

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIEL FERNANDO ESTEVES CARDIA

Efeito do óleo essencial da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) sobre a
resposta inflamatória aguda

Maringá
2016

GABRIEL FERNANDO ESTEVES CARDIA

Efeito do óleo essencial da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) sobre a
resposta inflamatória aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Saúde Humana.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C267e Cardia, Gabriel Fernando Esteves
Efeito do óleo essencial da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) sobre a resposta inflamatória aguda / Gabriel Fernando Esteves Cardia. -- Maringá, 2016.
40 f. : il. col., figs.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016

1. Resposta inflamatória aguda - Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) - Óleo essencial. 2. Inflamação - Óleo essencial - Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill). 3. Produtos naturais - Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill). I. Cuman, Roberto Kenji Nakamura, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed. 615.32

MN-003327

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIEL FERNANDO ESTEVES CARDIA

Efeito do óleo essencial da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) sobre a resposta inflamatória aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Francielli Maria de Souza Silva-Comar
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 22 de março de 2016.

Local de defesa: Auditório, Bloco K68, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a coragem, luz, sabedoria e força nas escolhas da direção correta a tomar.

Aos meus pais, pelo apoio e pela compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho e de minha formação, pelo exemplo de coragem, simplicidade e persistência em suas metas, incentivando para que eu nunca desistisse dos meus sonhos.

À minha família e a todas as pessoas especiais que mudaram e marcaram a minha vida, não seria metade da pessoa que sou hoje e muito menos teria alcançado um terço do meu objetivo sem vocês.

Aos amigos, professores e técnicos do laboratório de inflamação, os quais dividimos diversas experiências que levarei para toda vida, que contribuíram para meu amadurecimento e auxiliaram sempre quando precisei, por trás deste trabalho existe uma grande equipe, e sem ela eu não conseguiria.

À todos os professores que me inspiraram e auxiliaram na minha formação, aos membros da banca e em especial, Roberto Cuman, meu orientador e amigo, pelo qual tenho muita estima e admiração, que me propiciou um grande aprendizado, pelas pacientes e criteriosas reflexões e sugestões efetuadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Maringá, por tudo o que foi proporcionado para o meu desenvolvimento acadêmico, nesta longa caminhada que se iniciou em 2008 e não tem data para terminar.

EPÍGRAFE

“Enfrente seus medos e realize seus sonhos”.

Autor desconhecido.

Efeito do óleo essencial da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) sobre a resposta inflamatória aguda

RESUMO

Neste estudo foi avaliado a atividade anti-inflamatória do LEO administrado via oral e topicamente. O processo inflamatório é uma resposta complexa do tecido vascularizado a estímulos irritantes, por meio da ativação e liberação de diferentes mediadores inflamatórios, visando uma reparação ao dano tecidual. Os produtos naturais e seus óleos essenciais vêm sendo muito utilizados como alternativa ao tratamento de diversas doenças inflamatórias, e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, pois apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos adversos. O óleo essencial da lavanda (LEO) apresenta diversos efeitos farmacológicos, tais como, anticonvulsivante, ansiolítico, antioxidante, anticolinesterásico, atividades antimicrobiana e antifúngica. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de LEO em modelos experimentais de inflamação aguda, utilizando os modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Além disso, foi determinada a atividade da enzima mieloperoxidase e concentração de óxido nítrico. Foram determinados os constituintes de LEO e seus efeitos citotóxicos e quimioatraente. Os resultados demonstraram que os constituintes majoritários do LEO são 1,8-cinel, borneol e cânfora. LEO possui uma atividade anti-inflamatória *in vivo* capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos para o tecido inflamado, tanto no tratamento tópico quanto por via oral, capaz e reduzir o edema e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no edema de orelha e no edema de pata induzido por dextrana e carragenina. O tratamento com LEO também reduziu a produção de óxido nítrico (NO). O LEO não apresentou ter potencial quimioatraente para nenhuma concentração testada no modelo de quimiotaxia *in vitro*, e em baixas concentrações (0,5, 1, 3, 10 µg/ml), não mostrou-se ser citotóxico. Estes efeitos podem estar relacionados com a inibição de diferentes mediadores inflamatórios e/ou alérgicos, onde estavam envolvidos principalmente com a histamina, e parcialmente com o NO.

Palavras-chave: Produtos naturais; *Lavandula angustifolia* Mill; Inflamação.

Effect off Lavender essential oil (*Lavandula angustifolia* Mill) in acute inflammatory response

ABSTRACT

This study evaluated the anti-inflammatory activity of LEO administered orally and topically. The inflammatory process is a complex response of vascularized tissue to irritant stimuli by activating and release of various inflammatory mediators aiming to repair tissue damage. Natural products and their essential oils have been widely used as an alternative to the treatment of various inflammatory diseases and the development of new therapeutic strategies, since they have low toxicity and few adverse effects. The essential oil of lavender (LEO) shows various pharmacological effects such as anticonvulsant, anxiolytic, antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial and antifungal activities. The objective of this study was to investigate the LEO activity in experimental models of acute inflammation using ear edema models induced by croton oil and paw edema induced by carrageenan and dextran. Furthermore, it was determined the activity of the enzyme myeloperoxidase and nitric oxide concentration. It was determined the constituents of LEO and its cytotoxic effects and chemoattractant. The results showed that the main constituents of LEO are 1,8-cineol, borneol and camphor. LEO an anti-inflammatory activity in vivo can reduce the infiltration of neutrophils into the inflamed tissue, both in the topical treatment as orally, capable and reduce edema and activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in the ear edema and paw edema induced by carrageenan and dextran. Treatment with LEO also reduced nitric oxide (NO) production. The LEO showed no chemoattractant have the potential for any concentration tested in the in vitro chemotaxis model, in low concentrations (0.5, 1, 3, 10/ml), showed to be cytotoxic. These effects may be related to the inhibition of various inflammatory and/or allergic mediators, which were primarily concerned with histamine and partially with NO

Keywords: Natural products; *Lavandula angustifolia* Mill; Inflammation.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): disponível em: The American Journal of Chinese Medicine

<<http://www.worldscientific.com/page/ajcm/submission-guidelines>>

SÚMARIO

1. CAPÍTULO I.....	8
O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	8
PRODUTOS NATURAIS: Óleo essencial da <i>lavandula angustifolia</i> Mill	10
JUSTIFICATIVA	13
OBJETIVOS	13
REFERÊNCIAS	13
2. CAPÍTULO II.....	17
Artigo 1: “EFEITO ANTI-INFLAMATORIO DO ÓLEO ESSENCIAL DA LAVANDA (<i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i> MILL) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA”	17
3. CAPÍTULO III	39
CONCLUSÕES	39
PERSPECTIVAS FUTURAS	40

CAPÍTULO I

O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação ou processo inflamatório é uma resposta complexa do tecido vascularizado a estímulos irritantes, tais como: infecção, trauma mecânico, temperatura, agentes químicos, radiação, autoimunidade, isquemia e/ou necrose. Inicialmente ocorre a formação de edema devido ao extravasamento celular, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, por meio da ativação e liberação de diferentes substâncias, visando destruir o agente nocivo (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; ALESSANDRI et al., 2013).

O processo inflamatório é caracterizado por cinco sinais cardinais clássicos: o calor, rubor, tumor e dor, quando esta resposta não é modulada, pode culminar com a perda de função do tecido. Ele é dividido em duas fases distintas a fase aguda e a fase crônica (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; ALESSANDRI et al., 2013).

A fase aguda é de curta duração, e corresponde a resposta inicial do organismo aos estímulos nocivos, seguido de uma cascata de acontecimentos que inclui: alterações do calibre vascular, aumento do fluxo sanguíneo e migração de leucócitos para o local inflamado, onde diversos mediadores inflamatórios são liberados, sendo responsáveis pela indução da resposta inflamatória aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; KUMAR, ABBAS & ASTER, 2013).

A segunda fase do processo inflamatório, a fase crônica, pode durar de semanas a meses. Nesta fase, a inflamação encontra-se associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação vascular, fibrose e necrose tecidual, e as tentativas de reparo ocorrem simultaneamente (KUMAR, ABBAS & ASTER, 2013).

Entre os mediadores inflamatórios, apresentam grande destaque as ações dos eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), aminas vasoativas (histamina e serotonina), citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α), quimiocinas (IL-8), interferons e óxido nítrico (MEDZHITOV, 2008).

A histamina está presentes nos mastócitos, basófilos e nas plaquetas e é secretada mediante traumas, toxinas ou presença de alérgenos. Ela apresenta ação imediata, provendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A serotonina é oriunda das plaquetas e possui um efeito semelhante à histamina (BOLAM & ELLENDER., 2015).

As citocinas são mediadores proteicos ou polipeptídicos sintetizados e secretados por células do sistema imune durante o processo inflamatório. São capazes de mediar à ação das células inflamatórias e do sistema imunológico, apresentando efeitos complexos sobre

leucócitos, células endoteliais, mastócitos, células tronco hematopoiéticas e regulando a proliferação e ativação dessas células (SHAKOLA et al., 2015).

Outros mediadores inflamatórios são os derivados do ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado encontrado na membrana plasmática das células, importante para a fluidez da membrana. A cascata do ácido araquidônico é dividida em duas vias principais, a da ciclooxigenase (COX) e a da lipoxigenase (LOX).

A LOX produz os leucotrienos que promovem vasodilatação e extravasamento plasmático. As ações pró-inflamatórias dos leucotrienos são controladas e mediadas pelas lipoxinas, uma classe de eicosanoides oxidados que se ligam a receptores celulares bloqueando o fluxo de neutrófilos (URQUHART e t al., 2014; HARIZI, 2015).

A COX é uma enzima responsável por converter o ácido araquidônico em prostaglandinas. As prostaglandinas desempenham uma atividade importante nas condições fisiopatológicas, incluindo a resposta imune inflamatória e a alérgica. Elas promovem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; HARIZI, 2015). Os tromboxanos atuam em conjunto com as prostaglandinas na regulação de importantes ações do processo inflamatório, como vasoconstrição e são potentes fatores de agregação plaquetária (HAMMOND & O'DONNELL., 2012).

Há duas isoformas de COX principais envolvidas no processo de conversão de ácido araquidônico: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa na maioria das células e tecidos, e participa de funções de manutenção celular indispensáveis para a atividade fisiológica. Já a COX-2 é usualmente induzida sempre que as células sofrem estímulos inflamatórios, atuando no local inflamado (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; HARIZI, 2015).

