

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GABRIELA LUCAS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE LAVANDA**

(Lavandula angustifolia Mill)

Prof. Dr. JARBAS RODRIGUES DE OLIVEIRA

Orientador

Porto Alegre

2009

GABRIELA LUCAS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATÓRIA
E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA**

(Lavandula angustifolia Mill)

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Prof. Dr. JARBAS RODRIGUES DE OLIVEIRA

Orientador

Porto Alegre

2009

GABRIELA LUCAS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATÓRIA
E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA**

(Lavandula angustifolia Mill)

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Andréia Buffon

Dra. Maria Martha Campos

Dr. Amauri Braga Simonetti

**Porto Alegre
2009**

Resumo

Neste estudo, foram avaliadas as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antioxidante do óleo essencial de lavanda. A atividade antioxidante foi testada *in vitro* e serviu como *screening* para os experimentos posteriores. Em animais, o efeito do óleo essencial de lavanda foi comparado com drogas analgésicas e anti-inflamatórias conhecidas (dexametasona, tramadol e indometacina, respectivamente). Isto foi feito na tentativa de sugerir um provável mecanismo de ação. Considerando o potencial terapêutico do óleo essencial de lavanda foi realizado também um estudo de toxicidade aguda, no qual foi demonstrado que o óleo essencial de lavanda na dose de 600 mg/kg é bem tolerado oralmente. Esta dose foi considerada segura e utilizada nos experimentos posteriores. A atividade anti-inflamatória foi testada através de dois modelos de inflamação aguda: pleurisia induzida por carragenina e edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. As respostas inflamatórias produzidas pela carragenina e pelo óleo de cróton foram significativamente reduzidas após o tratamento com óleo de lavanda. Enquanto na pleurisia a droga usada como controle, dexametasona, foi mais eficaz, no edema de orelha o efeito antiedematogênico do óleo foi similar ao observado para a dexametasona. A atividade antinociceptiva foi testada utilizando o modelo de dor induzida por formalina injetada na pata de ratos. Neste modelo, o óleo de lavanda inibiu a nocicepção espontânea provocada pela formalina e apresentou efeito similar ao tramadol. Esses resultados sugerem que o mecanismo envolvido no efeito anti-inflamatório da lavanda pode estar relacionado a um antagonismo de receptores acoplados a proteína G ou interferência no sistema de segundo mensageiros intracelulares fosfolipase C/fosfato de inositol. Em conclusão, os resultados deste estudo revelam atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas do óleo essencial de lavanda. Além disso, essas atividades paralelas à baixa toxicidade encontrada também suportam o interesse para aplicação do óleo de lavanda na aromaterapia e demonstram seu importante potencial terapêutico.

Palavras chave: óleos essenciais, inflamação, dor, lavanda, antioxidantes.

Abstract

In this study, we evaluated the antinociceptive, antiinflammatory and antioxidant effects of lavender essential oil. The antioxidant activity was tested *in vitro* and used as screening for subsequent experiments. In animals, the effect of lavender essential oil was compared to those displayed by known antiinflammatory and analgesic drugs (dexamethasone, tramadol and indomethacine). Attempts have been made in order to suggest a probable mechanism of action. Considering the pharmacological potential of the lavender essential oil, we have also investigated its possible toxic effects. We demonstrated that the dose of 0,6 g/kg is well tolerated orally. This dose was considered safe and was used in subsequent experiments. The antiinflammatory activity was tested using two models of acute inflammation: the pleurisy induced by carrageenan and the ear edema induced by croton oil. The inflammatory response evoked by carrageenan and by croton oil were reduced by the pre-treatment of animals with lavender oil. On pleurisy, the drug used as positive control, dexamethasone, was more efficacious. However, in the ear swelling, the antiedematogenic effect of the oil was similar to the obtained for dexamethasone. The antinociceptive activity was tested using the model of pain induced by formalin injection into the hind paw of rats. In this model, lavender oil consistently inhibited nociception and presented a similar effect to tramadol. This finding suggests that the mechanism involved in the antiinflammatory effect of lavender may be related to interference in the system of intracellular second messenger phospholipase C/inositol phosphate. In conclusion, the results of this study reveal remarkable analgesic and antiinflammatory activities for the lavender essential oil. Furthermore, the effectiveness of the oil associated with the low toxicity support the interest for the application of lavender essential oil in aromatherapy, and demonstrated its important therapeutic potential.

Key words: essential oils, inflammation, nociception, lavender, antioxidants.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1.1 Óleos essenciais..... | 1 |
| 1.1.1.2 Óleo essencial de Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)..... | 3 |
| 1.1.1.3 Análise fitoquímica..... | 4 |
| 1.1.2 Sistema Imune..... | 7 |
| 1.1.2.1 Resposta imune natural e inflamação..... | 8 |
| 1.1.2 Inflamação..... | 10 |
| 1.1.3.1 Estresse oxidativo e inflamação..... | 13 |
| 1.1.3.2 Dor e inflamação..... | 16 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE..... | 18 |
| 1.3 Objetivos..... | 19 |
| 1.3.1 Objetivos gerais..... | 19 |
| 1.3.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 1.4 ASPECTOS ÉTICOS..... | 20 |
| CAPÍTULO 2 | 21 |
| 2.1 MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO..... | 21 |
| CAPÍTULO 3 | 55 |
| 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 55 |
| CAPÍTULO 4 | 57 |
| 4.1 REFERÊNCIAS..... | 57 |
| ANEXO A – DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO | 63 |

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente, solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentando baixa solubilidade em água. Também podem ser chamados de óleos voláteis (Simões, et. al., 2003). São obtidos principalmente por hidrodestilação ou expressão e podem ser oriundos de várias partes vegetais, como folhas, flores ou frutos. Quimicamente, a maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides e/ou terpenóides (Robbers, et. al., 1997). Tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, sendo que normalmente um deles é o componente majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). Pesquisas demonstram que o óleo essencial (constituído por uma série de substâncias apresenta uma melhor atividade terapêutica do que suas substâncias isoladas. Geralmente, os diferentes compostos químicos da mistura apresentam ação sinérgica ou aditiva (De La Cruz, 1997).

De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos, exercendo uma função ecológica na espécie que o produz, especialmente como inibidor da germinação de outras espécies vegetais que venham a competir pelo solo, luz e água; na proteção contra predadores; na atração de polinizadores; na proteção contra perda de água, entre outras (Craveiro et. al., 1986). Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando este órgão representa um substrato renovável, é possível extrair a essência sem eliminar a planta; isso a torna uma fonte de óleo essencial ecologicamente correta. A grande parte dos óleos essenciais comercializados atualmente são oriundos de cultivos racionalizados e, sempre que possível, estabilizados geneticamente e climaticamente, o que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto (Sinai, et. al., 2000).

O cultivo de espécies aromáticas tem aumentado e a obtenção de óleos essenciais constitui importante atividade econômica, sendo amplamente utilizados como fragrâncias em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, além do seu emprego como intermediários sintéticos em perfumes (Siani et. al., 2000).

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade; há registros de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas a cura de males e à busca de bem estar físico, através dos aromas obtidos de certos vegetais. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos. A partir de então, a aromaterapia cresceu rapidamente ao redor do mundo (Woolf, 1999).

O termo aromaterapia teria sido criado pelo químico francês Maurice René de Gattefossé em 1937, que após ter queimado as mãos em um acidente em seu laboratório, acelerou a cicatrização das queimaduras sofridas através do uso da essência de lavanda. A partir deste evento, passou a pesquisar as atividades terapêuticas dos óleos essenciais, que até então eram utilizados apenas com finalidade cosmética e odorizante (Hudson, 1996).

Aos óleos essenciais utilizados na aromaterapia são atribuídas diversas funções farmacológicas, tais como: antimicrobianas, sedativas, e anti-inflamatórias. Estas atividades são reconhecidas, principalmente, através de experiência clínica; porém, têm sido pouco elucidadas experimentalmente. As atividades anti-inflamatórias destes óleos, usados contra uma variedade de doenças alérgicas e reumáticas, possuem mecanismos de ação ainda pouco claros (Shigeru et. al., 2003; 2004).

1.1.1.2 Óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Entre os óleos essenciais disponíveis, o óleo da Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill) é um dos mais comumente utilizados na aromaterapia (____,2004). A espécie pertence ao gênero *Lavandula*, que é um importante membro da família Lamiaceae, com relevância medicinal bem documentada (Göran, et. al., 2002). A planta é um subarbusto de aproximadamente 60 cm de altura; suas folhas são estreito-lanceoladas com inflorescência terminal composta de pequenas flores azuis, que medem de 5 a 8 mm de comprimento e de 3 a 4 mm de diâmetro (Costa, 2002). É nativa da região do Mediterrâneo, sendo extensivamente cultivada em todo Sul da Europa (principalmente França, Itália e Espanha). As partes de onde o óleo essencial pode ser extraído incluem as flores frescas e/ou inflorescências e as flores secas da planta (Gören, at. al., 2002; Costa, 2002).

As monografias da comissão E são uma coleção de documentos oficiais compilados durante quase duas décadas que avaliam a segurança e a eficácia de plantas medicinais por meio de revisão da literatura existente. A Comissão E aprova o uso da lavanda para tratar perda de apetite, dispepsias, insônia e desordens circulatórias e nervosas. A planta pode ser usada como extrato seco em infusões ou como aditivos em banhos de imersão. Segundo o *Therapeutic Guide to Herbal Medicines*, quando administrada internamente, na forma de infusão, devem ser utilizados 1 a 2 colheres do extrato seco por copo de água. Externamente, em banhos de imersão, a dose indicativa varia de 20 a 100 g para cada 20 litros de água. O óleo essencial pode ser administrado em cubos de açúcar, em doses que variam de 20 a 80 mg por cubo (1-4 doses/dia) (____, 1998).

O óleo essencial de lavanda é obtido por destilação das flores frescas da planta e possui cor amarelo-pálida. Apresenta-se como um líquido límpido que possui odor característico e deve ser conservado protegido da luz e a temperaturas que não excedam 25 graus. É composto principalmente por (-)-linalol (20-50%) e acetato de linalila (30-40%), sendo encontrados em menores quantidades: cis-ocimento, terpine-4-ol, beta-cariofileno, acetato de lavandulila, lavandulol, alfa-terpineol, entre outros (____, 2004; ____, 1998).

A ação farmacológica da lavanda tem sido objeto de muitos estudos com o passar dos anos e diversas ações tem sido atribuídas ao seu óleo essencial. Dentre elas, se destacam: ação depressora do sistema nervoso central, anticonvulsivante, sedativa, espasmolítica, anestésica local, antioxidante e inibidora da degranulação de mastócitos (___, 2003).

Kim & Cho (1999) demonstraram que o óleo de lavanda, aplicado topicamente, inibe reações alérgicas por diminuir a secreção de TNF α e, recentemente, muitos estudos têm sugerido uma ação supressora do óleo sobre a liberação de histamina e sobre a produção de citocinas (Shigeru, et. al., 2003). O (-)-linalol, componente majoritário do óleo de lavanda, suprimiu a produção e a liberação de óxido nítrico em estudo in vitro e, em altas doses, inibiu a expressão de ciclooxigenase (COX-2) (Peana, et. al., 2006). Um estudo com humanos, em 2007, sugeriu também a ação analgésica do óleo ao demonstrar que o tratamento com óleo essencial de lavanda reduziu o consumo de opióides no pós-operatório de pacientes submetidos à cirurgia de laparoscopia intra-abdominal (Kim, et. al., 2007).

