

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEA ROSA CHIOCA

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA
INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2013

LEA ROSA CHIOCA

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA
INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia,
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Chioca, Lea Rosa

Avaliação do mecanismo de ação do efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda em camundongos. / Lea Rosa Chioca – Curitiba, 2013.

92f.: il. ; 30cm.

Orientador: Roberto Andreatini

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Ansiedade 2. Camundongo 3. Farmacologia 4. Olfato I. Título II. Andreatini, Roberto III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA EM CAMUNDONGOS”, de autoria da pós-graduanda **LÉA ROSA CHIOCA FERRO**, sob orientação do Prof. Dr. Roberto Andreatini e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Roberto Andreatini (Presidente - Farmacologia - UFPR), Prof.^a Dr.^a Márcia Thaís Pochapski (Odontologia - UEPG), Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR) e Prof.^a Dr.^a Sâmia Regiane Lourenço Joca (FCFRP – USP), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 27 de março de 2013.

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.ª Dr.ª Márcia Thaís Pochapski (Odontologia - UEPG)

Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Farmacologia – UFPR)

Prof.ª Dr.ª Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR)

Prof.ª Dr.ª Sâmia Regiane Lourenço Joca (FCFRP – USP)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Andreatini, pela oportunidade de participar da realização desse lindo trabalho! Muito obrigada pela amigável orientação, pela ajuda, pelos ensinamentos, pelo suporte e confiança durante essa jornada. Por ser um exemplo de bom senso e ética profissional, muito obrigada!

Ao meu marido Marcelo Ferro, por todo amor e carinho. Pelo companheirismo e amizade, por sempre me dar força e incentivo! Obrigada por sempre me fazer sorrir! Amo você!

Aos meus pais, Luiz e Délia Chioca, pelo amor incondicional. Pelo incentivo e apoio em mais essa etapa da minha vida. Vocês formaram em mim a base firme que sustenta os pilares que estou construindo com o passar do tempo. Muito obrigada por serem exemplos admiráveis! Amo vocês!

A toda minha família, especialmente a Denize, Raimundo, Ana Paula e Natália; e a Lorena, Volmir, Rubens, Rodrigo e Marina, pela força, incentivo, apoio e amor. Amo vocês!

Às professoras Dra. Estela Losso, Dra. Irinéria Baretta, Dra. Juliana Chichorro e ao prof. Dr. Juliano Ferreira, pela colaboração e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores e professoras do departamento de Farmacologia, pelos ensinamentos.

À da Universidade Positivo e as professoras Dra. Thais Andrade Costa Casagrande e Dra. Maria Fernanda Torres pelos animais cedidos para realização desse trabalho.

Aos funcionários do departamento de farmacologia e do biotério UFPR, em especial a Sílvia Cordazzo, pela ajuda, carinho e amizade.

A todos os amigos e colegas de laboratório que me acompanharam nessa etapa, pela força, ajuda e compreensão. Muito obrigada pelo sorriso amigo, pelas conversas e risadas! A amizade de todos vocês foi muito importante para mim durante a realização desse trabalho.

À UEPG e ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, espaço cedido para realização de experimentos e pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao programa de apoio os planos de reestruturação e expansão das universidades federais (Reuni) pela bolsa concedida durante o período de realização desse trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O uso do óleo essencial de lavanda, com finalidade terapêutica, é uma prática milenar. Trabalhos tem demonstrado efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda em estudos clínicos e pré-clínicos. Porém, pouco se sabe a respeito da farmacologia do óleo essencial de lavanda, o que constitui um obstáculo à credibilidade do seu efeito sobre a ansiedade. Sendo assim, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica, serotoninérgica e nitrinérgica, assim como investigar a participação do sistema olfatório, no mecanismo de ação do efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo de lavanda em camundongos. Camundongos machos Swiss foram expostos a 15 minutos de inalação do óleo de lavanda em diferentes concentrações (1, 2,5 e 5%) e todas apresentaram efeito tipo ansiolítico no teste de esconder esferas, reduzindo o número de esferas escondidas. A concentração de 5% também foi avaliada no teste do labirinto em cruz elevado e aumentou a exploração dos braços abertos. Não foi observada alteração na locomoção dos animais tratados com o óleo de lavanda. Esses dados corroboram o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda. Na avaliação do envolvimento de neurotransmissores no mecanismo de ação do óleo de lavanda, observamos que o sistema GABAérgico parece não estar envolvido, pois o pré-tratamento com picrotoxina (antagonista GABA-A) não bloqueou o efeito do óleo essencial de lavanda. Além disso, o óleo essencial de lavanda não interferiu com a ligação do [³H]flunitrazepam no ensaio de binding do receptor benzodiazepínico GABA-A. Na investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico observamos que a inalação do óleo essencial de lavanda reduziu a síndrome serotoninérgica nos camundongos. Também constatamos que o pré-tratamento com pindolol (antagonista não seletivo do receptor 5-HT1A) e com WAY100635 (antagonista seletivo do receptor 5-HT1A) bloquearam o efeito tipo ansiolítico da lavanda no teste de esconder esferas, enquanto que o pré-tratamento com 8-OH-DPAT (agonista 5-HT1A) em uma dose inefetiva potencializou o efeito de uma concentração não efetiva da lavanda. Em relação à participação do sistema nitrinérgico, observamos que o pré-tratamento com L-arginina (precursor de NO) foi capaz de bloquear o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas, e que o pré-tratamento com 7-NI (inibidor da NO sintase neuronal), em uma dose inefetiva, potencializou o efeito de uma concentração não efetiva da lavanda. A avaliação da participação do sistema olfatório, pela percepção do aroma do óleo essencial de lavanda quando inalado, foi realizada pela indução de anosmia (perda do olfato) pela lavagem da cavidade nasal dos camundongos com uma solução de gluconato de zinco + acetato de zinco. Observou-se que a anosmia não prejudicou o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda em nenhuma das concentrações estudadas (2,5 e 5%). Em conjunto, estes resultados indicam a participação do sistema serotoninérgico, provavelmente através do receptor 5HT1A, e do sistema nitrinérgico no efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda em camundongos, sendo que a percepção do aroma do óleo essencial de lavanda, pelo sistema olfatório, parece não ser necessária para obtenção do seu efeito tipo ansiolítico.

Palavras-chaves: Lavanda. Ansiedade. Camundongos. Mecanismo farmacológico. Olfato. Teste de esconder esferas.

ABSTRACT

The use of lavender essential oil, for therapeutic purposes, is ancient. Clinic and pre-clinic studies have demonstrated the lavender essential oil anxiolytic-like effect. However, its pharmacological mechanisms is not completely known, which leads to a lack of credibility of the lavender oil effect on anxiety. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the participation of the GABAergic, serotonergic and nitrinergic neurotransmissions, as well the olfactory system activation, on the mechanism of the lavender essential oil anxiolytic-like effect. Male Swiss mice were submitted to 15 min of lavender oil inhalation at different concentrations (1, 2.5 and 5%) and all concentrations reduced the number of marbles buried. The 5% concentration was also tested on the elevated plus maze test and it increased the exploration of the open arms. Lavender oil inhalation did not alter the mice locomotor activity. These data corroborate the anxiolytic-like effect of lavender essential oil. About the neurotransmitters involved on the pharmacological mechanism of lavender oil, it was observed that the GABA-A/benzodiazepine neurotransmission seems not to be implicated, since the picrotoxin (GABA-A antagonist) pre-treatment did not modify the behavioral effect of lavender essential oil. Also, lavender essential oil did not alter [³H]-flunitrazepam binding to the benzodiazepine site on the GABA-A receptor. In the investigation of the serotonin system participation, we observed that lavender oil inhalation reduced the serotonin syndrome in mice. Also, we found that the pre-treatment with pindolol (a non-selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) and WAY100635 (a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) blocked the anxiolytic-like effect of lavender essential oil on the marble-burying test, while the combination of ineffective doses of 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist) and lavender essential oil reduced the number of marbles buried. About the participation of nitrinergic system, it was observed that the pre-treatment with L-arginine (precursor of NO production) prevented the anxiolytic-like effect of lavender essential oil. Furthermore, the treatment with a combination of behaviorally inactive doses of lavender essential oil and 7-Nitroindazole (a neuronal NO synthase inhibitor), exerted an anxiolytic-like effect. To investigate the participation of the lavender oil aroma perception on its effect, the anosmia condition (loss of sense of smell) was induced in the mice by irrigating their nasal cavity with a zinc gluconate plus zinc acetate solution. It was observed that the anosmia did not impair the anxiolytic-like effect of the lavender essential oil on the concentration evaluated (2.5 and 5%). Therefore, the aroma perception by the olfactory system does not seem to be needed to achieve the lavender essential oil anxiolytic-like effect. Thus, these results suggest the serotonin neurotransmission, probably through 5-HT_{1A} receptors, and the nitrinergic neurotransmission contributes to anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice.

Key-words: Lavender. Anxiety. Mice. Pharmacological mechanism. Olfaction. Marble-burying.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Lavandula angustifolia</i>	21
FIGURA 2 - Caixa de Inalação	32
FIGURA 3 - Teste de esconder esferas	33
FIGURA 4 - Labirinto em cruz elevado.....	34
FIGURA 5 - Caixa automatizada de movimentação espontânea	35
FIGURA 6 - Campo Aberto.....	35
FIGURA 7 - Esquema do experimento da Síndrome Serotoninérgica	36
FIGURA 8 - Diagramas modificados representando DMPAG e DRD	39
FIGURA 9 - Experimentos I e II	40
FIGURA 10 - Experimento III.....	40
FIGURA 11 - Experimentos VI e VII	41
FIGURA 12 - Experimento VIII	42
FIGURA 13 - Experimento IX	42
FIGURA 14 - Experimento X	43
FIGURA 15 - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas..	44
FIGURA 16 - Efeito do óleo essencial de lavanda sobre o comportamento de animais expostos ao labirinto em cruz elevado	45
FIGURA 17 - Efeito do pré-tratamento com Picrotoxina sobre o efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda ou diazepam no comportamento de esconder esferas	46
FIGURA 18 - Efeito do óleo essencial de lavanda e diazepam sobre o binding de [³ H]flunitrazepam em membrana de cérebro de ratos	47
FIGURA 19 - Efeito da inalação do óleo essencial de lavanda sobre a síndrome serotoninérgica induzida por 5-HTP+fluoxetina.....	48

FIGURA 20 - Efeito do pré-tratamento com Pindolol sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda ou 8-OH-DPAT no teste de esconder esferas.....	49
FIGURA 21 - Efeito do pré-tratamento com WAY 100635 sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda ou 8-OH-DPAT no teste de esconder esferas	50
FIGURA 22 - Efeito da coadministração de 8-OH-DPAT e óleo essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas.....	51
FIGURA 23 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.....	52
FIGURA 24 - Efeito da coadministração de 7-nitroindazol e óleo essencial de lavanda no comportamento de esconder esferas.....	53
FIGURA 25 - Fotos da histoquímica para NADPH-d.....	54
FIGURA 26 - Histoquímica para NADPH-d nas estruturas de núcleo dorsal da rafe e matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial.....	54
FIGURA 27 - Caixa para o teste de discriminação olfatória	60
FIGURA 28 - Campo aberto	60
FIGURA 29 - Desenho Experimental do Experimento 1 e Experimento 2	62
FIGURA 30 - Efeito da solução zinco sobre o teste de discriminação olfatória durante 26 dias.....	64
FIGURA 31 - Efeito da solução de zinco sobre o teste de discriminação olfatória 7 dias após o tratamento	65
FIGURA 32 - Efeito da irrigação nasal com a solução de zinco sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Avaliação da atividade locomotora na caixa de movimentação (Parte 1).....	55
TABELA 2	Avaliação da atividade locomotora no campo aberto (Parte 1).....	55
TABELA 3	Avaliação da atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto (Parte 2).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Água destilada
BZD	Benzodiazepínico
DZP	Diazepam
GABA	Ácido gama-amino butírico
GABA-A	Receptor do ácido gama-aminobutirico tipo A
L-arg	L-arginina
MCP	Matéria cinzenta periaquedutal
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NO	Óxido nítrico
OEL	Óleo essencial de lavanda
PTX	Picrotoxina
SNC	Sistema nervoso central
WAY100635	maleato de N-{2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-N-2-piridinilcicloexanocarboxamida
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
7-NI	7-nitroindazol
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ANSIEDADE.....	17
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
1.3 ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.....	20
1.4 ESTUDOS SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO DE LAVANDA ..	21
1.4.1 Estudos pré-clínicos	21
1.4.2 Estudos clínicos	22
1.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.....	24
1.5.1 Neurotransmissores	24
1.5.2 Sistema Olfatório.....	26
1.6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	27
PARTE 1 - Avaliação do envolvimento das vias GABAérgica, Serotoninérgica e Nitrinérgica no mecanismo de ação do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda	
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E METODOS	31
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 DROGAS E TRATAMENTOS	31
3.2.1 INALAÇÃO	32
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	33
3.3.1 Teste de Esconder Esferas	33
3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado	33

3.3.3 Atividade locomotora	34
3.3.3.1 Caixa de movimentação	34
3.3.3.2 Campo Aberto	35
3.3.4 Síndrome Serotoninérgica	36
3.4 BINDING DO RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO GABA-A.....	37
3.5 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE	38
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL	39
3.7 ESTATÍSTICA	43
4 RESULTADOS	44
4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA NOS TESTES COMPORTAMENTAIS: ESCONDER ESFERAS, LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E CAMPO ABERTO	44
4.1.1 Experimento I: Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de lavanda (OEL) no teste de esconder esferas.....	44
4.1.2 Experimento II: Efeito do óleo essencial de lavanda 5% no labirinto em cruz elevado.	45
4.2 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA.....	45
4.2.1 Experimento III: Influência do pré-tratamento com picrotoxina (0,5 mg/kg) no efeito do óleo de essencial de (5%) lavanda e do diazepam (1mg/kg) sobre o comportamento de esconder esferas.....	45
4.2.2 Experimento IV: Efeito do óleo essencial de lavanda (1 a 100 µg/ml) no binding de [³ H]flunitrazepam em membranas de cérebros de ratos “in vitro”	47
4.3 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA	47
4.3.1 Experimento V: Efeito do óleo essencial de lavanda (5%) sobre a síndrome serotoninérgica induzida por fluoxetina e 5-HTP.	47

4.3.2 Experimento VI: Influência do pré-tratamento com pindolol no efeito do óleo de essencial de lavanda e do 8-OH-DPAT sobre o comportamento de esconder esferas	49
4.3.3 Experimento VII: Influência do pré-tratamento com WAY 100635 no efeito do óleo de essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas ...	49
4.3.4 Experimento VIII: Efeito da coadministração de uma dose inefetiva de 8-OH-DPAT e óleo essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas.	50
4.4 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO NITRINÉRGICA.....	52
4.4.1 Experimento IX: Efeito da pré-administração de L-arginina no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.	52
4.4.2 Experimento X: Efeito da administração conjunta de uma dose inefetiva de 7-NI e inalação de uma concentração inefetiva do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.	53
4.5 HISTOQUÍMICA PARA NADPH DIAFORASE (Experimento XI)	53
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	55
4.6.1 Experimento XIIa: Caixa de movimentação.....	55
4.6.2 Experimento XIIb: Campo aberto	55
PARTE 2 - Avaliação da participação do sistema olfatório para obtenção do efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda	
2 OBJETIVOS.....	57
2.1 OBJETIVO GERAL	57
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
3 MATERIAIS E METODOS	58
3.1 ANIMAIS.....	58
3.2 DROGAS E TRATAMENTOS	58
3.2.1 Administração Intranasal da solução de Zinco	58

3.2.2 Inalação do óleo essencial de lavanda.....	59
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	59
3.3.1 Discriminação olfatória	59
3.3.2 Campo Aberto	60
3.3.3 Teste de esconder esferas	61
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	61
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4 RESULTADOS.....	64
4.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA IRRIGAÇÃO INTRANASAL COM A SOLUÇÃO DE ZINCO SOBRE A DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA DURANTE 26 DIAS.....	64
4.2 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA ANOSMIA SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA.....	65
4.2.1 Teste de Discriminação olfatória 7 dias após o tratamento com a solução de zinco.....	65
4.2.2 Avaliação da atividade locomotora no campo aberto dos animais tratados com a solução de Zinco	65
4.2.3 Teste de Esconder Esferas	66
4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA SOBRE O COMPORTAMENTO LOCOMOTOR NO CAMPO ABERTO	66
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE

A ansiedade é uma resposta normal, que pode ser observada em situações de perigo real ou imaginário. Porém, quando essa resposta de ansiedade interfere com o cotidiano, por se tornar uma ansiedade persistente, excessiva ou desproporcional, pode-se estar sendo observado um transtorno de ansiedade (CRYAN e SWEENEY, 2011).

O estudo da neurobiologia da ansiedade tem englobado a avaliação dos sistemas neuroanatômico, neuroendócrino e dos neurotransmissores. Alterações nesses sistemas podem decorrer por vários motivos, entre eles estão as experiências vividas, o meio ambiente e a predisposição genética (BARIK et al., 2013; MARTIN *et al.*, 2010; OLER *et al.*, 2010). Dentre as estruturas encefálicas mais relacionadas ao estudo da ansiedade estão o córtex pré-frontal, os núcleos da rafe e as pertencentes ao sistema límbico, como o hipocampo, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal (GRAEFF e ZANGROSSI, 2010; SOKOLOWSKI e CORBIN, 2012). Os neurotransmissores são os principais responsáveis pela comunicação entre as regiões do sistema nervoso central, e alterações nesse sistema de sinalização têm sido relacionadas aos transtornos de ansiedade. Os sistemas de transdução neuronal (neurotransmissores e seus receptores) mais estudados em relação à ansiedade são o GABAérgico, o glutamatérgico e o monoaminérgico, o último representando o grupo dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (BARIK et al., 2013; MARTIN *et al.*, 2010; MOSIENKO, 2012; MÖHLER, 2012). Além dos neurotransmissores clássicos, outras substâncias que participam da sinalização neuronal também têm sido estudadas em relação à ansiedade, como os neuropeptídeos (ex.: fator liberador de corticotropina, neuropeptídeo Y) e o óxido nítrico (MAGALHAES *et al.*, 2010; VOLKE *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2010).

O transtorno de ansiedade generalizada está entre os transtornos de ansiedade mais comumente observados e atinge uma parcela significativa da população. O transtorno de ansiedade generalizada pode ser debilitante, comprometendo a vida pessoal e profissional dos pacientes, além de aumentar o risco para o surgimento de comorbidades, como exemplo, transtornos de humor, uso

abusivo de substâncias, alterações gastrointestinais, alterações cardiovasculares, dor crônica e enxaqueca. Mesmo existindo opções eficazes de tratamento farmacológico, acredita-se que muitos pacientes com transtorno de ansiedade não recebam o tratamento adequado (ANDREATINI *et al.*, 2001; CRYAN e SWEENEY, 2011; KOEN e STEIN, 2011).

Os medicamentos usualmente indicados para os pacientes com transtornos de ansiedade são os benzodiazepínicos, os quais atuam como moduladores alostéricos positivos no sítio benzodiazepínico do receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA-A) causando aumento da neurotransmissão inibitória; antidepressivos, principalmente os inibidores da recaptação de serotonina (5-HT) e buspirona, um agonista do receptor de serotonina 5-HT_{1A} (KOEN e STEIN, 2011; RAVINDRAN e STEIN, 2010; RUDOLPH e KNOFLACH, 2011).

Embora efetivos, os efeitos colaterais destes medicamentos muitas vezes dificultam a adesão do paciente ao tratamento (ANDREATINI *et al.*, 2001; RAVINDRAN e STEIN, 2010; KOEN e STEIN, 2011).

No caso dos benzodiazepínicos, os principais efeitos colaterais são sedação, amnésia, abuso, dependência, síndrome de abstinência e interações com depressores do sistema nervoso central (SNC) (ANDREATINI *et al.*, 2001; RAVINDRAN e STEIN, 2010; KOEN e STEIN, 2011).

Dentre os antidepressivos, a principal classe indicada é a dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que embora seja conhecida por causar menos efeitos colaterais quando comparado a outras classes de antidepressivos, como os inibidores da monoamina oxidase e os tricíclicos, apresenta alta taxa de abandono do tratamento, que pode ser decorrente da demora em iniciar sua ação terapêutica e o fato de poder causar disfunção sexual e alteração de peso (ANDREATINI *et al.*, 2001; RAVINDRAN e STEIN, 2010; KOEN e STEIN, 2011).

Além disso, esses medicamentos citados não apresentam eficácia na totalidade de pacientes submetidos ao tratamento. Sendo assim, alguns pacientes acabam sendo tratados com outros fármacos, como por exemplo, a buspirona que apresenta baixa satisfação dos pacientes, ou os antipsicóticos, que podem causar parkinsonismo, dentre outros efeitos colaterais (ANDREATINI *et al.*, 2001; RAVINDRAN e STEIN, 2010; KOEN e STEIN, 2011).

Recentemente foi introduzido na prática clínica a pregabalina, que apresentou resultados positivos no transtorno de ansiedade generalizada

(BOSCHEN, 2011). A pregabalina liga-se à subunidade alfa2-delta dos canais de cálcio voltagem dependentes, reduzindo a entrada de cálcio e conseqüente liberação de neurotransmissor (LOTARSKI *et al.*, 2011). Entretanto, 20 a 30% dos pacientes tratados com pregabalina apresentam sedação e tontura, podendo ainda acarretar alterações cognitivas (BOSCHEN, 2011).

Logo, a pesquisa de novos fármacos para o tratamento da ansiedade, que apresentem menos efeitos colaterais e maior adesão por parte dos pacientes é de importante relevância.