Atualmente, há diversos fármacos utilizados na terapêutica para a redução dos sinais e sintomas da inflamação, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), que atuam pela inibição da COX e prostaglandinas (RAHMAN & MALCOUN., 2014). Já os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ligam-se a receptores intracelulares interagindo com o DNA e modificam a transcrição gênica, podendo induzir ou inibir a síntese proteica. Os AIEs apresentam graves efeitos adversos quando utilizado por um tempo prolongado (BRUNE K & PATRIGNANI., 2015).

Todavia, este arsenal terapêutico muitas vezes não modifica de forma satisfatória o processo patológico responsável pela resposta inflamatória, podendo gerar efeitos adversos importantes, como lesões gastrintestinais, insuficiência renal, efeitos cardiovasculares, osteoporose, alterações metabólicas e outras, limitando a utilização destes fármacos (KONTOGIORGIS & HADJIPAVLOU-LITINA., 2002; BATLOUNI, 2010). Desta forma,

os produtos naturais e seus óleos essenciais vêm sendo muito utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

PRODUTOS NATURAIS: Óleo essencial da *Lavandula angustifolia* Mill

O emprego de produtos naturais para terapia, cura e prevenção de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas que existe. A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que, para 65 a 80% dos indivíduos de países em desenvolvimento, os produtos naturais eram os mais utilizados nos cuidados básicos de saúde. Mesmo com o desenvolvimento da medicina alopática, no momento ainda há barreiras em sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento, a partir do acesso aos centros médicos até a obtenção dos exames e medicamentos. Desta forma, o fácil acesso e a tradição da utilização dos produtos naturais colaboram em seu uso pelas populações desfavorecidas (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a composição de novos fármacos vem sendo amplamente descrito ao longo dos anos, visando a substituição de substâncias não naturais (BARREIRO & BOLZANI, 2009; GU et al., 2013). Seu uso tem aumentado significativamente, impulsionando a receptividade dos mercados mundiais no campo de fitoterápicos no cuidado de feridas, cicatrização, febre, infecções, edemas e entre outras injúrias, sugerindo que seu uso pode ser mais seguro que grande parte dos fármacos, graças a sua baixa toxicidade e efeitos adversos (ETHUR et al., 2011; GOSSLAU et al., 2011).

A maior parte dos fármacos utilizados na clínica é de origem natural ou ainda produzidos com base nos produtos naturais que apresentam diversas substâncias com atividades biológicas, uma das classes mais relevantes é a dos óleos essenciais (BARREIRO & BOLZANI, 2009; GU et al., 2013).

Deste modo diversas, pesquisas visam desvendar a atividade farmacológica de produtos naturais, pois existe um grande interesse em seu uso, na indústria farmacêutica e alimentícia (BAKKALI, *et al.*, 2008; de SOUZA, 2012).

As plantas da família Lamiaceae possuem distribuição cosmopolita, sendo mais abundante na região do Mediterrâneo, Ásia e Europa. Englobam aproximadamente 300 gêneros e 7500 espécies, presentes no mundo todo. No Brasil são encontrados por volta de 28

gêneros e 350 espécies pertencentes à esta família. Destaca-se a enorme quantidade de espécies aromáticas incluindo a alfavaca (*Ocimum basilicum* L.), o orégano (*Origanum vulgare* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e a hortelã (*Plectranthus barbatus* Andrews) (LORENZI & SOUZA, 2008).

As plantas da família Lamiaceae são constituídas principalmente de plantas aromáticas que apresentam uma enorme fonte de polifenóis e, conseqüentemente, podem possuir diversas propriedades antioxidantes. Dentre os principais gêneros aromáticos da família Lamiaceae, está o gênero *Lavandula* (BIASI & DESCHAMPS, 2009; McNAUGHTON, 2006)

O gênero *Lavandula* é constituído por plantas medicinais aromáticas com cerca de 25-30 espécies, denominadas por lavandas ou alfazemas. São arbustos ou subarbustos eretos e com caules lenhosos. O seu nome vem proveniente do latim “lavare” com o significado “lavar”, referente a sua utilização em banhos (BIASI & DESCHAMPS, 2009; McNAUGHTON, 2006). Dentre o gênero lavandula encontramos a *Lavandula angustifolia* Mill, uma planta aromática que tem apresentado diversas propriedades terapêuticas e atividades biológicas (VERMA et al., 2011; MEFTAHIZADE et al., 2011).

A espécie *Lavandula angustifolia* Mill, originária das regiões montanhosas do Mediterrâneo é cultivada em grande parte da Europa, em especial, na França, Itália e Espanha. No entanto, seu cultivo ampliou-se para outros continentes, como o Asiático e Americano (VERMA, R. S. et al., 2011; MEFTAHIZADE, H. et al., 2011). Exibe algumas sinonímias botânicas aceitas, como: *Lavandula vera* DC., *Lavandula spica* L. e *Lavandula officinalis* Chaix ex Vill. (BARRETT, 1949; McNAUGHTON, 2006; PLATT, 2009).

Figura 1 – Lavanda



Fonte: UPSON & ANDREWS, 2004.

Devido ao aumento da aplicação da fitoterapia e aromaterapia, recentemente, as lavandas tem sido mais conhecidas comercialmente e o seu óleo essencial tem sido muito utilizado na perfumaria, em cosméticos e na produção de fármacos (McNAUGHTON, 2006; PLATT, 2009).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis derivados de produtos naturais, sintetizado e armazenado em células específicas em diversas partes do organismo vegetal como flores, folhas, ramos, frutos, rizomas e etc. Podem ser obtidos por meio de hidrodestilação, englobam misturas complexas de produtos voláteis, lipofílicas e frequentemente odoríferas que, são formados por moléculas de álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e fenóis associados à classe dos terpenóides (AMORATI et al., 2013; TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014).

Os constituintes majoritários do óleo essencial da *Lavandula angustifolia* Mill são: 1,8-cineol, cânfora e endo-borneol, porém, outros componentes também podem ser encontrados, em quantidade inferior, como, o α -pineno, canfeno, β -pineno, limoneno, α -canfonelal, terpinen-4-ol, criptona, entre outros (HAJHASHEMI et al., 2003; PRASHAR et al., 2004). Entretanto, a composição química deste óleo pode variar de acordo com o genótipo, meio ambiente, processamento e método de extração (ZHELJAZKOV et al., 2012).

O óleo essencial de lavanda apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como, anticonvulsivantes (SHAHRIYARI et al., 2004), ansiolítico e depressor do sistema nervoso central (KRITSIDIMA et al., 2010; WOELK & SCHLAFKE, 2010), antioxidante e propriedades anticolinesterases (COSTA et al., 2011; MESSAOUD et al., 2011), atividade

antimicrobiana (VARONA et al., 2013) e antifúngica (BENABDELKADER et al., 2011; ZUZARTE et al., 2012). Em vista disto, muitos pesquisadores dedicam-se a investigação deste óleo essencial.

JUSTIFICATIVA

A maioria dos fármacos utilizados na terapêutica apresentam vários efeitos adversos e não são eficazes em todos os casos. Assim, estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de encontrar novos compostos anti-inflamatórios de origem natural, que apresentem maior eficácia farmacológica e menores efeitos adversos. Neste sentido a lavanda pode ser uma planta promissora com potencial anti-inflamatório.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- O objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade do óleo essencial da lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) em modelos experimentais de inflamação aguda.

Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial da lavanda.
- Determinar o efeito do óleo essencial da lavanda sobre a resposta inflamatória aguda, utilizando diversos modelos experimentais de inflamação.
- Esclarecer o possível mecanismo de ação do óleo essencial da lavanda.

REFERÊNCIAS

- ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, v.139, p. 189–212, 2013.
- AMORATI R., FOTI M. C., VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 61, p. 10835-10847, 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

- BARBOSA-FILHO, J M; PIUVEZAM M R.; MOURA M D.; SILVA M S.; LIMA K V B; LEITÃO-Da-CUNHA E V; FECHINE I M., TAKEMURA O S. Anty-antiinflammatory activity of alkaloyds: a twenty century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 16, p. 109-139, 2006.
- BARREIRO EJ, BOLZANI VS. *Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos*. *Química Nova*, v.32, p.679-688, 2009.
- BARRETT, P. *Growing & using lavender*. USA: Storey Country Wisdom Bulletin, 31p, 1949.
- BATLOUNI M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.94, p.556-563, 2010.
- BENABDELKADER T, ZITOUNI A, GUITTON Y, JULLIEN F, MAITRE D, CASABIANCA H, LEGENDRE L, KAMELI A. Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, Chemical Variability, and in vitro Biological Properties. *Chemistry & Biodiversit*, v.8 p.937-953, 2011.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. *Plantas Aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial*. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, p.160, 2009.
- BOLAM, J. P., ELLENDER, T. J. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*. 2015
- BRUNE K, PATRIGNANI P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pain Research*. v. 20, p. 105-118, 2015.
- COSTA P, GONÇALVES S, ANDRADE P B, VALENTÃO P, ROMANO A. Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe²⁺-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chemistry*, v.126, p.1779–1786, 2011.
- De SOUSA, D. P. *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*, 1 ed. New York: Nova Science Publishers, p. 236, 2012.
- DIGNANI, D. F. *Peperomia blanda (Piperaceae): avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante*. 2009. 109 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- ETHUR LZ, JOBIM JC, RITTER JG, OLIVEIRA G, TRINDADE BS. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui – RS. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. v.13, p. 121-128, 2011.
- GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K.Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. v.55, p.74-82, 2011.
- GU J, GUI Y, CHEN L, YUAN G, LU HZ, XU X. Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. *PLoS One*. v. 8, 2013.
- HAJHASHEMI V, GHANNADI A, SHARIF B. Antiinflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 89, p.67–71, 2003.

HAMMOND, V. J., O'DONNELL, V. B. Esterified eicosanoids: generation, characterization and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1818, p. 2403-2412, 2012.

HARIZI H. Epigenetic regulations of inflammatory cyclooxygenase-derived prostanoids: molecular basis and pathophysiological consequences. *Mediators of Inflammation*. 2015.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. *Current Medicinal Chemistry*. v. 9, p. 89-98, 2002.