1.1.1.3 Análise fitoquímica

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo definir os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isso lamento mais utilizados atualmente. As diferentes técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia em papel (CP), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), entre outras, são as mais utilizadas para análise de compostos vegetais, principalmente quando acopladas a métodos de detecção adequados (Simões et. al., 2006).

A caracterização cromatográfica constitui um processo físico-químico muito utilizado para análise de autenticidade de produtos de origem vegetal, sendo fundamental para a identificação de matérias-primas adquiridas na forma de preparados fitoterápicos intermediários.

Para as análises de identificação, é recomendada a determinação do perfil cromatográfico, utilizando a técnica e o sistema cromatográfico adequados para o grupo de constituintes que se deseja avaliar. Nestas análises, é recomendada a utilização de padrões das substâncias características, de extratos de amostra autêntica ou, na ausência destes, de substâncias marcadoras ou de referência (Simões et. al, 2003).

A CG serve para separar componentes a partir de misturas de compostos voláteis. Nas aplicações analíticas, é possível o acoplamento com um sistema de espectrometria de massas (CG/EM), que é extremamente útil no controle de qualidade dos óleos essenciais, pois permite, tanto a identificação, como a quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas (Simões et. al, 2003).

A tabela I mostra a composição química e a concentração relativa dos principais constituintes do óleo essencial de lavanda obtidos por CG/EM (Kubeczka, 2002).

TABELA I – Composição química do óleo essencial de *Lavandula officinalis*:

| Componente | Concentração relativa (%) |
|---|----------------------------------|
| α -pipeno/ α -tujeno | 1,53 |
| Canfeno | 0,76 |
| β -pipeno | 0,68 |
| Sabineno | 0,13 |
| Careno | 0,11 |
| Mirceno | 0,29 |
| Limoleno | 2,06 |
| β -felandreno | 4,31 |
| (Z)- β -ocimeno | 1,16 |
| (E)- β -ocimeno | 0,48 |
| <i>para</i> -cimeno | 1,06 |
| 1-octenil-3-acetato | 0,75 |
| Butirato de hexila | 0,34 |
| Trans-óxido de linalol | 0,34 |
| 1-octen-3-ol | 0,44 |
| Cis-óxido de linalol | 0,31 |
| Canfora | 3,67 |
| Linalol | 42,44 |
| Acetato de linalila | 22,04 |
| Terpinen-4-ol | 5,39 |
| β -cariofileno/acetato de lavsndulila | 2,67 |
| Lavandulol | 0,76 |
| α -terpineol | 1,22 |
| Borneol | 1,85 |
| Acetato de nerila | 0,32 |
| Acetato de geranila | 0,60 |
| Nerol | 0,15 |
| Geraniol | 0,44 |

1.1.2 Sistema Imune

A imunologia é o estudo dos mecanismos de defesa do organismo contra agentes infecciosos e outras substâncias estranhas, denominadas antígenos (Abbas, et. al., 2008). Abrange muitos tipos de defesa, incluindo barreiras físicas como a pele, substâncias químicas encontradas no sangue e líquidos teciduais e reações fisiológicas dos tecidos à lesão ou à infecção. Entretanto, as estratégias de defesa mais elaboradas e eficazes são executadas por células que desenvolveram capacidades especializadas para reconhecer e eliminar microrganismos e substâncias potencialmente deletérias. Devido ao papel central na defesa do hospedeiro, estas células constituem o principal enfoque da imunologia moderna (Stites, et. al., 2004).

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imune e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica. A função fisiológica do sistema imunológico é a defesa contra microrganismos infecciosos; entretanto, até mesmo substâncias não infecciosas são capazes de desencadear uma resposta. Além disso, estes mecanismos protetores, por si só, são capazes de causar doença e dano tecidual em algumas situações. A imunologia é portanto, o estudo dos eventos celulares e moleculares que ocorrem depois que o organismo encontra microrganismos ou outras moléculas estranhas, independentemente das consequências fisiológicas ou patológicas que estes eventos podem vir a causar (Abba, et. al., 2008).

A defesa contra microrganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade natural e as respostas tardias da imunidade adquirida (Abbas, et. al., 2008). Um patógeno provoca uma série de reações quando consegue ultrapassar as barreiras de defesa e penetrar no organismo (Stites, et. al., 2004). A imunidade natural (também chamada de imunidade inata ou nativa) é a linha de defesa inicial contra microrganismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programadas para responder rapidamente. Os mecanismos da imunidade natural são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos semelhantes e não conseguem distinguir diferenças discretas entre substâncias estranha, isto confere ao organismo uma proteção

relativamente inespecífica contra uma grande variedade de patógenos (Stites, et. al., 2004; Abbas, et. al., 2008).

Em contraste com a imunidade natural, existem outras respostas imunológicas que estão fracas ou ausentes por ocasião da primeira exposição, mas que aumentam acentuadamente com exposições subsequentes ao mesmo patógeno. Como esta forma de imunidade se desenvolve em resposta a infecções e se adapta à infecção, é chamada de imunidade adaptativa ou adquirida. O sistema imunológico adquirido é capaz de responder a um grande número de substâncias, sejam elas microbianas ou não. Além disso, ele tem uma incrível capacidade para distinguir entre os diferentes tipos de moléculas, até mesmo aquelas que apresentam uma grande semelhança. Estas características conferem a este tipo de resposta, duas propriedades muito importantes e ausentes na resposta imune inata, a especificidade e a memória (Stites, et. al, 2004; Abbas, et. al., 2008).

Tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa são constituídas de numerosos fatores solúveis e diversos tipos celulares que desempenham papéis específicos na defesa do hospedeiro. Ambas as respostas são componentes de um sistema integrado de defesa do hospedeiro no qual várias células e moléculas funcionam em cooperação. Esses sistemas são essenciais à saúde, dependem muito um do outro para eficácia máxima, e certos tipos celulares ou proteínas são de suma importância para a atuação em ambos os sistemas (Stites, et. al., 2004).

1.1.2.1 Resposta imune natural e inflamação

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra as infecções. Seus mecanismos existem antes do encontro com os microrganismos, e são rapidamente ativados por eles antes do desenvolvimento das respostas imunológicas adquiridas. As principais células efetoras deste tipo de resposta são os neutrófilos, os fagócitos mononucleares e as células *natural killer* (NK). Cada uma destas células desempenha um papel distinto, atacando microrganismos que romperam as barreiras epiteliais e entraram nos tecidos ou na circulação (Stites, et. al., 2004; Abbas, et. al., 2008).

O sistema imunológico natural evoluiu para reconhecer microrganismos, e não moléculas de mamíferos. As substâncias presentes nos microrganismos que são capazes de estimular a resposta imune natural são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses padrões incluem, por exemplo, os ácidos nucleicos que são exclusivos de microrganismos, como o RNA dupla-hélice; os complexos de lipídeos e carboidratos que são sintetizados por microrganismos mas não por células de mamíferos; tais como lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias gram-negativas, ácidos teicóicos em bactérias gram-positivas e oligossacarídeos ricos em manose encontrados em glicoproteínas microbianas, mas não em glicoproteínas de mamíferos (Abbas, et. al, 2008).

Os fagócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos, são recrutados do sangue para os locais de infecção por ligação a moléculas de adesão em células endoteliais e por quimioatraentes produzidos em resposta a lesão/infecção. No local, os fagócitos são capazes de reconhecer, fagocitar e destruir microrganismos. Além disso, produzem citocinas que desempenham muitos papéis importantes nas respostas imunes e no reparo tecidual. Essas funções dos fagócitos são importantes não só na imunidade natural, mas também nas fases efetoras das respostas adquiridas. Além dos produtos microbianos, o sistema imunológico natural também pode eliminar as células do hospedeiro que sofreram estresse ou lesão; estas células expressam moléculas que são encontradas em células normais e são reconhecidas e eliminadas pelas células NK (Abbas, et. al., 2008; Goldsby, et. al., 2007).

A reação global e integrada do hospedeiro – abrangendo a resposta imunológica juntamente com todos os seus fenômenos secundários associados – é denominada inflamação.

1.1.3 Inflamação

A reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico de resposta à invasão por um agente infeccioso ou apenas uma reação a uma lesão de natureza variada (química, térmica e mecânica), sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este mecanismo é composto por fenômenos complexos que se associam e se complementam, formando uma reação em cascata, que envolve uma complexa interação entre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos) e células vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa) (Stites, et. al., 2004).

A inflamação consiste no recrutamento de leucócitos e no extravasamento de várias proteínas plasmáticas em um local de infecção ou lesão e na ativação dos leucócitos e proteínas para eliminar o agente infeccioso. A resposta inflamatória visa destruir, diluir ou isolar o agente agressivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e reparo de dano tecidual (Tedgui & Mallat, 2000). Diante de uma lesão celular, independentemente do agente agressor, uma série de modificações do tecido conjuntivo vascularizado ocorre, com acúmulo de líquidos e recrutamento de elementos celulares com funções específicas, particularmente granulócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos, ambos fagócitos por excelência, que objetivam a eliminação rápida do agente agressor e o reparo do tecido lesado, caracterizando a resposta inflamatória aguda (Chandrossoma & Taylor, 1993).

A reação orgânica aguda que se verifica em uma inflamação é, fundamentalmente, uma resposta de defesa e proteção do organismo lesado contra o agente agressor e as consequências que ele pode vir a causar. É um fenômeno estereotipado, cujos sinais clínicos de calor, rubor, edema e dor foram primeiramente descritos por Celsius 178 a. C., sendo que a estes, Galeno adicionou a perda de função. Atualmente, sabe-se que estes sinais são consequências da liberação de substâncias químicas encontradas no local da lesão, particularmente as citocinas (Cotran, et. al., 2005).

As citocinas inflamatórias, importantes mediadoras das respostas vasculares e celulares desencadeadas por estímulo inflamatório agudo, são substâncias químicas circulantes no plasma ou ligadas a membrana; dentre elas, destacam-se as interleucinas,

o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Sedgwick & Willoughby, 1995; Cassatela, 2005).

A inflamação aguda tem duração relativamente curta, durando alguns minutos, horas ou dias e é independente da natureza do agressor, sendo a resposta muito similar, aos diferentes estímulos. Sob certas circunstâncias, quando o processo reacional agudo não é o suficiente para eliminar o agente causal e/ou reparar os danos locais causados, a reação inflamatória pode se prolongar por dias ou mesmo por semanas ou meses, instalando-se então, um processo racional crônico, com a infiltração de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e proliferação de mastócitos, além dos macrófagos e PMN já presentes (Cotran, et. al., 2005).