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Produtos considerados naturais e a medicina alternativa têm apresentado crescente aceitação pela população em geral (ERNST, 2006; SARRIS *et al.*, 2011). Segundo revisão de Faustino *et al.* (2010), nos Estados Unidos da América, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos pela população varia de 16,5 a 42,0%, sendo que 5,5 a 20,5% o fazem para condições relacionadas à ansiedade.

Nesse contexto, o interesse pelo estudo das propriedades terapêuticas do óleo essencial de lavanda tem sido renovado (GEDNEY *et al.*, 2004; WORONUK *et al.*, 2011).

O início do uso de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas se perde no tempo. Existem relatos do seu uso por egípcios no processo de embalsamar os mortos, e por romanos em banhos termais (HERZ, 2009).

Dentre uma variedade de usos populares, os óleos essenciais de plantas aromáticas são usados por apresentar influencia sobre o humor, comportamento e bem estar (HERZ, 2009; WORONUK *et al.*, 2010; DIEGO *et al.*, 1998; TSANG e HO, 2010). Essa prática é chamada de aromaterapia, a qual inclui o uso de óleos essenciais por inalação, ingestão ou aplicação dérmica (GEDNEY *et al.*, 2004; WORONUK *et al.*, 2011).

Em particular, o óleo essencial de lavanda tem demonstrado resultados positivos na redução da ansiedade em estudos clínicos e pré-clínicos (BRADLEY *et al.*, 2007; LINCK *et al.*, 2009, 2010; LEHRNER *et al.*, 2005; KRITSIDIMA *et al.*, 2010, TSANG e HO, 2010).

1.3 ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA

As lavandas são plantas do gênero *Lavandula* que pertencem à família Lamiaceae (Labiatae). Dentre as espécies mais conhecidas de *Lavandula* estão a *L. angustifolia* (também conhecida por *L. officinalis*), *L. latifolia*, *L. stoechas*, *L. dentata*, e existe também a comercialização de formas híbridas. No Brasil, a lavanda pode ser referida como alfazema (CUNHA *et al.*, 2003; LORENZINI e MATOS, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2011; WORONUK *et al.*, 2011).

A composição do óleo essencial de lavanda é uma mistura complexa de diferentes componentes, dentre eles, álcoois, ésteres, óxidos e cetonas mono e sesquiterpenoides. Os compostos principais do óleo essencial de lavanda são os monoterpenoides linalol, acetato de linalil, cineol, terpineno e canfora (CUNHA *et al.*, 2003; WORONUK *et al.*, 2011).

A proporção dos compostos terpenoides no óleo de lavanda varia de acordo com a espécie de lavanda utilizada. Diferenças também podem ser observadas em uma mesma espécie, devido a influências do meio ambiente como temperatura, composição do solo, exposição ao sol e umidade durante o crescimento da planta (WORONUK *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais de lavanda mais comercializados são obtidos das espécies *L. angustifolia* e *L. latifolia*. A *Lavandula angustifolia* (Figura 1) é a mais usada em produtos aromáticos e cosméticos, e também é a espécie de lavanda mais usada em trabalhos que estudam o efeito ansiolítico da lavanda (TSANG e HO, 2010, WORONUK *et al.*, 2011). Acredita-se que isso seja devido à composição dessa espécie, que apresenta alta concentração de linalol e acetato de linalil e baixa concentração de canfora (TAKAHASHI *et al.*, 2011; WORONUK *et al.*, 2011).

Linalol é o composto que tem se mostrado mais relacionado com o efeito ansiolítico da lavanda (LINCK *et al.*, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2011; TSANG e HO, 2010; UMEZU *et al.*, 2006; WORONUK *et al.*, 2011).

O conhecimento popular relata que o óleo essencial de lavanda pode reduzir a ansiedade e isso tem sido comprovado em estudos pré-clínicos e clínicos (PERRY *et al.*, 2012; TSANG e HO, 2010).



FIGURA 1 - *Lavandula angustifolia*

FONTES:

Esquerda: Lorenzine e Matos. Plantas medicinais no Brasil, 2008, pg. 304

Direira: Cunha, Silva e Roque. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia, 2003, pg. 99

1.4 ESTUDOS SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO DE LAVANDA

1.4.1 Estudos pré-clínicos

Os estudos pré-clínicos tem mostrado o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial da lavanda através do uso de modelos animais de ansiedade (TSANG e HO, 2010). Esse efeito ansiolítico foi observado em ratos submetidos ao teste de campo aberto (SHAW *et al.*, 2007 e 2011), em esquilos da Mongólia (BRADLEY *et al.*, 2007) e em camundongos (TAKAHASHI *et al.*, 2011) expostos ao labirinto em cruz elevado, e também ao teste de Geller-Seifter e de Vogel (UMEZU *et al.*, 2006).

Estudos realizados com compostos isolados também apresentaram resultados positivos em testes de ansiedade com camundongos. A inalação do linalol, um dos principais componentes do óleo essencial de lavanda, mostrou efeito ansiolítico nos testes de conflito de Vogel e Geller-Seifter (UMEZU *et al.*, 2006), e também nos teste de interação social e caixa claro/escuro (LINCK *et al.*, 2010). Além disso, foi observado por Takahashi *et al.* (2011), que o efeito tipo ansiolítico do linalol, observado nos camundongos testados no labirinto em cruz elevado, foi potencializado na presença de outro componente do óleo de lavanda, o acetato de

linalil, sugerindo que esses compostos poderiam atuar de maneira sinérgica para a obtenção do efeito ansiolítico.

1.4.2 Estudos clínicos

Estudos clínicos também têm demonstrado efeitos positivos da lavanda no controle da ansiedade (PERRY *et al.*, 2012). Foi observado que a inalação do óleo essencial de lavanda na sala de espera para o atendimento odontológico causou redução na ansiedade dos pacientes nos trabalhos realizados por Lehrner *et al.* (2005) e Kritsidima *et al.* (2010). Porém, nesses estudos o grupo que inalou a lavanda foi comparado ao grupo sem odor, ou seja, que ficou exposto ao odor característico do consultório odontológico.

Sabe-se que o sentido do olfato e a percepção de odores podem modular humor, cognição e comportamento, sendo assim, odores podem se conectar a formação e evocação de memórias relacionadas a odores específicos, principalmente os envolvidos com situações emotivas (ROBIN *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 2003; SOUDRY *et al.*, 2011). Logo, o próprio odor do consultório odontológico, caracterizado principalmente pelo odor do eugenol, produto usado em alguns procedimentos odontológicos, pode por si só despertar um estado de ansiedade em pacientes que tiveram experiências negativas associadas ao tratamento odontológico (ROBIN *et al.*, 1999). Sendo assim a lavanda poderia estar mascarando o odor de eugenol do consultório odontológico e assim reduzindo a ansiedade dos pacientes.

A inalação do óleo essencial de lavanda reduziu a ansiedade em um grupo de voluntários na realização de um teste aritmético (DIEGO *et al.*, 1998), também foi observada redução do cortisol salivar de 22 voluntários saudáveis (ATSUMI e TONOSAKI, 2007). A inalação do óleo essencial de uma espécie híbrida, o lavandin, durante o pré-operatório, também ajudou no controle da ansiedade relacionada a procedimentos cirúrgicos (BRADEN *et al.*, 2009). Um estudo realizado com idosos com demência mostrou que a inalação de lavanda ajudou a controlar a agitação desses pacientes (LIN *et al.*, 2007).

Por outro lado, a literatura também apresenta estudos clínicos com resultados negativos em relação ao efeito ansiolítico da lavanda. A lavanda não teve efeito na ansiedade de estudantes após o teste de Digit Symbol, que consiste na

repetição de sequências de números e foi usado para causar agitação e estresse nos voluntários (HOWARD e HUGHES, 2008). Resultado semelhante foi encontrado por Toda e Morimoto (2008), quando pediram para voluntários saudáveis definirem seu grau de autopercepção de ansiedade, após a realização de um teste aritmético, com o auxílio de uma escada horizontal contendo do lado esquerdo a definição “nenhum estresse” e na extremidade direita “pior estresse que eu posso imaginar”. Entretanto, nesse mesmo estudo, a análise de marcadores endócrinos de estresse na saliva detectou a diminuição da cromogranina A no grupo que inalou a lavanda, embora nenhuma diferença tenha sido notada na avaliação do cortisol.

Porem outros estudos, em diferentes situações, também mostraram resultados positivos. Redução da ansiedade foi observada após administração por via oral de cápsulas contendo óleo essencial de lavanda, em voluntários normais após assistirem um filme neutro, mas não teve efeito nos voluntários que assistiram a um filme que provocava ansiedade. Neste estudo os autores sugeriram que a lavanda poderia ajudar no controle da ansiedade leve, mas não nos casos de alta ansiedade (BRADLEY et al., 2009).

Apesar de os estudos clínicos com voluntários mostrarem resultados contraditórios, estudos clínicos controlados (randomizados, comparativos, duplo-cego) com pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade, têm indicado um efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda. Estes estudos utilizaram a administração oral de silexan, uma preparação de óleo essencial extraído das flores da espécie *Lavandula angustifolia*, que é um fitoterápico com autorização para venda na Alemanha sob o nome comercial de Lasea (KASPER et al., 2010a; PERRY et al., 2012; WOELK e SCHLÄFKE, 2010).

Woelk e Schläfke (2010) mostraram que o silexan (n=36 pacientes) foi tão efetivo quanto o lorazepam (n=33 pacientes), um fármaco benzodiazepínico, após 6 semanas de tratamento, no controle da ansiedade de pacientes com diagnóstico de transtorno de ansiedade generalizada, avaliados pela escala de ansiedade Hamilton. Além disso, os autores observaram que o silexan não causou sedação, que é um dos efeitos colaterais dos benzodiazepínicos. Porém esse trabalho não teve a participação de um grupo placebo, que seria interessante para eliminar um possível resultado falso positivo.

Kasper et al. (2010a), também em um estudo randomizado e duplo cego, selecionou 221 pacientes com transtorno de ansiedade não especificado. Os

pacientes foram separados em 2 grupos, silexan e placebo, e após 10 semanas de tratamento os autores relataram que o grupo que recebeu silexan apresentou melhora na ansiedade e nos distúrbios de sono relacionados à ansiedade, em comparação ao grupo placebo, sem apresentar sedação ou outros efeitos colaterais. Esse mesmo grupo de pesquisadores, Kasper *et al.* (2010b), em um artigo de revisão de estudos clínicos, propõem que o silexan poderia ser uma opção de tratamento nos casos de ansiedade subsindrômica, pois nesses casos os pacientes não apresentam todos os critérios para serem diagnosticados com algum transtorno de ansiedade, sendo assim, acabam não recebendo o tratamento farmacológico convencional. Nesta situação o silexan poderia ajudar na melhora do bem estar, agitação e qualidade do sono desses pacientes, sem apresentar os efeitos colaterais dos benzodiazepínicos ou antidepressivos, o que facilitaria a adesão do paciente ao tratamento.

Ainda, em estudo aberto com o silexan, Uehleke *et al.* (2012) observaram que após 6 semanas de tratamento, 50 pacientes diagnosticados com neurastenia ou estresse pós-traumático relataram melhora nos sintomas de inquietação, distúrbio de sono e ansiedade. O único efeito indesejado descrito pelos pacientes foi um leve a moderado desconforto gastrointestinal.

Nesses três últimos estudos com pacientes, o óleo de lavanda foi administrado oralmente na forma de cápsulas (80mg/dia) e não por inalação, como visto em outros trabalhos. Sendo assim, o óleo essencial de lavanda tem apresentado efeito ansiolítico em humanos independentemente da via de administração.

1.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA

1.5.1 Neurotransmissores

O mecanismo de ação do efeito ansiolítico da lavanda ainda não foi completamente desvendado, mas estudos a respeito da sua farmacodinâmica têm contribuído para o assunto.

Aoshima e Hamamoto (1999) relataram que o óleo essencial de diferentes espécies de lavanda causou potencialização da resposta inibitória do receptor GABA-A quando expresso em oócitos de *Xenopus* (gênero de rãs aquáticas).

Shaw *et al.* (2011) observaram uma redução na expressão de *c-fos* induzida por ansiedade não condicionada (exposição ao campo aberto), em cérebro de ratos. Embora em algumas áreas do cérebro (núcleos paraventricular e dorsomedial do hipotálamo e núcleo central da amígdala) essa redução tenha sido similar, porém mais branda, do que no grupo de ratos que recebeu clordiazepóxido, os autores concluem que não há evidências suficientes que comprovem que a lavanda atue pelos mesmos mecanismos neurais que os benzodiazepínicos.

Lis-Balchin e Hart (1999) observaram que a lavanda e o composto isolado, linalol, causaram uma ação espasmolítica sobre o músculo liso do íleo de porquinho-da-índia em experimento de órgão isolado. Nesse experimento *in vitro* os autores também observaram aumento do AMPc e sua mediação pós-sináptica, o que sugerem ter sido a via de ação do relaxamento muscular observado.

Ainda, Elisabetsky *et al.* (1995), mostraram que o linalol inibiu a ligação do glutamato aos seus receptores, quando testado *in vitro* em córtex cerebral de rato. Sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, os autores sugerem que a diminuição da sua ligação a seus receptores poderia estar envolvida no efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda.

Outros estudos com o composto isolado linalol demonstraram inibição da ligação do glutamato ao receptor NMDA, porém o linalol não alterou a ligação do GABA ao receptor GABA-A em experimento *in vitro* usando membrana cortical de camundongo (Silva Brum *et al.*, 2001a). Também foi demonstrado que o linalol inibiu a liberação de glutamato estimulada por potássio, assim como a recaptação do glutamato, porém não alterou sua liberação basal em sinaptossoma cortical de camundongo (Silva Brum *et al.*, 2001b).

Apesar de estudos estarem sendo dedicados ao delineamento do mecanismo de ação ansiolítico do óleo essencial de lavanda e o seu principal componente, linalol, ainda não se conhece o seu mecanismo de ação exato, sendo assim, sua correlação com outras vias e neurotransmissores envolvidos nos transtornos de ansiedade precisam ser estudados. Além disto, não existe estudo comportamental associando estes efeitos neuroquímicos do óleo essencial de lavanda e do linalol com seus efeitos comportamentais. Com o entendimento do

mecanismo de ação do óleo essencial de lavanda sobre a ansiedade, poderá se antever possíveis efeitos colaterais e interação com medicamentos, como por exemplo, os benzodiazepínicos e antidepressivos.

1.5.2 Sistema Olfatório

Estudos têm demonstrado o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda após sua administração por diferentes vias. A via inalatória demonstrou resultado positivo em estudos pré-clínicos (BRADLEY *et al.*, 2007; LINCK *et al.*, 2010) e clínicos (DIEGO *et al.*, 1998; KRITSIDIMA *et al.*, 2010; LEHRNER *et al.*, 2005), assim como a via intraperitoneal, em camundongos (UMEZO *et al.*, 2006) e a via oral, em pacientes (KASPER *et al.*, 2010b; WOELK e SCHLÄFKE, 2010; UEHLEKE *et al.*, 2012).

Como citado anteriormente, os óleos essenciais podem ser absorvidos através do sistema respiratório, através da aplicação dérmica ou pela ingestão oral (WORONUK *et al.*, 2011). Quando o óleo essencial de lavanda é usado por via inalatória pode ser absorvido de duas maneiras: (a) através da absorção pela mucosa pulmonar e nasal, caindo na corrente sanguínea para seguir para o sistema nervoso central; (b) via sistema olfatório, já que a administração intranasal de substâncias pode atravessar a barreira hematoencefálica e a via olfatória levaria as substâncias para o SNC (FATURI *et al.*, 2010; HANSON e FREY, 2008; KAGAWA *et al.*, 2003).

Por outro lado o óleo essencial de lavanda poderia ativar as células olfatórias na cavidade nasal, causando ativação do bulbo olfatório, o qual passaria essa ativação para regiões do sistema nervoso central (ALMEIDA *et al.*, 2004; FATURI *et al.*, 2010; HERZ, 2009; KAGAWA *et al.*, 2003; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2011).

É conhecido que o sistema olfatório se encontra anatomicamente próximo às regiões do cérebro relacionadas a emoções e humor, sendo que algumas dessas estruturas são comuns ao processamento de emoções e odores, como tálamo, hipotálamo, amígdala, hipocampo, córtex orbitofrontal e insular (HERZ, 2009; SOUDRY *et al.*, 2011).

A transdução olfatória é iniciada pela percepção de odores, que ativa os neurônios primários. Essa ativação é transmitida ao sistema olfatório central, através

dos glomérulos presentes no bulbo olfatório. Na sequência, a informação é conduzida para o córtex piriforme, ou córtex olfatório, que transmite a ativação para o tálamo, hipotálamo, amígdala, hipocampo, córtex orbitofrontal e insular (SOUDRY *et al.*, 2011). Sendo assim, a inalação de óleos essenciais, poderia ativar estruturas pertencentes ao sistema límbico, que estão relacionadas com modulação de comportamento e emoção. Entretanto, como descrito anteriormente, o componente farmacologicamente ativo do óleo essencial, poderia ser absorvido pela mucosa pulmonar, caindo assim na corrente sanguínea, e chegando ao sistema nervoso central, ou ainda, o efeito poderia decorrer de uma somatória das duas vias (HERZ, 2009; SOUDRY *et al.*, 2011).

1.6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A busca por novos medicamentos ansiolíticos visando maior eficácia, menor custo e a redução dos efeitos colaterais, tem renovado o interesse pelos óleos essenciais. A maior aceitação das terapias alternativas e complementares tem contribuído para o crescente número de estudos clínicos e pré-clínicos com o óleo essencial de lavanda, que mostram os seus efeitos sobre o controle da ansiedade. Além disto, a administração por via inalatória tem a vantagem de um início de ação mais rápido e administração em grupo (por exemplo, sala de espera de consultório odontológico), porém a via oral permite um controle mais preciso da dosagem.

Entretanto, ainda existe a necessidade de mais estudos, entre eles, estudos que esclareçam o mecanismo de ação farmacológico do óleo essencial de lavanda, estudos sobre o seu uso crônico, sobre o desenvolvimento de tolerância ou dependência, e estudos sobre os efeitos da lavanda na cognição, por exemplo. Um maior embasamento científico que comprove a eficácia e a segurança do uso do óleo essencial de lavanda pode aumentar a utilidade e interesse dessa prática.

PARTE 1

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DAS VIAS GABAÉRGICA,
SEROTONINÉRGICA E NITRINÉRGICA NO MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO
TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA**

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da neurotransmissão GABAérgica, serotoninérgica e nitrinérgica no mecanismo de ação farmacológico do efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas e no labirinto em cruz elevado.
- Comparar o efeito do óleo essencial de lavanda com um odor neutro (acetato de amila) e com o controle sem odor (água destilada).
- Investigar a influencia do pré-tratamento com picrotoxina (antagonista GABA-A) sobre o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.
- Avaliar a ligação do óleo essencial de lavanda no sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A, pelo ensaio de binding de [³H] flunitrazepam.
- Investigar a influencia do pré-tratamento com pindolol (antagonista não seletivo 5HT1A), WAY 100635 (antagonista 5HT-1A) no efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.
- Investigar a influencia da coadministração com 8-OH-DPAT (agonista 5HT-1A) no efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.

- Avaliar a influencia do óleo essencial de lavanda na síndrome serotoninérgica induzida por fluoxetina e 5-HTP.
- Investigar o efeito do pré-tratamento com L-arginina (precursor do NO) ou da coadministração de 7-NI (inibidor da NO sintase neuronal) no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda, na avaliação da participação da neurotransmissão nitrinérgica.
- Investigar o efeito da inalação do óleo essencial de lavanda na atividade da NADPH-d nas regiões do núcleo rafe dorsal (NDR) e matéria cinzenta periaquedutal (MCP), pelo teste de histoquímica para NADPH-d.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos adultos machos Swiss (30-45 g), em grupos de 15 animais por caixa (41 X 34 X 16 cm), foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas, luzes acesas às 7:00h) e temperatura (21 ± 1 °C). Comida e água estiveram disponíveis *ad libitum*. O presente trabalho foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA), o protocolo experimental aplicado foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 407 (ANEXO 1).

3.2 DROGAS E TRATAMENTOS

O óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Phytoterápica, São Paulo, Brazil), 100% puro, foi diluído em propilenoglicol para obtenção das concentrações de 0,1%, 1,0%, 2,5% e 5,0% (v/v), minutos antes dos experimentos. Análise química do óleo essencial de lavanda indicou presença de 46,5% de linalol e 53,5% de acetato de linalil (análise de cromatografia gasosa realizada pela Dall soluções analíticas e empresariais – ANEXO 2). Acetato de amila (5%, Sigma, St. Louis, MO, USA), o qual possui odor semelhante à banana e não apresenta efeito algum sobre ansiedade em modelos animais (PASCHALL e DAVIES, 2002; PAVESI *et al.*, 2011), e água destilada foram usadas como controles. Os camundongos foram submetidos a 15 min de inalação imediatamente antes dos testes comportamentais.

Diazepam (1 mg/kg e 3 mg/kg, União Química, Brasil), picrotoxina (0,5 mg/kg, Sigma), 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, 3 mg/kg e 0,5 mg/kg, Sigma), maleato de N-{2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida (WAY100635, 3mg/kg, Sigma), fluoxetina (40 mg/kg, EMS, Brasil) e L-arginina (L-arg; 200 mg/kg, Sigma) foram diluídas em salina e administradas intraperitonealmente (i.p.). Pindolol (32 mg/kg, i.p.,Sigma) foi diluído em salina com 1% de Tween 80 e 5-Hidroxitriptofano (5-HTP, 80 mg/kg, i.p., Sigma)

foi diluído em salina com 5% de Tween 80, 7-nitroindazole (7-NI; 10 mg/kg, i.p., Sigma) foi dissolvido em óleo de milho e mantido em gelo.

Todas as drogas foram preparadas minutos antes dos experimentos e administradas no volume de 10ml/kg de peso.