KRITSIDIMA M, NEWTON T, ASIMAKOPOULOU K. The effects of lavender scent on dental patient anxiety levels: a cluster randomised-controlled trial. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, v.38, p.83-87, 2010.

KUMAR, V., ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Inflamação e Reparo. In:_____. *Robbins patologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap 2.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de. *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MAEDA H, YAMAZAKI M, KATAGATA Y. KUROMOJI (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.77, p.482-486, 2013.

McNAUGHTON, V. *Lavender: the grower's guide*. Portland (USA): Timber Press, p.192, 2006.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEFTAHIZADE, H.; MORADKHANI, H.; BARJIN, A. F.; NASERI, B. Application of *Lavandula officinalis* L. antioxidant of essential oils in shelf life of confectionary. *African Journal of Biotechnology*, Nodari, v. 10, p. 196-200, 2011.

MESSAOUD C, CHONGRANI H, BOUSSAID M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Natural Product Research*, v.26, p.1976-1984, 2011.

OMS. Organização Mundial de Saúde. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Genebra. p. 67, 2002.

PLATT, E. S. *Lavender: How to grow and use the fragrant herb*. 2nd. ed. Mechanicsburg PA: Stackpole books, p. 157, 2009.

PRASHAR A, LOCKE IC, EVANS CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*. v.37, p. 221–229, 2004.

RAHMAN, S., MALCOUN, A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase-2, and the kidneys. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. v. 41, p. 803-821, 2014.

RICCIOTTI, E., FITZGERALD G. A. Prostaglandins and inflammation. *Archives - Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. v.31, p. 986-1000, 2011.

SHAKOLA, F., SURI, P., RUGGIU, M. Splicing Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines: At the Interface of the Neuroendocrine and Immune Systems. *Biomolecules*. v. 5, p. 2073-2100, 2015.

SHAHRIYARI, H., A. ERSALI, M. RAHMANIFARD Anticonvulsant effect of *Lavandula officinalis* in two epilepsy animal model. *Journal of Iran Medical Basic Sciences*, v.8 p.172–178, 2004.

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

TONGNUANCHAN P., BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*. v. 79, p. R1231-1249, 2014

UPSON, TIM & ANDREWS, SUSYN. *The Genus Lavandula*, Royal Botanic Gardens. Hardback, 2004.

URQUHART, P., NICOLAOU, A., WOODWARD, D. F. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1851, p. 366-376, 2014.

VARONA, S. ROJO SR, MARTIN A, COCERO MJ, SERRA AT, CRESPO T, DUARTE CMM. Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, v.42, p.243-250, 2013.

VERMA, R. S.; RAHMAN, L. U.; CHANOTIYA, C. S.; VERMA, R. K.; CHAUHAN, A.; YADAV, A.; SINGH, A.; YADAV, A. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society*. v.75, p.343-348, 2010.

VEIGA JR. VF, MACIEL MAM, PINTO AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quimica Nova*, v.28, p.519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.

WOELK H, SCHLAFKE S. A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*, v.17, p. 94–99, 2010.

ZHELJAZKOV V.D, ASTATKIE T, HRISTOV A.N, Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. *Industrial Crops and Products*, v.36, p.222-228, 2012.

ZUZARTE M, VALE-SILVA L, GONÇALVES M J, CAVALEIRO C, VAZ S, CANHOTO J, PINTO E, SALGUEIRO L. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v.31, p.1359-1366, 2012.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DA LAVANDA (*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA”

Efeito anti-inflamatório do óleo essencial da *Lavandula angustifolia* Mill sobre a resposta inflamatória aguda.

Gabriel Fernando Esteves Cardia, Roberto Kenji Nakamura Cuman.

Laboratório de inflamação, Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

Resumo: O óleo essencial da *Lavandula angustifolia* Mill (LEO), apresenta diversos efeitos farmacológicos, tais como: anticonvulsivante, ansiolítico, antioxidante, anticolinesterásicos, antimicrobiano e antifúngico. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de LEO em modelos experimentais de inflamação. LEO foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório tópico e oral através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton e edema de pata induzido por carragenina e dextrana, adicionalmente determinamos a atividade da enzima mieloperoxidase, concentração de oxido nítrico, o efeito citotóxico e quimioatraente do LEO. Os resultados sugerem que LEO possui uma atividade anti-inflamatória *in vivo* capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, tanto no tratamento tópico quanto por via oral. Estes efeitos poderiam estar relacionados com a inibição de diferentes mediadores químicos da resposta inflamatória e/ou alérgica como a histamina, e parcialmente com o NO.

Palavras Chave: Produtos naturais; Lavanda; Inflamação.

Introdução

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a obtenção de novos fármacos vem sendo amplamente descrita ao longo dos anos. Os produtos naturais e seus óleos essenciais vêm sendo popularmente utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estudos sugerem que o uso de produtos naturais pode ser mais seguro e eficaz, uma vez que apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos adversos (Gosslau et al., 2011).

As plantas da família Lamiaceae representam uma grande fonte de polifenóis e propriedades farmacológicas já descritos na literatura. Pertencente a família Lamiaceae, a *Lavandula angustifolia* Mill é originária das regiões montanhosas do Mediterrâneo, apresentando diversas propriedades terapêuticas e atividades biológicas (Verma et al., 2011).

Estudos fitoquímicos revelaram que os constituintes majoritários do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill (LEO) são 1,8-cineol, cânfora e endo-borneol. Outros componentes também podem ser encontrados em menores quantidades, como: o α -pineno, canfeno, β -pineno, limoneno, α -canfonelal, terpinen-4-ol, criptona, dentre outros. No entanto,

a composição química do óleo essencial de lavanda pode variar de acordo com o genótipo, meio ambiente, processamento e método de extração (Hajhashemi et al., 2003; Prashar et al., 2004; Lakusić et al., 2014).

O LEO apresenta variados efeitos farmacológicos já descritos na literatura, tais como: atividade anticonvulsivante (Shahriyari et al. 2004), ansiolítica (Woelk and Schlafke, 2010), antioxidante, propriedades anticolinesterásica (Costa et al., 2011; Messaoud et al., 2011), atividade antimicrobiana (Verona et al., 2013), e antifúngica (Zuzarte et al., 2012). Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade do óleo essencial de *Lavandula Angustifolia* em modelos experimentais de inflamação aguda.

Materiais e métodos

Obtenção do óleo essencial

As folhas e caule frescos da *Lavandula angustifolia* Lamiceae foram comercialmente adquiridas no ano de 2014 na Central Regional de Comercialização do Centro Oeste do Paraná (Cercopa) Guarapuava, PR, Brasil. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger durante 3h. O óleo foi armazenado sob refrigeração (3-4 °C) em um frasco escuro.

Análise e identificação dos componentes do óleo essencial

O óleo essencial foi analisado por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). A cromatografia de gás foi efetuada sob as seguintes condições: DB-5 de coluna capilar (30m x 0,32mm, 0,25mm), temperatura da coluna (60°C durante 1min a 180°C a 3°C/min), temperatura do injetor (220°C), temperatura do detector (220°C), razão de separação (1:10), o gás transportador (He), e taxa de fluxo (1,0 mL/min). O volume injetado (1µl) foi diluído em acetona (1:10). A análise de CG-EM foi realizada num espectrômetro de massa Quadrupolo (modelo DSQ II, Thermo Electron Corporation) operado a 70v. A identificação dos componentes individuais foi baseada na comparação do seu índice de retenção CG (IR) e os espectros de massa, com padrão autêntico adquirido a Sigma-Aldrich e o composto isolado do óleo essencial obtido no nosso laboratório. O índice de retenção (IR) foi calculado em relação a um conjunto de alcanos (C₈-C₄₀, Sigma Aldrich) em coluna DB-5, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963). Os doze componentes menores de óleo

foram identificados comparando seus espectros de massa e IR com os relatados por Adams (2007).

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com peso entre 25-35 g. Os animais foram mantidos em condição padrão de biotério (temperatura controlada de ± 23 °C, ciclo claro/escuro ± 12 horas, água e ração *ad libitum*). O protocolo dos experimentos foi aprovado pelo CEUA/UEM (Parecer n. 3024210315).

Ensaio da viabilidade celular – MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é baseado na redução do corante tetrazólio pela enzima mitocondrial para determinar a viabilidade celular. Os leucócitos foram isolados a partir da cavidade peritoneal de camundongos quatro horas após a injeção de 200 μ l de solução de zymosan (1mg/cavidade i.p.). As células foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^5 células/poço em um volume de 100 μ l de meio RPMI (suplementado com soro fetal bovino 10% e penicilina 100 U/ml + estreptomicina 100 μ g/ml) em placa de 96 poços. As células foram expostas a diferentes concentrações de 0,5, 1, 3, 10, 30 e 90 μ g/ml do LEO por 90 minutos, e após esse intervalo foi adicionado 10 μ l da solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após 2 horas de incubação a 37°C foi removido 150 μ l do sobrenadante e adicionados 100 μ l de DMSO em cada poço. As células foram incubadas por 10 minutos a 25°C e a absorbância foi medida em leitor de ELISA em um comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de viabilidade foi calculada segundo a equação:

% Viabilidade celular=

$$\frac{\text{Absorbância células tratadas} - \text{absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle} - \text{absorbância do branco}} \times 100$$

Quimiotaxia in vitro

Para avaliar a quimiotaxia leucocitária *in vitro* induzida por LEO, os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, 4 horas após injeção com zymosan (200 μ g/cavidade, i.p.). As células foram contadas em câmara de Neubauer e o número de células foi ajustado para 1×10^6 células/ml em meio RPMI contendo 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). O ensaio de quimiotaxia foi realizado utilizando a câmara de Boyden de 48 poços (Probe, Inc., Cabin John, MD–USA). No compartimento inferior da câmara de quimiotaxia

foram pipetados e adicionados 28,4 µl do agente quimiotáxico, fMLP (10^{-6} mM), e do óleo essencial de lavanda nas concentrações de 2, 15 e 150 µg/ml, e como controle da migração foi utilizado o meio RPMI 1640. Sobre o compartimento inferior foi colocado uma membrana de polycarbonato (5µm; Poretics Membranes; Osmonics, Laboratory & Specialty Products Group; Livermore, CA-USA). Sobre essa membrana foi colocada uma membrana de polietileno, onde a parte superior da câmara foi encaixada. No compartimento superior colocamos 50µL da suspensão dos leucocitos (1×10^6 células/ml). Em seguida, a câmara foi incubada em estufa a 37 °C com 5% CO₂ por 1 hora. Após este período, a membrana de polycarbonato foi retirada, passada em solução fisiológica, corada com o kit de coloração Diff-Quik (Baxter Scientific Products; Baxter Health Corporation, McGaw Park, IL – USA) e fixada em lâmina. Os neutrófilos foram contados em microscópio óptico, cinco campos (1000X) em cada poço. O ensaio foi realizado em triplicata.