Evidências demonstram que vários fatores desempenham importantes papéis na modulação da resposta inflamatória de cada uma das fases da inflamação aguda. Na fase precoce, mediadores como a histamina e bradicinina modulam a resposta inflamatória aumentando o calibre e o fluxo vasculares, gerando calor e rubor presente no foco da inflamação (Contran, et. al., 2005; Springer, 1995).

Durante a fase inicial da inflamação aguda, há predominância de eventos celulares que se caracterizam pela marginação, adesão endotelial, diapedese e migração de leucócitos para o foco da lesão, decorrentes de estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade (Cotran, et. al., 2005). Os neutrófilos, população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes o sangue, medeiam as fases iniciais das respostas inflamatórias. A produção de neutrófilos é estimulada pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF); os neutrófilos produzidos circulam no sangue por apenas 6 horas e se não forem recrutados para um foco inflamatório dentro deste período, sofrem apoptose e são fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço. Mesmo após entrarem nos tecidos, eles funcionam por algumas horas e depois morrem (Abbas, et. al., 2008).

Os neutrófilos acumulam-se rapidamente no sítio de lesão e secretam substâncias, não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também de recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Sedgwick & Willoughby, 1985).

Em contraste com a reação aguda, na qual predominam as PMNs, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de células mononucleares (MNC), incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran, et. al., 2005). Dentre as células, os macrófagos ocupam posição de destaque comparável ao papel principal desempenhado pelos PMNs na reação aguda. Em contraste com um tempo de vida de cerca de 24 horas para monócitos circulantes, os macrófagos sobrevivem por vários meses, durante os quais, ao responderem a diferentes estímulos, especialmente citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas. Atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, produzem reagentes metabólitos do oxigênio e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos (Cotran, et. al., 2005; Reeves & Todd, 2000).

A inflamação é controlada pela presença de mediadores químicos. Estes mediadores podem se originar do plasma, das células ou do tecido agredido, sendo divididos nos seguintes grupos: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cininas, sistema complemento, sistema de coagulação); metabólitos do ácido araquidônico (via cicloxigenase e via lipoxigenase); proteases lipossômicas; radicais livres derivados do oxigênio; fator derivado de plaquetas (FAP); citocinas, óxido nítrico, entre outros (Cotran, et. al., 2005; Reeves & Todd, 2000).

O óxido nítrico (NO) é um gás de radical livre que modula diversos aspectos da função corporal. A convergência de diversas linhas de pesquisa levou ao reconhecimento de que o NO constitui uma molécula chave de sinalização no sistema cardiovascular e no sistema nervoso, além de desempenhar um papel na defesa do hospedeiro. É um potente vasodilatador, que aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. O NO ou os compostos derivados dele, também exercem ação citotóxica contra bactérias, fungos, vírus e parasitas metazoários; acredita-se que possa potencializar os mecanismos de defesa local. Entretanto, quando produzido em excesso, pode ser prejudicial para as células do hospedeiro. Estudos recentes têm demonstrado que o NO desempenha um papel preponderante como mediador da inflamação, aumentando a liberação e a síntese de mediadores

inflamatórios, como as citocinas, espécies reativas de oxigênio e prostaglandinas, resultando em promoção da resposta inflamatória. Portanto, drogas que interfiram na síntese ou na liberação de NO podem ser alvos de estudos visando sua utilização no tratamento de condições inflamatórias (Tomlinson, et. al, 1994).

1.1.3.1 Estresse oxidativo e inflamação

O organismo dos mamíferos possui uma habilidade de se adaptar a variados tipos de estresse, internos e externos, aos quais é submetido. Quando o O₂ passou a ser utilizado no processo de respiração, ocorreu paralelamente, o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade daquele gás, já que o metabolismo aeróbio conduz à formação de radicais livres. Assim, os organismos se adaptaram à quantidade de O₂ existente na atmosfera e à consequente produção de radicais livres, gerando um sistema de defesa antioxidante. Desse modo, qualquer estímulo que leve à produção excessiva de radicais livres e/ou a depleção de antioxidantes leva a uma alteração significativa do balanço entre a produção e a remoção de radicais livres (Urso, 2003).

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado ocupando uma órbita externa. O ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila ([•]OH) e o óxido nítrico (NO[•]), são exemplos de radicais livres. Existem, entretanto, compostos igualmente reativos que não possuem elétrons não-pareados na última camada e, portanto não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion nitroxila (NO⁻) e o peroxinitrito (ONOO⁻) (Dröge, 2002).

O desbalanço entre a produção de ROS/RNS e a remoção pelos sistemas de defesa antioxidantes é denominado stress oxidativo (Dröge, 2002). Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (McBride, 1999). Esta ocorre em ácidos graxos poliinsaturados e inicia por um radical hidroxila que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo. O fato

de que o O_2 é 7 vezes mais solúvel em meio não polar do que em meio polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de O_2 na região hidrofóbica medial, onde este tem potencial para causar o maior dano a ácidos graxos poli-insaturados da membrana, isto é, a membrana é a estrutura mais susceptível à desestruturação provocada pela peroxidação lipídica. Assim, um ácido graxo com um elétron desemparelhado reage com O_2 gerando um radical peroxil. Este produto é altamente reativo e pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas de membrana (Gaté, et. al., 1999). Um dos produtos da lipoperoxidação das membranas é o malondeído, um dialdeído altamente reativo, que eventualmente reage com o grupo amino de proteínas, fosfolipídeos ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das moléculas biológicas (McBride, 1999).

O estresse oxidativo é um importante fator no desenvolvimento de muitas doenças, principalmente câncer e desordens cardiovasculares, como arteriosclerose (Valentova, et. al., 2003). Altas concentrações de ROS estão envolvidas na ativação do fator de transcrição NF- κ B), promovendo a manutenção de processos inflamatórios crônicos (Hwang & Kim, 2007). A excessiva formação endógena de radicais livres pode ser causada por: (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteína em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes (Fillipin, et. al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune. Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema NADPH oxidase que resulta num aumento marcante no consumo de oxigênio e consequente produção de ânion superóxido. A ativação da NADPH oxidase pode ser induzida por LPS, lipoproteínas e citocinas, como interferon-gama (IFN- γ) interleucina-1 beta (IL-1 β) e TNF- α (Peano et. al., 2006; Goldsby, et. al., 2007). Entretanto, em muitas doenças

inflamatórias ocorre a produção excessiva de ROS, causando diversos danos patológicos (Fillipin, et. al., 2008).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou prevenir a oxidação de lipídeos e outras moléculas por inibir a iniciação ou a propagação de reações de oxidação em cadeia (Valentova, et. al., 2006). Muitos compostos de origem vegetal possuem potente atividade antioxidante. Recentemente, foi comprovada a ação provedora de termotolerância, fotoprotetora e antioxidante de monoterpenos de plantas, relacionadas especialmente a sua capacidade de captar radicais de oxigênio oriundos do processo fotossintético. O efeito antioxidante dos óleos voláteis, muitas vezes, decorre do sinergismo existente entre as substâncias (Souza, et. al., 2007).

Diversos ensaios foram desenvolvidos para *screening* de atividade antioxidante de produtos vegetais. Os mais utilizados são o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazila), redução do íon férrico (FRAP) e capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC). Como alguns desses ensaios possuem mecanismos diferentes, sua resposta depende do tipo e da relação oxidante/antioxidante utilizados.

O ensaio de descoloração do radical DPPH^{*} em que ocorre captura de radicais e a formação de DPPH-H é um método amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante em um espaço de tempo relativamente curto quando comparado com outros métodos. Este método é baseado na redução de uma solução metanólica do DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, levando a formação de DPPH-H. este teste já foi utilizado no *screening* de atividade antioxidante de diversos óleos voláteis de utilização medicinal a alimentícia (Souza, et. al., 2007).

1.1.3.2 Dor e inflamação

A dor é uma das mais importantes e complexas experiências humanas e está relacionada ao dano tecidual e às consequências que este dano pode vir a causar. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, para o qual o organismo possui um complexo sistema (Andrade Filho, 2001).

Para chegar à medula espinhal, a informação nociva depende da participação dos neurônios aferentes primários (NAPs). Essencialmente, devemos conhecer dois tipos de dor, a dor aguda e a dor crônica. A primeira resulta da estimulação nociva intensa ou potencialmente injuriante, é bem localizada e transitória. Este tipo de dor é mediado por NAPs especializados, capazes de codificar o estímulo nocivo quanto a sua modalidade, localização, intensidade e duração. O segundo tipo de dor denominada dor crônica, ocorre em resposta à lesão tecidual, possui também um período agudo, geralmente associada a dano tecidual e inflamação, os quais também exercem papel protetor (Andrade Filho, 2001; Rang, 2007).

Foi demonstrado que os gânglios da raiz dorsal, onde se encontram os corpos celulares dos NAPs, sintetizam diversas substâncias com potencial para atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores da dor. Substância P, glutamato, neurocinina A, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, colestocinina, nociceptina e peptídeo intestinal vasoativo são substâncias produzidas na raiz dorsal e capazes de estimular células espinhais nociceptivas. Peptídeos opióides (encefalinas e dinorfinas) são também produzidos no gânglio da raiz dorsal, mas possuem predominantemente ação inibitória sobre células nociceptivas (Andrade filho, 2001).

Os terminais periféricos dos NAPs (nociceptores) possuem receptores para bradicinina (tipo B2), prostaglandinas, opióides, histamina, serotonina, noradrenalina e acetilcolina, substâncias que podem ser liberadas em tecidos lesados. Mais recentemente, tem sido enfatizada a participação do óxido nítrico em fenômenos de hiperalgesia. Este gás é formado a partir da L-arginina por ação das óxido nítrico sintetases e tem a propriedade de ativar guanilato ciclase em terminais nervosos dos NAPs, promovendo aumento da concentração intracelular de GMP cíclico (GMPc). Além dos terminais dos NAPs, neurônios intrínsecos gabaérgicos, colinérgicos

encefalinérgicos e liberadores de substância P foram também encontrados na medula espinhal e estão envolvidos na modulação da entrada de estímulos nociceptivos (Andrade Filho, 2001).

Um sistema endógeno de controle está presente e depende da ativação de fibras descendentes noradrenérgicas e serotoninérgicas. As fibras noradrenérgicas podem inibir diretamente as células espinhais nociceptivas ou indiretamente, via ativação de neurônios intrínsecos colinérgicos. Já o papel analgésico da estimulação da via descendente serotoninérgica envolve a ativação de neurônios opióides intrínsecos da medula espinhal, produtores de encefalina e dinorfina, estas sim capazes de inibir a passagem dos estímulos nocivos do NAP para a célula espinhal por ação inibitória pré-sináptica (Ballantyne, 2002).

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O conhecimento popular das propriedades terapêuticas das plantas, há séculos, é transmitido de geração em geração e constitui forte indicador do potencial terapêutico de várias espécies, servindo como instrumento para criação de novos fármacos. Tem sido amplamente demonstrado que compostos derivados de plantas possuem efeito anti-inflamatório significativo. Por esta razão, estes compostos podem representar potencial molecular para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente designadas para o tratamento e/ou controle de estados inflamatórios crônicos.