As doses usadas foram estabelecidas de acordo com a literatura (CASAROTTO *et al.*, 2010; DALVI e RODGERS, 1996; DIAZ e MAROTEAUX, 2011; EGASHIRA *et al.*, 2008; FOX *et al.*, 2007; MATSUSHITA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2011; UMATHE *et al.*, 2009; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004) ou por prévios experimentos realizados pelo grupo (dados não mostrados).

A inalação do óleo essencial de lavanda foi feita por 15 min antes dos testes comportamentais. A administração intraperitoneal das demais drogas foi feita 30 min antes dos testes comportamentais. Os esquemas de tratamento, com os tempos de administração, estão detalhados na sessão 3.6 (desenho experimental).

3.2.1 INALAÇÃO

Grupos de 5 animais (para o teste de esconder esferas) ou um camundongo (para o labirinto em cruz elevado, campo aberto e síndrome serotoninérgica), dentro de uma caixa moradia (28 X 17 X 12 cm), foram colocados dentro de um recipiente plástico com tampa (32 X 24 X 32 cm). Água destilada (controle), acetato de amila 5% e óleo essencial de lavanda nas concentrações de 0,1%, 1,0%, 2,5% e 5,0% (v/v) foram depositados, no volume constante de 1ml, sobre um pedaço de algodão (0,7 a 0,8 g) colocado dentro do recipiente plástico (Figura 2). Os camundongos foram submetidos a 15 minutos de inalação nas caixas imediatamente antes dos testes. Cada algodão foi usado apenas 1 vez e renovado para cada animal.



FIGURA 2 - Caixa de Inalação. FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Teste de Esconder Esferas

O teste de esconder esferas foi o teste escolhido para investigar o mecanismo de ação farmacológico do óleo essencial de lavanda por ser um teste sensível a drogas usadas clinicamente para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, como benzodiazepínicos e antidepressivos (CRYAN e SWEENEY 2011; NICOLAS *et al.* 2006; HAYASHI *et al.* 2010).

Nesse teste os camundongos foram colocados individualmente no centro de uma caixa de polietileno (40 X 34 X 16 cm), forrada com 5 cm de cepilho, contendo 24 esferas de vidro (15 mm de diâmetro) uniformemente distribuídas pela periferia da caixa (5 cm das paredes) (Figura 3). Após 20 minutos, o camundongo foi removido da caixa e foi contado o número de esferas com pelo menos 2/3 da sua superfície coberta por cepilho. A caixa e o cepilho foram trocados e as esferas de vidro lavadas em álcool 10% entre animais, para reduzir a interferência do cheiro do animal anteriormente testado (HAYASHI *et al.*, 2010; KRASS *et al.*, 2010).



FIGURA 3 - Teste de esconder esferas
FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado usado consiste de 2 braços abertos (30x5 cm) e dois braços fechados (30x5x25 cm) feitos de madeira, na altura de 45cm acima do

chão (LISTER, 1987). Os braços abertos apresentam uma borda de 0,5 cm para prevenir que os camundongos caiam (Figura 4). Após o tratamento, os animais foram colocados individualmente na plataforma central de frente para um dos braços fechados do labirinto e foram avaliados por 5 min. Os parâmetros observados foram o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos braços abertos (dados expressos como porcentagem). Considerou-se entrada nos braços quando o animal entrou com as quatro patas dentro dos mesmos. O número de entradas nos braços fechados foi considerado índice de atividade locomotora, a porcentagem de entradas assim como o tempo de permanência nos braços abertos como parâmetros de ansiedade (BARETTA *et al.*, 2012; LISTER, 1987). Os experimentos foram filmados para avaliação subsequente.



FIGURA 4 - Labirinto em cruz elevado
FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3.3 Atividade locomotora

3.3.3.1 Caixa de movimentação

Cada camundongo foi colocado individualmente dentro da caixa de movimentação (40×20×26 cm) a qual é equipada com três fotocélulas nas suas paredes (10 cm entre elas) e o número de interrupções dos feixes foi registrado de maneira cumulativa por um período de 5 minutos (Figura 5). A caixa de movimentação usada consiste de paredes laterais de madeira e a base é feita de

uma malha de arame, com uma tampa de acrílico verde escura (PEREIRA *et al.*, 2011).

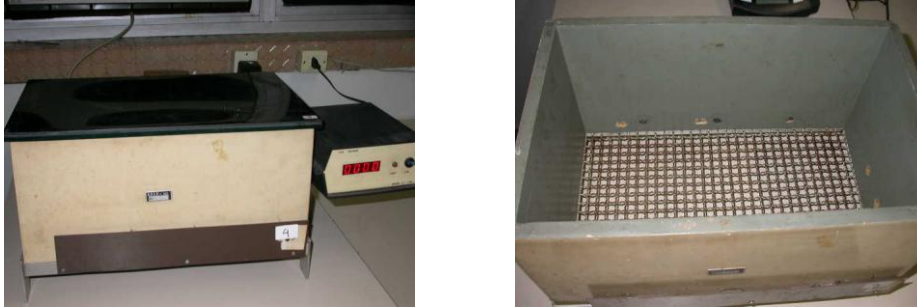


FIGURA 5 - Caixa automatizada de movimentação espontânea
FONTE: Roberto Andreatini

3.3.3.2 Campo Aberto

O campo aberto usado consiste de uma arena circular feita de metal (40 cm de diâmetro e 28 cm de altura) pintada de branco. A base da arena foi dividida em 25 espaços arranjados em 3 círculos concêntricos (Figura 6). Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número de quadrados cruzados com todas as patas foi contado durante 5 min. As sessões foram filmadas por uma câmera colocada acima do campo aberto. Foi utilizado álcool 10% em água para limpeza do campo aberto entre os animais (TADAIESKY *et al.*, 2006).



FIGURA 6 - Campo Aberto
FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3.4 Síndrome Serotoninérgica

Para a síndrome serotoninérgica, cada camundongo foi habituado à caixa teste (caixa de vidro, 32 cm x 17 cm x 21 cm) por 15 min. Após esse período de habituação, foi feita a administração de fluoxetina (40 mg/kg) e na sequência os animais foram submetidos à inalação do óleo de lavanda (5%) por 15 min; imediatamente após a inalação foi administrado 5-HTP (80 mg/kg) e após 5 min o primeiro vídeo foi feito, seguido por 4 vídeos de 1 min a cada 5 min (Figura 7).

Os comportamentos associados à síndrome serotoninérgica foram filmados em 5 vídeos de 1 minuto cada, para posterior avaliação por observador não informado sobre os tratamentos de cada grupo.

Os comportamentos foram avaliados como intermitentes e contínuos. Os comportamentos intermitentes incluíram balançar cabeça, pisar das patas dianteiras e movimento para trás, pontuados em uma escala de 0 a 4; sendo 0, ausente, 1, presente uma vez; 2, presente várias vezes; 3, presente frequentemente; 4, presente continuamente. Os comportamentos contínuos incluíram abdução das patas posteriores, cauda de Straub, tremor e postura corporal abaixada, pontuados em uma escala de 0 a 4; sendo 0, ausente; 1, perceptível; 2, fraco; 3, médio; 4, máximo (DIAZ e MAROTEAUX, 2011; FOX *et al.*, 2007, 2008; KALUEFF *et al.*, 2007).

A pontuação dos 5 vídeos de 1 min cada foram somados para cada comportamento. A pontuação total para a síndrome serotoninérgica foi obtida pela soma de todos os comportamentos, intermitentes e contínuos, durante os 5 min de avaliação (DIAZ e MAROTEAUX 2011; FOX *et al.*, 2007, 2008; KALUEFF *et al.*, 2007).

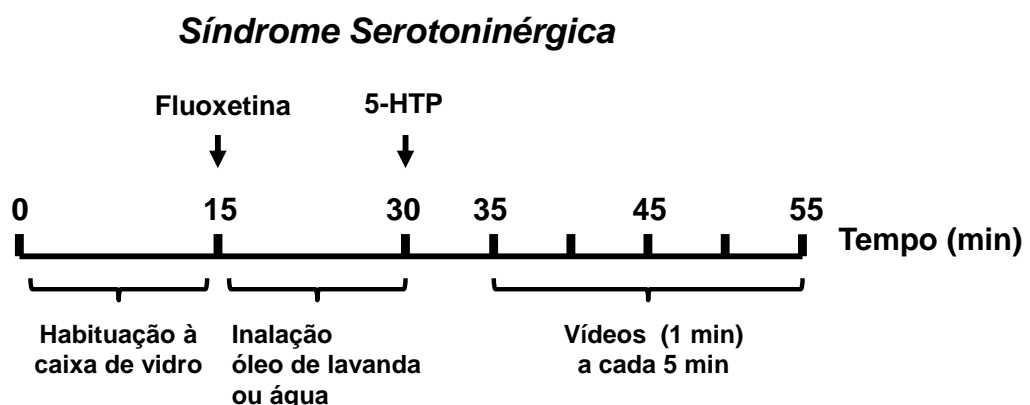


FIGURA 7 - Esquema experimento da Síndrome Serotoninérgica

3.4 BINDING PARA O RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO GABA-A

Para a preparação das membranas, o cérebro de ratos Wistar foi homogeneizado (1:10, m/v) em solução tampão (Tris-HCl 10 mM, sacarose 300 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado (4°C a 1,000 × g por 10 min), o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado (4°C a 16,000 × g por 20 min). O sedimento foi resuspenso na mesma solução tampão e congelado a -20°C por 48 h. Após esse período as membranas foram descongeladas e resuspensas (1:20, m/v) em Tris-HCl 50 mM e EDTA 2 mM (pH 7,4), e centrifugado a 4°C a 16,000 × g por 10 min. O sedimento foi resuspenso no mesmo tampão e incubado a 37°C por 30 min. Após incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas nas mesmas condições descritas acima por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi resuspenso em HEPES 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7,4), e o teor de proteína foi determinado de acordo com Bradford (1976).

O ensaio de binding de flunitrazepam [³H] foi realizado conforme descrito por Vogel (2008). As amostras foram incubadas em duplicata em tubos de policarbonato (volume total de 500 µl) contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e 0,5 mg de proteína de membrana na ausência ou na presença do óleo essencial de lavanda (1-100 µg/ml). Diazepam (10 µM) foi usado como controle positivo (Huen *et al.*, 2003). A incubação foi iniciada pela adição de 1 nM de flunitrazepam [³H] (85 Ci/mmol, Perkin-Elmer, USA) e mantido em gelo por 60 min. A reação foi interrompida por filtração a vácuo, e cada filtro foi lavado com 15 ml de tampão Tris-HCl 10 mM gelado. Os filtros foram colocados individualmente em tubos de policarbonato, e 1 ml de líquido de cintilação foi adicionado. A radioatividade foi determinada utilizando um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2100TR). A ligação não específica (10-20% do total de ligação) foi determinada pela adição de diazepam 100 µM ao meio em ensaio paralelo. Foi considerada como ligação específica a diferença entre a ligação total e a ligação não específica. Os resultados são expressos como a porcentagem de ligação específica.

3.5 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE

Após o tratamento com o óleo essencial de lavanda 5% ou água destilada e a exposição ao teste de esconder esferas, os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos com PBS (pH 7,4) e em seguida com paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e armazenados em geladeira no paraformaldeído por 4 horas e depois mantidos em sacarose a 30% durante a noite. No dia seguinte, os cérebros foram emblocados em Tissue Tek e congelado em gelo seco. Os blocos foram mantidos a -80°C até o momento da sua utilização. As amostras foram cortadas em criostato, em secções de 25 µm. Os cortes foram processados em ensaio free-floating. As secções foram lavadas com PBS (pH 7,4) e incubadas por 20 minutos em 0,3% de Triton X-100 em PBS. Em seguida, as secções foram incubadas por 2 horas em uma mistura contendo 3 mg/ml de NADPH (Sigma), 1 mg/ml de azul de nitrotetrazólio (NBT) e 0,1% de Triton X-100 em PBS. A reação foi interrompida através da incubação das secções em PBS gelado. Os cortes foram feitos baseando-se no atlas Paxinos e Franklin (2004) para obtenção das regiões matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial (DMPAG) e núcleo dorsal da rafe (DRD), 12 cortes foram feitos a partir de bregma -4,48 mm a -4,84 mm, e 1 em cada 4 cortes foi avaliado (Figura 8).

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, as quais foram cobertas com uma mistura de 70% de glicerol em PBS e lamínula. No dia seguinte as lâminas foram avaliadas e fotografadas (microscópio Leica Microsystems DM2500, Alemanha). As imagens foram avaliadas por um observador não familiarizado com os tratamentos, e as células marcadas pela coloração azul escura foram consideradas NADPH-d positivas (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006; JOUNG *et al.*, 2012)

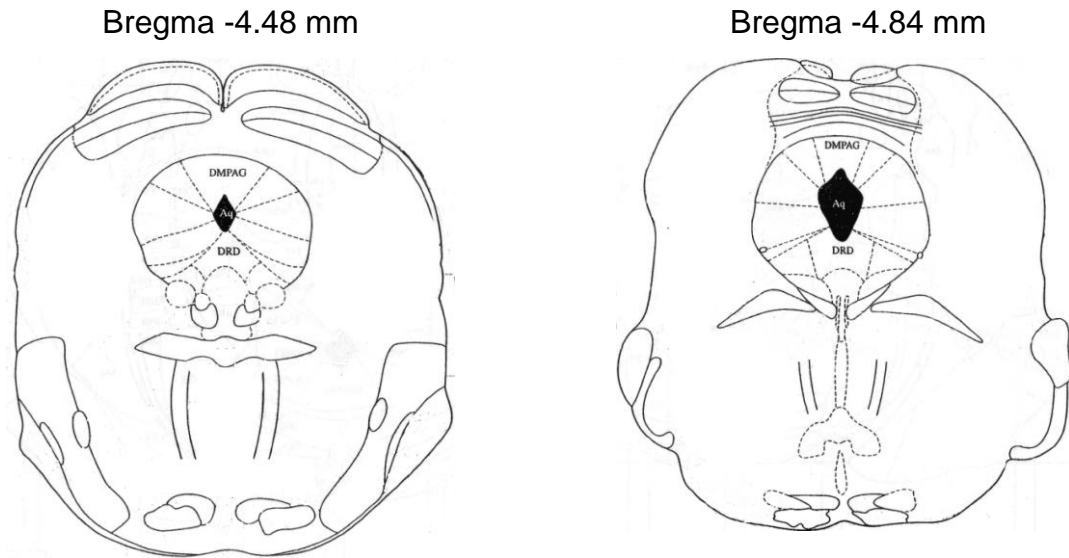


FIGURA 8 - Diagramas modificados representando DMPAG e DRD
FONTE: *The mouse Brain in stereotaxic coordinates* de Paxinos e Franklin (2004)

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Nos dias de experimento, os camundongos foram habituados à sala experimental por 30 minutos antes do início da administração das drogas, com livre acesso a ração e água.

O teste de esconder esferas, o labirinto em cruz elevado, o campo aberto e a caixa de locomoção, foram realizados no período da manhã, das 8:00 as 13:00 h.

O teste da síndrome serotoninérgica foi realizado no período da tarde, entre 13:00 e 18:00 h.

Cada teste comportamental foi realizado com um grupo diferente de camundongos.

3.6.1 Avaliação do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda em camundongos

Experimento I: Efeito da inalação de diferentes concentrações de óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas. Inalação de água destilada foi usada como controle, e a inalação de acetato de amila (odor semelhante à banana) foi usado como controle negativo. O tempo de inalação foi de 15 minutos, imediatamente antes do teste.

Experimento II: Efeito do óleo essencial de lavanda 5% (15 min de inalação) no teste do labirinto em cruz elevado. Água destilada foi utilizada como controle

Tratamento		Teste comportamental
Óleo essencial de Lavanda 1%, 2,5% e 5%	15 min	Teste de Esconder Esferas
Acetato de Amila 5%	→	
Água Destilada		
Óleo Essencial de Lavanda 5%	15 min	Labirinto em Cruz Elevado
Água Destilada	→	

FIGURA 9 - Experimentos I e II

3.6.2 Estudo do envolvimento da via de neurotransmissão GABAérgica no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda

Experimento III: Influência do pré-tratamento com picrotoxina (0,5 mg/kg, i.p) no efeito do óleo essencial de lavanda (5%) sobre o comportamento de esconder esferas. Diazepam (1mg/kg, ip) foi empregado como controle positivo e água destilada (no algodão) foi utilizada como controle. A picrotoxina ou o veículo foram administrados 15 min antes da inalação do óleo essencial de lavanda ou água destilada, seguido de 15 min de inalação, assim como do diazepam, seguido de 30 min de intervalo, antes do teste comportamental.

Tratamento		Teste comportamental
Veículo	15 min	→ Teste de esconder Esferas
	→	
	Lavanda 5% Diazepam 1,0 mg/kg Água destilada	
Picrotoxina 0,5 mg/kg	→	→ Teste de esconder Esferas
	Lavanda 5% Diazepam 1,0 mg/kg Água destilada	

FIGURA 10 - Experimento III

Experimento IV: Efeito do óleo essencial de lavanda (1 a 100 µg/ml) no binding de [³H]flunitrazepam em membranas de cérebros de ratos “in vitro”. Diazepam (10µM) foi utilizado como controle positivo.

3.6.3 Estudo do envolvimento da via de neurotransmissão serotoninérgica no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda

Experimento V: Efeito do óleo essencial de lavanda (5%) sobre a síndrome serotoninérgica induzida por fluoxetina (40 mg/kg, i.p) e 5-HTP (80 mg/kg, i.p). Após 15 min de habituação à caixa experimental os camundongos receberam o tratamento com fluoxetina, na sequência foram colocados nas caixas de inalação (com óleo essencial de lavanda ou água destilada) por 15 min, ao final do tempo de inalação os camundongos receberam a administração de 5-HTP e após 5 min foram iniciadas as filmagem (5 videos de 1 min, a cada 5 min de intervalo – Fig. 7).

Experimento VI: Influência do pré-tratamento com pindolol (32 mg/kg, i.p, 30 min antes dos demais tratamentos) no efeito do óleo de essencial de lavanda (5%, 15 min inalação) sobre o comportamento de esconder esferas. 8-OH-DPAT (3 mg/kg, i.p, 30 min antes do teste) foi usado como controle positivo e água destilada (no algodão) foi utilizada como controle

Experimento VII: Influência do pré-tratamento com WAY 100635 (3 mg/kg, i.p, 30 min antes dos demais tratamentos) no efeito do óleo de essencial de lavanda (5%, 15 min inalação) sobre o comportamento de esconder esferas. 8-OH-DPAT (3 mg/kg, i.p, 30 min antes do teste) foi usado como controle positivo e água destilada (no algodão) foi utilizada como controle.

		Tratamento	Teste comportamental	
Veículo	30 min	Lavanda 5%	→	Teste de esconder Esferas
	→	8-OH-DPAT 3 mg/kg		
		Água destilada		
Pindolol 32 mg/kg	30 min	Lavanda 5%	→	Teste de esconder Esferas
	→	8-OH-DPAT 3 mg/kg		
		Água destilada		
WAY 100635 3 mg/kg	30 min	Lavanda 5%	→	Teste de esconder Esferas
	→	8-OH-DPAT 3 mg/kg		
		Água destilada		

FIGURA 11 - Experimentos VI e VII

Experimento VIII: Efeito da coadministração de uma dose inefetiva de 8-OH-DPAT (0,5 mg/kg) e óleo essencial de lavanda (0,1%) sobre o comportamento de esconder esferas. A administração de 8-OH-DPAT foi feita 15 min antes da inalação do óleo de essencial lavanda ou água destilada, seguida de 15 min de inalação do óleo essencial de lavanda imediatamente antes do teste comportamental.

Tratamento			Teste comportamental	
Veículo	15 min	Lavanda 0,1%	15 min	Teste de esconder Esferas
	→	Água destilada		
8-OH-DPAT 0,5 mg/kg	15 min	Lavanda 0,1%	15 min	Teste de esconder Esferas
	→	Água destilada		

FIGURA 12 - Experimento VIII

3.6.4 Estudo do envolvimento da via de neurotransmissão nitrinérgica no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda

Experimento IX: Efeito da pré-administração de L-arginina (200 mg/kg, i.p) no efeito do óleo essencial de lavanda (5%, inalação) sobre o comportamento de esconder esferas. Água destilada (no algodão) foi utilizada como controle. A administração de L-arg foi feita 15 min antes da inalação do óleo de essencial lavanda ou água destilada, seguida de 15 min de inalação do óleo essencial de lavanda imediatamente antes do teste comportamental.

Tratamento			Teste comportamental	
Veículo	15 min	Lavanda 5%	15 min	Teste de esconder Esferas
	→	Água destilada		
L-arginina 200 mg/kg	15 min	Lavanda 5%	15 min	Teste de esconder Esferas
	→	Água destilada		

FIGURA 13 - Experimento IX

Experimento X: Efeito da administração conjunta de uma dose inefetiva de 7-NI (10 mg/kg, i.p) e inalação de uma concentração inefetiva do óleo essencial de lavanda (0,1%) no teste de esconder esferas. Água destilada (no algodão) foi utilizada como controle. A administração de 7-NI foi feita 15 min antes da inalação do óleo de essencial lavanda ou água destilada, seguida de 15 min de inalação do óleo essencial de lavanda imediatamente antes do teste comportamental.