Avaliação do efeito anti-inflamatório tópico

O modelo de edema de orelha, induzido pelo óleo de cróton foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do LEO. A orelha esquerda dos camundongos foram tratadas topicamente com diferentes concentrações de LEO (0,125 mg, 0,250 mg, 0,500 mg, 1 mg, 2,5 mg e 5 mg) diluídas em acetona/água, o grupo controle foi tratado com dexametasona (0,1 mg), uma hora antes da aplicação do óleo de cróton. O edema foi induzido pela aplicação de 20 µL de óleo de cróton (200 µg) dissolvido em solução de acetona/água na face interna da orelha esquerda dos camundongos de cada grupo. Na orelha direita foi aplicado somente o veículo (acetona/água) (20 µL). Após 6 horas, os animais foram eutanasiados com overdose de solução anestésica contendo quetamina (20 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), as orelhas foram seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica. O grau do edema foi expresso como aumento percentual na orelha perfurada pelo peso da mesma (%), utilizando a seguinte fórmula: porcentagem de peso do edema = [(peso da orelha esquerda (inflamada) – peso da orelha direita (não inflamada)) X 100] / peso da orelha direita (não inflamada). A média do percentual (%) de inibição do edema foi calculado por comparação com o grupo controle negativo.

Avaliação do efeito anti-inflamatório sistêmico

O efeito anti-inflamatório sistêmico foi avaliado por meio da técnica de edema de pata. Os animais foram tratados por gavagem, com uma emulsão estável do óleo essencial de lavanda com água, em doses crescentes de 50, 75, 100 e 250mg/kg. Uma hora após, os

animais receberam uma injeção intraplantar (via intradérmica) de 20 μ L de uma solução com 500 μ g/pata de dextrana ou carragenina, dissolvidos em salina 0.9% (veículo) na pata posterior esquerda e o mesmo volume de veículo na pata posterior direita. O volume das patas foi mensurado nos períodos de 30, 60, 120 e 240 minutos após a aplicação de dextrana, ou 1, 2, 4 e 6 horas após a aplicação de carragenina. Com o auxílio de um pletismógrafo digital (Ugo Basile®), conforme técnica de Winter, Risley e Nuss (1962) e Paszcuk et al. (2008), o aumento do volume final da pata foi calculado subtraindo o volume da pata injetada com salina (pata controle) pelo da pata injetada com o agente flogístico.

Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da enzima MPO, uma medida indireta da migração de leucócitos foi determinada no sobrenadante dos homogenados obtidos das secções das orelhas e tecido das patas, e é um indicativo de resposta inflamatória. Os tecidos das orelhas e das patas foram colocados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6.0, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil-amônio em homogeneizador de Potter. O homogenato foi agitado em vórtex e centrifugado durante 20 minutos a 5.000g. Dez microlitros do sobrenadante foram adicionados a microplaca de 96 poços, em triplicata, sendo a seguir, adicionados 200 μ L de solução tampão contendo diidrocloreto de o-dianisidina (16,7 mg), água bidestilada (90 mL), tampão fosfato de potássio (10 mL) e H₂O₂ 1% (50 μ L). A atividade da enzima foi determinada pela técnica de ponto final por meio da medida de absorbância (460 nm) em leitor de microplaca (Biochrom Ltda® - ASYS Expert Plus).

Concentração de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico está envolvido no processo inflamatório agudo, sendo um marcador da inflamação. A concentração de NO foi determinada pelo método de Griess, o qual avalia a produção de nitrito como uma medida indireta do NO. O sobrenadante do homogenato do tecido plantar e das secções da orelha foram colocados em microplaca de 96 poços, em triplicata, e a seguir adicionado solução de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fórfórico e 0,1% de di-hidrocloreto de N-1-naftiletilonodiamina em água) a temperatura ambiente. Após 10 minutos foi realizada a leitura utilizando um leitor de placas de ELISA (Biochrom Ltda® - ASYS Expert Plus) em comprimento de onda de 550 nm. As concentrações de NO foram calculados a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em μ M.

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente e expressos pela média±erro padrão da média. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância ANOVA, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism Software Inc. versão 5.0, seguido pelo teste Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos estatisticamente.

Resultados

Análise e identificação dos componentes do óleo essencial

O óleo essencial obtido apresentava cor amarelo pálido, e foi seco com sulfato de sódio e armazenado a 4 °C em frascos escuros até ser utilizado nos experimentos. O rendimento do LEO foi 0,14 % v/w. O resultado da análise por Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa (CG-EM) (Figura 1) evidenciou a presença de 27 constituintes no LEO, com predominância de 1,8-cineol (39,8%), endo-borneol (22,6%) e cânfora (22,1%), conforme demonstrado na Tabela 1.

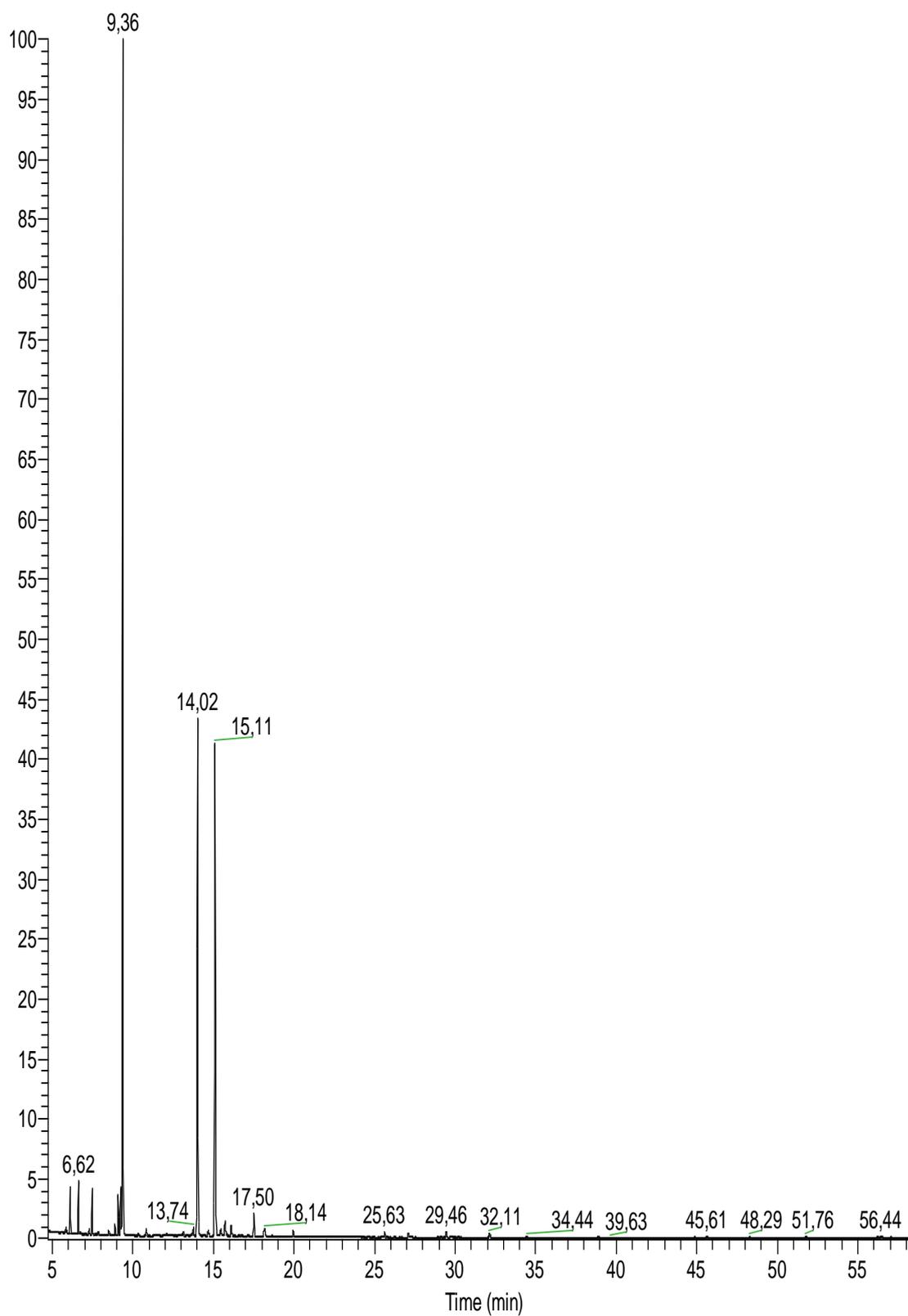


Figura1. Cromatograma CG-EM do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill

IR ^a	Compostos	%AR ^b	Métodos ^c
922	Tujeno	0,15	(EM, IR)*
932	α -pineno	1,26	EM, IR
948	Canfeno	1,50	EM, IR
971	Sabineno	0,23	EM, IR
977	β -pineno	1,44	EM, IR
988	α -felandreno	0,17	EM, IR
1008	δ -3-carene	0,17	(EM, IR)*
1019	<i>p</i> -cimeno	0,37	EM, IR
1024	<i>o</i> -cimeno	1,45	(EM, IR)*
1028	Limoneno	1,62	EM, IR
1031	1,8-cineol	39,83	EM, IR
1069	<i>cis</i> -hidrate de sabineno	0,31	(EM, IR)*
1126	α -canfonelal	0,15	(EM, IR)*
1140	<i>trans</i> -pinocarveol	0,22	(EM, IR)*
1147	Cânfora	22,12	EM, IR
1163	Pinocarvona	0,42	(EM, IR)*
1172	Borneol	22,63	EM, IR
1180	terpinen-4-ol	0,31	EM, IR
1186	Criptona	0,72	(EM, IR)*
1195	Dihidrocarveol	0,56	(EM, IR)*
1227	Acetato de <i>cis</i> -hidrate de sabineno	1,12	(EM, IR)*
1242	Cuminaldeido	0,60	EM, IR
1283	acetato de bornila	0,31	(EM, IR)*
1416	β -cariofileno	0,23	EM, IR
1452	E- β -farneseno	0,21	EM, IR
1510	γ -cadineno	0,27	(EM, IR)*
1578	Óxido de cariofileno	0,17	EM, IR
-----	Outros compostos minoritários	1,06	EM, IR

O ^aíndice de retenção (IR) foi calculado em relação a um conjunto de alcanos C₈H₁₈-C₂₀H₄₂ em coluna DB-5, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963). ^bÁrea Relativa (área do pico em relação à área total do pico). ^cIdentificação baseada no índice de retenção (IR) e espectros de massa (EM) dos compostos autênticos. *Identificação com base na literatura (Adams, 2007).