A lavanda é uma planta largamente utilizada na aromaterapia e na medicina popular e muitos estudos têm demonstrado que seu óleo essencial possui ações relacionadas com os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. Em face ao exposto, o óleo essencial de lavanda desta espécie tornou-se alvo do nosso interesse no sentido de explorar o seu potencial medicinal através de ensaios in vivo e in vitro que determinem além do seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e /ou anti-nociceptivo, sua toxicidade.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos gerais

Avaliar a toxicidade, a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo essencial de lavanda.

1.3.2 Objetivos específicos

“in vitro”

- Mensurar a atividade antioxidante do óleo essencial de lavanda através do ensaio com o reagente DPPH, avaliando a concentração inibitória 50 (CI50).

“in vivo”

- Avaliar a toxicidade aguda do óleo essencial de lavanda.
- Avaliar a ação anti-inflamatória do óleo essencial de lavanda, administrado por via oral, através da coleta de exsudato inflamatório, determinação do volume de exsudação, determinação do óxido nítrico no exsudato e avaliação da migração de células inflamatórias para cavidade pleural, utilizando o modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos.
- Avaliar a ação anti-inflamatória tópica do óleo essencial de lavanda e comparar com a atividade oral, utilizando modelo de edema de orelha em camundongos.
- Avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial de lavanda, utilizando o modelo de dor induzida por formalina em ratos.
- Comparar a atividade de analgésicos e antiinflamatórios conhecidos com a ação da lavanda.

1.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê Científico da faculdade de Biociências e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o registro nº. 09/0088.

CAPÍTULO 2

2.1 MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

ACUTE TOXICITY AND THERAPEUTIC ACTIONS OF LAVENDER ESSENTIAL OIL
(*Lavandula angustifolia* Mill.)

SUBMETIDO AO PERIÓDICO: JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

**ACUTE TOXICITY AND THERAPEUTIC ACTIONS OF LAVENDER ESSENTIAL OIL
(*Lavandula angustifolia* Mill.)**

Gabriela Lucas da Silva^{1,2}, Robson Henrich do Amaral¹, Marcos Schuch de Azambuja^{1,2}, Cristina Machado Bragança de Moraes^{1,2}, Ricardo Obalski de Mello^{1,2}, Eduardo Cassel^{3,4}, Marcos Aurélio de Almeida Pereira^{3,4}, Denizar Alberto da Silva Melo¹, Jarbas Rodrigues de Oliveira^{1,2}

¹ Faculdade De Biociências e Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação. ² Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM). ³ Faculdade de Engenharia e Laboratório de Operações Unitárias (Lope). ⁴ Programa de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA). Porto Alegre, RS, Brasil.

Adress correspondence to: Jarbas Rodrigues de Oliveira, Laboratório de Pesquisa em biofísica celular e inflamação, faculdade de biociências, Av. Ipiranga, 6681, prédio 12c, sala 263, porto alegre, RS, Brasil, CEP 90619-900.

55 51 3320 3500 x. 4147, fax: 55 51 3320 3612

E-mail: jarbas@pucrs.br (J.R. de Oliveira)

Abstract

The objective of this study was to assess the antinociceptive, antiinflammatory and antioxidant effects of lavender essential oil. The in vitro DPPH decolorization assay was used for antioxidant activity evaluation. The antiinflammatory activity was tested using two models of acute inflammation: the pleurisy induced by carrageenan and the ear edema induced by croton oil. The antinociceptive activity was tested using the model of pain induced by formalin injected into the hind paw of rats. Considering the pharmacological potential of lavender essential oil, we also investigated its possible toxic effects. We demonstrated that lavender oil presents some toxic effects, but it is well tolerated by oral route at the dose of 0,6 g/kg. This dose was considered safe and used in subsequent experiments. The inflammatory response evoked by carrageenan and by croton oil was reduced by the pre-treatment of animals with lavender oil. On pleurisy the drug used as positive control, dexamethasone was more efficacious. However, in the ear swelling, the antiedematogenic effect of the oil was similar to the observed for dexamethasone. This finding suggests that lavender interferes on the system of intracellular second messenger phospholipase C/inositol phosphate. In the formalin test, the lavender oil consistently inhibited spontaneous nociception and presented similar effect to tramadol. The results of this study reveal the remarkable analgesic and antiinflammatory activities of the lavender oil. Furthermore, the effectiveness of the oil without evidence of toxic effects at low doses support the interest for application of lavender essential oil in aromatherapy and demonstrate its important therapeutic potential.

Key words: essential oil, inflammation, nociception, lavender, antioxidants.

1 INTRODUCTION

Lavender genus is an important member of Lamiaceae family. *Lavandula* species are widely distributed in the Mediterranean region and cultivated in France, Italy and Spain. The medicinal importance of the plant is well-documented (Gören et. al., 2002). *Lavandula angustifolia* Mill. Specie is well known among people as a powerful aromatic and medicinal herb. The plant is used in traditional and folk medicines of different parts of the world for the treatment of several gastrointestinal, nervous and rheumatic disorders (Hajhashemi et. al., 2003). *Lavandula angustifolia* essential oil and its major components, (-)-linalool and linalyl acetate, presented antiinflammatory properties in rats (Peana et. al, 2002). In an in vitro study, (-)-linalool and linalyl acetate decreased the production and the release of nitric oxide (NO), without interference in the prostaglandins (PGs) pathway (Peana et. al., 2006).

Several studies have investigated the antinociceptive, immunomodulatory and antiinflammatory properties of compounds found in the lavender oil (Peana et. al, 2002, 2006; Hart, 2000; Kim and Cho, 1999). These studies investigated the effects of different constituents of essential oils, such as α -pinene, α -terpinene, terpin-4-ol, α -terpineol, linalyl acetate and linalool. Collectively, these studies concluded that compounds present in the lavender essential oil might have direct or indirect antiinflammatory or antinociceptive activities.

In fact, *Lavandula angustifolia* specie is reported to be one of the most effective of all essential oils. In recent years, the study of natural products continues attract researcher's attention in the detection of possible clinical uses of the lavender, and the list of its biological activities is increasing. Although a conspicuous number of investigations have been conducted in the last years, no conclusive data is reported about lavender oil action mechanism.

In this work, the *in vitro* antioxidant activity of lavender essential oil was investigated. The antiinflammatory effects were evaluated using different models of acute

inflammation and the antinociceptive activity was tested by using the model of pain induced by formalin.

Different animal models were used and the effect of lavender essential oil was compared to known antiinflammatory and analgesic drugs. Attempts have also been made in order to investigate some mechanism of action. Considering the pharmacological potential of the lavender essential oil, we have also investigated the possible toxic effects in rats using histopathological, biochemical and hematological parameters.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Plant material and GC/MS Analyses*

Lavender oil was purchased from Bioessencia Natural products LTDA (Brazil). The oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The equipment used is from Brand Agilent Technologies, model 7890A GC system, equipped with a data processor. Capillary column HP – 5 MS (30 m x 0,250 mm; film thickness 0,25 µm), 60 to 325/350°C temperature. Helium was the carrier gas used. MS analysis was performed in equipment operating at 70 eV, and temperature of the ion source was maintained at 250 °C. The injected volume was 5 µl of diluted sample (1:1) in n-hexane for each analysis. Identification of components in the oil was based on GC retention indexes relative by comparison of the fragmentation patterns of mass spectra with those reported in the literature (Adams, 2007).

2.2 *Animals*

Male swiss mice (30 ± 5 g), female Wistar rats (180 ± 20 g) and male Wistar rats (280 ± 20 g) were obtained from the Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde – FEEPS, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were housed under conditions of optimum light, temperature and humidity (12:12 h light-dark cycle, 22 ± 1°C, 50-60%) with food and water provided *ad libitum*. All experiments were carried out between 8:00 a.m. and 7 p.m. The Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul approved the experimental procedures. All efforts were made in order to minimize the animal suffering.

2.3 Bleaching of the free-radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH test)

The anti-radical activities of the lavender essential oil were determined using the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), according to procedures described for Aquino et. al. (2001). DPPH has an absorption band at 515 nm, which disappears upon reduction of an anti-radical compound. An aliquot containing different amounts of the oil was added to freshly prepared DPPH solution (150 μ M in methanol); the concentration of lavender essential oil employed were 0,1 mg/ml; 1,0 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml; 40 mg/ml; 60 mg/ml; 80 mg/ml; 100 mg/ml; 120 mg/ml and 150 mg/ml. An equal volume of methanol was added to control tubes. After starting the reaction, and a 60 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 515 nm. All experiments were carried out in triplicate. We expressed the radical scavenger activity in terms of the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH absorbance by 50% (IC₅₀). The IC₅₀ value was determined graphically by plotting the percentage disappearance of DPPH as a function of the sample concentration. Inhibition radical in percent (I %) was calculated as follows:

$$I (\%) = (A_{blank} - A_{sample})/A_{blank} \times 100$$

Where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound), and A_{sample} is the absorbance of the test compound.

2.4 Oral acute toxicity

Female Wistar rats (180-220 g) were used. For toxicological evaluation, some protocols are indispensable such as observations of toxic signals. In this study, animals

were randomly divided into five groups (n=6). The first group (control group) received saline solution per oral (p.o.). Groups 2-5 were treated with lavender essential oil at the doses of 0,6 g/kg, 1,5 g/kg, 3,0 g/kg and 5,0 g/kg, respectively. Animals were observed for 14 days after treatment. During these 14 days, the appearance of general toxic signs was observed. In this period, the following parameters were also measured: weight changes, food consumption and mortality recording. The surviving animals were euthanized by decapitation and then the blood collection for hematological and biochemical analyses was carried out. The animals that died during the 14 days had their lungs, liver and kidneys collected for histological analyses. The lethal dose 50 (LD50) was calculated by linear regression analysis.

2.4.1 Hematological and Biochemical analysis

Hematological analysis were performed using an automatic hematological analyzer (Cell Dyn® 1700). The parameters included: red blood cells (RBC) count, white blood cells (WBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MHC), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelets count. The differential leucocyte counting was performed with an optical microscopy after staining and, in each case, 100 cells were counted. Biochemical analysis were made in an automatic biochemical analyzer. The blood was centrifuged at 1500 rpm for 10 min to obtain the serum. The following parameters were analyzed: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea, creatinine, sodium, potassium and total protein.

2.4.2 Histological examination of the tissues

Liver, kidney and lungs were carefully dissected out. Small slices of these freshly harvested tissues were fixed in buffered formaldehyde solution (10%), dehydrated by serial ethanol solution, diaphazined with ethanol-benzene and enclosed with paraffin. Micrometer sections, cut by a microtome (Leitz 1512) were stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined under a light microscope.