Tratamento			Teste comportamental	
Veículo	15 min →	Lavanda 0,1% Água destilada	15 min →	Teste de esconder Esferas
7-NI 10 mg/kg	15 min →	Lavanda 0,1% Água destilada	15 min →	Teste de esconder Esferas

FIGURA 14 - Experimento X

Experimento XI: Histoquímica para NADPH-d em camundongos após inalação de óleo essencial de lavanda 5%. As áreas analisadas foram o núcleo dorsal da rafe (NDR), parte dorsal, e matéria cinzenta periaquedutal (MCP) dorsomedial

Experimento XII (a e b): Avaliação da atividade locomotora do óleo essencial de lavanda, drogas GABAérgicas, serotoninérgica e nitrinérgicas. Os camundongos tratados com óleo essencial de lavanda, drogas GABAérgicas (picrotoxina, diazepam) e serotoninérgica (WAY100635, pindolol e 8-OHDPAT) foram avaliados na caixa de locomoção (XIIa), enquanto que diferentes grupos de camundongos tratados com óleo essencial de lavanda, L-arg e 7-NI foram avaliados no campo aberto (XIIb).

3.7 ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média \pm EPM. Os dados do teste de esconder esferas, do teste do campo aberto e da caixa de locomoção foram analisados pela ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan, para comparações individuais. Os dados do labirinto em cruz elevado, síndrome serotoninérgica e histoquímica para NADPH foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras independentes, para comparar o grupo controle e lavanda 5%. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA NOS TESTES COMPORTAMENTAIS: ESCONDER ESFERAS, LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E CAMPO ABERTO

4.1.1 Experimento I: Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de lavanda (OEL) no teste de esconder esferas.

Como mostra a figura 15, ANOVA de uma via indicou efeito significativo do tratamento [$F(4, 45) = 7.568$; $p < 0,001$]. Todas as concentrações do óleo essencial de lavanda reduziram significativamente o número de esferas escondidas em comparação aos grupos água destilada e acetato de amila (todos $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos água destilada e acetato de amila ($p > 0,10$). Não foi observada diferença significativa entre as diferentes concentrações do óleo essencial de lavanda (todos $p > 0,10$)

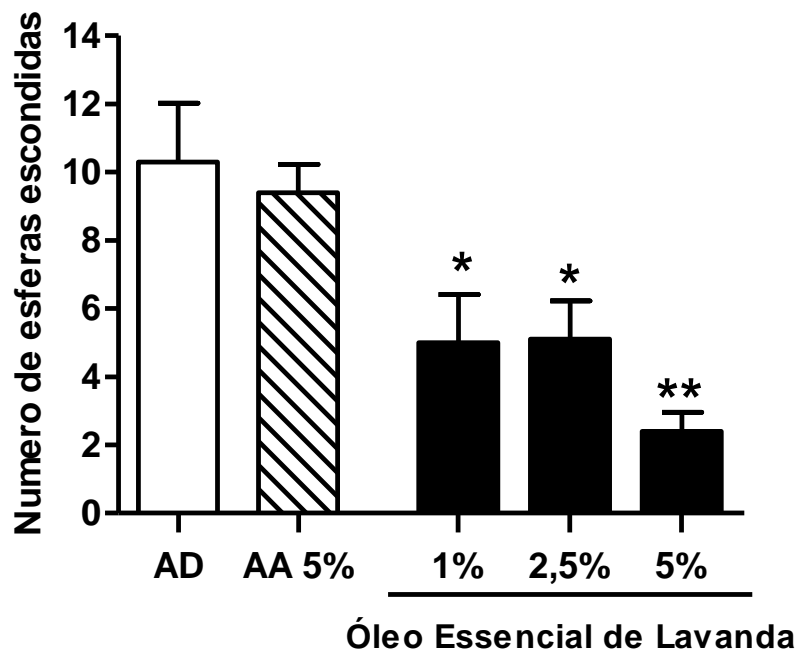


FIGURA 15 - Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de lavanda, acetato de amila (AA) e controle (água destilada; AD) no comportamento de esconder esferas. Valores expressos como média \pm EPM do número de esferas escondidas durante 20 min ($n = 10$ camundongo/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado aos grupos AD e AA 5%.

4.1.2 Experimento II: Efeito do óleo essencial de lavanda 5% no labirinto em cruz elevado.

Resultados apresentados na figura 16. O teste *t* de Student indicou efeito significativo do óleo essencial de lavanda 5% sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$t(20) = -3,833$; $p \leq 0,01$] assim como sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos [$t(20) = -3,877$; $p \leq 0,01$]. Não foi observada diferença na entrada nos braços fechados [$t(20) = -1,720$; $p > 0,10$; Controle: $6.9 \pm 0,54$; Lavanda: 8.2 ± 0.55 , valores de média \pm EPM].

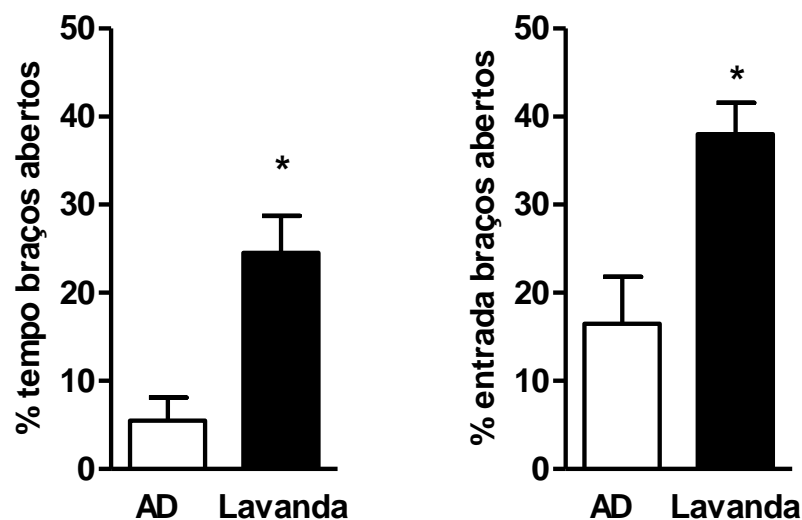


FIGURA 16 - Efeito do óleo essencial de lavanda 5% (15 min de inalação) no labirinto em cruz elevado (5 min): % do tempo total gasto nos braços abertos (esquerda), % de entrada nos braços abertos (direita). Valores de média \pm EPM ($n = 11$ camundongos / grupo). * $p \leq 0,05$ comparado ao controle (AD: água destilada).

4.2 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO GABAÉRGICA

4.2.1 Experimento III: Influência do pré-tratamento com picrotoxina (0,5 mg/kg) no efeito do óleo de essencial de (5%) lavanda e do diazepam (1mg/kg) sobre o comportamento de esconder esferas.

ANOVA de uma via indicou que o tratamento exerceu um efeito significativo [$F(5, 45) = 7,763$; $p < 0,001$]. A figura 17 mostra que os camundongos tratados com

picrotoxina 0,5 mg/kg mostraram um comportamento de esconder esferas similar ao grupo salina ($p > 0,10$), enquanto os que receberam diazepam 1 mg/kg ou óleo essencial de lavanda 5% apresentaram uma inibição significativa no comportamento de esconder esferas (ambos $p < 0,01$ comparado ao grupo salina). O pré-tratamento com picrotoxina 0.5 mg/kg inibiu o efeito do diazepam 1 mg/kg, pois esse grupo teve o número de esferas escondidas semelhante ao grupo salina ($p > 0,10$) e maior que o grupo que recebeu apenas diazepam ($p < 0,02$). Por outro lado, o pré-tratamento com picrotoxina 0,5 mg/kg não interferiu no efeito do óleo essencial de lavanda 5%, sendo que o grupo que recebeu a combinação de picrotoxina e óleo essencial de lavanda escondeu menos esferas que o controle ($p < 0,01$), sendo similar ao grupo que recebeu apenas óleo essencial de lavanda ($p > 0,10$).

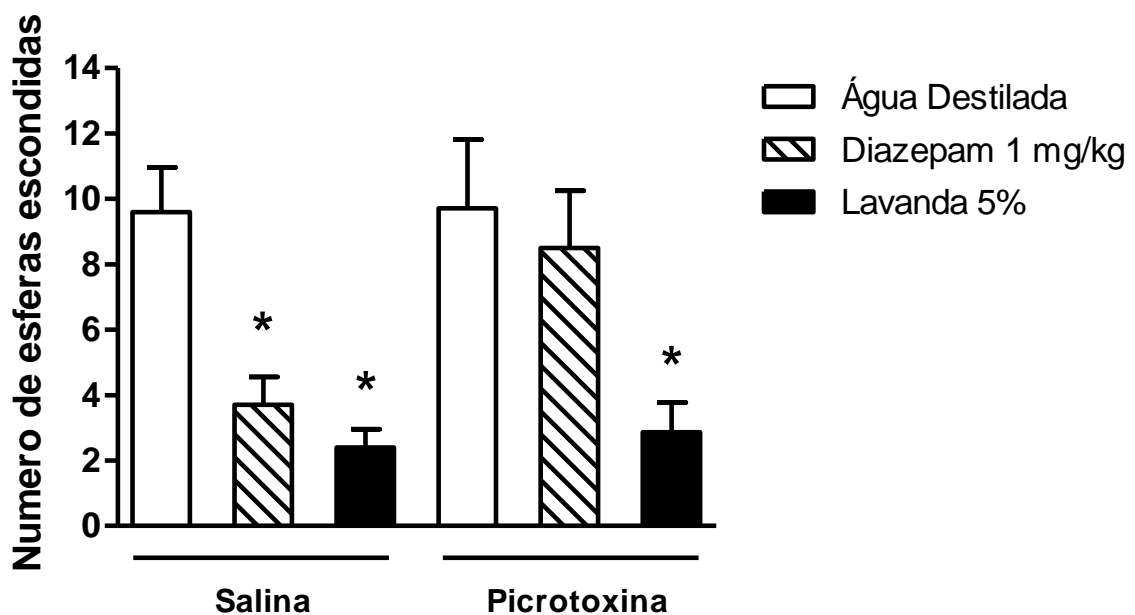


FIGURA 17 - Efeito do pré-tratamento com Picrotoxina (0,5 mg/kg, ip) sobre o efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda (5%, inalação) ou diazepam (1,0 mg/kg, ip) no comportamento de esconder esferas. Valores expressos como média \pm EPM do número de esferas escondidas durante 20 min ($n = 7-10$ camundongo/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao controle (salina+ água destilada)

4.2.2 Experimento IV: Efeito do óleo essencial de lavanda (1 a 100 µg/ml) no binding de [³H]flunitrazepam em membranas de cérebros de ratos “in vitro”

Como mostra a figura 18, diazepam, usado como controle positivo, reduziu a ligação específica do [³H] flunitrazepam em 86 ± 1%. Esse efeito não foi observado com o óleo essencial de lavanda.

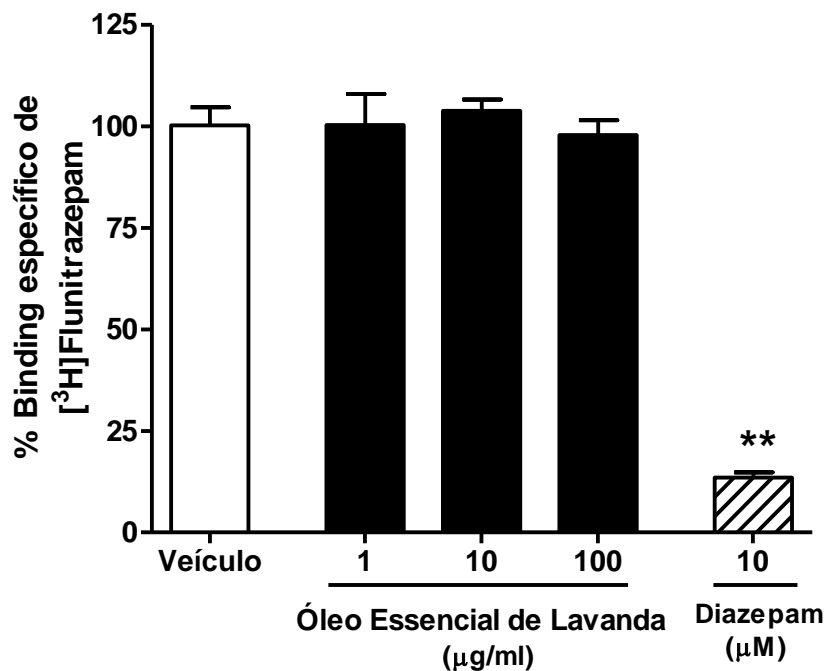


FIGURA 18 - Efeito do óleo essencial de lavanda (1 a 100 µg/ml) e diazepam sobre o binding de [³H]flunitrazepam em membrana de cérebro de ratos. Resultados apresentados como média ± EPM de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como % em relação ao controle. **p < 0,01 em comparação com veículo

4.3 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA

4.3.1 Experimento V: Efeito do óleo essencial de lavanda (5%) sobre a síndrome serotoninérgica induzida por fluoxetina e 5-HTP.

Como demonstrado na figura 19, houve uma redução significativa na severidade da síndrome serotoninérgica (pontuação total) no grupo que recebeu

óleo essencial de lavanda comparado ao grupo veículo [$t(24) = 2.314$, $p < 0,05$]. Não foi observado efeito significativo nas pontuações individuais [todos $t(24)$ entre 1.889 e -0.31], mas foi observada uma tendência de redução ($p < 0.10$) no grupo óleo essencial de lavanda para as pontuações de abdução das patas traseiras, postura corporal abaixada e tremor.

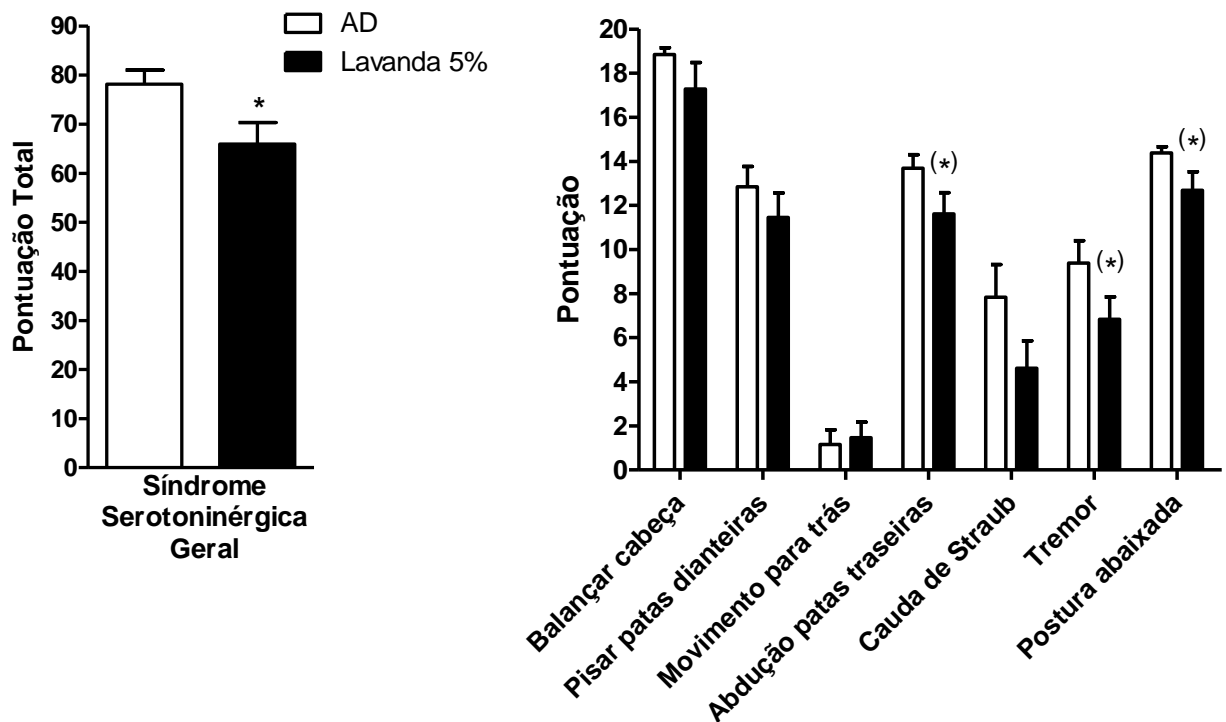


FIGURA 19 - Efeito da inalação do óleo essencial de lavanda 5% sobre a síndrome serotoninérgica induzida por 5-HTP+fluoxetina: pontuação para síndrome serotoninérgica geral (somatória dos comportamentos individuais; esquerda); pontuação dos comportamentos individuais (direita). Valores de média \pm EPM ($n = 13$ camundongo/grupo). * $p < 0,05$ e (*) $p < 0,10$ comparado ao controle (AD = água destilada).

4.3.2 Experimento VI: Influência do pré-tratamento com pindolol no efeito do óleo de essencial de lavanda e do 8-OH-DPAT sobre o comportamento de esconder esferas

ANOVA de uma via indicou que o tratamento exerceu efeito significativo [F(5, 62)=5,060, $p < 0,01$. Fig. 20]. O óleo essencial de lavanda e o 8-OH-DPAT reduziram o número de esferas escondidas quando comparados ao grupo controle (ambos $p < 0,02$). A redução no comportamento de esconder esferas do óleo essencial de lavanda e do 8-OH-DPAT foi bloqueado pelo pré-tratamento com pindolol, sendo assim, não foi encontrada diferença entre esses grupos e o grupo controle. O pindolol isoladamente não diferiu do controle.

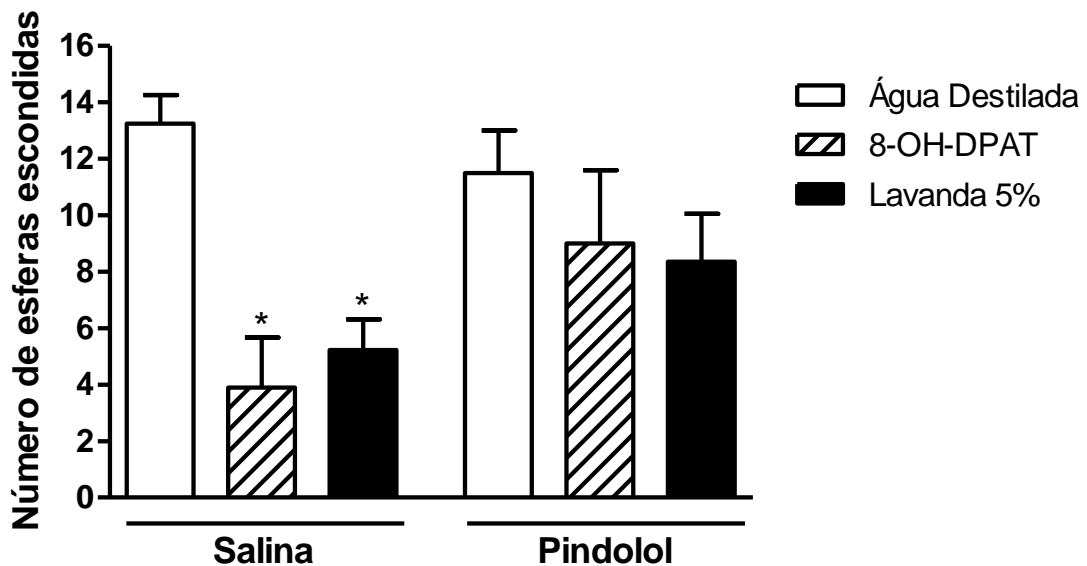


FIGURA 20 - Efeito do pré-tratamento com Pindolol (32 mg/kg, ip) sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda (5%, inalação) ou 8-OH-DPAT (3 mg/kg, ip) no teste de esconder esferas. Valores expressos como média \pm EPM do número de esferas escondidas (n=8-12 camundongos/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao controle (salina+ água destilada).

4.3.3 Experimento VII: Influência do pré-tratamento com WAY 100635 no efeito do óleo de essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas

ANOVA de uma via indicou que o tratamento exerceu efeito significativo [F(5,60)= 2.972; $p < 0.02$; Fig. 21]. Óleo essencial de lavanda e 8-OH-DPAT reduziram o número de esferas escondidas quando comparados ao grupo controle (ambos $p < 0,02$). A redução no comportamento de esconder esferas do óleo

essencial de lavanda e do 8-OH-DPAT foi bloqueado pelo pré-tratamento com WAY100635, sendo assim, não foi encontrada diferença entre esses grupos e o grupo controle (ambos $p > 0,10$). O WAY 100635 isoladamente não diferiu do controle.

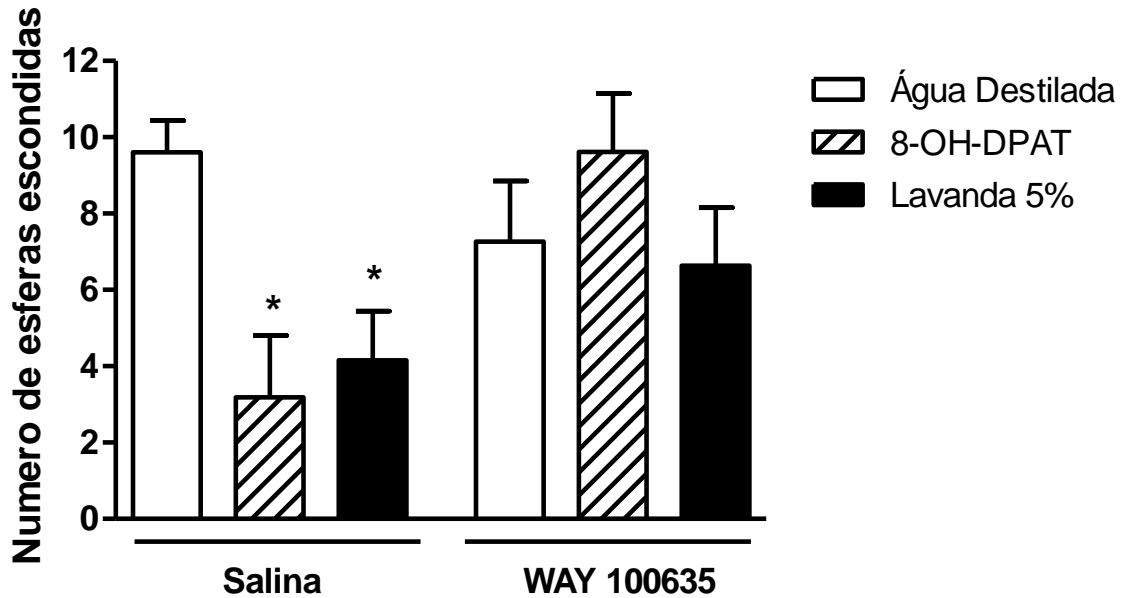


FIGURA 21 - Efeito do pré-tratamento com WAY 100635 (3 mg/kg, ip) sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda (5%, inalação) ou 8-OH-DPAT (3 mg/kg, ip) no teste de esconder esferas. Valores expressos como média \pm EPM do número de esferas escondidas (n=8-12 camundongos/ grupo). * $p < 0,05$ comparado ao controle (salina+ água destilada).