Ensaio de viabilidade celular

As células tratadas com diferentes concentrações de LEO (0,5, 1, 3, 10, 30, e 90 μ g/ml) apresentaram uma viabilidade celular de 79, 77, 76, 76, 68 e 60%, respectivamente. Os nossos dados indicam que o LEO possui baixa citotoxicidade *in vitro* em baixas

concentrações, apresentando viabilidade celular maior que 75%, até a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Efeito quimiotático do óleo essencial de lavanda in vitro.

Avaliamos o efeito quimiotático *in vitro* de LEO em diferentes concentrações (2, 15, 150 $\mu\text{g/ml}$). O LEO não elevou a migração de neutrófilos em nenhuma das concentrações testadas, quando comparado com o veículo RPMI 1640 (Vh). Entretanto o fMLP (10^{-6} mM) induziu uma significativa migração de leucócitos (Figura 2). Demonstrando que o LEO não apresenta um perfil de agente quimiotático.

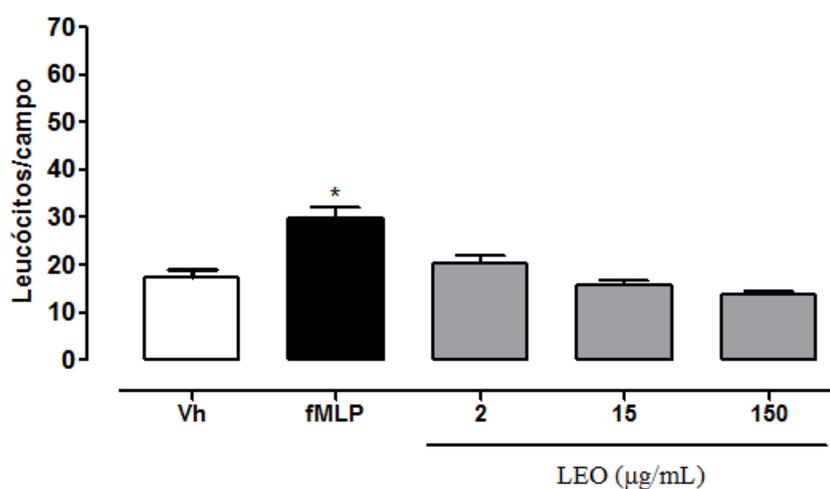


Figura 2. O LEO foi utilizado como um agente quimiotático nas concentrações de 2, 15, e 150 $\mu\text{g/ml}$, assim como o fMLP. Os neutrófilos foram obtidos a partir de peritonite induzido por zymosan (200 $\mu\text{g/cavidade}$). Os valores são média \pm EPM e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação ao Vh (one-way ANOVA, teste de Tukey).

Efeito do óleo essencial de lavanda sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton

Para avaliar o efeito tópico de LEO, utilizamos a técnica do edema de orelha induzido por óleo de cróton. A aplicação do óleo de cróton na orelha esquerda dos camundongos induziu uma resposta inflamatória observada pela formação do edema na sexta hora após a aplicação do agente flogístico. O tratamento com LEO nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/orelha reduziu significativamente o edema de orelha em 59,6; 36,3 e 30,6%, respectivamente, porém em intensidade menor quando comparado com o anti-inflamatório de referência, a dexametasona (78,7%). No entanto, LEO nas suas maiores concentrações não foi capaz de reduzir o edema (Figura 3A).

Para verificar o efeito de LEO sobre a migração celular, avaliamos a atividade da enzima MPO. O óleo de cróton aumentou em 5,3 vezes a atividade da MPO. O tratamento com o LEO, nas concentrações de 0,25mg, 0,5mg e 1,0mg/orelha, inibiu a migração celular em 62,5, 58,3 e 21,8% respectivamente, entretanto a dexametasona foi mais eficaz, inibindo em 82,5% (Figura 3B).

Adicionalmente, avaliamos a concentração de NO, um mediador inflamatório que está envolvido no processo de formação do edema de orelha induzido por óleo de cróton. O tratamento com LEO, em todas as concentrações testadas (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/orelha), foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico em 80, 76, 80,2, 71,3, 82,3 e 81,3% respectivamente, semelhante ao tratamento com dexametasona (0,1 mg/orelha) que reduziu em 73,2% (Figura 3C).

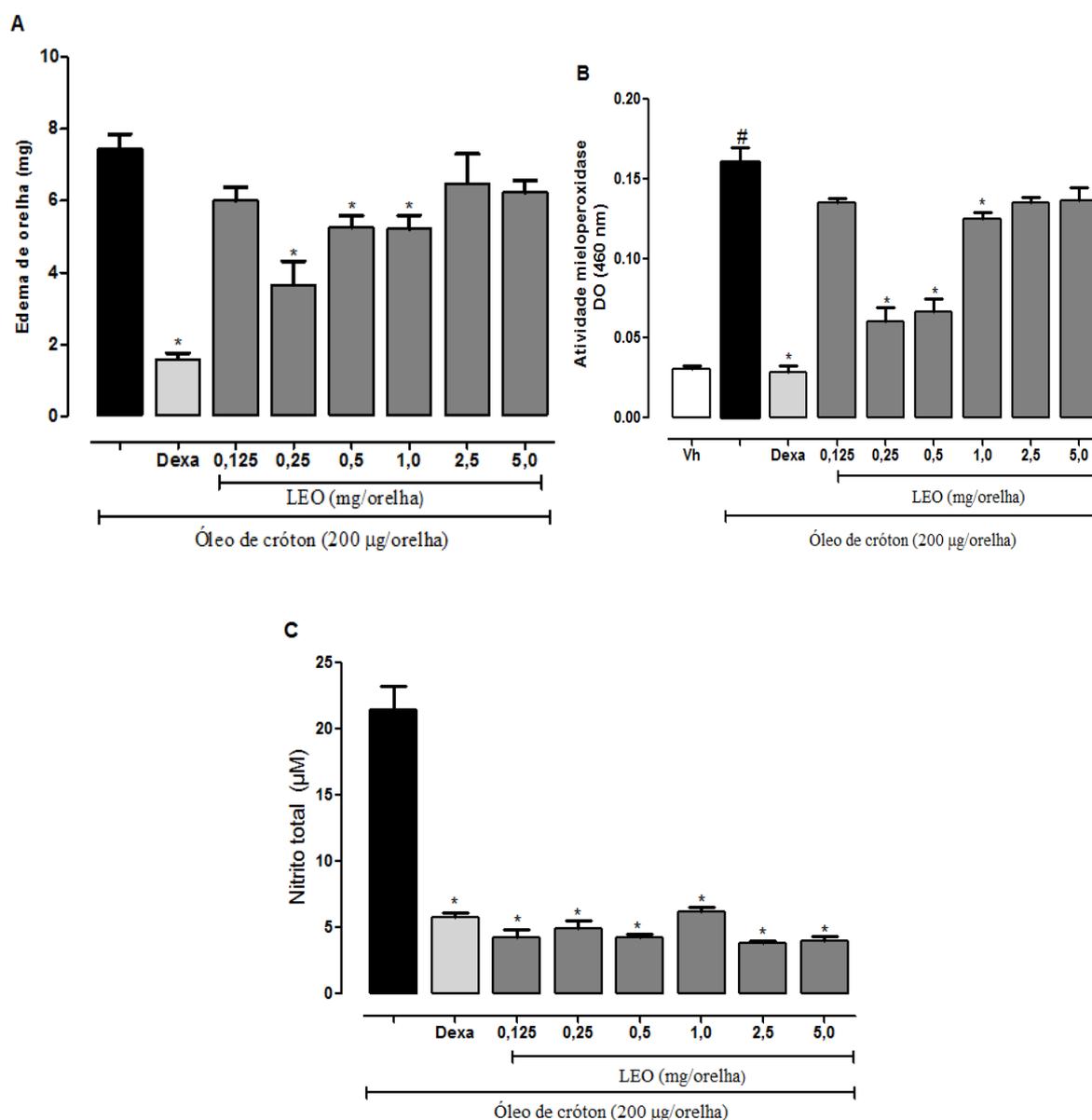


Figura 3. Efeito do tratamento tópico com LEO, nas concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0mg sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton, os camundongos do grupo controle positivo foram tratados com dexametasona (Dexa) na concentração de 0,1 mg/orelha. Os animais foram tratados topicamente com LEO ou Dexa 1 h antes da aplicação de óleo de cróton, * p< 0,001 ** p < 0,0001 em comparação com o óleo de cróton (A). Atividade da enzima myeloperoxidase * p< 0,001 ** p < 0,0001 em comparação com o óleo de cróton, # p < 0,0001 em comparação com o veículo (Vh) (B). Concentração de oxido nítrico * p< 0,0001 em comparação com o óleo de cróton (C). O edema de orelha, a atividade da myeloperoxidase e a concentração de oxido nítrico foram determinados 6 horas após a aplicação do óleo de cróton. Os dados são expressos em média ± E.P.M. (one-way ANOVA, teste de Tukey).

