami e Kudo, 2004; Tilley et al., 2001).

Um aspecto importante a ser considerado é que nesses modelos o anetol foi utilizado em dose única, por isso não podemos descartar a possibilidade de um efeito inibitório sobre a produção de citocinas em tratamento mais prolongado.

Adicionalmente, enfatizamos que as doses do anetol usadas não causaram alterações morfológicas e bioquímicas no fígado, baço e rins dos animais (dados não mostrados).

Em resumo, o presente estudo forneceu evidências que o anetol possui atividade antiinflamatória significativa quando administrado por via oral em animais. Esta atividade pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, ao efeito inibitório sobre a produção e/ou liberação do óxido nítrico e de metabólitos ativos do ácido araquidônico.

Outros experimentos estão em progresso para avaliar propriedades e mecanismos adicionais do anetol, que pode representar em um futuro próximo uma nova opção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, fourth edition. Allured Publishing corporation, USA.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 78, 206-209.
- Chantraine, J.M., Laurent, D., Ballivian, C., Saavedra, G., Ibañez, R., Vilaseca, L.A., 1998. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *Phytotherapy Research* 12, 350-354.
- Dzamic, A., Sokovic, M., Ristic, M. S., Grijic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., Marin, P. D., 2009. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chemistry of Natural Compounds* 45, 259-261.
- Freire, R.S., Morais, S.M., Catunda-Junior, F.E.A., Pinheiro, D.C.S.N., 2005. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 4353–4358.
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 2, 364-371.
- Geroniakaki, A.A., Gavalas, A., 2006. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 9, 425-442.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A., 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine* 5(6), 698-701.
- Goodman, R., Mantegna, L.R., Mcallister, C.L., Bruin, E., Dowling, R.L., George, H., Feeser, W., Freimark, B., Lischwe, M., Pick, S., Harris, R.R., Kerr, J.S., 1993. IL-1 and its role in rat carrageenin pleurisy. *Mediators of inflammation* 2, 33-39.
- Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R., 1996. Quantification of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in Enzymology* 268, 237-246.
- Harada, Y., Hatanaka, K., Kawamura, M., Saito, M., Ogino, M., Majima, M., Ohno, T., Ogino, K., Yamamoto, K., Taketani, Y., Yamamoto, S., Katori, M., 1996. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E₂ formation in carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins* 51(1), 19-23.

- Iwata, M., Suzuki, S., Asai, Y., Inoue, T., Takagi, K., 2010. Involvement of nitric oxide in rat modelo of carrageenan-induced pleurisy. *Mediators of inflammation* 2010, 1-11.
- Kosalec, I., Peljnjak, S., Kustrak, D., 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica* 55, 377-85.
- Lima, R.K., Cardoso, M. G., MORAES, J. C., VIEIRA, S. S., MELO, B. A., FILGUEIRAS, C. C., 2008. Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *BioAssay* 3(8), 1-6.
- Newberne, P., Smith, R.L., Doull, J., Goodman, J.I., Munro, I.C., Portoghese, P.S., Wagner, B.M., Weil, C.S., Woods, L.A., Adams, T.B., Lucas, C.D., Ford, R.A., 1999. The FEMA GRAS assesement of trans-anethole used as a flavoring substance. *Flavour and extract manufacture's association. Food and Chemical toxicology* 37, 789-811.
- Moore, A.R., 2003. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. *Methods in Molecular Biology* 118(19), 123-128.
- Murakami, M.A., Kudo, I. 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin-E₂ biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research* 43, 3-35.
- O'Dell, J.R., 2004. Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 350, 2591-2602.
- Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Topical anti-inflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507, 253-259.
- Paul-Clark, M.J., Gilroy, D.W., Willis, D., Willoughby, D.A., Tomlinson, A., 2001. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending in their route administration. *Journal of Immunology* 166(2), 1169-1177.
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., Campos, M.M., Araujo, J.G., Pesquero, J.L., Souza, G.E., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2004. Kinin B₁ receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *The Journal of Immunology* 172, 1839-1847.
- Pinheiro, R.M., Calixto, J.B., 2002. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflammation research* 51, 602-610.
- Portanova, J.P., Zhang, Y., Andreson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L., Siebert, K., Gregory, S.A., Isakson, P.C., 1996. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks

- inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 184, 883-891.
- Shimoni, E., Baasov, T., Ravid, U., Shoham, Y., 2002. The *trans*-anethole degradation pathway in an *Arthrobacter* sp. *The Journal of Biological Chemistry* 277(14), 11866-11872.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H., 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 15-23.
- Tomlinson, A., Appleton, I., Moore, A.R., Gilroy, D.W., Willis, D., Mitchell, J.A., Willoughby, D.A., 1994. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *British Journal of Pharmacology* 113(3), 693-698.
- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., 1973. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat (37397). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 143, 711-714.
- Yea, S.S., Jeong, H., Choi, C.Y., Park, K., Oh, S., Shin, J., Yun, C., 2006. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF- κ B and AP-1. *Toxicology in vitro* 20, 1098-1105.