4.3.4 Experimento VIII: Efeito da coadministração de uma dose inefetiva de 8-OH-DPAT e óleo essencial de lavanda sobre o comportamento de esconder esferas.

ANOVA de uma via indicou que o tratamento induziu um efeito significativo [$F(3,33) = 6.510$; $p < 0.01$; Figura 22]. O óleo essencial de lavanda combinado a 8-OH-DPAT reduziu o número de esferas escondidas comparado a todos os outros grupos (todos $p < 0,02$). Por outro lado, isoladamente, tanto o óleo essencial de lavanda como o 8-OH-DPAT não diferiram do controle.

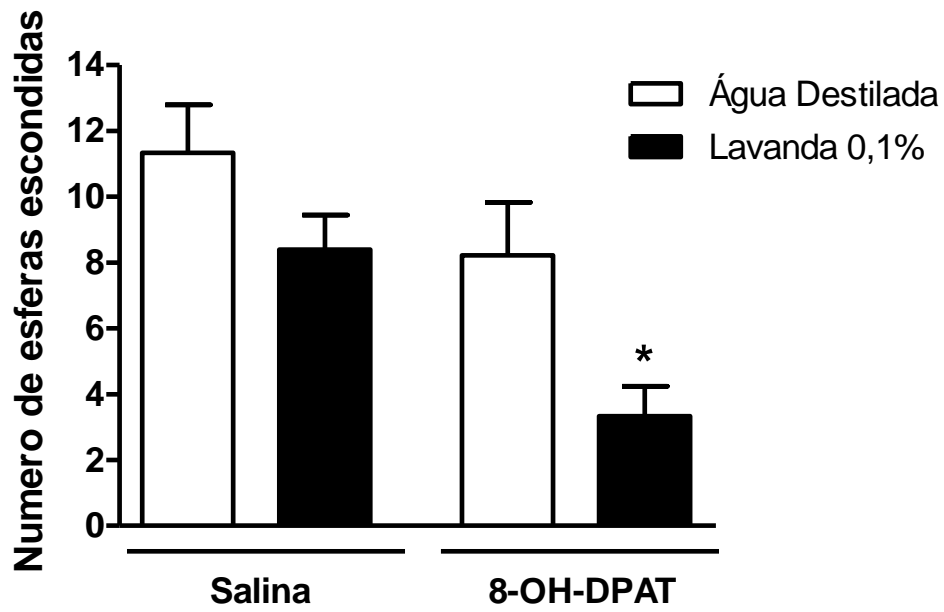


FIGURA 22 - Efeito da coadministração de 8-OH-DPAT (0,5 mg/kg, ip) e óleo essencial de lavanda 0,1% (inalado) sobre o comportamento de esconder esferas. Valores de média \pm EPM do número de esferas escondidas (n= 9-10). *p< 0,05 comparado ao controle (salina+ água destilada).

4.4 ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DE NEUROTRANSMISSÃO NITRINÉRGICA.

4.4.1 Experimento IX: Efeito da pré-administração de L-arginina no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.

ANOVA de uma via indicou efeito significativo do tratamento [$F(3,26) = 4,898$; $p < 0,001$]. Como demonstrado na figura 23, camundongos tratados com óleo essencial de lavanda 5% esconderam menos esferas quando comparado aos outros grupos (todos $p < 0,05$). L-arg, quando administrada sozinha, não alterou o comportamento de esconder esferas quando comparado ao controle ($p > 0,10$). O pré-tratamento com L-arg 200 mg/kg inibiu o efeito do óleo essencial de lavanda 5%, sendo assim, os camundongos que receberam a combinação de L-arg e óleo essencial de lavanda 5%, tiveram o número de esferas escondidas semelhante ao controle ($p > 0,10$) e maior que o grupo do óleo essencial de lavanda 5% sozinho ($p < 0,03$).

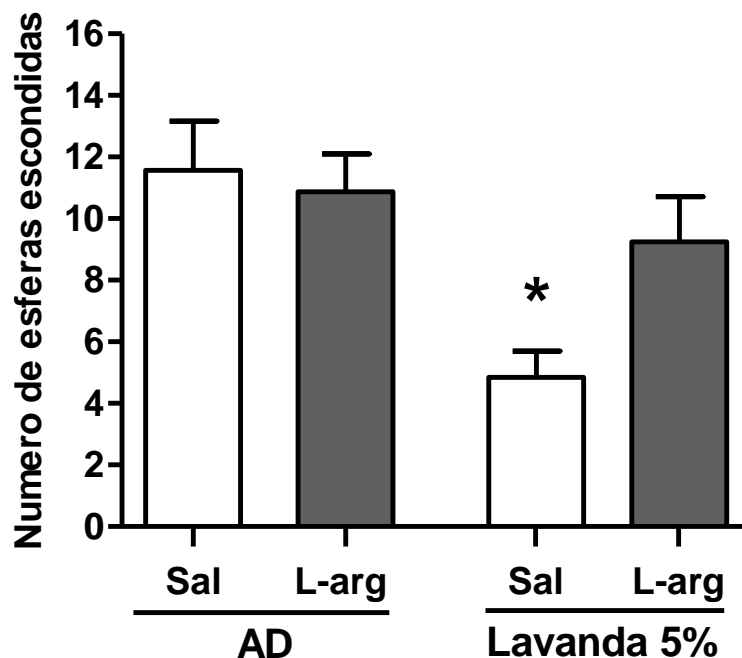


FIGURA 23 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina (L-arg 200 mg/kg, ip) sobre o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda 5% no teste de esconder esferas. Dados representam média \pm EPM do número de esferas escondidas ($n = 7-8$ / group). * $p < 0,05$ comparado a todos os outros grupos.

4.4.2 Experimento X: Efeito da administração conjunta de uma dose inefetiva de 7-NI e inalação de uma concentração inefetiva do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.

ANOVA indicou efeito significativo do tratamento [$F(3,27)= 5.197$; $p < 0.01$]. Como mostra a figura 24, óleo essencial de lavanda 0,1% e 7-NI 10 mg/kg sozinhos não reduziram o número de esferas escondidas comparados ao controle (ambos $p > 0,10$). A combinação de doses inefetivas de óleo essencial de lavanda (0,1%) e 7-NI (10 mg/kg) diminuiu o número de esferas escondidas comparado aos outros grupos (todos $p < 0,01$).

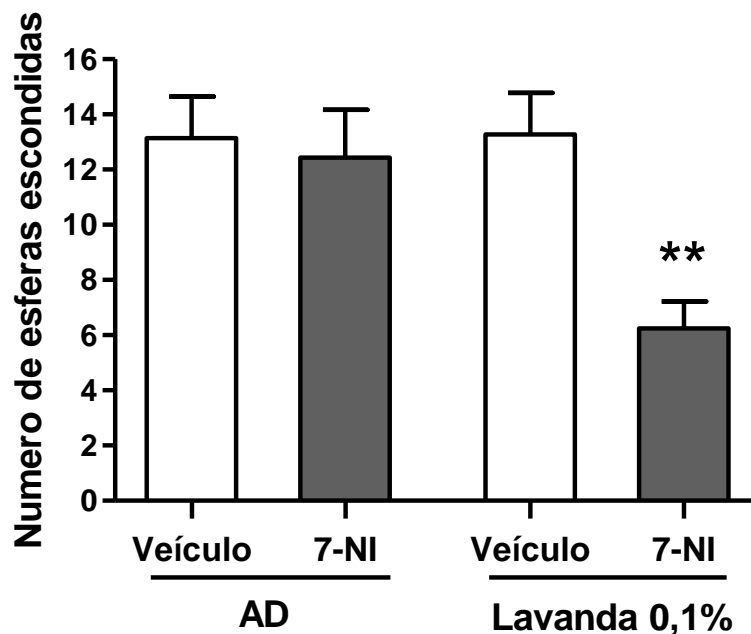


FIGURA 24 - Efeito da coadministração de 7-nitroindazol (7-NI) e óleo essencial de lavanda 0,1% no comportamento de esconder esferas. Dados expressos como média \pm EPM do número de esferas escondidas durante 20 min ($n = 7-9$ / grupo). ** $p < 0,01$ comparado a todos os outros grupos.

4.5 HISTOQUÍMICA PARA NADPH DIAFORASE (Experimento XI)

Resultados preliminares

Não houve diferença significativa no número células positivas para NADPH-d entre os grupos controle e óleo essencial de lavanda 5%, para as regiões do NDR dorsal [$t(7)= 0,25$; $p= 0,8$], e MCP dorsomedial [$t(8)= 2,08$; $p= 0,07$], como pode ser observado nas figuras 25 e 26.

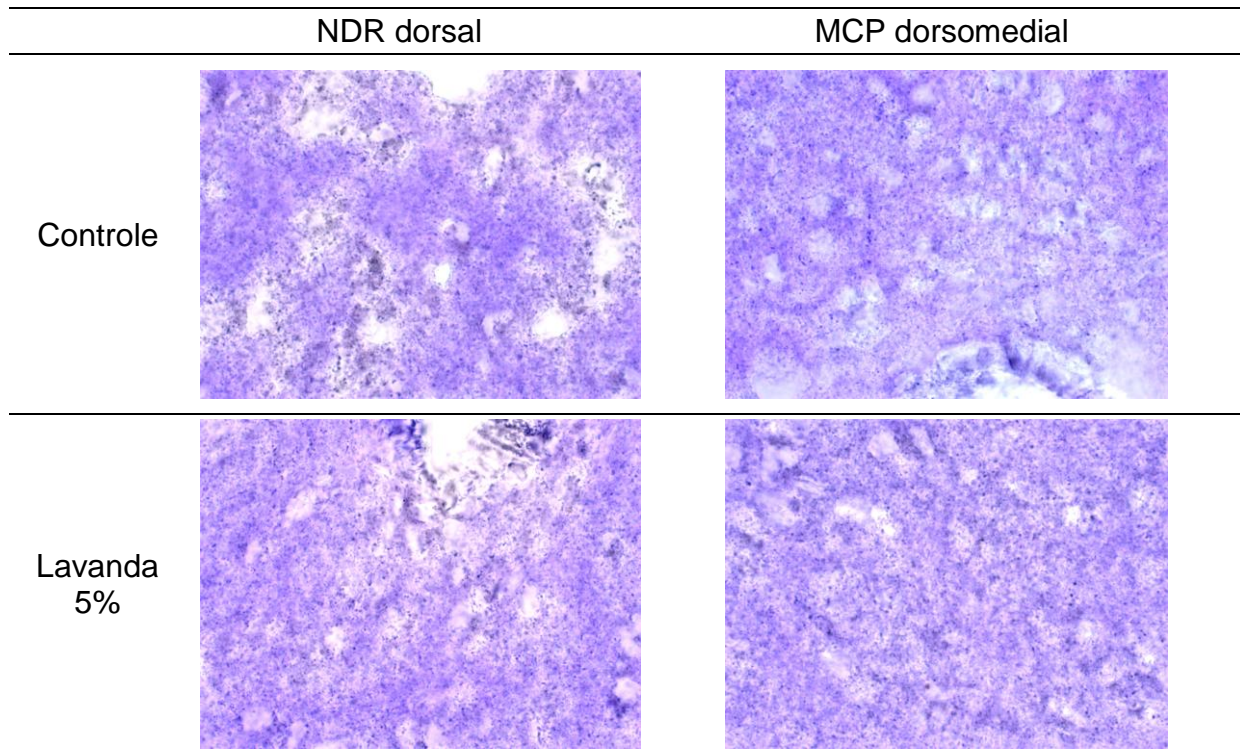


FIGURA 25 - Fotos da histoquímica para NADPH-d

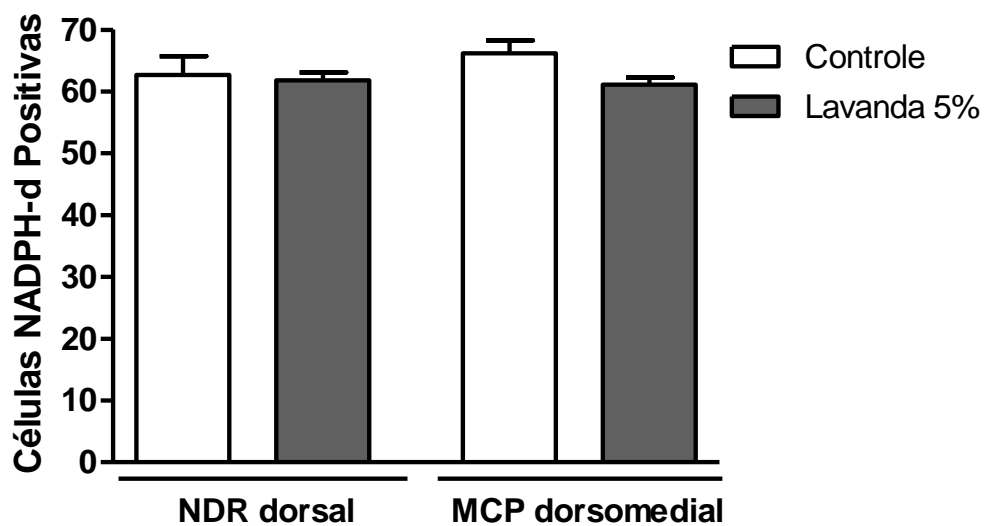


FIGURA 26 - Histoquímica para NADPH-d nas estruturas de núcleo dorsal da rafe (NDR), parte dorsal e matéria cinzenta periaquedutal (MCP) dorsomedial. Valores de média \pm EPM do número de células positivas para NADPH-d (n= 4-5/grupo).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

4.6.1 Experimento XIIIa: Caixa de movimentação

Não foi observada alteração significativa na atividade locomotora espontânea dos camundongos tratados com óleo essencial de lavanda 5% e as drogas serotoninérgicas e GABAérgicas usadas nesse trabalho comparadas ao grupo controle [$F(7, 58) = 1.9306$; $p = 0,08$].

Tabela 1.

Avaliação da atividade locomotora na caixa de movimentação (5 min).

Grupos	Cruzamentos
Controle	147 ± 14
Óleo essencial de lavanda 5%	158 ± 11
8-OH-DPAT 3 mg/kg	98 ± 22
8-OH-DPAT 0,5 mg/kg	116 ± 10
WAY100635 3 mg/kg	116 ± 12
Picrotoxin 0,5 mg/kg	151 ± 13
Diazepam 1 mg/kg	155 ± 23
Pindolol 32 mg/kg	131 ± 12

Dados representam a média ± EPM, n= 8-9/grupo

4.6.2 Experimento XIIIb: Campo aberto

Não foi observada diferença significativa na locomoção dos camundongos no campo aberto após tratamento com lavanda, 7-NI ou L-arg em comparação com o grupo controle. [$F(3, 32) = 2,6647$, $p = 0,06$]. n= 8-10/grupo

Tabela 2.

Avaliação da atividade locomotora no campo aberto durante 5 minutos.

Grupos	Cruzamentos
Controle	182 ± 9
Óleo essencial de lavanda 5%	168 ± 9
7-NI 10 mg/kg	177 ± 17
L-arginina 200 mg/kg	212 ± 8

Dados representam a média ± EPM do número de cruzamentos, n= 8-9/grupo

PARTE 2

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OLFATÓRIO PARA OBTENÇÃO
DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
LAVANDA.**

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a percepção do odor do óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*), quando inalado, é necessária para obtenção do seu efeito tipo ansiolítico, em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a indução de anosmia induzida pela administração intranasal da solução de gluconato de zinco e acetato de zinco.
- Observar o tempo de permanência da condição de anosmia.
- Avaliar se a condição de anosmia interfere com o comportamento de esconder esferas e com o comportamento locomotor dos camundongos.
- Investigar se a condição de anosmia interfere no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos adultos machos Swiss (30-40 g), em grupos de 10 animais por caixa (40 X 34 X 16 cm), foram mantidos em condições controladas de temperatura 21 ± 1 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00h), comida e água à vontade. Três dias antes do teste de discriminação olfatória, os animais foram isolados em caixas menores (28 X 17 X 12 cm).

O protocolo experimental aplicado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, protocolo número 532 (ANEXO 3), e realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA).

3.2 DROGAS E TRATAMENTOS

3.2.1 Administração Intranasal da solução de Gluconato de Zinco e Acetato de Zinco

Solução de gluconato de zinco e acetato de zinco foi obtida do produto Zicam® Oral Mist (Matrixx Initiatives, Inc, Scottsdale, USA), comercializado nos EUA e Europa para aliviar os sintomas da gripe. Na administração intranasal, os camundongos foram previamente anestesiados com xilazina (7.5 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg) intraperitonealmente, e então 30 µl da solução de gluconato de zinco e acetato de zinco ou salina (controle) foi cuidadosamente administrado em cada cavidade nasal com o auxílio de uma seringa Hamilton conectada a uma agulha gengival de ponta romba através de um tubo de polietileno. A agulha foi inserida 3 mm dentro da cavidade nasal para ajudar no processo de irrigação da cavidade nasal. O procedimento foi realizado primeiro na narina direita e após um intervalo de 3 a 5 minutos foi repetido da narina esquerda.

Durante a respiração normal do camundongo, parte da solução foi expelida através das narinas, o que foi prontamente absorvido com auxílio de papel absorvente, para evitar com que o animal tivesse dificuldade em respirar (LIM *et al.*, 2009; McBRIDE *et al.*, 2003; SLOTNICK *et al.*, 2010).

3.2.2 Inalação do óleo essencial de lavanda

O óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Phytoterápica, São Paulo, Brasil) foi diluído em propilenoglicol para obtenção das concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,0% (v/v), minutos antes dos experimentos. Água destilada foi usada como controle.

Cada camundongo, dentro da sua própria caixa moradia pequena (28 X 17 X 12 cm), foi colocado dentro de um recipiente plástico com tampa (32 X 24 X 32 cm). O óleo essencial de lavanda ou água destilada foi depositado, no volume de 1ml, sobre um pedaço de algodão (0,7 a 0,8 g) colocado dentro do recipiente plástico. Os camundongos foram submetidos a 15 minutos de inalação nas caixas, na sequência foram realizados os testes comportamentais. Cada algodão foi usado apenas 1 vez e renovado para cada animal.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Discriminação olfatória

O teste de discriminação olfatória foi realizado usando uma adaptação do método descrito por Prediger *et al.* (2010). Primeiramente os camundongos foram isolados por 3 dias. No dia do teste, os animais foram transferidos para outra caixa, idêntica a caixa moradia pequena (28 X 17 X 12 cm), a qual foi dividida, por acrílico transparente, em duas áreas iguais que se comunicavam por uma porta (Figura 27). Durante 5 minutos de habituação, a caixa continha apenas o cepilho que o próprio animal tinha usado por 3 dias. Após esse período, em um dos lados o cepilho do próprio animal (lado familiar) foi substituído por cepilho usado por outro camundongo (lado não familiar), e nos próximos 5 minutos foi registrado o tempo gasto em cada um dos lados da caixa.



FIGURA 27 - Caixa para o teste de discriminação olfatória.
FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3.2 Campo Aberto

O campo aberto usado para avaliar a atividade locomotora constituiu de uma caixa de polietileno (40 X 34 X 16 cm), a mesma usada como caixa moradia. A base foi dividida em 24 quadrados (Figura 28). Cada camundongo foi colocado individualmente no centro da arena e o número de quadrados cruzados, com as 4 patas, foi registrado durante 5 minutos. Álcool 10% foi usado para a limpeza do campo aberto entre animais.

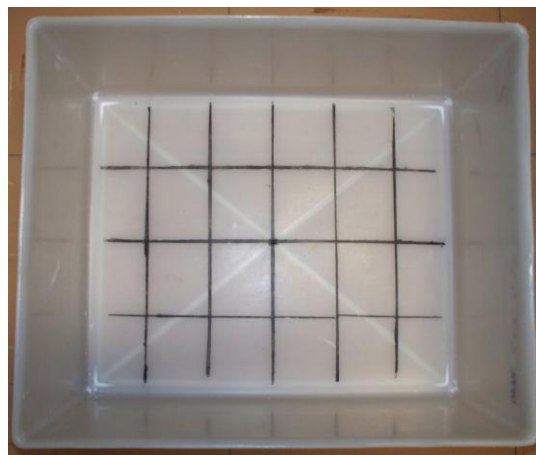


FIGURA 28 - Campo aberto
FONTE: Lea Chioca (2012)

3.3.3 Teste de esconder esferas

Os camundongos foram colocados individualmente no centro de uma caixa de polietileno (40 X 34 X 16 cm), a mesma usada como caixa moradia, contendo 24 esferas de vidro (15 mm de diâmetro) uniformemente distribuídas pela periferia da caixa (5 cm das paredes) sobre 5 cm de cepilho (Figura 3). Após 20 minutos, o camundongo foi removido da caixa e o número de esferas, pelo menos 2/3, cobertas por cepilhos foram contadas. A caixa e o cepilho foram trocados e as esferas de vidro lavadas em álcool 10% entre animais, para reduzir a interferência do cheiro do animal anteriormente testado (HAYASHI *et al.*, 2010; KRASS *et al.*, 2010).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Primeiramente, o teste de discriminação olfatório foi realizado nos dias 2, 5, 8, 11, 15, 20 e 26 após a administração de salina ou a solução de gluconato de zinco e acetato de zinco (solução de zinco), (n= 7-9 camundongo/grupo), para avaliar a duração do prejuízo olfatório, que levou a perda do olfato, ou anosmia (Fig. 29, experimento 1).