Efeito do óleo essencial de lavanda sobre o edema de pata induzido por carragenina

A injeção intraplantar de carragenina provocou uma resposta inflamatória local, com intensidade máxima de edema na 6^a hora. O tratamento com LEO nas doses de 75 e 100 mg/kg, promoveu uma redução significativa na intensidade da resposta inflamatória na 2^a, 4^a e 6^a hora após a aplicação do agente flogístico (LEO_{75mg/kg} = 48,7; 37,5 e 40,7%, LEO_{100mg/kg} = 65,7; 56,2 e 42,4%, respectivamente). A dose de 250 mg/kg reduziu o edema na 4^a hora e 6^a hora (LEO_{250mg/kg} = 39,6% e 44,1%, respectivamente) (Figura 4A). O tratamento com a indometacina reduziu significativamente a intensidade da resposta, na 2^a, 4^a e 6^a hora em 42,3, 52,5 e 41,3%, respectivamente. O celecoxibe reduziu o volume do edema apenas na 4^a e 6^a hora em 40, e 37,2%, respectivamente (Figura 4B).

Adicionalmente avaliamos a concentração de NO 6 h após a indução do edema de pata com carragenina. O tratamento com LEO por via oral, nas doses de 75, 100 e 250 mg/kg, promoveu uma redução significativa na concentração de oxido nítrico (LEO_{75mg/kg} = 36,7%, LEO_{100mg/kg} = 49,4%, LEO_{250mg/kg} = 47,6%) semelhante a indometacina (54,3%) (Figura 4C).

A atividade da enzima MPO foi avaliada 6 h após a indução do agente flogístico. O tratamento com LEO, nas doses de 75, 100 e 250 mg/kg, reduziram significativamente a atividade da enzima mieloperoxidase em 25%, 50,3% e 59,4%, respectivamente semelhante a indometacina (57,1%) (Figura 4D).

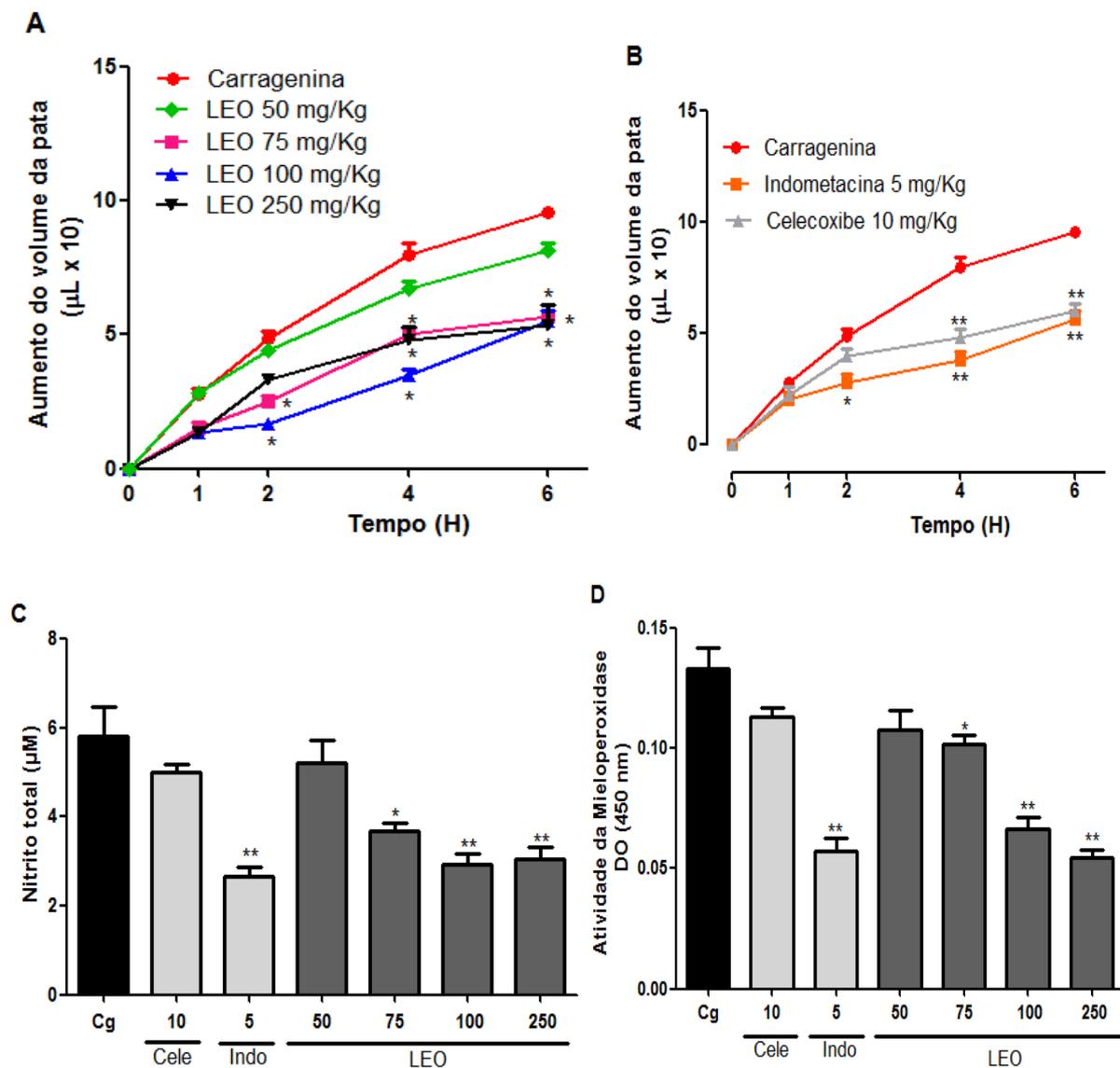


Figura 4. Efeito do tratamento por via oral com LEO no desenvolvimento do edema de pata induzido pela injeção intradérmica de 500 μg /pata de carragenina (Cg). Cada ponto representa o volume médio da pata \pm E.P.M., em 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção de Cg, ** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (carragenina) (A). Os Camundongos do grupo controle positivo foram tratados por via oral na dose de 5 mg/Kg de Indometacina (Indo) (B). Concentração de óxido nítrico (C), Atividade da enzima mieloperoxidase (D). * $p < 0,001$ ** $p < 0,0001$ em comparação com a Carragenina (one-way ANOVA, teste de Tukey).

Efeito do óleo essencial de lavanda sobre o edema de pata induzido por dextrana

A injeção intradérmica de dextrana na pata posterior esquerda dos camundongos promoveu uma resposta inflamatória local, com intensidade máxima de edema na 1ª hora após a aplicação do agente flogístico. O tratamento com LEO, nas doses de 75 e 100 mg/kg, reduziu significativamente a intensidade da resposta, em 30, 60 e 120 minutos após a injeção da dextrana (LEO_{75mg/kg} = 40, 50 e 48,7% e LEO_{100mg/kg} = 53,8, 50, e 44,6%). No entanto LEO nas doses de 50 e 250 mg/kg não foi capaz de reduzir o edema de forma significativa

(Figura 5A). O tratamento com a prometazina, droga utilizada de referência, reduziu significativamente o edema em 30, 60 e 120 minutos após a injeção de dextrana (45,4, 60 e 67,9%, respectivamente) (Figura 5B).

O tratamento com LEO, nas doses de 75 e 100 mg/kg, reduziu significativamente a atividade da MPO em 57,4% e 62%, respectivamente, semelhante a prometazina (65,1%). Por outro lado, as doses de 50 e 250 não foram efetivas na inibição da atividade da MPO (Figura 5C). O tratamento com LEO não reduziu a concentração de NO no edema induzido pela dextrana (Figura 5D).

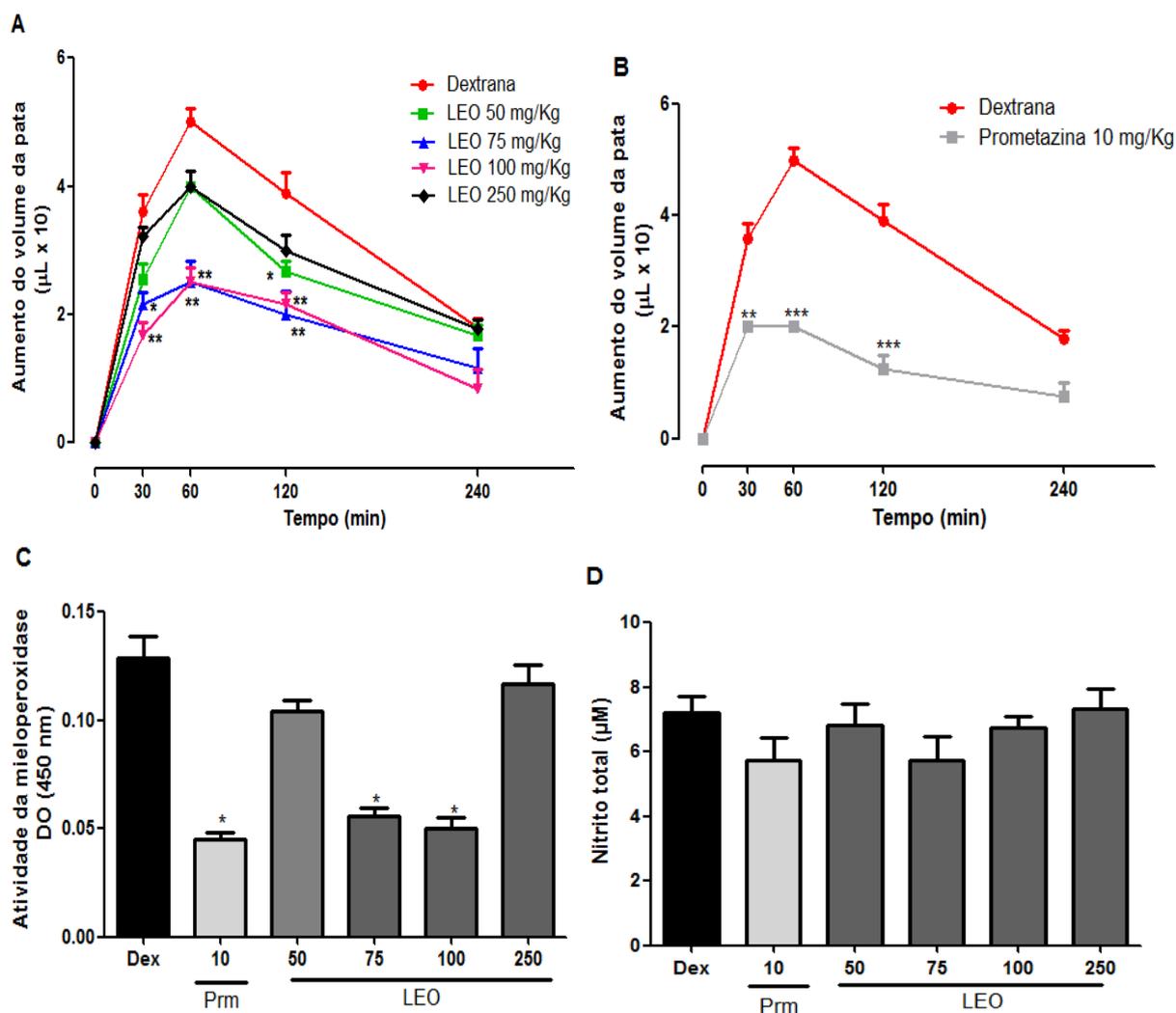


Figura 5. Efeito do tratamento por via oral com LEO no edema de pata induzido pela injeção intradérmica de 500 μg /pata de dextrana (Dex). Cada ponto representa o volume médio da pata \pm E.P.M., em 30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção de Dex, * $p < 0,001$ ** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle (Dextrana) (A). Os camundongos do grupo controle positivo foram tratados por via oral na dose de 10 mg/Kg de prometazina (Prm) ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo controle (Dextrana) (B). Atividade da MPO * $p < 0,0001$ em comparação com a Dex (C). Concentração de óxido nítrico (D) (one-way ANOVA, teste de Tukey).