2.5 *In vivo* antiinflammatory and antinociceptive activity assays

2.5.1 Pleurisy

Female Wistar rats (180-220 g) were used. Animals were treated with lavender essential oil (lavender group – 0,6 mg/kg p.o.), with saline (carrageenan group) or dexamethasone (dexamethasone group – 0,5 mg/kg s.c.) 1h prior to the induction of pleurisy. Dexamethasone, a steroidal antiinflammatory, was used as a reference drug. Pleurisy was induced by the intrapleural injection of 200 µl of a 1% (w/v) carrageenan solution, according to the method described previously by Ialenti et. al. (2000) and Pinheiro & Calixto (2002). A control group was treated with saline p.o. and received an intrapleural injection of 200 µl of saline solution (saline group). Four hours after carrageenan/saline injection, the animals were euthanized and the pleural exudate was collected by pleural cavity lavage with 2 ml of saline solution (NaCl 0,9%) containing EDTA 1%. The samples of the pleural lavage were collected to determine exudation, total protein and nitric oxide levels, as well as the total and differential leucocyte counts. Exudate volumes were measured and the results were calculated by subtracting the volume injected into the pleural cavity (2 ml) from the total volume recovered. The total cell count in each sample was estimated after dilution with Türk solution (1:20), using a Neubauer cell counting chamber (Boeco, Germany). Cytospin preparations of the

samples were stained with May-Grunwald-Giemsa for the differential leucocyte count, which was performed under the immersion objective of a light microscope. After the cell count, samples of the pleural lavage obtained from control and treated animals were collected, separated and stored at -20°C. Nitric oxide levels were determined by the Griess reaction (Green et. al., 1982) and the protein concentration was measured by the Biuret technique (Gornal et. al., 1949), as previously described.

2.5.2 Ear edema

To estimate the topical antiinflammatory activity of lavender essential oil, the mouse ear edema model was used (n=6). Lavender essential oil was applied topically to the right ear (60 µl/ear) about 60 min before the croton oil treatment (lav to group). Briefly, 65 µl of acetone solution containing 2% croton oil was applied topically to the right ear of male mice (25-35 g). the left ear received an equal volume of acetone. To compare the topical antiinflammatory activity with oral antiinflammatory activity, a separate group was treated orally with the lavender essential oil (0,6 g/kg), p.o., diluted in DMSO (lav vo group). Another group was treated only with diluent (DMSO) and was used as control (DMSO group). Dexamethasone (dex group) was used as a reference drug (0,5 mg/kg s.c. – 60 min before). Six hours after the application of croton oil, the mice were euthanized and a plug (6 mm diameter) was removed from both treated (right) and untreated (left) ears. The edematous response was measured by the weight difference between the two plugs.

2.5.3 Measurement of antinociceptive activity

To assess the antinociceptive activity of lavender essential oil, the model of nociception induced by formalin was employed. In this test, a dilute (0,5-5%) formalin solution is injected into the paw of a rodent, and pain-related behaviors are observed.

Male wistar rats weighting 280-320 g were used in these experiments. The animals were divided into three groups and pre-treated with lavender, indomethacin or tramadol, 1 h before formalin injection and placed in individual cages (22,0 x 15,0 x 12,5 cm), which served as the observation chamber after the injection of formalin. To reduce the variability they were placed in an open Plexiglas® observation chamber for 30 min to allow them to get used to their surroundings, then they were removed for formalin administration. Nociceptive behavior was induced by injecting 50 µl 2% formalin subcutaneous (s.c.) into the surface of the right hind paw (a control group received an injection of 50 µl of saline). Animals were returned to the observation chamber and a mirror was placed behind the chamber to enable observation of the formalin injected paw. Rats were observed for nociceptive behavior immediately after formalin injection every 5 minutes until 60 minutes after injection. Nociceptive flinching behavior was quantified as the number of flinches of the injected paw during the observation period. Phase I was defined as the first 10 minutes and the second phase was considered the remaining time. At the end of the experiments, the rat was euthanized in a CO₂ chamber.

The antinociceptive effects produced by lavender essential oil (0,6 g/kg p.o. 1 h prior) were compared to the opioid-like analgesic tramadol (30 mg/kg, p.o., 1 h prior), and with a non-steroidal antiinflammatory non-selective COX inhibitor (indomethacin 5 mg, p.o., 1 h prior). The dose of reference drugs was chosen using data reported on literature by García-Hernandez et. al. (2007) and Mohajer et. al. (2005), respectively.

2.6 Statistical analysis

The results were evaluated statistically using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 12.0 software. The Shapiro-Wilk test was used for analysis of the data distribution. After confirmation of normal data, differences were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Newman Keuls test *pos hoc*. In the formalin test, the differences were evaluated by ANOVA with repeated measures. The results were

expressed as the mean \pm standard of the mean (S.E.M.). All data was consistent with the necessary presuppositions for the tests completion.

3 RESULTS

3.1 GC and GC/MS Analysis

The essential oil of *Lavandula angustifolia* showed a diverse composition with 28 constituents, comprising approximately 82% of the total oil composition, reported in Table I. The components found are in agreement with the British Pharmacopeia and as reported in the literature, the oil is predominated by linalool (32,52%) and linalyl acetate (21,57%), demonstrating the authenticity of the sample.

3.2 DPPH-Radical-Scavenging Activity

Figure 1 shows the absorbance reduction when DPPH solution was tested against various concentrations of lavender essential oil. The greatest inhibitory activity was observed at the concentration of 100 mg/ml. No significant differences were found between 150, 120 and 100 mg/ml. For calculating the IC₅₀, the maximum concentration used was 100 mg/ml. The concentration of lavender essential oil resulting in a 50% inhibition of the free radical (IC₅₀) was 51,05 mg/ml. This value was calculated using geometric means.

3.3 Acute toxicity study

The acute treatment with lavender essential oil by oral route at doses up to 1,5 g/kg did not produce any sign of toxicity or death in rats during 14 days of observation. There were no changes in the behavior of animals treated with doses of 0,6 g/kg and 1,5 g/kg. In higher doses (3,0 g/kg and 5,0 g/kg) the main signs of toxicity were: atypical locomotion, anorexia, ataxia, piloerection, hypo activity and respiratory depression. The letal dose 50 was calculated in 3,55 g/kg (Figure 2). The hematological and biochemical profile of control and treated groups are present in Table II. The lavender essential oil administration did not induce changes in urea, creatinine, total protein, sodium and potassium. However, an increase of transaminases (ALT and AST) serum levels and a decrease of total leucocytes were observed in all treated animals, with the exception of the dose of 0,6 mg/kg.

3.3.1 Histological Analysis

Histological features of control rats showed normal structures. In the kidneys and liver, the product studied did not cause histological changes. However, the animals treated with the higher doses (3,0 g/kg and 5,0 g/kg) showed marked inflammatory infiltration process in the lungs. The essential oil caused enlargement of lobules, due to inflammatory process, and erosion of bronchiolar mucosa, associated with inflammatory process (Figure 3).

3.4 Pleurisy

The results depicted in Figure 4 demonstrate that edematogenic response evoked by intra-pleural injection of carrageenan in rats was significantly reduced by the pre-treatment of animals with lavender essential oil (0,6 g/kg, p.o., 1 h prior to the induction of pleurisy). The essential oil caused a marked reduction of volume and total protein concentration in the collected exudate. There was also a reduction of the total cell counting and number of polymorphonuclear leucocytes that migrated into the pleural cavity. Dexamethasone, the drug used as reference, produced similar effects, but it has been significantly more effective than the essential oil. However, only the lavender essential oil significantly reduced the concentration of nitric oxide in the exudate.

3.5 Ear edema

The oral administration of lavender essential oil (0,6 g/kg) or the topical application (80 µl/ear), 60 min before croton oil, inhibited the development of ear edema. The inhibitory effect of the oil was similar to the inhibition caused by dexamethasone (Figure 5).

3.6 Formalin test

Formalin injection produced a typical pattern of flinching behavior. Two phases of spontaneous licking behavior were observed after the formalin injection. The first phase started immediately after administration of formalin and then diminished gradually in about 10 min. The second phase started about 15 min and lasted until 60 min.

We demonstrated that, when give prior to the 2% formalin injection, lavender essential oil consistently inhibited the spontaneous nociception and presented a similar effect to tramadol. The administration of lavender essential oil (Figure 6A) or tramadol (Figure 6B) significantly reduced the number of flinches in the first phase. In contrast, the administration of indomethacin was not able to reduce the flinching behavior in this stage (Figure 6C). in the second phase, all treatments inhibited the nociceptive behavior, but only indomethacin was effective throughout are the observation period.

4 DISCUSSION

Plants are known to be a rich source of naturally occurring antinociceptive substances and there is compelling evidence showing that many plants or its active principles used in traditional medicine might be useful for the treatment of inflammatory conditions (Fernandes et. al, 2007; Mohajer et. al, 2005).

Pathogenesis and symptoms of inflammatory process are accompanied and/or initiated by the production of free radicals, reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS). The imbalance between the production of ROS/RNS and removal by antioxidant defense systems is called oxidative stress (Dröge, 2002). Oxidative stress is an important factor in the development of many diseases (Valentova et. al, 2003). High concentrations of ROS are involved in the activation of transcription factor NF- κ B promoting the maintenance of chronic inflammatory processes (Hwang & Kim, 2007).

Many compounds of plant origin have potent antioxidant activities, thus in the present study a *screening* of anti-oxidant activity was performed before performing *in vivo* tests. The free radical scavenging capacity of the lavender essential oil was determined using the stable radical, DPPH. As expected, the lavender essential oil presented antioxidant activity and this ability was dose-dependent (Figure 1).

Despite the potential pharmacological activities attributed to lavender essential oil, there is insufficient data about its toxicity. We performed a study of acute toxicity that showed that lavender essential oil has some toxic effects in doses up to 1,5 g/kg, though the dose 0,6 g/kg appears to be well tolerated orally. Histopathological examination revealed some alterations in organs of animals treated with high doses (3,0 g/kg and 5,0 g/kg). In the kidneys and liver, the product studied did not cause histological changes. In the lungs, an erosion of bronchiolar mucosa, associated with inflammatory infiltration; these data is consistent with clinical signs of toxicity observed before death (hyperventilation followed by respiratory depression) (Figure 3). However, considering that such changes were found only in animals treated with high experimental doses, this

data can be understood as a result of an overload of the evaluated product. The treatment with lavender essential oil caused a decrease in the total leucocytes and increase in transaminases (AST and ALT) at doses higher than 0,6 g/kg (Table II). The dose of 0,6 g/kg was considered safe and was used in further studies.

Carrageenan-induced pleurisy is a well characterized experimental model of inflammation that permits the quantification and correlation of both exudate and cellular migration. It has recently been shown that carrageenan activates the Toll-like receptor 4 (TLR4). TLR4 is an important receptor in the initiation of the inflammatory response in human cells (Aderem & Ulevitch, 2000). Identification of TLR4 as the receptor membrane that interacts with carrageenan strengthens the hypothesis that the effects of carrageenan are attributed to activation of NF- κ B (Bhattacharyya, 2008). Our results revealed that the treatment with lavender essential oil was effective in reducing the responses evoked by carrageenan. However, the drug used as reference, dexamethasone, was more effective to prevent these effects (Figure 4).