A próxima etapa foi avaliar a influencia da anosmia sobre o efeito ansiolítico da lavanda. Um grupo diferente de camundongos foi tratado com a solução de zinco ou salina, e o teste de discriminação olfatória foi realizado 7 dias após o tratamento, para confirmar a perda da habilidade em diferenciar os lados da caixa teste (n=44 camundongo/ grupo). Dentre esses animais, um subgrupo (n= 16 camundongo/grupo) foi testado no campo aberto imediatamente após o teste de discriminação olfatória, com o objetivo de avaliar o efeito da anosmia sobre a locomoção dos animais. No dia seguinte, os animais que receberam salina ou a solução zinco, foram tratados com o óleo essencial de lavanda (0,5 - 2,5 - 5,0%) ou água destilada (AD) e imediatamente após 15 min. de inalação foram submetidos ao teste de esconder esferas (Fig. 29, experimento 2; n=11 camundongo/ grupo).

Um terceiro grupo de camundongos foi testado no campo aberto, 15 minutos após a inalação do óleo essencial de lavanda, nas concentrações de 2,5% e 5%, salina e diazepam (3 mg/kg) foram usados como controles (n= 8 camundongos/grupo).

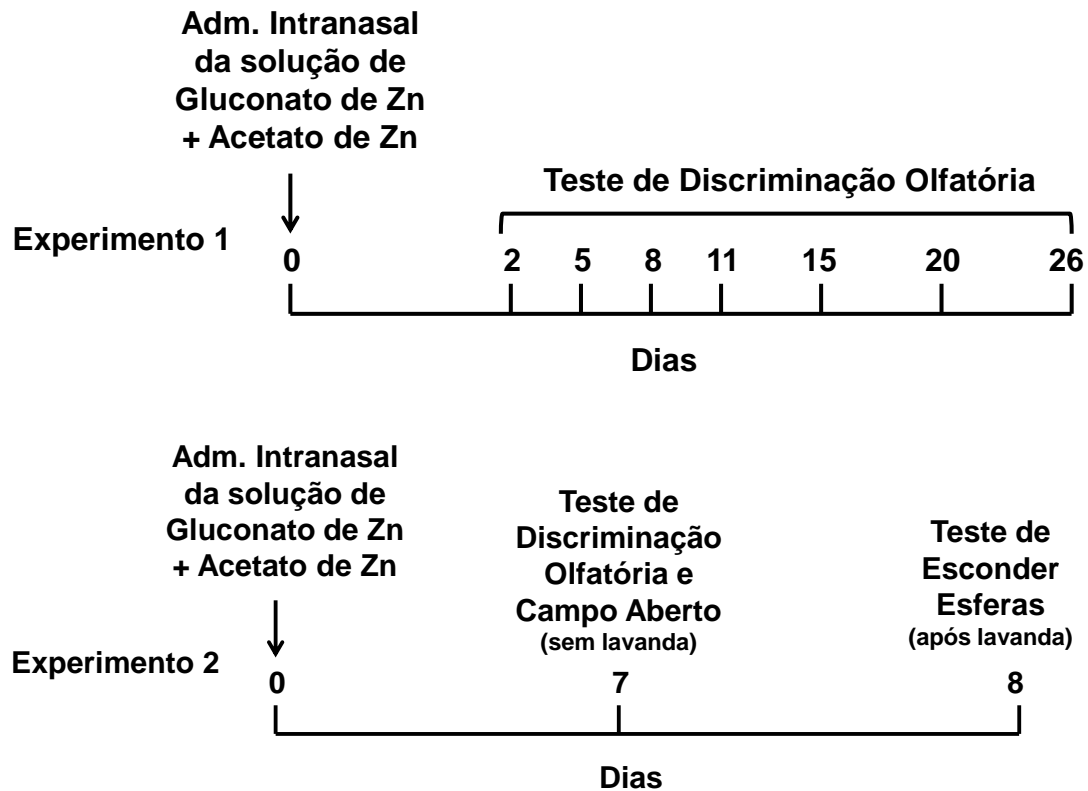


FIGURA 29 - Desenho Experimental do Experimento 1 (avaliação da indução de anosmia) e do Experimento 2 (influência da anosmia no efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda)

EXPERIMENTO 1: Efeito da irrigação intranasal com 30 µl da solução de zinco ou salina em cada narina. Os camundongos foram mantidos isolados durante o período do teste de discriminação olfatória que foi realizado nos dias 2, 5, 8, 11, 15, 20 e 26.

EXPERIMENTO 2: Em outro grupo de camundongos foi feita a irrigação intranasal com a solução de zinco ou salina, e após 7 dias de intervalo foram realizados os testes de discriminação olfatória (com todos os camundongos que receberam o tratamento intranasal) e em seguida o teste do campo aberto (apenas com um subgrupo de camundongos que receberam o tratamento intranasal). No dia seguinte os camundongos foram submetidos ao teste de esconder esferas após a inalação do óleo essencial de lavanda ou água destilada.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de discriminação olfatória foi analisado pelo teste t de Student para amostras dependentes comparando o tempo gasto em cada lado da caixa.

Os dados do campo aberto foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Duncan, ou o teste t de Student para amostras independentes.

Os dados do teste de esconder esferas foram analisados pela ANOVA de duas vias, tendo como fatores a anosmia e a inalação, seguida do teste de Duncan. Foi considerada diferença estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Valores são expressos como média \pm EPM.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA IRRIGAÇÃO INTRANASAL COM A SOLUÇÃO DE ZINCO SOBRE A DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA DURANTE 26 DIAS

Como mostra a figura 30, os camundongos do grupo salina apresentaram preferência pelo compartimento com o cepilho usado por outro camundongo (lado não familiar) em todos os dias testados [t(6) entre -2,93 e -10,60; todos $p < 0,03$]. A administração intranasal da solução de zinco prejudicou a discriminação olfatória, visto que os camundongos tratados não mostraram preferência por nenhum lado nos dias 2, 5, 8, 11, 15, 20 e 26 após o tratamento [t(8) entre -2,22 e 1,11; todos $p > 0,05$].

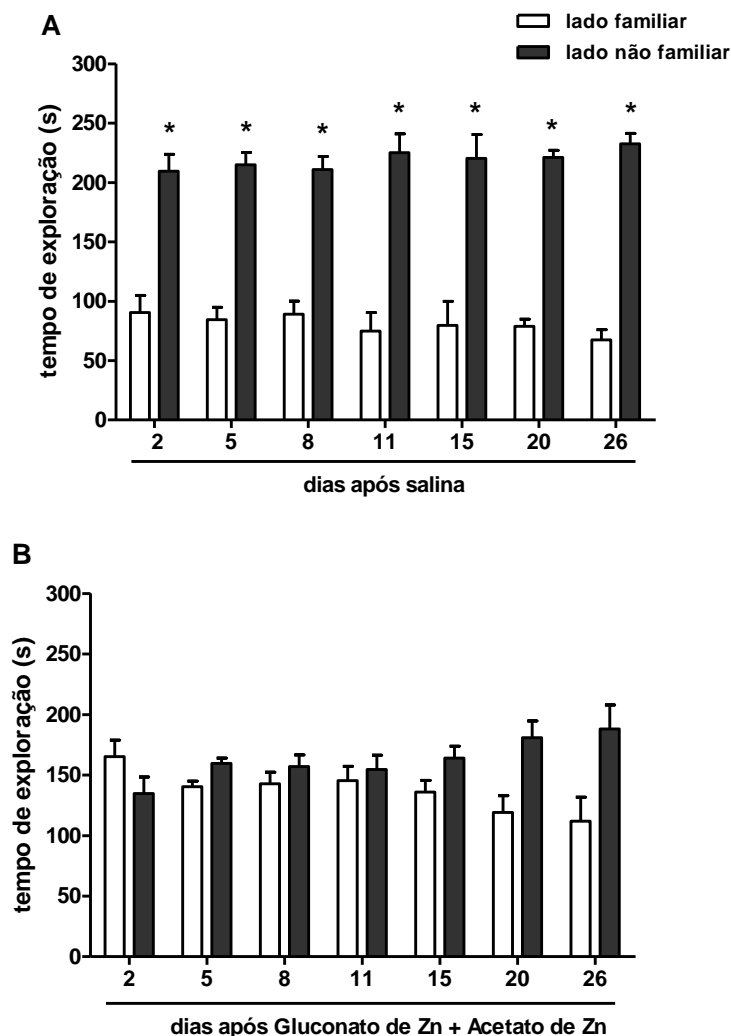


FIGURA 30 - Efeito da solução zinco sobre o teste de discriminação olfatória durante 26 dias. Dados representam média \pm EPM ($n = 7-9$ camundongo/ grupo) do tempo gasto (s) no lado com o cepilho familiar e o lado com cepilho (não familiar) durante 5 min. * $p < 0,05$ comparado com o lado familiar.

4.2 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DA ANOSMIA SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA

4.2.1 Teste de Discriminação olfatória 7 dias após o tratamento com a solução de zinco

Como mostra a figura 31, nos animais tratados com salina houve uma diferença significativa entre o tempo gasto no lado familiar e não familiar da caixa teste [$t(43) = 16.103$, $p < 0.0001$]. Por outro lado, como visto no experimento 1, a irrigação nasal com a solução de zinco aboliu essa diferença [$t(43) = -0.981$, NS]. (n= 44 camundongos/grupo).

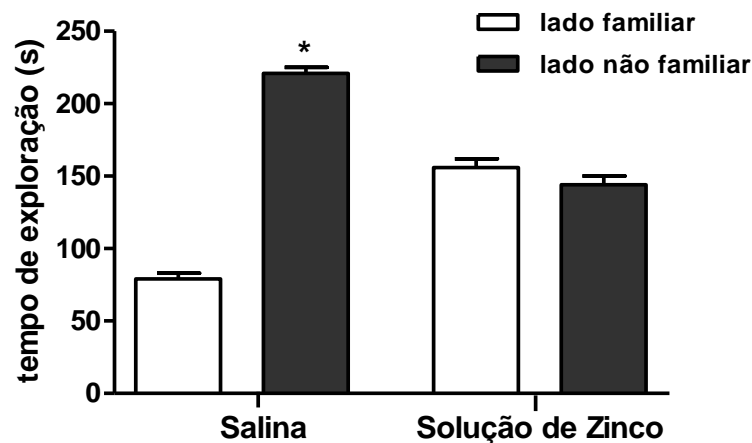


FIGURA 31 - Efeito da solução de zinco sobre o teste de discriminação olfatória 7 dias após o tratamento. Dados representam média \pm EPM do tempo gasto (s) no lado da caixa teste com o cepilho familiar e não familiar durante 5 min (n= 44 camundongo/ grupo). * $p < 0,05$ comparado com o lado familiar.

4.2.2 Avaliação da atividade locomotora no campo aberto dos animais tratados com a solução de Zinco

Não foi observado efeito significativo da solução de zinco sobre a locomoção, 7 dias após sua administração [$t(30) = 0,59$ NS]. O número de cruzamentos no campo aberto para o grupo salina foi de 179 ± 13 , e para o grupo solução de gluconato de zinco mais acetato de zinco foi de 168 ± 13 (média \pm EPM; n=16/grupo).

4.2.3 Teste de Esconder Esferas

ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da lavanda [$F(3,80) = 215.94, p < 0,001$], mas não significativo da solução de zinco [$F(1,80) = 5.737, NS$], e não foi observada interação entre os fatores [$F(3,80) = 3.924, NS$]. Como mostra a figura 32, o óleo essencial de lavanda, nas concentrações de 2,5% e 5,0%, reduziu o número de esferas escondidas em comparação aos grupos água destilada e lavanda 0,5% (todos $p < 0,05$), independentemente da irrigação intranasal com salina ou solução de zinco.

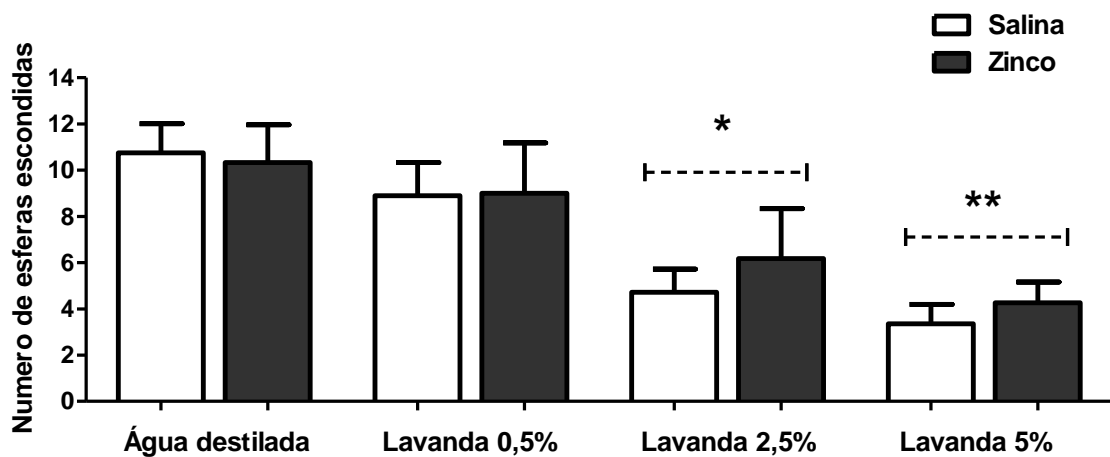


FIGURA 32 - Efeito irrigação nasal com a solução de zinco sobre o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no teste de esconder esferas. Dados representam média \pm EPM do número de esferas escondidas durante 20 minutos ($n=11$ camundongo/ grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle (água destilada) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan).

4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA SOBRE O COMPORTAMENTO LOCOMOTOR NO CAMPO ABERTO

Foi observado efeito significativo do tratamento sobre o número de cruzamentos no campo aberto [$F(3,28)=23,008, p < 0,0001$]. Diazepam (3 mg/kg) reduziu a atividade locomotora quando comparado a todos os outros grupos (todos $p < 0,001$). Óleo essencial de lavanda (2,5 e 5,0%) não mostrou alteração em relação ao controle salina mais água destilada (todos $p > 0,1$). Esses camundongos testados no campo aberto não receberam tratamento intranasal de salina ou solução de zinco.

Tabela 3. Avaliação da atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto

Grupos	Cruzamentos
Controle (inalação de AD)	186 ± 12
Inalação de Lavanda 2,5%	160 ± 14
Inalação de Lavanda 5,0%	187 ± 11
Diazepam (3 mg/kg i.p.)	73 ± 7*

Dados representam a média ± EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos, n= 8-10/grupo.

*p<0,05 comparado ao grupo controle

5 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudos foram as observações da participação da neurotransmissão serotoninérgica e nitrinérgica no efeito tipo ansiolítico da inalação óleo essencial de lavanda. Por outro lado, a neurotransmissão GABA-A/benzodiazepínica parece não participar deste efeito do óleo essencial de lavanda. Ainda a anosmia induzida pela solução de gluconato de zinco mais acetato de zinco não prejudicou o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda, sugerindo que a percepção do odor também não contribui para este efeito.

O teste de esconder esferas vem sendo usado como uma boa ferramenta para triagem de drogas com potencial efeito tipo ansiolítico (CRYAN e SWEENEY, 2011; NICOLAS *et al.*, 2006, HAYASHI *et al.*, 2010). Nesse teste, camundongos cavam o cepilho e escondem inofensivas esferas de vidro, um comportamento incondicionado, e drogas com efeito tipo ansiolítico diminuem o comportamento de esconder esferas em doses que não alteram a atividade locomotora (BARETTA *et al.*, 2012; BORSINI *et al.*, 2002; NICOLAS *et al.*, 2006; NJUNG'E e HANDLEY, 1991a,b). Drogas com diferentes mecanismos farmacológicos, clinicamente usadas para o tratamento de ansiedade, como os benzodiazepínicos e antidepressivos (inibidores seletivos da recaptção de serotonina, inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina e antidepressivos tricíclicos), após tratamento agudo, demonstram perfil tipo ansiolítico nesse teste, reduzindo o número de esferas escondidas pelos camundongos, sem causar alteração locomotora (ICHIMARU *et al.*, 1995; HAYASHI *et al.*, 2010; MILLAN *et al.*, 2001; NICOLAS *et al.*, 2006). Embora esse teste possa também responder a drogas antipsicóticas, as doses necessárias para inibir o comportamento de esconder esferas também causa prejuízo locomotor (NICOLAS *et al.*, 2006; HAYASHI *et al.*, 2010; UMATHE *et al.*, 2009).

No presente estudo, o óleo essencial de lavanda reduziu significativamente o comportamento de esconder esferas em concentração que não alterou a atividade locomotora no campo aberto, o que indicou um perfil tipo ansiolítico.

Apesar da boa validade preditiva do teste de esconder esferas para drogas tipo ansiolíticas (CRYAN e SWEENEY, 2011; NJUNG'E e HANDLEY, 1991a, 1991b), é recomendado o uso de mais de um modelo animal de ansiedade para

evitar resultados falsos positivos. Considerando que o teste do labirinto em cruz elevado é um dos modelos mais usados para o estudo de drogas com efeitos sobre comportamentos relacionados à ansiedade, ele foi usado para confirmar o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda observado no teste de esconder esferas. De fato, o óleo essencial de lavanda 5% causou aumento da exploração dos braços abertos (% de tempo gasto nos braços aberto e % de entradas nos braços abertos), os quais são considerados a parte aversiva do labirinto em cruz elevado (DALVI e RODGERS, 1996), corroborando o comportamento tipo ansiolítico previamente observado no teste de esconder esferas. Não houve alteração locomotora nos camundongos tratados com óleo essencial de lavanda 5% e submetidos ao labirinto em cruz elevado, já que o número de entradas nos braços fechados foi similar ao grupo controle. Essa observação consiste com o resultado do campo aberto, o qual também mostrou a ausência de efeito do óleo essencial de lavanda 5% sobre a atividade locomotora.

Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que indicaram o efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda em estudos clínicos e pré-clínicos (BRADLEY *et al.*, 2007; KRITSIDIMA *et al.*, 2010; LEHRNER *et al.*, 2005; LINCK *et al.*, 2010; TSANG e HO, 2010). Entretanto, seu mecanismo farmacológico ainda não foi completamente entendido.

Nessa linha, o presente estudo avaliou o possível envolvimento dos sistemas GABAérgico, serotoninérgico e nitrinérgico no mecanismo de ação farmacológico do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda.

Levando em consideração que o padrão comportamental observado nos camundongos tratados com óleo essencial de lavanda, submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado, foi similar ao padrão observado em roedores tratados com benzodiazepínicos (DALVI e RODGERS, 1996), e que trabalhos anteriores sugeriram uma mediação do sistema GABAérgico na modulação do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda (AOSHIMA e HAMAMOTO, 1999; TSANG e HO, 2010; WORONUK *et al.*, 2011), se tornou relevante tentar identificar o papel dessa via de sinalização.

Em modelos animais de ansiedade, drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, são usadas como ferramentas farmacológicas de validação (p.ex. ALMEIDA *et al.*, 2004; CRYAN e SWEENEY, 2011; NICOLAS *et al.*, 2006; LISTER, 1987), e antagonistas GABA-A (como a picrotoxina ou a bicuculina) e antagonistas

benzodiazepínicos (como flumazenil) são usados para avaliar a mediação GABA/BZD de drogas com efeito tipo ansiolítico (p.ex. BARETTA *et al.*, 2012; DOMBROWSKI *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2008).

No presente trabalho, com o propósito de investigar o envolvimento da via GABAérgica, camundongos foram tratados com picrotoxina, um antagonista GABA-A, com uma dose silenciosa (ou seja, que isoladamente não altera o comportamento de esconder esferas ou a locomoção) que bloqueou o efeito ansiolítico do diazepam. Esse fato foi observado no teste de esconder esferas, já que o grupo de camundongos que recebeu a combinação de picrotoxina e diazepam teve o comportamento de esconder esferas semelhante ao grupo controle. Por outro lado, o pré-tratamento com picrotoxina não interferiu no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda. Esse resultado está de acordo com o resultado negativo do ensaio de binding benzodiazepínico, o qual mostrou que o óleo essencial de lavanda não competiu com o flunitrazepam pelo sítio de ligação benzodiazepínico do receptor GABA-A. Ainda, esses resultados corroboram com a observação de que o linalol não apresentou efeito sobre a ligação do [³H]muscimol (agonista GABA-A) em membranas corticais de camundongo (SILVA BRUM *et al.*, 2001a), e também é coerente com a observação de que a inalação do óleo essencial de lavanda e a administração intraperitoneal de clordiazepóxido provocaram reversão do aumento da expressão de c-fos provocada pelo campo aberto em poucas regiões encefálicas coincidentes (SHAW *et al.*, 2011). Portanto, o presente estudo sugere que o efeito tipo ansiolítico exercido pelo óleo essencial de lavanda provavelmente não envolva uma mediação do receptor GABA-A/BZD.