Discussão

Os resultados obtidos pela análise da composição química do LEO demonstram que os seus constituintes majoritários são 1,8-cineol, borneol e cânfora, semelhante a outro estudo em que foram identificadas os mesmos constituintes majoritários do LEO, porém em diferentes concentrações (Hajhashemi et al., 2003).

No ensaio de citotoxicidade verificou-se que o LEO, em concentrações elevadas (30 e 90 µg/ml) afetou a viabilidade celular. Entretanto, em menores concentrações o LEO não mostrou-se ser citotóxico. Corroborando com os nossos resultados, um estudo relatou que a citotoxicidade do óleo essencial da lavanda é dose-dependente e pode variar de acordo com seus constituintes (Prashar et al., 2004). Ademais, um estudo de Alnamer et al (2012), observou que a administração oral do extrato da lavanda não apresentou toxicidade e nem mudanças no peso corporal, indicando que o seu uso em baixas concentrações pode ser considerado seguro.

Vários estudos demonstraram que a lavanda apresenta um efeito irritativo após a sua exposição na pele (Rudzki et al., 1976; Rademaker et al., 1994; Varma et al., 2000). Um estudo realizado no Japão, durante um período de nove anos, encontrou que até 13,9% dos indivíduos apresentavam dermatite de contato em exposição ao óleo de lavanda (Sugiura et al., 2000). Também há relatos de dermatite facial devido ao uso deste óleo em travesseiros (Coulson e Khan, 1999). Estes dados sugerem que o LEO pode apresentar um potencial irritativo, envolvendo componentes da resposta alérgica e/ou inflamatória.

Com o objetivo de avaliar um possível efeito irritativo do LEO, realizamos experimentos para determinar o seu efeito quimioatraente pelo método da quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Os resultados mostraram que o LEO não estimulou a quimiotaxia, sugerindo que o LEO, não estimula a migração leucocitária.

Em seguida, avaliamos o efeito anti-inflamatório tópico *in vivo* de LEO, utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (OC). O OC é um agente flogístico que provoca danos celulares e ativa a enzima fosfolipase A₂, promovendo assim a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, relacionados com edema inflamatório e migração celular (Kremyda et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento tópico com LEO, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0mg, inibiu a formação de edema induzido pelo OC, efeito semelhante ao tratamento com a dexametasona que é utilizada como fármaco de referência. Este efeito também foi demonstrado por Silva et al. (2015), os quais verificaram que o tratamento por via

oral com o óleo essencial da lavanda foi capaz de reduzir a formação do edema de orelha, atividade esta que pode estar relacionada com a inibição dos mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico. Um estudo de Kim e Cho (1999) demonstrou que o tratamento tópico com o óleo essencial da lavanda também é capaz de reduzir o edema de orelha, induzido pelo composto 48/80, indicando que o LEO pode reduzir o edema, pela inibição de histamina, um mediador da resposta alérgica.

Os neutrófilos são as primeiras células a se deslocarem para a região exposta a um estímulo nocivo, liberando mediadores pró-inflamatório e enzimas proteolíticas, como a MPO. A atividade desta enzima está aumentada durante a inflamação e, quando em alta intensidade é deletéria ao organismo, agravando a resposta inflamatória. Para verificar se o LEO possui efeito sobre a infiltração celular, a atividade da enzima MPO foi determinada como uma medida indireta da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no local inflamado (Bradley et al., 1982; Karakas e Koenig, 2012).

Em nossos experimentos, a administração tópica do LEO nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg inibiu o infiltrado celular, demonstrada indiretamente pela redução da atividade da enzima MPO. Neste sentido, outros autores relataram que o óleo essencial da lavanda foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO, e apresentar efeito antiedematogênico em modelo experimental de isquemia cardíaca (Ziaee et al., 2015), sugerindo que a ação antiedematogênica do LEO poderia estar relacionada à inibição de mediadores inflamatórios envolvidos na ativação celular, reduzindo a migração leucocitária.

Adicionalmente, foi avaliado o efeito do LEO sobre a produção de óxido nítrico, atuando como um mediador inflamatório. O NO promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Associado a estes efeitos, quando produzido em quantidades elevadas, o óxido nítrico apresenta ação citotóxica mediada por radicais livres (Lo Faro et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento tópico com LEO foi capaz de reduzir a produção de NO semelhante à dexametasona, sugerindo que o efeito antiedematogênico do LEO pode estar relacionado também, à redução da concentração de NO. Este dado pode estar indicando que o seu mecanismo de ação envolve parcialmente o NO, semelhante a outros estudos (Rahmati et al., 2013; Rufino et al., 2015).

Em seguida, avaliamos o efeito anti-inflamatório do LEO sistemicamente (via oral), por meio do edema de pata induzido por carragenina. Este agente flogístico induz uma reação inflamatória, envolvendo duas fases distintas. Na primeira ocorre a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), responsáveis pela vasodilatação e aumento da

permeabilidade vascular, enquanto que a segunda fase é resultante da produção de citocinas, NO, prostaglandinas, cininas e uma intensa infiltração celular (Di Rosa et al., 1971; Morris, C. J. 2003).

O tratamento por via oral com LEO, nas doses de 75 e 100 mg/kg inibiu a formação do edema já na primeira fase da carragenina, semelhante a indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal inibidor não seletivo da COX, utilizado como fármaco de referência. Em doses maiores (250 mg/kg), LEO apresentou efeito apenas na segunda fase deste modelo experimental. Resultados semelhantes foram encontrados após o tratamento com celecoxibe, um anti-inflamatório não esteroidal inibidor seletivo da COX-2, utilizado como fármaco de referência. Corroborando com nossos resultados, um estudo realizado por Hajhashemi et al (2003), com o óleo essencial da lavanda, também demonstrou um efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por carragenina em altas doses.

Nossos resultados sugerem que LEO pode apresentar um efeito sobre a COX, e que em maiores doses, parece ser mais seletivo para COX-2. Da mesma forma, um estudo de Husseini et al, (2016) demonstrou o efeito inibitório do extrato hidro-alcóolico da lavanda sobre a atividade da enzima COX, de maneira dose dependente, tanto para COX-1 quanto para COX-2.

O tratamento com LEO também diminuiu a migração celular, como observado na avaliação da atividade da enzima MPO, semelhante ao tratamento com a indometacina. Portanto o efeito antiedematogênico e inibidor da migração de leucócitos do LEO pode ocorrer por meio da inibição de diferentes mediadores inflamatórios liberados durante o processo inflamatório, principalmente com a histamina.

Adicionalmente, determinamos a concentração de NO, visto que, o NO desempenha um papel importante na resposta inflamatória induzida por carragenina (Salvemini et al., 1996). O tratamento com LEO reduziu a concentração de NO, sugerindo que no efeito anti-inflamatório de LEO este mediador pode estar, pelo menos parcialmente envolvido. Outros terpenos como o (-)-linalol, um dos constituintes do LEO, reduziu a produção e a liberação de óxido nítrico, e em altas concentrações, inibiu a expressão de COX-2, sugerindo que a redução da produção de NO pelo LEO pode estar diretamente relacionada aos seus constituintes (Peana et al., 2006).

O edema de pata induzido por dextrana é um teste caracterizado pelo desenvolvimento de um edema vascular, que pode ser detectado já nos primeiros 30 min após sua indução e apresenta uma pequena quantidade de proteínas e neutrófilos, principalmente devido à degranulação de mastócitos seguido da liberação de aminas vasoativas (Ankier e Neat, 1972).

O tratamento com LEO (75 e 100 mg/kg) foi efetivo já na primeira fase da carragenina ao inibir o edema, e esta fase é caracterizada pela liberação de histamina e serotonina. Assim, os resultados obtidos pelo teste de edema de pata induzido por dextrana, podem sugerir que o LEO atua na liberação e/ou ação de autacóides, principalmente a histamina.

Verificamos também que o tratamento com LEO (75 e 100 mg/kg) reduziu o infiltrado celular, como observado pela atividade da enzima MPO resultado semelhante ao observado após o tratamento com prometazina, uma droga anti-histamínica. Outros trabalhos demonstraram também o provável efeito anti-histaminico do óleo essencial de lavanda, onde Lis-Balchin e Hart (1999) constataram que o óleo essencial da lavanda bloqueia os receptores de histamina sobre uma resposta contrátil induzida por histamina. Além disso, Kim e Cho (1999) demonstraram que o óleo essencial da lavanda, aplicado topicamente inibe a liberação de histamina, a partir de mastócitos peritoneais, induzida pelo composto 48-80. Nossos resultados sugerem uma ação supressora do óleo sobre a atividade da histamina em diferentes locais, ou ainda, estar atuando sobre receptores histaminérgicos.

Foi possível verificar que o edema induzido pela dextrana aumentou a concentração de NO semelhante ao observado por Mayhan (1994). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com LEO não reduziu a produção de NO, sugerindo que o efeito antiedematogênico do LEO não envolve a participação do NO.