The antiinflammatory activity of lavender essential oil was further evaluated by the inhibition of croton oil-induced ear edema (Figure 5). The fact that carrageenan and croton oil have different inflammatory mechanisms, led us to suggest a possible mechanism of action for lavender essential oil. The croton oil is a highly irritating substance and stimulated an inflammatory response in the epidermis. Tetradecanoyl-phorbol acetate (TPA) is a phorbol ester derivative of croton oil (Pilot, 1979). TPA-induced inflammation is associated with alterations in cytokine production and increase production of certain prostaglandins and leukotrienes. These effects are thought to be mediate by protein kinase C (Wang et. al., 2001). Most protein kinases C (PKCs) are activated by diacylglycerol and high levels of intracellular calcium, both produced by activation of receptors coupled to protein G. Protein kinase C mediates a number of intracellular signal transduction pathways implicated in the pathogenesis of inflammation, including phospholipase A₂-dependent arachidonic acid release and eicosanoid production.

The antiinflammatory action of lavender essential oil in croton oil-induced ear edema model compared to the reference drug, dexamethasone, was greater than the effect observed in the model of pleurisy. This finding suggests that the mechanism involved in the antiinflammatory effect of lavender may be related to a receptor coupled to G protein and/or interference in the system of intracellular second messenger phospholipase C/inositol phosphate. In addition, these findings may indicate a possible inhibition of phospholipase A₂ or inactivation of PKC.

The inflammatory reaction leads to nociceptors activation. Acute pain results from harmful stimulation, is well located, and transient when tissue damage does not occur. Chronic pain is a phenomenon usually associated with tissue damage and inflammation (Andrade Filho, 2001). Acute and chronic pain can be relieved effectively by non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) that inhibit cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and, consequently, they are widely used (Hoogstraate et. al., 2003). The opioid analgesic drugs remain the most effective therapy available for the treatment of moderate to severe pain; however, the problems arising from unwanted side effects persist. The use of NSAIDs is limited by adverse events and the clinically most important are the upper gastrointestinal side effects (Griffin, 1998). The development of new management strategies affords clinicians additional options for pain management (Melnish, 2002).

The antinociceptive properties of lavender essential oil have been demonstrated by many authors (Barocelli et. al., 2004; Hajhashemi et. al., 2003). In this study, we evaluated the antinociceptive effect of lavender essential oil using the model of pain induced by formalin. There is a correlation between nociceptive and inflammatory effects in this model. This relationship is dependent on the concentration of formalin, which produce significant plasma extravasation, are suitable for demonstrating the antinociceptive effects of antiinflammatory agents (Yashpal and Coderre, 1998). In a pilot test in our laboratory, we found that this concentration would be 2%, since the antinociceptive effects of indomethacin parallel their antiinflammatory action were observed throughout the second phase (Figure 6C).

In this work, we demonstrated that, in addition to antiinflammatory activity, the oral treatment with lavender essential oil produces significant antinociception (Figure 6A). Barocelli et. al. (2004) showed that lavender analgesic mechanism could be related to opioidergic neurotransmission, since naloxone pretreatment prevented its analgesic action.

Traditionally, the first phase of formalin model has been viewed as being due to an acute activation of nociceptors. In most cases, the stimulation of nociceptive receptors in the periphery is of chemical origin (Hunnskaar, S., Hole, K., 1997; Yashpal, K., Coderre, T.J., 1998). We hypothesize that since formalin is an acid substance, it causes a change in the chemical environment of afferent nociceptors. In the first phase, the low pH activates channels, resulting in depolarization and excitation of the cells and generating the nociceptive behavior observed. In the second phase, the painful sensation provokes the release of inflammatory mediators. These mediators cause a painful response (Roslan, J.K., 1990).

In the first phase, lavender essential oil as well as tramadol presented antinociceptive effects. Indeed, indomethacin, a non-selective COX inhibitor, was able to inhibit the antinociceptive behavior only in the second phase. This data support a relevant role for cyclooxygenases in this model. With rationale one would think that, if lavender treatment cause a similar behavior to tramadol and different from indomethacin, then maybe the action mechanism of lavender is not involved with inactivation of COX. However, in this study we found evidence that the mechanism of action is likely to opioidergic neurotransmission.

The opioid receptors belong to the family of receptors coupled to G protein and inhibit adenylate cyclase, reducing the content of intracellular AMPc. These receptors also exert effects on ion channels (Waldhoer et. al., 2004). As the animals treated with lavender oil exhibited behavior similar to those treated with tramadol, a weak agonist of opioid receptors, we think that lavender essential oil has similar action mechanism.

4.1 Conclusions

In conclusion, the results of this study reveal the remarkable analgesic and antiinflammatory activities of the lavender essential oil. The fact that lavender essential oil presented similar effect to tramadol and have been able to inhibit the action of croton oil (a PKC activator), are strong evidence that the mechanism action is related to the activation of channels via protein G. Furthermore, the effectiveness of the oil without evidence of significant toxic effects supported the interest for potential application of lavender essential oil in aromatherapy and demonstrated its important therapeutic potential. We also conclude that further studies should be done to evaluate and characterize the receptors involved in antinociceptive and antiinflammatory effects.

Figure 1:

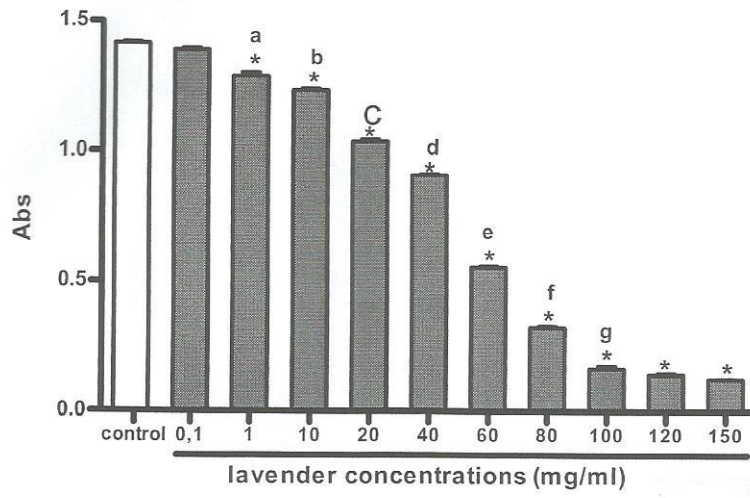


Figure 2:

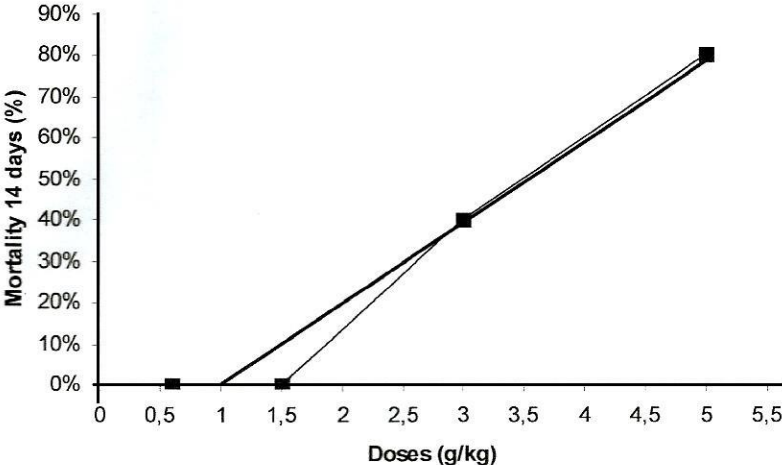


Figure 3

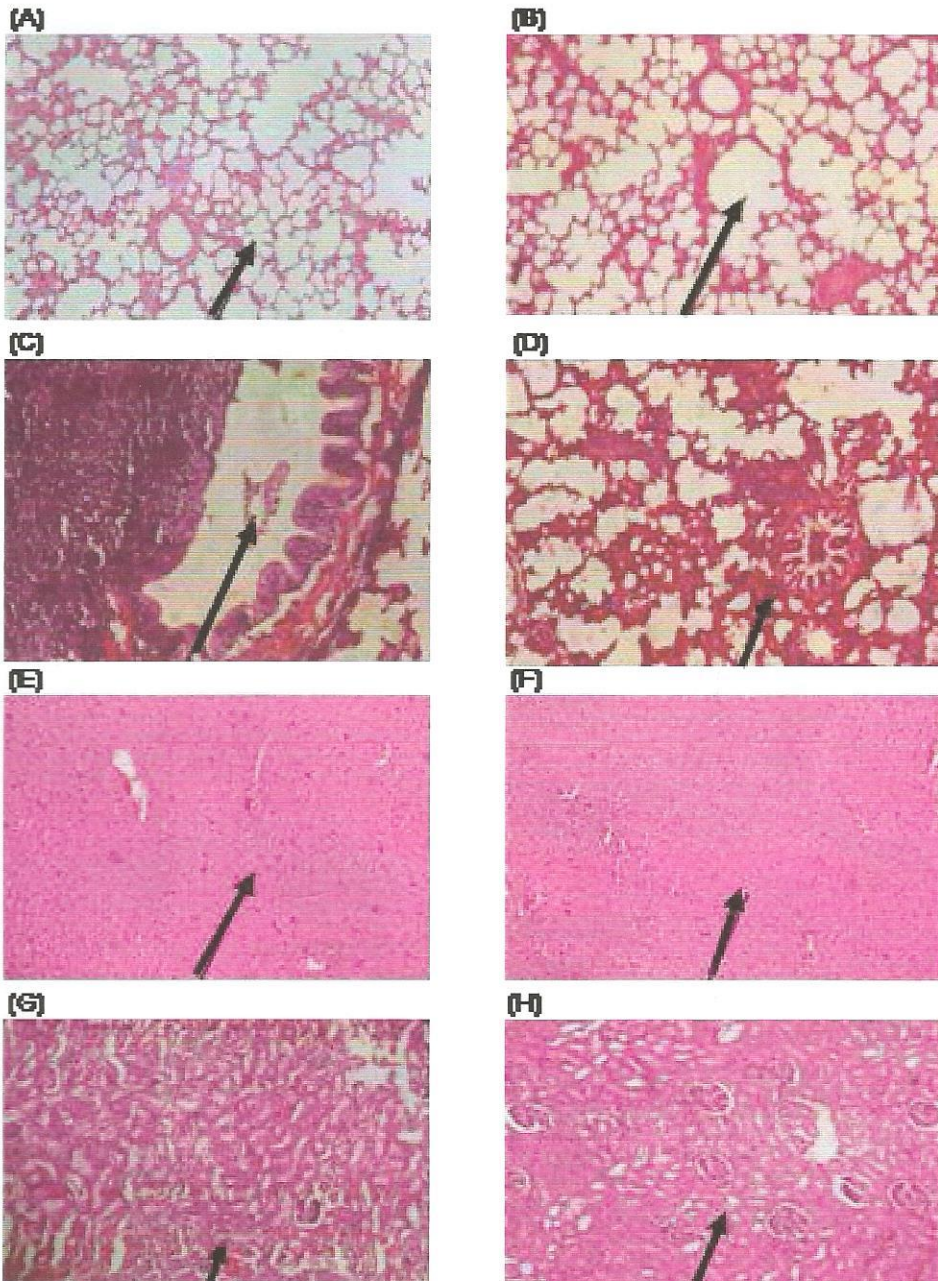


Figure 4

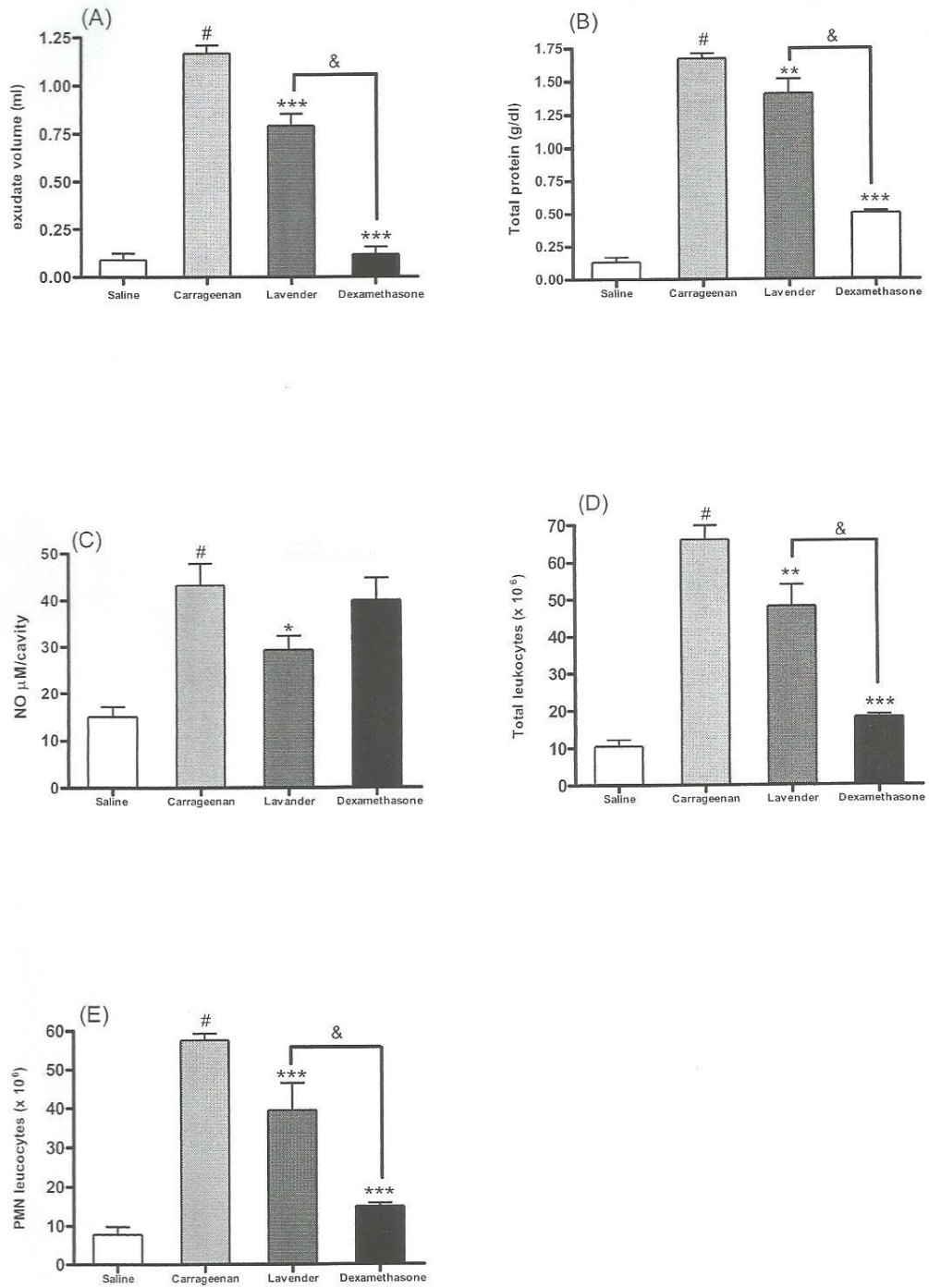


Figure 5:

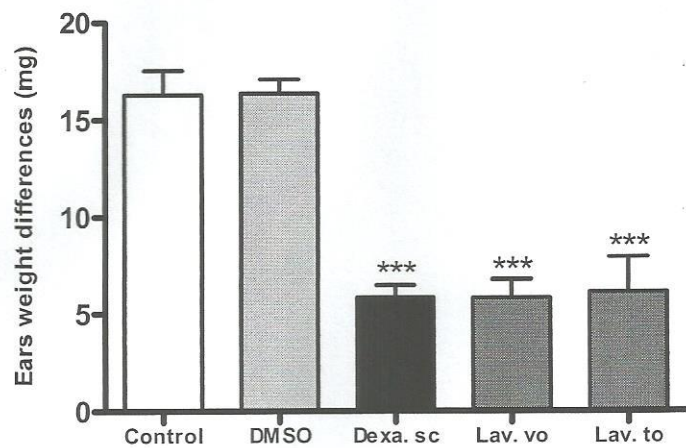


Table I. The percentage composition of the total oil from *Lavandula angustifolia*:

| Retention time (min) | Compound | Percentage (%) |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 7.012 | α -phellandrene | 0,05 |
| 7.370 | α -pipene | 2,45 |
| 8.029 | camphene | 0,381 |
| 9.523 | β -pipene | 0,720 |
| 11.075 | α -phellandrene | 0,116 |
| 11.397 | α -pipene | 0,046 |
| 11.800 | (+)-4-carene | 0,725 |
| 12.693 | D-limolene | 6,477 |
| 12.727 | Eucalyptol | 1,816 |
| 13.191 | 4-carene | 0,655 |
| 14.253 | 3-carene | 0,367 |
| 14.722 | β -cis-terpineol | 0,036 |
| 17.423 | linalyl acetate | 21,57 |
| 17.702 | octen-1-ol acetate | 0,170 |
| 19.225 | camphora | 3,934 |
| 20.323 | borneol | 1,763 |
| 21.817 | α -terpineol | 4,301 |
| 22.153 | cyclohexanol | 1,195 |
| 24.204 | camphene | 0,277 |
| 25.822 | linalool | 32,52 |
| 31.240 | α -bourbonene | 0,069 |
| 32.316 | α -bisabolene | 0,112 |
| 32.704 | α -cedreno | 0,041 |
| 32.880 | caryophyllene | 1,593 |
| 34.366 | α -cariophyllene | 0,101 |
| 36.358 | naphthalene | 0,071 |
| 36.885 | cis- α -bisabolene | 0,171 |
| 44.280 | α -bisabolol | 0,346 |

Table II. Effects of the *Lavandula angustifolia* essential oil (0,6 – 5,0 g/kg) administered orally on serum and hematological parameters in female Wistar rats:

| Parameters | Control | 0,6 g/kg | 1,5 g/kg | 3,0 g/kg | 5,0 g/kg |
|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Na+ | 146,8 ± 8,1 | 146,5 ± 12,8 | 142,4 ± 3,7 | 141,0 ± 2,8 | 142,0 ± 1,4 |
| K+ | 6,3 ± 1,3 | 5,53 ± 0,5 | 6,34 ± 0,8 | 6,0 ± 0,1 | 5,75 ± 0,1 |
| AST | 114,2 ± 17,5 | 117,0 ± 15,9 | 225,4 ± 63,2* | 195,5 ± 62,4 * | 223,5 ± 34,6* |
| ALT | 60,65 ± 9,9 | 68,4 ± 12,5 | 134,2 ± 33,2* | 117,0 ± 32,5* | 101,5 ± 5,9* |
| Protein | 7,0 ± 0,2 | 6,8 ± 0,3 | 7,2 ± 0,7 | 8,1 ± 0,6 | 6,7 ± 0,2 |
| Creatinine | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | 0,9 ± 0,3 | 0,8 ± 0,1 |
| Urea | 56,8 ± 3,6 | 47,8 ± 5,6 | 49,8 ± 4,3 | 51,5 ± 9,2 | 48,0 ± 7,0 |
| Leucocytes | 6400 ± 916,5 | 6133 ± 736,4 | 3000 ± 400*** | 2200 ± 282*** | 2900 ± 141*** |

The results are expressed as the mean ± S.E.M. *P<0,05; ***P<0,001.

5 REFERENCES

Adams, R.P., 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, third ed., Allured Publ. Corp., Carol Stream, Illinois.

Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Review article: Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature*. 406, 782-787.

Almeida, R.N., Falcão, A.C.G.M., Diniz, R.S.T. et. al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*. 80, 72-76.

Andrade Filho, A.C.C., 2001. Dor: diagnóstico e tratamento, 1st ed. Roca Ltda, Rio de Janeiro.

Aquino, R., Morelli, S., Lauro, M.R. et. al., 2001. Phenolic constituents and antioxidante activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. *Journal of Natural Products*. 64, 1019-1023.

Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M. et. al., 2004. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sciences*. 76, 213-223.

Battacharryya, S., Gill, R., Chen, M.L. et. al., 2008. Toll-like receptor mediates induction of Bcl10-NFκB-IL-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 10550-10558.

British Pharmacopeia, 2003. The Stationery Office, London.

Derelanko, M.J., 2008. *The toxicologist's pocket handbook*. 2nd ed., Informa Healthcare, London.

Dröge, W., 2002. Free radicals in physiological control cell function. *Physiological Reviews*. 81, 47-95.

Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R. et. al., 2007. Antiinflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. 569, 228-236.

García-Hernandez, L., Déciga-Campos, M., Guevara-Lopez, U. et. al., 2007. Co-administration of rofecoxib and tramadol results in additive or sub-additive interaction during arthritic nociception in rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 87, 331-340.

Gören, A.C., Topçu, G., Bisel, G. et. al., 2002. The chemical constituents and biological activity of *Lavandula stoechas* ssp. *Zeitschrift Naturforschung C*. 57, 797-800.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M.J., 1949. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *Journal of Biological chemistry*. 177, 751-766.

Green, I.C., Wagner, D.A., Glowsky, J., Skkiper, P.L. et. al., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126, 131-138.

Griffin, M.R., 1998. Epidemiology of non-steroidal antiinflammatory drug-associated gastrointestinal injury. *American Journal of Medicine*. 104, 23S-29S.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Antiinflammatory properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 89, 67-71.

Hart, P.H., Brand, C., Carson, C.F. et. al., 2000. Terpin-4-ol, the main component of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*. 49, 619-626.

Hoogstraate, J., Andersson, L.I., Berge, O. et. al., 2003. COX-inhibiting nitric oxid donators (CINODs) – a new paradigm in the treatment of pain and inflammation. *Inflammopharmacology*. 11, 423-428.

Hunnskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 30, 103-114.

Hwang, E.S., Kim, G.H., 2007. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. 229, 1-10.

Ialenti, A., Ianaro, A., Maffia, P. et. al., 2000. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. *Inflammation Research*. 49, 411-417.

Kim, H., Cho, S., 1999. Lavender inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51, 861-781.

Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid Receptors. *Annual Review of Biochemistry*. 73, 953-990.

Mehlish, D.R., 2002. The efficacy of combination analgesic therapy in relieving dental pain. *Journal of American Dental Association*. 133, 861-871.

Mohajer, M., Sarjhail, P., Hajarolasvadi, N. et. al., 2005. Antiinflammatory and analgesic effects of *Phlomis lanceolate* Boiss. and Hojen. Extracts and examination of their components. *International Journal of Pharmacology*. 2, 50-54.