A serotonina é outro neurotransmissor frequentemente associado com ansiedade e drogas ansiolíticas. O sistema serotoninérgico possui uma grande variedade de receptores, dentre eles, o receptor 5-HT_{1A} tem sido o mais relacionado com a modulação de comportamentos relacionados à ansiedade (AKIMOVA *et al.*, 2010). Seu importante papel na ansiedade tem sido demonstrado pela buspirona, um agonista parcial 5-HT_{1A}, que é clinicamente efetivo no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (KOEN e STEIN, 2011). Além disso, estudos pré-clínicos tem demonstrado que agonistas 5-HT_{1A} exibiram efeito tipo ansiolítico em modelos animais, enquanto que antagonistas 5-HT_{1A} bloquearam o efeito tipo ansiolítico de algumas drogas, como o canabidiol (AKIMOVA *et al.*, 2010; CAMPOS e GUIMARÃES, 2008). O receptor 5-HT_{1A} é um receptor inibitório

(inibição da adenilato ciclase e abertura de canal de K^+) que pode ser localizado nas terminações das inervações serotoninérgicas, pós-sinápticamente, principalmente nas regiões límbicas e corticais, mas também é encontrado pré-sinápticamente, em alta densidade, nos corpos dos neurônios serotoninérgicos, na região do núcleo medial e dorsal da rafe. No último caso, o receptor 5-HT_{1A} atua como autorreceptor inibitório, modulando a atividade dos neurônios serotoninérgicos através de uma retroalimentação negativa (AKIMOVA *et al.*, 2010; OHNO, 2010). Nessa linha, o presente trabalho também avaliou o envolvimento dessa via de transmissão serotoninérgica no mecanismo do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda.

Também foi observado que assim como a inalação do óleo essencial de lavanda, a administração sistêmica de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A}, reduziu o número de esferas escondidas em doses que não afetaram a atividade locomotora dos animais. Ainda, a mesma dose silenciosa de WAY100635 foi capaz de reverter o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda e do 8-OH-DPAT no teste de esconder esferas. Esses resultados reafirmam o importante papel dos receptores 5-HT_{1A} no bloqueio do comportamento de esconder esferas, como sugerido pela inibição do efeito tipo ansiolítico da fluvoxamina, paroxetina, canabidiol e 8-OH-DPAT por antagonistas 5-HT_{1A} (CAMPOS e GUIMARÃES, 2008; CASAROTTO *et al.*, 2010; EGASHIRA *et al.*, 2008; ICHIMARU *et al.*, 1995; MATSUHITA *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o resultado observado da redução da síndrome serotoninérgica pela inalação do óleo essencial de lavanda poderia estar relacionado à ativação do receptor 5-HT_{1A} pré-sináptico, o qual exerce atividade de autorreceptor inibitório, visto que a participação do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, no aumento da síndrome serotoninérgica tem sido relacionada à sua atuação nos receptores pós-sinápticos (FOX *et al.*, 2008). Outra possibilidade seria uma atividade agonista parcial nos receptores 5-HT_{1A}.

Logo, esses resultados sugerem que o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda no comportamento de esconder esferas pode estar relacionado à neurotransmissão serotoninérgica, provavelmente pela mediação do receptor 5-HT_{1A}.

Entretanto, o efeito ansiolítico da ativação dos receptores 5-HT_{1A} poderia estar relacionado à supressão na síntese de óxido nítrico (NO) no encéfalo (DHIR e KULKARNI, 2011). Zhang *et al.* (2010), demonstraram que o receptor 5-HT_{1A}

modula a expressão da NOS neuronal (nNOS) hipocampal, já que 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) apresentou uma regulação negativa na expressão da nNOS no hipocampo, enquanto que o antagonista 5-HT_{1A}, NAN-190, aumentou a expressão da nNOS no hipocampo, e o seu efeito ansiogênico, observado no teste de neofobia alimentar, foi revertido pela administração de 7-NI (inibidor da NOS neuronal).

Ainda, Harkin *et al.* (2003), sugeriram uma interação entre NO e 5-HT, já que a depleção de 5-HT reverteu o efeito tipo antidepressivo de inibidores da NOS testados na natação forçada. Além disso, Zhang *et al.* (2010), também demonstraram que o tratamento com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de 5-HT) diminuiu a expressão da nNOS no hipocampo.

O óxido nítrico é um gás instável produzido a partir do aminoácido L-arginina (L-arg) pelas famílias das enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS). Dentre as isoformas de NOS, a principal encontrada nas células neuronais do encéfalo é a NOS neuronal, a qual é uma isoforma constitutiva, dependente de cálcio/calmodulina, que necessita do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e Ca²⁺ como cofatores (CALABRESE *et al.*, 2007; DHIR e KULKARNI, 2011; ESPLUGUES, 2002).

Tem sido relatada a participação da neurotransmissão nitrinérgica na regulação de comportamentos como a ansiedade (KRASS *et al.*, 2010; VOLKE *et al.*, 1995, 1997; YILDIZ *et al.*, 2000; BARETTA *et al.*, 2001; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2007; SPIACCI *et al.*, 2008; UMATHE *et al.*, 2009) e a depressão (HARKIN *et al.*, 1999; VOLKE *et al.*, 2003; SPIACCI *et al.*, 2008).

NO tem sido relacionado com a modulação de neurotransmissores como serotonina e glutamato (ESPLUGUES, 2002; CALABRESE *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2011). A L-arginina, precursora do NO, tem sido usada para avaliar a mediação nitrinérgica no efeito de drogas. Por exemplo, foi demonstrado que a L-arg reverteu o efeito tipo ansiolítico de antidepressivos no teste de esconder esferas (KRASS *et al.*, 2010; UMATHE *et al.*, 2009).

O teste de esconder esferas, além de ser sensível a benzodiazepínicos e antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (NJUNG'E e HANDLEY, 1991b; NICOLAS *et al.*, 2006; CRYAN e SWEENEY 2011), também é sensível a drogas nitrinérgicas, visto que inibidores da NOS (p.ex. 7-NI, um inibidor relativamente seletivo para a NOS neuronal) induziu um efeito tipo ansiolítico nesse teste (UMATHE *et al.*, 2009; KRASS *et al.*, 2009). Além disso, o pré-tratamento com

L-arginina, o precursor do NO, bloqueou o efeito de redução no comportamento de esconder esferas de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (p.ex. citalopram, paroxetina), indicando uma mediação nitrinérgica no efeito dessas drogas (UMATHE *et al.*, 2009; KRASS *et al.*, 2010).

No presente estudo, o pré-tratamento com L-arginina, em dose que não interferiu com o comportamento de esconder esferas, preveniu o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda nesse teste.

O inibidor da NOS neuronal, 7-NI, que apresenta efeito tipo ansiolítico em modelos animais (YILDIZ *et al.*, 2000; VOLKE *et al.*, 1997; SPOLIDÓRIO *et al.*, 2007), em doses entre 20-40 mg/kg reduziu o número de esferas escondidas sem causar alteração locomotora (UMATHE *et al.*, 2009). No presente trabalho, quando 10 mg/kg de 7-NI e 0,1% de óleo essencial de lavanda foram administrados separadamente, não foi observada alteração no comportamento de esconder esferas, mas a administração em combinação dessas doses não efetivas de 7-NI e óleo essencial de lavanda resultou em inibição do comportamento de esconder esferas. Isso parece indicar uma potencialização do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda pelo 7-NI.

De uma maneira geral, esses resultados sugerem a participação da via nitrinérgica no efeito do óleo essencial de lavanda. Esse resultado é corroborado pela observação de que o linalol inibiu a formação de NO em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (PEANA *et al.*, 2005).

A histoquímica para atividade da NADPH-d pode ser usada para identificar os neurônios que contêm NO sintase. Estudos demonstraram colocalização de neurônios positivos para NADPH-d e NOS neuronal, sendo assim, a ativação de NADPH pode estar relacionada à atividade da NOS neuronal (MATSUMOTO *et al.*, 1993; ESPLUGUES, 2002; OKERE e WATERHOUSE 2006).

No presente estudo essa técnica foi aplicada para as regiões do núcleo dorsal da rafe (NDR) e da matéria cinzenta periaquedutal (MCP). Essas estruturas foram selecionadas por exercerem modulação sobre a ansiedade (GRAEFF e ZANGROSSI, 2010; MARTIN *et al.*, 2010). A região da rafe apresenta a maior concentração dos corpos dos neurônios serotoninérgicos no encéfalo, logo, a maior concentração dos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos (MARTIN *et al.*, 2010), ainda, neurônios no NDR apresentam colocalização para 5-HT e NOS neuronal (WANG *et al.*, 1995). Segundo a teoria do papel dual da serotonina sobre a ansiedade, a

ativação de receptores serotoninérgicos na MCP causaria uma inibição da resposta defensiva ao um perigo próximo, que estaria relacionada à inibição do pânico, enquanto que a ativação de receptores serotoninérgicos no córtex pré-frontal e na amígdala facilitaria a resposta defensiva a uma ameaça distante, relacionada ao aumento da ansiedade (GRAEFF, 2002; GRAEFF e ZANGROSSI, 2010).

Além disso, estudos demonstraram a presença de NADPH e NOS neuronal em neurônios do núcleo dorsal da rafe, assim como colocalização da nNOS e da 5-HT, sugerindo a participação do NO na função do NDR e da serotonina sobre comportamentos, como por exemplo, ansiedade, estresse e medo (WANG *et al.*, 1995; GRAHN *et al.*, 2000; VASUDEVA *et al.*, 2011). Observações semelhantes foram feitas em estudos anteriores que demonstraram que inibidores da NOS neuronal administrados na região da matéria cinzenta periaquedutal apresentaram efeito ansiolítico em testes comportamentais (CALIXTO *et al.*, 2008; TONETTO *et al.*, 2009), e que ratos que passaram pelo estresse de contenção apresentam maior número de células positivas para NADPH-d na região da MCP dorsolateral quando comparados aos animais que não passaram pela situação aguda de estresse (SMALLS e OKERE, 2012).

Pelos resultados comportamentais, indicando a influência da L-arg e do 7-NI sobre o efeito do óleo essencial de lavanda, era esperado que a marcação do NADPH-d fosse diminuída, porém não houve diferença entre os grupos controle e óleo essencial de lavanda 5%. Isso pode ser devido ao fato de que essa técnica não marca a totalidade de NADPH-d ativa presente no tecido, pois o processo de fixação dos tecidos acaba por inibir a ativação de parte da NADPH-d (MATSUMOTO *et al.*, 1993; NH *et al.*, 1999). Sendo assim, essa técnica não é sensível a pequenas variações ou pequena quantidade de NOS neuronal, visto que Ng *et al.* (1999) demonstraram ausência da marcação para NADPH-d na região do núcleo arcuato do hipotálamo em ratos, onde a marcação de imunohistoquímica para NOS foi positiva, sendo que esse autores sugerem que a histoquímica para NADPH-d não deve ser considerada uma marcação absoluta para a presença de NOS neuronal. Ainda, trabalhos anteriores demonstraram aumento da marcação para NADPH-d em ratos submetidos ao estresse induzido por contenção (JOUNG *et al.*, 2012), porém, não foi observada alteração após exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006). Além disso, outras estruturas cerebrais

podem estar envolvidas, além do núcleo dorsal da rafe e da matéria cinzenta periaquedutal, analisadas no presente trabalho.

Nesse contexto, é possível que os resultados observados nos testes comportamentais sejam devidos a uma redução na produção de NO que não foi suficientemente intensa para ser observada pela histoquímica do NADPH-d, porém suficiente para causar um efeito tipo ansiolítico, já que o NO é um gás que se difunde de maneira rápida pelos tecidos, uma pequena alteração em uma região pode atingir vários neurônios adjacentes. Ou ainda, o mecanismo de ação do óleo essencial de lavanda pode estar relacionado à via nitriérgica sem necessariamente causar uma redução direta da NOS cerebral (ZHOU e ZHU, 2009). Foi relatado por Joung *et al.* (2012), que ambos inibidores da NO sintase, 7-NI e L-NAME, reduziram o comportamento de ansiedade em ratos submetidos a contenção física e exposição ao labirinto em cruz elevado, mas apenas o 7-NI apresentou redução no número de células positivas para NADPH-d, sugerindo que esses dois inibidores da NOS possam atuar por mecanismos diferentes sobre a ansiedade.

Por outro lado, observando a modulação do efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda pelo receptor 5-HT_{1A} e pelo NO, no presente estudo, poderíamos ainda inferir que a lavanda não esteja diretamente atuando sobre essas duas vias, mas que o receptor 5-HT_{1A} e o NO estejam modulando uma outra via que participe da ação do óleo essencial de lavanda.

Foi relatado por Zhang *et al.* (2010) que a serotonina, agindo via receptor 5-HT_{1A}, inibe a expressão da NOS neuronal no hipocampo, e Jahanshahi *et al.* (2010) demonstraram que ratos tratados com buspirona (agonista parcial 5-HT_{1A}) apresentaram redução da NOS neuronal na região do núcleo dorsal da rafe.

Wegener *et al.* (2003) mostraram que antidepressivos serotoninérgicos diminuem a atividade da NOS hipocampal *in vivo* e *in vitro*, e eles sugerem que esse efeito possa ocorrer pela inibição do receptor glutamatérgico NMDA. O receptor NMDA é um dos receptores ionotrópicos do glutamato, que quando ativado permite a entrada de Na⁺ e Ca²⁺ nas células, assim como causa aumento da atividade da NOS neuronal, levando a um aumento da produção de NO a partir da L-arginina (ESPLUGUES, 2002; WANG *et al.*, 2012). Estudos tem demonstrado que o aumento de NO, pela administração de L-arg ou um doador de NO, pode provocar uma modulação inibitória sobre os receptores NMDA, e que esse mecanismo regulatório

preveniria uma super ativação do receptor NMDA (CHOI *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2012).

Visto que a redução da transmissão glutamatérgica pode induzir um efeito tipo ansiolítico (ESPLUGUES, 2002; WANG *et al.*, 2012), essa via de transmissão poderia estar envolvida no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda. Nesta linha, foi demonstrado que o linalol, principal constituinte do óleo essencial de lavanda, bloqueou os receptores NMDA (ELISABETSKY *et al.*, 1995). Ainda, Wegener *et al.* (2003) sugeriu que a inibição do receptor NMDA pode contribuir para a interação entre a serotonina e o NO no hipocampo.

Ainda, sabe-se que a principal ação do receptor 5-HT_{1A} pré-sináptico é a abertura de canais de K⁺, o que leva a hiperpolarização neuronal, e que o NO afeta positivamente a atividade elétrica de neurônios pela modulação de canais iônicos (ARTINIAN *et al.*, 2010; POTGIETER *et al.*, 2010; STEINERT *et al.*, 2011). Foi observado por Artinian *et al.* (2012) que o inibidor da NOS, 7-NI, potencializou a abertura dos canais de K⁺ e regulou negativamente a abertura dos canais de Na⁺ e Ca²⁺, causando hiperpolarização de neurônios em cultivo celular.

O mecanismo de ação conhecido da pregabalina, usada na clínica para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, é resultante da sua ligação aos canais de Ca²⁺ voltagem dependente, inibindo a entrada de Ca²⁺, reduzindo a atividade neuronal (LOTARSKI *et al.*, 2011). Sendo assim, o efeito do óleo essencial de lavanda ainda poderia não estar diretamente relacionado ao receptor 5-HT_{1A} ou ao NO, mas ser devido a uma ação sobre o potencial elétrico da membrana neuronal. Além disso, o receptor NMDA também sofre influência do potencial de membrana, uma vez que sua abertura é dificultada pela hiperpolarização da membrana, o que dificulta que o Mg²⁺, que bloqueia o canal, seja removido (WANG *et al.*, 2012)

Em relação ao envolvimento do sistema olfatório, observamos que a anosmia não prejudicou o efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda. Além disso, o resultado negativo da inalação do acetato de amila, que foi usado como odor controle no teste de esconder esferas, sugere que o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda não foi devido a um efeito inespecífico do odor (em contraste com a condição sem odor), mas devido a um efeito específico de componentes presentes nos óleos essenciais aromáticos, já que óleos essenciais de rosa, limão, laranja e lavanda são citados na literatura por seu potencial efeito tipo

ansiolítico (e.g. ALMEIDA *et al.*, 2004; CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; FATURI *et al.*, 2012; KOMIYA *et al.*, 2006; MOSS *et al.*, 2003; SHAW *et al.*, 2007).

Como citado na introdução, a absorção de óleos essenciais, quando usados por via inalatória, poderia decorrer da absorção dos princípios ativos pela mucosa pulmonar, ou então via sistema olfatório, para chegar ao SNC. Nestas duas situações, o efeito do óleo essencial de lavanda decorreria de sua ação direta no SNC. Outra possibilidade seria que o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda poderia ocorrer pela ativação das terminações nervosas olfativas, já que essas terminações presentes na cavidade nasal se conectam com o SNC e a percepção de odores está relacionada ao processamento de emoções (ALMEIDA *et al.*, 2004; FATURI *et al.*, 2010; KAGAWA *et al.*, 2003; SOUDRY *et al.*, 2011). Na avaliação da participação da ativação do sistema olfatório no efeito ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda, a condição de anosmia foi induzida em camundongos pela administração intranasal da solução de zinco (gluconato de zinco e acetato de zinco), que prejudicou a discriminação olfatória, indicando perda do sentido do olfato nos camundongos. Essa condição foi observada por até 26 dias após o tratamento. Esse resultado corrobora com estudos anteriores que também mostraram que a administração intranasal de zinco causa anosmia (LIM *et al.*, 2009; McBRIDE *et al.*, 2003; SLOTNICK *et al.*, 2007). Além disso, foi observado que a irrigação intranasal com a solução de zinco não interferiu com o comportamento de esconder esferas ou com a atividade locomotora dos camundongos, 7 dias após o tratamento. A inalação do óleo essencial de lavanda também não prejudicou a atividade locomotora dos camundongos.

Estudos têm relatado que a administração intranasal de sulfato de zinco ou gluconato de zinco pode causar dano no tecido nasal de humanos e de roedores, levando a uma significativa disfunção de olfato, o qual pode permanecer por longo tempo, ou mesmo ser irreversível (ALEXANDER e DAVIDSON, 2006; JAFEK *et al.*, 2004; McBRIDE *et al.*, 2003; SLOTNICK *et al.*, 2007, 2010). A perda de olfato causada pelo zinco resultaria de um rompimento das conexões funcionais do epitélio olfatório para o bulbo olfatório (LIM *et al.*, 2009; McBRIDE *et al.*, 2003; SLOTNICK *et al.*, 2010).

A condição de anosmia em camundongos, detectada por testes comportamentais, pode permanecer por 60 dias após a irrigação nasal com a

solução de gluconato de zinco mais acetato de zinco (LIM *et al.*, 2009) ou permanecer por 30 dias após o uso de sulfato de zinco (McBRIDE *et al.*, 2003).

Além disso, Lim *et al.* (2009) relataram, após análise histológica, perda completa ou quase completa do epitélio e da submucosa 2 meses após o tratamento com a solução de gluconato de zinco mais acetato de zinco.

No presente estudo, demonstramos que a anosmia perdurou por pelo menos 26 dias, já que não foram realizados testes após esse período. Levando isso em consideração, no presente estudo, os camundongos tiveram uma semana de intervalo entre a administração da solução de zinco e a realização dos testes comportamentais, para tentar prevenir que o protocolo de administração intranasal interferisse nos testes comportamentais e permitisse que a anosmia estivesse presente. Considerando que alteração locomotora pode alterar o comportamento de esconder esferas, ressaltamos que a anosmia ou a administração da solução de zinco não alteraram a locomoção no campo aberto.

Observamos que a indução de anosmia não interferiu com o efeito tipo ansiolítico óleo essencial de lavanda. Esse resultado está de acordo com o trabalho Kagawa *et al.* (2003), que verificaram que a anosmia por sulfato de zinco não interferiu no efeito da inalação de cedrol (principal componente do óleo de cedro), no tempo de sono induzido por pentobarbital. Entretanto, neste mesmo estudo, os autores observaram que a anosmia prejudicou o efeito sedativo da inalação de uma mistura de óleo de lavanda e camomila romana. Assim, no presente estudo, os compostos voláteis do óleo essencial de lavanda podem ter exercido efeito tipo ansiolítico através de absorção pela mucosa pulmonar, o que levou os compostos ativos para a circulação sistêmica e, conseqüentemente, para o SNC. Portanto, a ativação olfativa parece não ser necessária para o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda.

A vantagem do uso de óleos essenciais pela via inalatória é que podem exercer seu efeito sobre vários indivíduos ao mesmo tempo, como relatado por Diego *et al.* (1998), Lehrner *et al.* (2005) e Kritsidima *et al.* (2010) os quais observaram efeito ansiolítico da inalação do óleo de lavanda em pacientes. Por outro lado, nesse procedimento de administração, é difícil controlar a dose entregue a cada indivíduo.

6 CONCLUSÃO

- A inalação do óleo essencial de lavanda demonstrou ter um perfil tipo ansiolítico no teste de esconder esferas e no labirinto em cruz elevado, em concentração que não induziu alteração na atividade locomotora, em camundongos.
- A via de transmissão GABA-A/benzodiazepínica parece não estar envolvida no mecanismo de ação do óleo essencial de lavanda.
- A neurotransmissão serotoninérgica, provavelmente através do receptor 5-HT1A, parece participar no mecanismo farmacológico pelo qual o óleo essencial de lavanda exerce seu efeito.
- A neurotransmissão nitrinérgica também parece contribuir para o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de lavanda.
- A percepção do aroma do óleo essencial de lavanda, quando inalado, parece não ser necessária para obtenção do seu efeito tipo ansiolítico.

REFERÊNCIAS

- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. **Biol Psychiatry**, v. 66, p. 627-635, 2009.
- ALEXANDER, T.H.; DAVIDSON, T.M. Intranasal zinc and anosmia: the zinc-induced anosmia syndrome. **Laryngoscope**, v.116, p. 217-220, 2006.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; DE BRITO FATURI, C.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, p. 361-364. 2004.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001
- AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.63, p. 743-748, 1999.
- ATSUMI, T.; TONOSAKI, K. Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. **Psychiatry Research**, v. 150, p. 89–96, 2007.
- BARETTA, I.P.; ASSREUY, J.; DE LIMA T.C. Nitric oxide involvement in the anxiogenic-like effect of substance P. **Behav Brain Res**, v. 121, p. 199-205, 2001.
- BARETTA, I.P.; FELIZARDO, R.A.; BIMBATO, V.F.; DOS SANTOS, M.G.; KASSUYA, C.A.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; DA SILVA, C.R.; DE OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, J.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **J Ethnopharmacol**, v. 140, p. 46-54, 2012.
- BARIK, J.; MARTI, F.; MOREL, C.; FERNANDEZ, S.P.; LANTERI, C.; GODEHEU, G.; TASSIN, J.P.; MOMBÉREAU, C.; FAURE, P.; TRONCHE, F. Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. **Science**, v. 339, n. 6117, p. 332-335, 2013.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F.S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 4, p. 347-355, 2006.
- BOSCHEN, M.J. A meta-analysis of the efficacy of pregabalin in the treatment of generalized anxiety disorder. **Can J Psychiatry**, v. 56, n. 9, p. 558-566, 2011
- BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacol (Berl)**, v. 163, n. 2, p. 121-141, 2002.

BRADEN, R.; REICHOW, S.; HALM, M.A. The use of the essential oil lavandin to reduce preoperative anxiety in surgical patients. **J Perianesth Nurs**, v. 24, n. 6, p. 348-355, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, B.F.; BROWN, S.L.; CHU, S.; LEA, R.W. Effects of orally administered lavender essential oil on responses to anxiety-provoking film clips. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**, v. 24, p. 319-330, 2009.

BRADLEY, B.F.; STARKEY, N.J.; BROWN, S.L.; LEA, R.W. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 3, p. 517-525, 2007.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D.A.; STELLA, A.M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-775, 2007.

CALIXTO, A.V.; DUARTE, F.S.; MORAES, C.K.; FARIA, M.S.; DE LIMA, T.C. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. **Behav Brain Res**, v. 189, n. 2, p. 341-349, 2008.

CAMPOS, A.C.; GUIMARÃES, F.S. Involvement of 5HT_{1A} receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacol (Berl)**, v. 199, p. 223-230, 2008.

CARVALHO-FREITAS, M.I.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 12, p. 1629-1633, 2002.

CASAROTTO, P.C.; GOMES, F.V.; RESSTEL, L.B.; GUIMARÃES, F.S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB₁ receptors. **Behav Pharmacol**, v. 21, n. 4, p. 353-358, 2010.

CHIOCA, L.R.; PEREIRA, M.; BARETTA, I.P.; ANTUNES, V.D.C.; MENEZES, J.V.B.N.; FERREIRA, J.; ANDREATINI, R.; LOSSO, E.M. P.4.b.010 Anxiolytic-like effect of lavender and orange essential oil: participation of nitric oxide but not GABA-A benzodiazepine complex. **Eur Neuropsychopharmacol** v. 21, p. S538, 2011.

CHOI, Y.B.; TENNETI, L.; LE, D.A.; ORTIZ, J.; BAI, G.; CHEN, H.S.; LIPTON, S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. **Nat Neurosci** v. 3, n. 1, p. 15-21. 2000

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **Br J Pharmacol**, v. 164, p. 1129-1161, 2011.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2003

DALVI, A.; RODGERS, R.J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 128, p. 380-397. 1996.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v. 30, p. 125-131, 2011.

DIAZ, S.L.; MAROTEAUX, L. Implication of 5-HT(2B) receptors in the serotonin syndrome. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 495-502. 2011.

DIEGO, M.A.; JONES, N.A.; FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C.; MCADAM, V.; GALAMAGA, R.; GALAMAGA, M. Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. **Int J Neurosci**, v. 96, p. 217-224, 1998.

DOMBROWSKI, P.A.; FERNANDES, L.H.; ANDREATINI, R. Picrotoxin blocks the anxiolytic- and panicolytic-like effects of sodium valproate in the rat elevated T-maze. **Eur J Pharmacol**, v. 537, p. 72-76, 2006.

DUARTE, F.S.; MARDER, M.; HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DE LIMA, T.C. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacol (Berl)**, v. 197, p. 351-360, 2008.

EGASHIRA, N.; OKUNO, R.; MATSUSHITA, M.; ABE, M.; MISHIMA, K.; IWASAKI, K.; NISHIMURA, R.; OISHI, R.; FUJIWARA, M. Aripiprazole inhibits marble-burying behavior via 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptor-independent mechanisms. **Eur J Pharmacol**, v. 592, p. 103-108, 2008.

ELISABETSKY, E.; MARSCHENER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool on glutaminergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochem Res**, v. 20, n. 4, p. 461-465, 1995.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety- a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, p. 205-208, 2006.

ESPLUGUES, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol**, v. 135, p. 1079-1095, 2002.

FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, p. 605-609, 2010.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

FOX, M.A.; JENSEN, C.L.; GALLAGHER, P.S.; MURPHY, D.L. Receptor mediation of exaggerated responses to serotonin-enhancing drugs in serotonin transporter (SERT)-deficient mice. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 643-656. 2007.

GEDNEY, J.J.; GLOVER, T.L.; FILLINGIM, R.B. Sensory and affective pain discrimination after inhalation of essential oils. **Psychosom Med**, v. 66, p. 599-606, 2004.

GRAHN, R.E.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus. **Behav Brain Res**, v. 112, p. 33-41, 2000.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 10, p. 207-217, 2010.

HANSON, L.R.; FREY, W.H.2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. **BMC Neurosci**, v. 9, Suppl. 3, p. S5, 2008.

HARKIN, A.J.; BRUCE, K.H.; CRAFT, B.; PAUL, I.A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test, **Eur J Pharmacol**, v. 372, p. 207-213, 1999.

HARKIN, A.; CONNOR, T.J.; WALSH, M.; ST JOHN, N.; KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 616-623, 2003.

HAYASHI, E.; KURATANI, K.; KINOSHITA, M.; HARA, H. Pharmacologically distinctive behaviors other than burying marbles during the marble burying test in mice. **Pharmacology**, v. 86, p. 293-296, 2010.

HERZ, H.S. Aromatherapy facts and fictions: a scientific analysis of olfactory effects on mood, physiology and behavior. **Int J Neurosci**, v. 119, p. 263-290. 2009.

HOWARD, S.; HUGHES, B.M. Expectancies, not aroma, explain impact of lavender aromatherapy on psychophysiological indices of relaxation in young healthy women. **Br J Health Psychol**, v. 13 (Pt 4), p. 603-617, 2008

HUEN, M.S.; LEUNG, J.W.; NG, W.; LUI, W.S.; CHAN, M.N.; WONG, J.T.; XUE, H. 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi, with selective antagonistic properties. **Biochem Pharmacol**, v. 66, p. 125-132, 2003.

ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT_{1A}-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. **Jpn J Pharmacol**, v. 68, p. 65-70, 1995.

JAFEK, B.W.; LINSCHOTEN, M.R.; MURROW, B.W. Anosmia after intranasal zinc gluconate use. **Am J Rhinol**, v. 18, p. 137-141, 2004.

JAHANSHAHI, A.; LIM, L.W.; STEINBUSCH, H.W.; VISSER-VANDEWALLE, V.; TEMEL, Y. Buspirone-induced changes in the serotonergic and non-serotonergic cells in the dorsal raphe nucleus of rats. **Neurosci Lett**, v. 473, n. 2, p. 136-140, 2010.

JOUNG, H.Y.; JUNG, E.Y.; KIM, K.; LEE, M.S.; HER, S.; SHIM, I. The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. **Behav Brain Res**, v. 235, n. 2, p.176-181, 2012

KAGAWA, D.; JOKURA, H.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; TSUBONE, H. The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. **Planta Med**, v. 69, p. 637-641. 2003.

KALUEFF, A.V.; FOX, M.A.; GALLAGHER, P.S.; MURPHY, D.L. Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. **Genes Brain Behav**, v. 6, n. 4, p. 389-400, 2007.

KASPER, S.; GASTPAR, M.; MÜLLER, W.E.; VOLZ, H.P.; MÖLLER, H.J.; DIENEL, A.; SCHLÄFKE, S. Silexan, an orally administered Lavandula oil preparation, is effective in the treatment of 'subsyndromal' anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Inte Clin Psychopharmacol**, v. 25, n. 5, p. 277-287, 2010 (a).

KASPER, S.; GASTPAR, M.; MÜLLER, W.E.; VOLZ, H.P.; MÖLLER, H.J.; DIENEL, A.; SCHLÄFKE, S. Efficacy and safety of silexan, a new, orally administered lavender oil preparation, in subthreshold anxiety disorder - evidence from clinical trials. **Wien Med Wochenschr**, v. 160, p. 547-556, 2010 (b).

KRASS, M.; RÜNKORG, K.; WEGENER, G.; VOLKE, V. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. **Neuroscience Letter**, v. 480, p. 55-58, 2010.

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

KOEN, N.; STEIN, D.J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 423-437, 2011.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behav Brain Res**, v. 172, n. 2, p. 240-249, 2006.

LEHRNER, J.; MARWINSKI, G.; LEHR, S.; JOHREN, P.; DEECKE, L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 92-95, 2005.

LIM, J.H.; DAVIS, G.E.; WANG, Z.; LI, V.; WU, Y.; RUE, T.C.; STORM, D.R. Zicam-induced damage to mouse and human nasal tissue. **PLoS One**, v. 4, p. e7647, 2009.

LIN, P.W.; CHAN, W.C.; NG, B.F.; LAM, L.C. Efficacy of aromatherapy (*Lavandula angustifolia*) as an intervention for agitated behaviours in Chinese older persons with dementia: a cross-over randomized trial. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 405-410, 2007.

LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.; DUPONT BIRCK, F.; CARAMÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 303-307, 2009.

LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E.B.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, p. 679-683, 2010.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). **Phytother Res**, v. 13, n. 6, p. 540-542, 1999.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** (Berl), v. 92, p. 180-185, 1987.

LOTARSKI, S.M.; DONEVAN, S.; EL-KATTAN, A.; OSGOOD, S.; POE, J.; TAYLOR, C.P.; OFFORD, J. Anxiolytic-like activity of pregabalin in the Vogel conflict test in $\alpha 2\delta$ -1 (R217A) and $\alpha 2\delta$ -2 (R279A) mouse mutants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 615-621, 2011.

MAGALHAES, A.C.; HOLMES, K.D.; DALE, L.B.; COMPS-AGRAR, L.; LEE, D.; YADAV, P.N.; DRYSDALE, L.; POULTER, M.O.; ROTH, B.L.; PIN, J.P.; ANISMAN, H.; FERGUSON, S.S. CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT₂ receptor signaling. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 622-629, 2010.

MARTIN, E.I.; RESSLER, K.J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C.B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clin Lab Med**, v. 30, p. 865-891, 2010.

MATSUSHITA, M.; EGASHIRA, N.; HARADA, S.; OKUNO, R.; MISHIMA, K.; IWASAKI, K.; NISHIMURA, R.; FUJIWARA, M. Perospirone, a novel antipsychotic drug, inhibits marble-burying behavior via 5-HT_{1A} receptor in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. **J Pharmacol Sci**, v. 99, n. 2, p. 154-159, 2005.

MCBRIDE, K.; SLOTNICK, B.; MARGOLIS, F.L. Does Intranasal Application of Zinc Sulfate Produce Anosmia in the Mouse? An Olfactometric and Anatomical Study. **Chem Senses**, v. 28, p. 659-670, 2003.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol**, v. 70, p. 83- 244, 2003.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 42-53, 2012.

MOSIENKO, V.; BERT, B.; BEIS, D.; MATTHES, S.; FINK, H.; BADER, M.; ALENINA, N. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. **Transl Psychiatry**, v. 2, e122, 2012.

MOSS, M.; COOK, J.; WESNES, K.; DUCKETT, P. Aromas of rosemary and lavender essentials oils differentially affect memory and mood in healthy adults. **Inter J Neurosci**, v. 113, p. 15-38, 2003.

NICOLAS, L.B.; KOLB, Y.; PRINSSEN, E.P.M. A combined marble burying–locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **Eur J Pharmacol**, v. 547, p. 106-115, 2006.

NG, Y.K.; XUE, Y.D.; WONG, P.T. Different distributions of nitric oxide synthase-containing neurons in the mouse and rat hypothalamus. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 5, p. 383-92, 1999.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 38, n. 1, p. 63-67, 1991 (a).

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 1, p. 105-112, 1991 (b).

PASCHALL, G.Y.; DAVIS, M. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. **Behav Neurosci**, v. 116, p. 4-12, 2002.

OHNO, Y. New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 10, p. 148-57, 2010.

OKERE, C.O.; WATERHOUSE, B.D. Activity-dependent heterogeneous populations of nitric oxide synthase neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **Brain Research**, v.1086, p. 117-132, 2006.

OLER, J.A.; FOX, A.S.; SHELTON, S.E.; ROGERS, J.; DYER, T.D.; DAVIDSON, R.J.; SHELLY, W.; OAKES, T.R.; BLANGERO, J.; KALIN, N.H. Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 864-868, 2010.

PAVESI, E.; CANTERAS, N.S.; CAROBREZ, A.P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal preamillary nucleus as

an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 926-239, 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain stereotaxic coordinates**. 2.ed. San Diego: Elsevier Science, 2004.

PEANA, A.T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound, **Life Sci**. v. 78, p. 719-723, 2006.

PEREIRA, M.; SIBA, I.P.; CHIOCA, L.R.; CORREIA, D.; VITAL, M.A.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; ANDREATINI, R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1636-1644, 2011.

PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L.K.; ERNST, E. Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. **Phytomedicine**, v. 19, p. 825-835, 2012.

PREDIGER, R.D.; AGUIAR, A.S.JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A.E.; FIGUEIREDO, C.P.; MATHEUS, F.C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; BEL, E.D.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 17, p. 114-129, 2010.

RAVINDRAN, L.N.; STEIN, M.B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, p. 685-697, 2011.

SHAW, D.; ANNETT, J.M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J.C. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 613-620, 2007.

SHAW, D.; NORWOOD, K.; LESLIE, J.C. Chlordiazepoxide and lavender oil alter unconditioned anxiety-induced c-fos expression in the rat brain. **Behav Brain Res**, v. 224, p. 1-7, 2011.

SILVA BRUM, L.F.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D. Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. **Phytother Res**, v. 15, n. 5, p. 422-425, 2001 (a).

SILVA BRUM, L.F.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O.; ELISABETSKY, E. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochem Res**, v. 26, n. 3, p.191-194, 2001 (b).

SOKOLOWSKI, K.; CORBIN, J.G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. **Front Mol Neurosci**, v.5, 2012.

LORENZINI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, 2008

SLOTNICK, B.; RESTREPO, D.; SCHELLINCK, H.; ARCHBOLD, G.; PRICE, S.; LIN, W. Accessory olfactory bulb function is modulated by input from the main olfactory epithelium. **Eur J Neurosci**, v. 31, p. 1108-1116, 2010.

SLOTNICK, B.; SANGUINO, A.; HUSBAND, S.; MARQUINO, G.; SILBERBERG, A. Olfaction and olfactory epithelium in mice treated with zinc gluconate. **Laryngoscope**, v. 117, p. 743-749, 2007.

SMALLS, S.L.; OKERE, C.O. Acute restraint increases varicosity density and reduces the inter-varicosity distance in NADPH diaphorase-containing neurons in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter. **Neurosci Lett**, v. 511, n. 1, p. 23-27, 2012.

SOUDRY, Y.; LEMOGNE, C.; MALINVAUD, D.; CONSOLI, S.M.; BONFILS, P. Olfactory system and emotion: Common substrates. **Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis**, v. 128, p. 18-23, 2011.

SOUTO-MAIOR, F.N.; DE CARVALHO, F.L.; DE MORAIS, L.C.; NETTO, S.M.; DE SOUSA, D.P.; DE ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, p. 259-263, 2011.

SPIACCI JR A.; KANAMARU, F.; GUIMARÃES, F.S.; OLIVEIRA, R.M. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 88, p. 247-255, 2008.

SPOLIDÓRIO, P.C.; ECHEVERRY, M.B.; IYOMASA, M.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 195, n. 2, p. 183-192, 2007.

TADAIESKY, M.T.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **Eur J Pharmacol**, v. 535, p. 199-207, 2006.

TAKAHASHI, M.; SATOU, T.; OHASHI, M.; HAYASHI, S.; SADAMOTO, K.; KOIKE, K.; Interspecies comparison of chemical composition and anxiolytic-like effects of lavender oils upon inhalation. **Nat Prod Commun**, v. 6, n. 11, p. 1769-1774, 2011.

TODA, M.; MORIMOTO, K. Effect of lavender aroma on salivary endocrinological stress markers. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 10, p. 964-8, 2008.

TONETTO, L.L.; TERZIAN, A.L.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S.; RESSTEL, L.B. Inhibition of the NMDA receptor/Nitric Oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. **Behav Brain Funct**, v. 5, p. 40, 2009.

TSANG, H.W.; HO, T.Y. A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy on rodents under experimentally induced anxiety models. **Ver Neurosci**, v. 21, n. 2, p. 141-152, 2010.

UEHLEKE, B.; SCHAPER, S.; DIENEL, A.; SCHLAEFKE, S.; STANGE, R. Phase II trial on the effects of Silexan in patients with neurasthenia, post-traumatic stress disorder or somatization disorder. **Phytomedicine**, v. 19, p. 665-671, 2012.

UMATHE, S.N.; BHUTADA, P.S.; JAIN, N.S.; MUNDHADA, Y.R.; BORKAR, S.S.; DHUMAL, B. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. **Nitric Oxide**, v. 21, p. 140-147, 2009.

UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, p. 713-721, 2006.

VASUDEVA, R.K.; LIN, R.C.; SIMPSON, K.L.; WATERHOUSE, B.D. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. **J Chem Neuroanat**, v. 41, n. 4, p. 281-293, 2011.

VOGEL, H.G. **Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays**. 3.ed. Springer-Verlag: Berlin, 2008.

VOLKE, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J.; MANNISTO, P.T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus maze. **Neuroreport**, v. 6, p. 1413-1416, 1995.

VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KÕKS, S.; BOURIN, M.; MÄNNISTÖ, P.T.; VASAR, E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacol**, v. 131, p. 399-405, 1997.

VOLKE, V.; WEGENER, G.; BOURIN, M.; VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behav Brain Res**, v. 140, p. 141-147, 2003.

WANG, J.Q.; CHU, X.P.; GUO, M.L.; JIN, D.Z.; XUE, B.; BERRY, T.J.; FIBUCH, E.E.; MAO, L.M. Modulation of ionotropic glutamate receptors and Acid-sensing ion channels by nitric oxide. **Front Physiol**, v. 3, p. 164, 2012.

WANG, Q.P.; GUAN, J.L.; NAKAI, Y. Distribution and synaptic relations of NOS neurons in the dorsal raphe nucleus: a comparison to 5-HT neurons. **Brain Res Bull**, v. 37, p. 177-187, 1995.

WEGENER, G.; VOLKE, V.; HARVEY, B.H.; ROSENBERG, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Res**, v. 959, p. 128-134, 2003.

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

WORONUK, G.; DEMISSIE, Z.; RHEAULT, M.; MAHMOUD, S. Biosynthesis and Therapeutic Properties of Lavandula Essential Oil Constituents. **Planta Medica**, v. 77, p. 7-15, 2011.

YILDIZ, F.; ULAK, G.; ERDEN, B.F.; GACAR, N. Anxiolytic-Like Effects of 7-Nitroindazole in the Rat Plus-Maze Test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, p. 199-202, 2000.

ZHANG, J.; HUANG, X.Y.; YE, M.L.; LUO, C.X.; WU, H.Y.; HU, Y.; ZHOU, Q.G.; WU, D.L.; ZHU, L.J.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. **J Neurosci**, v. 30, p. 2433-2441, 2010.

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ROSA, A.O.; LIN, J.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res**, v. 1023, n. 2, p. 253-263, 2004.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética em Experimentação Animal
 (CEEA)



Nº 407

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno, do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.097717/2009-34

APROVADO: 10/11/2009 – R.O. 10/2009

TÍTULO: O efeito de odores na ansiedade de camundongos

AUTORES: Roberto Andreatini, Lea Rosa Chioca, Estela Maris Losso

DEPARTAMENTO: Farmacologia


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
 Coordenador do CEEA



RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 0094.12
Pag: 1 de 1

PRODUTO: **ÓLEO DE LAVANDA**
 CLIENTE: Dra. Irinéia Chioca UFPR
 LOTE: 160
 VALIDADE: 03/2015
 PROTOCOLO: 0115.12
 AMOSTRAGEM: Realizada pelo Cliente
 DATA DE RECEBIMENTO: 07.09.12
 DATA DE EMISSÃO DOS RESULTADOS: 21.09.12

RESULTADOS

Ensaio	Especificação	Resultado	Método
Teor de Linanol	NI	46,50 %	GC – Farmacopéia Europeia, 2011
Teor de Acetato de Linanil	NI	53,50 %	GC – Farmacopéia Europeia, 2011

Curitiba, 21 de Setembro de 2012


 Laerte Dall'Agnol
 Gerente Técnica
 CRF 2356

Observação: A presente análise tem valor restrito à amostra recebida pela DALL.
 As informações constantes neste Certificado são confidenciais e pertencentes ao solicitante.
 É permitida a reprodução desde que integralmente e sem nenhuma alteração.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética em Experimentação Animal
 (CEEA)



Nº 532

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

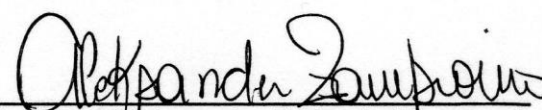
PROCESSO: 23075.074797/2011-74

APROVADO: 03/05/2011 – R.O. 04/2011

TÍTULO: Avaliação do bloqueio do olfato no efeito ansiolítico da inalação dos óleos essenciais de lavanda e laranja em camundongos

AUTORES: Roberto Andreatini, Lea Rosa Chioca, Estela Maris Losso, Valquíria Daniele Casanova Antunes

DEPARTAMENTO: Farmacologia


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
 Coordenador do CEEA