As atividades farmacológicas apresentadas pelo LEO podem estar relacionadas com os seus constituintes majoritários 1,8-cineol, borneol e cânfora. O composto 1,8-cineol, demonstrou ser um importante inibidor da migração de leucócitos, atuando na redução do edema de pata (Yamada et al., 2013). O borneol também foi capaz de inibir a migração de leucócitos (Almeida et al., 2013), enquanto que a cânfora, que apresenta propriedades anti-inflamatórias pois foi capaz de inibir a migração de neutrófilos *in vitro*, diminuir a infiltração celular e apresentar uma atividade antiedematogênica tópica (Silva-Filho et al., 2015). Outros compostos presentes no LEO, como α -pineno e *p*-cimeno, também demonstram atividade sobre o comportamento leucocitário, indicando serem componentes uteis no tratamento de doenças inflamatórias (Kummer et al., 2015).

Nossos resultados sugerem que o LEO possui uma atividade anti-inflamatória conforme demonstrado na inibição do edema e da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, tanto no tratamento tópico quanto por via oral. Foi demonstrado também que o mecanismo de ação do LEO está relacionado à inibição de diferentes mediadores do processo inflamatório, principalmente com a histamina, e parcialmente com o NO. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação do LEO.

Referências

- Adams, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy. *Carol Stream: Allured*. 4: 469, 2007.
- Almeida. J.R.G.S., G.R. Souza., J.C. Silva., S.R.G.L Saraiva., R.G. Oliveira-Júnior., J.S.S. Quintans., R.S.S Barreto., L.R Bonjardim., S.C.H. Calvacanti and L.J. Quintans-Júnior. Borneol, A Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. *The Scientific World Journal*. 1-5, 2013.
- Alnamer R, Alaoui K, Bouididael H, Benjouad A, Cherrah Y. Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of *lavandula officinalis* from morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*. 5: 1–5, 2012.
- Ankier S.I. and Neat ML. Some studies on acute inflammation induced by dextran in the mouse. *International Archives of Allergy and Immunology*. 42: 264-277, 1972.
- Costa. P., S. Gonçalves., P.B. Andrade., P. Valentão and A. Romano. Inhibitory effect of *Lavandula vir-p idis* on Fe²⁺-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chemistry*. 126: 1779–1786, 2011.
- Coulson. I. H and A.S. Ali Khan. Facial ‘pillow’ dermatitis due to lavender oil allergy. *Contact Dermatitis*. 41: 111, 1999.
- Di Rosa. M., J.P. Giroud and D.A. Willoughby. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology*, 104: 15-28, 1971.
- Gossiau. A., S. Li., C. Ho., K.Y. Chen and N.E. Rawson. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55: 74-82, 2011.
- Hajhashemi. V., A. Ghannadi and B. Sharif. Antiinflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 67–71, 2003.
- J. Baker., K. Brown., E. Rajendiran., A. Yip., D. DeCoffe., C. Dai., E. Molcan., S. A. Chittick., S. Ghosh., S. Mahmoud and D. L. Gibson. Medicinal lavender modulates the enteric microbiota to protect against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *American Journal of Physiology*. 303: G825-G836, 2012.
- Karakas. M. and W. Koenig. Myeloperoxidase production by macrophage and risk of atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 14: 277-283, 2012.
- Kim. H.M and S.H .Cho. Lavender Oil Inhibits Immediate-type Allergic Reaction in Mice and Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51: 221-226, 1999.
- Kremmyda. L., E. Tvrzicka., B. Stankova and A. Zak. Fatty acids as biocompounds: their role in humanmetabolism, helth and disesse-a review. Part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disese. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky*. 155: 195-218, 2011.
- Kummer. R., Estevão-silva. C. F., Lucena. R., Grespan. R., Silva. F.M. S., Spironello. R. A., Rocha. B. A., Silva. E. L., Amado. C. A. B and Cuman. R. K. N. Effect of p-cymene on

chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8: 27, 2015.

Kummer. R., Silva. C. F. E. Bastos, R.L., Rocha. B. A., Spironello. R. A., Nunes-Yamada, A., Amado. C. A. B and Cuman. R. K. N. Alpha-pinene reduces in vitro and in vivo leukocyte migration during acute inflammation. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8: 12-17, 2015.

Lakusić. B.,D. Lakusić., M. Ristić., M. Marcetić and V. Slavkovska. Seasonal variations in the composition of the essential oils of *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*. 6: 859-862, 2014.

Lis-Balchin. M and S. Hart. Studies on the Mode of Action of the Essential Oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research*. 13: 540–542, 1999.

Lo Faro M.L., B. Fox., J.L. Whatmore and P.G Winyard. Whiteman, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*. 14: 38-47, 2014.

Mayhan W.G. Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macromolecular extravasation. *American Journal of Physiology*. 266: H2369-H2373, 1994.

Messaoud. C., H. Chongrani and M. Boussaid. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Natural Product Research*. 26: 1976-1984, 2011.

Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*. 225: 115-121, 2003.

Paszczuk A.F., N.L. Quintão., E.S. Fernandes., L. Juliano., K. Chapman and P. Andrade-Gordon. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *European Journal of Pharmacology*. 581: 204-215, 2008.

Pirali-Kheirabadi. K. and J.A.T.D. Silva. *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*) control. *Experimental Parasitology*. 126: 184–186, 2010.

Prashar. A., I.C. Locke and C.S. Evans. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*. 37: 221–229, 2004.

Peana. A.T., S. Marzocco and A. Popolo. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*. 78: 729-723, 2006.

Rademaker. M. Allergic contact dermatitis from lavender fragrance in *Diffilama* gel. *Contact Dermatitis*, 31: 58–59, 1994.

Rahmati. B., M. Khalili., M. Roghani and P. Ahghari. Anti-epileptogenic and antioxidant effect of *Lavandula officinalis* aerial part extract against pentylenetetrazol-induced kindling in male mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 148: 152–157, 2013.

Rocha. R.P., E.C. Melo and L.L. Radünz. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: a review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 7076-7084, 2011.

- Rudzki. E., Z. Grzywa and S. Brno. Sensitivity to 35 essential oils. *Contact Dermatitis*, 2: 196–200, 1976.
- Rufino. A.T., I. Ferreira., F. Judas., L. Salgueiro., M.C. Lopes., C. Cavaleiro and A.F. Mendes. Differential effects of the essential oils of *Lavandula luisieri* and *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* in cell models of two chronic inflammatory diseases. *Pharmaceutical Biology*. 8:1220-1230, 2015.
- Salvemini. D., Wang. Z.Q., Bourdon. D.M., Stern. M.K., Currie. M.G and Manning. P.T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *European Journal of Pharmacology*, 303: 217–220, 1996.
- Shahriyari. H.A., M. Ersali and Rahmanifard. Anticonvulsant effect of *Lavandula officinalis* in two epilepsy animal model. *Journal of Iran Medical Basic Sciences*. 8: 172–178, 2004.
- Silva. G.L., C. Luft., A. Lunardelli., R.H. Amaral., D.A. Melo., M.V. Donadio., F.B. Nunes., M.S. Azambuja., J.C. Santana., C.M. Moraes., R.O. Mello., E. Cassel., M.A. Pereira and J.R. Oliveira. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87: 1397-1408, 2015.
- Silva-Filho S.E., F.M. Silva-Comar., L.A.M. Wiirzler., R.J. Do Pinho., R. Grespan., C.A. Bersani-Amado and R.K.M Cuman. Effect of Camphor on the Behavior of Leukocytes In vitro and In vivo in Acute Inflammatory Response. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research (Print)*, 13: 2031-2037, 2015.
- Sugiura. M., R. Hayakawa., Y. Kato., K. Sugiura and R. Hashimoto. Results of patch testing with lavender oil in Japan. *Contact Dermatitis*. 43: 157–160, 2000.
- Van den Dool. H and P.D. Kratz. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 11, 463-471, 1963.
- Varma. S., S. Blackford., B.N. Statham and A. Blackwell. Combined contact allergy to tea tree oil and lavender oil complicating chronic vulvovaginitis. *Contact Dermatitis*. 42: 309–310, 2000.
- Verma R.S. L.U. Rahman., C.S. Chanotiya., R.K. Verma., A. Chauhan., A. Yadav., A. Singh and A. Yadav. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 75: 343-348, 2010
- Verona. S., S.R. Rojo., A. Martin., M.J. Cocero., A.T. Serra and T. Crespo., C.M.M. Duarte. Antimicrobial activity of lavender essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, 42: 243-250, 2013.
- Winter. C.A., E.A. Risley and G.W. Nuss. Carrageenan-induced oedema in hind paw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Society for Experimental Biology and Medicine*. 111: 544-547, 1962.
- Woelk. H. and S.A. Schlafke. A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*. 17: 94–99, 2010.
- Yamada. N.A., R. Grespan., A.T. Yamada., E.L. Silva., S.E. Silva-Filho., M.J. Damião., M.M. De Oliveira Dalalio., C.A. Bersani-Amado and R.K.N. Cuman. Anti-inflammatory

Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. *The American Journal of Chinese Medicine*. 41: 913-926, 2013.

Ziaee. M., A. Khorrami., M. Ebrahimi., H. Nourafcan., M. Amiraslanzadeh., M. Rameshrad., M. Garjani and A. Garjani. Cardioprotective Effects of Essential Oil of *Lavandula angustifolia* on Isoproterenol-induced Acute Myocardial Infarction in Rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 14: 279-289, 2015.

Zuzarte. M., L. Vale-Silva., M.J. Gonçalves., C. Cavaleiro., S. Vaz., J. Canhoto., E. Pinto and L. Salgueiro. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31: 1359-1366, 2012.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos que o óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Mill (LEO) apresentou atividade anti-inflamatória sobre a resposta inflamatória aguda em diferentes modelos experimentais. Nossos resultados sugerem que o tratamento com LEO é capaz de diminuir a resposta de diferentes mediadores químicos da resposta inflamatória e/ou alérgica principalmente com a histamina, e parcialmente com o NO, reduzindo edema e infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, tanto no tratamento tópico quanto por via oral. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação do LEO.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho terá continuidade, já que o óleo essencial de lavanda demonstrou ser uma droga com potencial para o tratamento das doenças inflamatórias aguda, apresentando resultados semelhantes quando comparado com outras drogas de referencia utilizadas na clinica médica. O óleo essencial de lavanda pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias, apresentando menores efeitos adversos, para isto, mais estudos devem ser realizados.