Peana, A.T., D'Aquila, F., Panin, F. et. al., 2002. Antiinflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 9, 721-726.

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

Pinheiro, R.M., Calizto, J.B., 2002. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxibe and rofecoxibe in a rat acute model of inflammation. *Inflammation Research*. 51, 603-610.

Pilot, H.C., 1979. Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. Annual Review of Medicine. 30, 25-39.

Rosland, J. K. et al., 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. 42, 235-242.

Valentova, K., Cvak, L., Muck A. et. al., 2003. Antioxidant ctivity of extracts from leaves of *Smallanthus sonchifolius*. European Journal of Nutrition. 42, 61-66.

Yashpal, K., Coderre, T.J., 1998. Influence of formalin concentration on the nociceptive effects of antiinflammatory drugs in the formalin test in rats: separate machanisms underlying the nociceptive effects of low and high concentrations. European Journal of Pain. 2, 63-68.

Figure legends

Figure 1. Absorbance reduction obtained in the bleaching of the free-radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH test). Significantly different when compared to control group *P<0,001. Significantly different when compared to 0,1 mg/ml concentration (a); significantly different when compared to 1 mg/ml concentration (b); significantly different when compared to 10 mg/ml concentration (c); significantly different when compared to 20 mg/ml concentration (d); significantly different when compared to 40 mg/ml concentration (e); significantly different when compared to 60 mg/ml concentration (f); significantly different when compared to 80 mg/ml concentration (g).

Figure 2. Mortality graph. Median lethal dose of essential oil administered orally to female Wistar rats. Linear regression of the dose response: $r=0,9635$, $y=0,1954x - 0,1933$. LD50= 3,55 g/kg.

Figure 3. (A and B) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained pulmonary parenchyma sections of control group. (C and D) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained pulmonary parenchyma sections of lavender treated group (x400). (E) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained liver sections of control group. (F) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained liver sections of lavender treated group. (G) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained kidneys sections of control group. (H) Photomicrographs of hematoxylin and eosin stained kidneys sections of lavender treated group.

Figure 4. Effect of pre-treatment with lavender essential oil (600 mg/kg, p.o.) and Dexamethasone (0,5 mg/kg s.c.) on pleurisy induced by carrageenan on exudation (A); total protein concentration on exudate (B); NO concentration/cavity (C); number of total leucocytes (D); PMN leucocytes (E). Each column represents the mean of 6-10 animals

and the vertical bars represent the S.E.M. Significantly different when compared to saline group #P>0,001 and carrageenan-treated group *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Figure 5. Comparison of topical and oral antiinflammatory effects of lavender essential oil in croton oil-induced ear edema. Control group (mice treated with topical acetone – vehicle); DMSO group (mice treated with DMSO v.o.); Lav vo group (mice treated with lavender essential oil 600 mg/kg p.o.); Dexamethasone sc group (mice treated with dexamethasone 0,5 mg/kg s.c.); Lav to group (mice treated with topical lavender – 80 µl/ear) ***P<0,001.

Figure 6. Dose- and time-response curves of flinches induced by injection of formalin 2% s.c. into the surface of the right hind paw. Effect of treatments on the nociceptive behavior. (A) Lavender essential oil 600 mg/ml, p.o., 1h prior. Values represent the mean ± S.E.M. *P<0,05 compared to the formalin group.

CAPÍTULO 3

3.1 Considerações finais

As plantas medicinais são utilizadas no mundo desde o princípio das civilizações. Muitos dos medicamentos clássicos na medicina foram descobertos a partir da ação conhecida de certas plantas e, posteriormente identificados, extraídos e, eventualmente, sintetizados. Atualmente, os produtos extraídos de plantas continuam a representar uma diversidade química única, a qual continua sendo uma importante fonte de investigação de novas drogas.

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas cuja função envolve sinais de comunicação química no reino vegetal e defesa química contra o reino animal. Desde muitos séculos atrás, os óleos essenciais são utilizados, ainda que hoje não se tenha completamente documentado o início exato. Até mesmo durante as grandes guerras, as propriedades medicinais de óleos essenciais foram exploradas. Como ocorreu em situações em que alguns médicos não tinham a disposição antibióticos e eram forçados a usar o que tinham em mãos.

A lavanda é uma das plantas aromáticas mais utilizadas no mundo. Sua ação farmacológica tem sido objeto de muitos estudos com o passar dos anos e diversas ações tem sido atribuídas ao seu óleo essencial. Neste estudo, foram demonstradas a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo de lavanda. A atividade anti-inflamatória foi comprovada em diferentes modelos animais, revelando o grande potencial deste produto para atuar como anti-inflamatório. A ação anti-inflamatória associada a uma notável ação antinociceptiva pode ser uma estratégia importante para o tratamento da dor de origem inflamatória.

Foi demonstrada ainda a atividade antioxidante do óleo essencial de lavanda. Sabendo que o desbalanço entre a produção de radicais livres e sua remoção pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo é um fator importante para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo processos inflamatórios crônicos, podemos concluir que os benefícios do tratamento com óleo essencial de lavanda podem

ser bastante significativos. Estas ações terapêuticas, associadas à baixa toxicidade, sustentam o interesse para o aprofundamento nos estudos com este produto de origem vegetal.

Cabe salientar que mais estudos deveriam ser feitos na tentativa de desvendar qual ou quais os componentes responsáveis por estas ações e determinar de maneira mais clara o verdadeiro mecanismo de ação destas substâncias, o que permitiria uma indicação clínica correta. Entretanto, este é um trabalho de investigação difícil dada a enorme variedade de compostos químicos em diferentes concentrações encontrados no produto. Além disso, muitos autores acreditam que os efeitos terapêuticos dos óleos essenciais podem resultar de uma ação sinérgica entre seus diferentes componentes.

Finalmente, pode-se concluir que os resultados obtidos neste estudo sustentam o uso do óleo essencial de lavanda na aromaterapia. Contudo, dada a dificuldade em isolar os componentes responsáveis pela ação farmacológica do óleo de lavanda e seu importante potencial terapêutico demonstrado, concluímos que seu uso como terapia adjuvante deve ser incentivado. Alguns estudos já demonstraram o efeito benéfico do tratamento com óleo essencial de lavanda por via inalatória em humanos, mostrando ação tranquilizante e analgésica. Entretanto, é importante ressaltar que o uso por via inalatória deve ser realizado com cautela, devido a toxicidade pulmonar demonstrada neste estudo. Além disso, seu uso como essência em produtos antiinflamatórios dermatológicos ou o desenvolvimento de fórmulas dermatológicas contendo óleo essencial de lavanda pode ser uma estratégia interessante para obtenção dos efeitos curativos do produto.

Capítulo 4

4.1 Referências

Abbas, A.K.; Litchman, A.H.; Pillai, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 563 p.

British Pharmacopeia. London: The Stationery Office, 2003. V. II p. 1103-1105.

Cassatela, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v.16, n. 1, p. 21-26, 1995.

Chandrassoma, P.; Taylor, C. **Patologia Básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil, 1993, p. 31-41.

Costa, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. V.1.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L.; **Patologia: bases patológicas das doenças**. São Paulo: Elsevier, 2005. 1525 p.

Craveiro, A.A.; Machado, M.L.L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 23, p. 54-64, 1986.

De La Cruz, M.G.F. **Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e da doença.** Cuiabá, Mato Grosso, 1997. (Dissertação de mestrado Saúde a Ambiente/UFMT).

Dröge, W. Free radicals in physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

Fillipin, L.I. et. al. Redox influence on the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. pt 1. 375 p.

Gaté L. et. al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 169-180, 1999.

Goldsby, R.A. et. al. **Kuby Immunology.** New York: W.H. Freeman, 2007. 574 p.

Gören, A.C. et. al. The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. **Journal of Biosciences**, v. 57, n. 9-10 p. 797-800, 2002.

Hudson, R. The value of lavender for rest and activity in the elderly patient. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 4, n. 1, p. 52-57, 1996.

Hwang, E.S., Kim, G.H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. **Toxicology**, v. 229, p. 1-10, 2007.

Kim, H.; Cho, S. Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 51, n. 9, p. 221-226, 1999.

Kim, H. et. al. Treatment with lavender aromatherapy in the post-anesthesia care unit reduces opioid requirements of morbidly obese patients undergoing laparoscopic adjustable gastric banding. ***Obesity Surgery***, v. 17, n. 1, p. 920-925, 2007.

Kubeczka, K.H. **Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002. 461 p.

McBride, J.M.; Kraemer, W.J. Free radicals, exercise and oxidants. ***Journal of Strength and Conditioning Research***, v. 13, p. 175-183, 1999.

PDR for Herbal Medicines. Montvale: Medical Economics, 2004. P. 285-287.

Peana, A.T. et. al. (-)-Linalol inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. ***Life Sciences***, v. 78, n. 7, p. 719-723, 2006.

Rang, H.P. et. al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. P. 271-272.

Reeves, G.; Todd, I. **Lectures notes of immunology**. Oxford: Blackwell Science, 2000.

Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. **Farmacognosia a Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

Sedwick, A.D.; Willoughby, D.A.; Inicition of inflammatory response and its prevention. In: I.L. Bonta; M.A. Bray; M.J. Parnham. **Handbook of inflammation**, New York: Elsevier, 1985.

Shigeru, A. et. al. Supression of neutrophil accumulation in mice by geranium essential oil. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 1, p. 21-24, 2004.

Shigeru, A. et. al. Supression of necrosis factor-alpha-tumoral-induced neutrophil adherence responses by essential oil. **Mediators of inflammation**, v. 12, n. 6, p. 323-328, 2003.

Siani, A.C. et. al. Óleos essencias: potencial antiinflamatório. **Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 16, pág. 38-43, 2000.

Simões, C.M.O. et. al. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O.; Spitzer, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003. 387 p.

Simões, C.M.O. et al. Introdução a análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O., Santos, R.I., Falkenberg, M.B. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2003. P. 230-287.

Souza, T.J.T. et. al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

Springer, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 827-872, 1995.

Stites, D.P.; Terr, A.I.; Parslow, T.G. **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 684 p.

Tedgui, A.; Mallat, Z.; Antiinflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, v. 88, n. 9, p. 877-887, 2000.

The Complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. Austin, Texas: American Botanical Council, 1998. P. 159-158.

Tomlinson, A. et. al. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenan-induced pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 1, p. 693-698, 1994.

Urso, M.L.; Clarkson, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

Valentova, K. et. al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **European Journal of Nutrition**. v. 42, p. 61-66, 2003.

Woolf, A. Essential oil poisoning. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**, v. 6, n. 37, p. 721-727, 1999.

Anexo A

DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

Submission Confirmation for your paper

De: **Journal of Ethnopharmacology** (jethnoph@chem.leidenuniv.nl)

Enviada: segunda-feira, 17 de agosto de 2009 4:26:39

Para: gabi-ls@hotmail.com

Dear Dr. da Silva,

Your submission entitled "Acute Toxicity and Therapeutic Actions of Lavender Essential Oil (Lavandula angustifolia Mill.)" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology