



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALINE ARMILIATO EMER

POTENCIAL EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E PRÓ-RESOLUTIVO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Pogostemon cablin* EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DA VIA ANEXINA A1 / FPR2 / OPIOIDE

ALINE ARMILIATO EMER

POTENCIAL EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E PRÓ-RESOLUTIVO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Pogostemon cablin* EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DA VIA ANEXINA A1 / FPR2 / OPIOIDE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça

2018

E45 Emer, Aline Armiliato, 1988 -

Potencial efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo da inalação do óleo essencial pogostemon cablin em camundongos : análise da via anexina A1 / FPR2 / opioide / Aline Armiliato Emer. – 2018.

127 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Daniel Fernandes Martins

1. Inflamação - Tratamento. 2. Aromaterapia. 3 Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 4. Medicina integrativa. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. IV. Título.

CDD (21. ed.) 616.0473

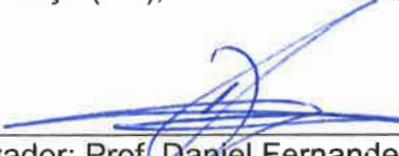
Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215

ALINE ARMILIATO EMER

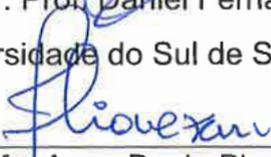
POTENCIAL EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO, ANTI-INFLAMATÓRIO E PRÓ-RESOLUTIVO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Pogostemon cablin* EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DA VIA ANEXINA A1 / FPR2 / OPIOIDE

Tese foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Doutorado, para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

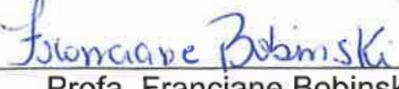
Palhoça (SC), 29 de novembro de 2018.


Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Universidade do Sul de Santa Catarina


Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

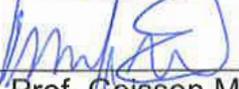
Universidade do Sul de Santa Catarina


Profa. Franciane Bobinski, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina


Prof. Josiel Mileno Mack, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento à força divina, que habita em mim, por iluminar e guiar sempre o meu caminho, me inspirar e conectar com a fé. Com fé e entrega nosso caminho fica mais fácil.

Gratidão em especial aos meus pais, pelo amor e exemplo de família em que fui criada, por acreditarem em mim e nos meus sonhos. Mesmo sem saberem o que exatamente eu estava fazendo, confiaram e sempre me deram asas, muito obrigada!

Agradeço ao meu companheiro Ari, pelo apoio e compreensão em todos os momentos. Por me dar a mão e caminhar ao meu lado, fazendo com que o caminho fosse mais suave e bonito. Obrigada pelos ensinamentos diários e sempre despertar o melhor em mim.

Agradeço imensamente ao professor e orientador Dr. Daniel Fernandes Martins, pela oportunidade e paciência. Obrigada por todos os ensinamentos e ajuda prestados em todos estes anos de trabalho juntos. Muito do que sou hoje como profissional, se deve aos nossos anos de convívio. Admiração e respeito pela sua conduta.

Agradecimento especial para a Professora Dra. Anna Paula Piovesan, que desde o começo sempre esteve me auxiliando de alguma forma, seja pela forma como compartilha seu conhecimento, seja pelo exemplo de profissional e de mulher. Agradeço em especial por esse ano, pelo apoio e confiança, me sinto muito privilegiada. Muito obrigada!

Agradeço a todos os mestres e professores que passaram por todos estes ciclos de vida comigo, que compartilharam seus preciosos conhecimentos, sua sabedoria e suas experiências, suas vidas me inspiram.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório. Muito obrigada a todos que participaram de alguma forma desta jornada, aprendi muito com cada um de vocês. Obrigada pela convivência, ajuda e apoio, conversas, incentivo, aprendizado e parceria. Vocês são uma grande equipe!

Gratidão a família Naturologia, que sempre me recebeu com braços e ouvidos acolhedores, com vocês me tornei mais humana. Obrigada pelas interações diárias, as trocas, o carinho e atenção de todos. Meus mestres que agora são meus colegas, sou muito honrada por isso.

Agradeço aos camundongos, por serem instrumentos desta pesquisa, sem eles nada seria possível.

Agradeço imensamente o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Seu nome deveria ser quintessência, a principal e celeste potência ou virtude em qualquer planta [...] que, pela força e pureza da substância total [...] preserva a boa saúde do corpo humano, prolonga a juventude, procrastina o envelhecimento e afasta todos os tipos de doença”. (Conrad Gesner, 1559)

RESUMO

Introdução: Produtos naturais têm sido alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Em especial o óleo essencial *Pogostemon cablin* (OEPc), rico em sesquiterpenos, tradicionalmente tem sido demonstrado produzir efeito anti-inflamatório. No entanto, o mecanismo de ação envolvido no efeito anti-inflamatório da inalação do OEPc, ainda não foi investigado. Objetivo: Avaliar o efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo da inalação do OEPc em modelos pré-clínicos de inflamação e analisar a via AnxA1/FPR2/opioides. Métodos: Inicialmente foi caracterizado o perfil fitoquímico do OEPc por meio de análise cromatográfica (GC-MS). Nos experimentos comportamentais foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas. Os animais foram submetidos a injeção intraplantar (i.pl.) com adjuvante completo de Freund (CFA). A hiperalgesia mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey e a espessura da pata avaliada pelo micrômetro. Os animais foram tratados com OEPc por até 5 dias. A avaliação do mecanismo anti-hiperalgésico foi realizada por meio da análise do envolvimento dos receptores receptor 2 para peptídeos formilados (FPR2) e opioides. Administrações subcutânea (s.c.), i.pl. e intratecal (i.t.) do antagonista para o FPR2 ou de naloxona foram realizadas no primeiro e quinto dia após CFA. Citocinas pró e anti-inflamatórias foram analisadas. Animais nocautes (*AnxA1^{-/-}*) foram avaliados a hiperalgesia mecânica e a espessura da pata. Na inflamação pleural induzida por carragenina, foram analisadas citocinas, contagem de leucócito total e diferencial. Anosmia foi induzida pela injeção intranasal de zicam, os animais foram avaliados no teste de discriminação olfatória, hiperalgesia mecânica, atividade locomotora e teste de suspensão da cauda. Resultados: Foram identificados como compostos químicos presentes no OEPc: o patchoulol, α -bulneseno, α -guaieno, α -copaeno, β -patchouleno, β -elemeno, cicloseicheleno, trans- β -cariofileno, seicheleno, α -patchouleno, γ -patchouleno, guai-4,11-dieno e pogostol. A inalação do OEPc reduziu a hiperalgesia mecânica, mas não edema. Não apresentou efeitos sobre as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Os FPR2 (sistêmicos e espinais) e opioides (sistêmicos, periféricos e espinais), assim como, a participação da AnxA1, participam do efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc. No modelo de pleurisia, o tratamento induziu redução de infiltrados celulares e citocinas inflamatórias. A ativação da via

olfatória não é necessária para o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc. Conclusão: O presente estudo mostrou que a inalação do OEPc foi efetiva em reduzir a hiperalgisia mecânica no modelo de inflamação persistente, no qual a via AnxA1/FPR2/opioides está envolvida, porém não reduziu edema e não apresentou efeitos sobre as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Além disso, foi demonstrado que ativação da via olfatória não é necessária para o efeito anti-hiperalgésico causado pela inalação do OEPc. No modelo de pleurisia a inalação do OEPc, apresentou efeito anti-inflamatório.

Descritores: Inflamação crônica, Mediadores pró-resolutivos, Práticas Integrativas e complementares, Aromaterapia, Óleo essencial de patchouli

ABSTRACT

Introduction: Natural products have been targeted for the development of novel therapeutic strategies for the treatment of inflammatory diseases. In particular the Pogostemon cablin essential oil (PcEO), rich in sesquiterpenes, has traditionally been shown to produce anti-inflammatory effect. However, the mechanism of action involved in the anti-inflammatory effect of inhaled PcEO, has not yet been investigated. **Objective:** To evaluate the antihyperalgesic, antiinflammatory and pro-resolution effect of PcEO inhalation in preclinical models of inflammation and to analyze the AnxA1/FPR2/opioid pathway. **Methods:** Initially the phytochemical profile of PcEO was characterized by chromatographic analysis. In the behavioral experiments were used female Swiss mice. The animals underwent intraplantar (i.pl.) injection with complete Freund's adjuvant (CFA). The mechanical hyperalgesia was evaluated by the von Frey test and the paw thickness evaluated by the micrometer. The animals were treated with PcEO for up to 5 days. The evaluation of the antihyperalgesic mechanism was performed by analyzing the involvement of formyl-peptide receptor (FPR2) and opioids. Subcutaneous administration (s.c.), i.pl. and intrathecally (i.t.) of the antagonist for the FPR2 receptor or naloxone were performed on the first and fifth day after CFA. Pro- and anti-inflammatory cytokines were analyzed. Animals knockout (AnxA1 $-/-$) were assessed for mechanical hyperalgesia and paw thickness. In pleural inflammation induced by carrageenan, cytokines were analyzed, total and differential leukocyte count. Anosmia was induced by the intranasal injection of zicam, the animals were evaluated in the olfactory discrimination test, mechanical hyperalgesia, locomotor activity and tail suspension test. **Results:** The chemical compounds present in the PcEO were identified as patchoulol, α -bulnesene, α -guaiene, α -copaene, β -patchoulene, β -elemene, cycloseichelene, trans- β -caryophyllene, seichhelene, α -patchoulene, guai-4,11-diene and pogostol. The inhalation of PcEO reduced mechanical hyperalgesia, but not edema. It had no effect on pro-and anti-inflammatory cytokine concentrations. FPR2 receptors (systemic and spinal) and opioids (systemic, peripheral and spinal), as well as the participation of AnxA1, participate in the antihyperalgesic effect of the inhaled PcEO. In the pleurisy model, there was reduction of cellular infiltrates and inflammatory cytokines. Olfactory pathway activation is not necessary for the antihyperalgesic effect of PcEO inhalation. **Conclusion:** The present

study showed that inhalation of PcEO was effective in reducing mechanical hyperalgesia in the persistent inflammation model, in which the AnxA1/FPR2/opioid pathway is involved, but did not reduce edema and had no effect on pro-and anti-inflammatory cytokine concentrations. In addition, it has been demonstrated that olfactory pathway activation is not required for the antihyperalgesic effect. In the model of pleurisy, the inhaled PcEO showed an anti-inflammatory effect.

Keywords: Chronic Inflammation, Pro-resolutin Mediators, Integrative and Complementary Practices, Aromatherapy, Patchouli Essential Oil

LISTAS E SIGLAS

Lista de abreviaturas

AA – Ácido araquidônico (do inglês, Arachidonic acid)

AINEs – anti-inflamatórios não-esteroides

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês, adenosine monophosphate cyclic)

ANOVA – Análise de variância (do inglês, Analysis of variance)

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

AnxA1 – Anexina A1 (do inglês, Annexin A1)

AnxA1^{+/+} – Camundongos selvagens com a proteína para Anexina-A1

AnxA1^{-/-} – Camundongos knock out para Anexina-A1

BHE – Barreira hemato-encefálica

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund (do inglês, Complete Freund's Adjuvant)

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CG-DIC – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama de hidrogênio

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Cicloxigenase (do inglês, Cyclooxygenase)

COX-1 – Cicloxigenase tipo 1 (do inglês, Cyclooxygenase-1)

COX-2 – Cicloxigenase tipo 2 (do inglês, Cyclooxygenase-2)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra- acético (do inglês, Ethylenediaminetetraacetic acid)

EEP – Extrato etanólico de Patchouli

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimático (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

FDA – Food and Drug Administration

FPR – Receptor para peptídeos formilados (do inglês, formyl peptide receptor)

GABA – ácido gama-aminobutírico (do inglês, Gamma-aminobutyric acid)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, Gas chromatography-mass spectrometry)

GPx – Glutathione peroxidase (do inglês, glutathione peroxidase)
GRD – Glutathione reductase (do inglês, glutathione reductase)
GSH – Glutathione (do inglês, glutathione)
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HOCl – Ácido hipocloroso
IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor (do inglês, International Association for the Study of Pain)
ICAM – Moléculas de adesão intracelular 1 (do inglês, intercellular adhesion molecules)
IL – Interleucina (do inglês, Interleukin)
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, inducible nitric oxide synthase)
IFN-1 β – Interferon 1beta
i.pl. – intraplantar
i.p. – intraperitoneal
i.t. – intratecal
IR – Índices de retenção
LaNEx – Laboratório de Neurociência Experimental
LD50 – Dose letal mediana
LOX – Lipoxigenases (do inglês, Lipoxygenases)
LPS – Lipopolissacarídeo (do inglês, Lipopolysaccharide)
LTs – Leucotrienos (do inglês, Leukotriene)
LXs – Lipoxinas (do inglês, Lipoxins)
Mars – Maresinas (do inglês, Maresins)
MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócitos (do inglês, monocyte chemoattractant protein)
MDA – Malondialdeído (do inglês, malondialdehyde)
MIA – Morte Indolor Assistida
MPO – Mieloperoxidase (do inglês, myeloperoxidase)
MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos -1 (do inglês, Monocyte Chemoattractant Protein)
NF- κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês, Nuclear factor kappa B)
NaCl – Cloreto de sódio
NO – Óxido nítrico (do inglês, nitric oxide)
OA – Osteoartrite

OE – Óleo essencial
OEPc – Óleo essencial *Pogostemon cablin*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão Fosfato Salino (do inglês, Phosphate buffered saline)
PG – Prostaglandina (do inglês, Prostaglandin)
PIs – Prostaciclina (do inglês, Prostacyclin)
PLA2 – Fosfolipase A2 (do inglês, Phospholipase A2)
PMN – Polimorfonucleares
PMSF – Fluoreto fenil-metil-sufonil (do inglês, Phenylmethanesulfonyl fluoride)
PNPICS – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
Prots – Protectinas (do inglês, Protectins)
Rvs – Resolvina (do inglês, Resolvins)
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SOD – Superóxido dismutase (do inglês, Superoxide dismutase)
SUS – Sistema Único de Saúde
TXs – Tromboxanos (do inglês, Thromboxanes)
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês, tumor necrosis factor-alpha)
TGF- β - Fator de crescimento transformante beta
R1TNF- α – Receptores tipo 1 para o TNF- α
R2TNF- α – Receptores tipo 2 para o TNF- α
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina
USP – Universidade de São Paulo
UV – Radiação ultravioleta (do inglês, ultraviolet)
VCAM-1 – Moléculas de adesão celular vascular 1 (do inglês, Vascular cell adhesion molecule)
WRW4 – Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-CONH₂

Lista de quadros

Quadro 3 – Variáveis de estudo..... 67

Lista de figuras

Figura 1 – Transmigração de leucócitos.....	25
Figura 2 – Processo inflamatório e resolutivo.....	30
Figura 3 – Secreção da anexina.....	31
Figura 4 – A AnxA1 desempenha papel na modulação da dor inflamatória por meio da ativação do FPR2.....	32
Figura 5 – A nocicepção é um processo bidirecional de vias neuronais ascendentes e descendentes, e pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibidores da dor.....	35
Figura 6 – Neutrófilos migram para o tecido inflamado transportando peptídeos opioides.....	36
Figura 7 – Folhas de <i>Pogostemon cablin</i>	45
Figura 8 – Desenho experimental. Primeiro conjunto de experimentos, modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA.....	56
Figura 9 – Desenho experimental. Segundo conjunto de experimentos, modelo de inflamação pleural induzida pela Carragenina.....	57
Figura 10 – Desenho experimental. Terceiro conjunto de experimentos, animais com anosmia e modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA.....	58
Figura 11 – Perfil fitoquímico do OEPc.....	70
Figura 12 – Avaliação do melhor tempo de inalação do OEPc sobre a hiperalgesia mecânica.....	72
Figura 13 – Efeito da inalação diária do OEPc sobre a hiperalgesia mecânica.....	74
Figura 14 – Efeito da inalação do OEPc sobre a atividade locomotora dos camundongos.....	75
Figura 15 – Efeito da inalação do OEPc no edema de pata.....	76
Figura 16 – Envolvimento da Anexina A1 no efeito anti-hiperalgésico do OEPc.....	77
Figura 17 – Envolvimento do FPR2/ALX no efeito anti-hiperalgésico do OEPc.....	79
Figura 18 – Envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico do OEPc.....	81

Figura 19 – Efeito da inalação do OEPc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação na pata.....	83
Figura 20 – Efeito da inalação do OEPc sobre as concentrações de citocinas no modelo de inflamação pleural.....	85
Figura 21 – Efeito da inalação do OEPc na contagem de leucócitos no modelo de inflamação pleural.....	86
Figura 22 – Efeito da administração de Zicam sobre a discriminação olfatória.....	87
Figura 23 – Efeito da administração intranasal de Zicam e da inalação do OEPc na atividade locomotora.....	88
Figura 24 – Efeito da administração intranasal de Zicam na anti-hiperalgesia induzida pela inalação do OEPc.....	89
Figura 25 – Efeito da administração intranasal de Zicam e da inalação do OEPc no teste da suspensão da cauda.....	90

Lista de tabelas

Tabela 1 – Revisão bibliográfica de estudos mostrando os efeitos anti-hiperalgésicos e/ou anti-inflamatórios utilizando o OEPc ou seus compostos majoritários em ensaios experimentais em <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	46
Tabela 2 – Descrição dos componentes identificados no OEPc.....	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	23
1.1.1 Inflamação.....	23
1.1.2 Resolução da inflamação	28
1.1.3 Uma breve visão sobre dor	34
1.1.4 Via inalatória	37
1.1.5 Aromaterapia	40
1.1.6 Óleos essenciais	43
1.1.7 Óleo essencial <i>Pogostemon cablin</i>	44
2. OBJETIVOS	53
2.1 OBJETIVO GERAL	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3. MÉTODOS	54
3.1 TIPO DE ESTUDO	54
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	54
3.3 ANIMAIS.....	54
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	55
3.5 TESTES	59
3.5.1 Caracterização do OEPc por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	59
3.5.2 Tratamento inalatório com óleo essencial.....	59
3.5.3 Modelo de inflamação persistente induzida pelo cfa	60
3.5.4 Modelo de inflamação pleural induzida pela carragenina.....	60
3.5.5 Testes comportamentais	61
3.5.5.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica	61
3.5.5.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	61
3.5.5.3 Avaliação do edema de pata	62
3.5.5.4 Avaliação de fenômenos relacionados ao mecanismo de ação da inalação do OEPc	62
3.5.5.4.1 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ANXA1 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPC	62

3.5.5.4.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS FPR2 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPC	62
3.5.5.4.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPC	63
3.5.6 Ensaios bioquímicos e imunológicos	63
3.5.6.1 Quantificação das concentrações teciduais de citocinas inflamatórias.....	63
3.5.6.2 Avaliação do envolvimento de células inflamatórias na inflamação pleural induzida pela carragenina	64
3.5.7 Avaliação do papel da via inalatória no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPc.....	65
3.5.7.1 Procedimento para indução de anosmia nos camundongos	65
3.5.7.2 Teste de discriminação olfatória após administração intranasal de zicam ...	65
3.5.7.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica após administração intranasal de zicam	66
3.5.7.4 Teste da atividade locomotora espontânea após administração intranasal de zicam	66
3.5.7.8 Teste de suspensão pela cauda após administração intranasal de zicam ...	66
3.5.8 Morte indolor assistida (MIA) dos animais	67
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	67
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	68
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	68
4. RESULTADOS.....	70
4.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO OEPC	70
4.2 EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPC NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CFA	71
4.2.1 Determinação do melhor tempo de inalação do OEPc.....	71
4.2.2 Avaliação do efeito da inalação diária do OEPc	72
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPc SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA	75
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPc NO EDEMA INDUZIDO POR CFA	75
4.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ANEXINA A1 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E ANTI-EDEMATOSO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc.....	77

4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO FPR2 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc	78
4.7 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc.....	80
4.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS	82
4.8.1 Efeito da inalação do oepc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação na pata	82
4.8.3 Efeito da inalação do oepc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação pleural.....	84
4.8.4 Efeito da inalação do oepc na contagem de leucócitos no modelo de inflamação pleural.....	86
4.9 PAPEL DA VIA INALATÓRIA NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPC	87
4.9.1 Teste de discriminação olfatória	87
4.9.2 Efeito da administração intranasal de zicam na atividade locomotora espontânea	88
4.9.3 Efeito da administração intranasal de zicam na anti-hiperalgesia induzida pela inalação do OEPc.....	89
4.9.4 Efeito da administração intranasal de zicam e da inalação do oepc no teste da suspensão pela cauda.....	90
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÃO	102
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXO.....	123
ANEXO A- PARECER APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	123

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo fisiológico, que envolve a participação de uma complexa cascata biológica de sinais moleculares e celulares. Inicialmente é um mecanismo benéfico e protetor, no entanto, quando não controlada ou não-resolvida pode levar a lesões teciduais severas, podendo gerar doenças inflamatórias crônicas. Sua função é manter a homeostase tecidual, promover a cicatrização e regeneração do tecido, evitando potencial dano^{1,2}.

De um modo geral, o processo inflamatório é caracterizado por duas fases distintas: a (i) fase precoce, caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios sobre as células endoteliais, os quais são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, facilitando o recrutamento de polimorfonucleares (PMN), especialmente neutrófilos, seguido de macrófagos. No foco inflamatório, os neutrófilos agem como a primeira linha de defesa e desempenham funções fagocíticas e microbidas, removendo o agente agressor. Após interação entre mediadores pró e anti-inflamatórios, neutrófilos entram em apoptose, sinalizando para monócitos/macrófagos finalizar o processo inflamatório. Esse conjunto de eventos, juntamente com a produção de mediadores resolutivos, leva a resolução da inflamação e restauração do tecido inflamado. No entanto, a (ii) fase crônica se deve ao estímulo inflamatório persistente, ou a uma falha no processo resolutivo, onde ocorre um desequilíbrio entre mediadores, levando a um acúmulo excessivo de neutrófilos e subsequente falha na remoção por meio da eferocitose por macrófagos^{1,3,4}.

O processo inflamatório não resolvido muitas vezes, leva a perda de função do tecido, por deposição de colágeno e cicatrização, tornando-se um estímulo prejudicial e contribuindo para a patofisiologia de muitas doenças inflamatórias crônicas⁵, além disso, o aumento da concentração de mediadores, contribuem para a estimulação de neurônios aferentes primários, aumentando sua sensibilização e contribuindo para o estímulo nociceptivo⁶ ou seja contribuem para dor crônica.

A partir da lesão tecidual, o estímulo nociceptivo é transmitido por fibras do tipo A δ e do tipo C até o corno posterior da medula espinal, onde ocorre a liberação de neurotransmissores, os quais são capazes de modular a resposta nociceptiva. Em seguida, a resposta nociceptiva é enviada por vias ascendentes para o tálamo e

centros superiores até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor⁷. A nocicepção é um processo bidirecional de vias neuronais ascendentes e descendentes, e pode ser modificada por sistemas endógenos inibidores da dor, como as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e opioidérgicas⁸⁻¹⁰. Uma importante via conhecida na modulação da dor, é a via opioidérgica. Os peptídeos opioides regulam a transmissão nociceptiva por meio de ações inibitórias, aumentando a entrada de canais de Ca^{2+} e saída K^+ nos terminais sensoriais, diminuindo a excitabilidade neuronal¹¹⁻¹³.

Além disso, a Anexina A1 (AnxA1), considerado um mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo, desempenha um importante papel na modulação da dor inflamatória. Por meio da ativação do receptor 2 para peptídeos formilados (FPR2) produz uma atenuação substancial da resposta nociceptiva a diferentes estímulos nocivos^{14,15}. Nesse contexto, há evidências de que a ativação do FPR2 pela AnxA1 pode promover a liberação de peptídeos opioides pelas células imunes. Neutrófilos, durante a fase precoce da inflamação, e monócitos/macrófagos na fase mais tardia, migram para o tecido inflamado transportando peptídeos opioides¹⁶. Sendo assim, a liberação de opioides por neutrófilos, pela ativação da AnxA1 por meio da ativação do seu FPR2, pode ser um importante mecanismo do papel antinociceptivo da AnxA1.

As doenças inflamatórias associadas a dor crônica, resultam em condições debilitantes. Elas apresentam grande impacto socioeconômico, gerando altos custos com tratamentos de saúde, além de influenciar diretamente sobre a qualidade de vida da população. As doenças inflamatórias crônicas estão entre as doenças mais comuns, sua prevalência aumenta com o envelhecimento e estão associadas a diversas comorbidades, causando limitações de atividades básicas da vida diária¹⁷⁻¹⁹.

O tratamento convencional das doenças inflamatórias é baseado na utilização de fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (AINE's), esteroides e anti-histamínicos. No entanto a utilização desses medicamentos é muitas vezes, limitada devido aos efeitos colaterais que podem causar²⁰. Neste cenário, surge uma urgente necessidade de pesquisas que busquem novos mecanismos (alvos) para o tratamento de condições inflamatórias. Nesse sentido, produtos naturais podem ser uma forma mais segura e eficaz, uma vez que apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais. Sendo assim, são fundamentais novas propostas terapêuticas adjuvantes, que promovam não apenas efeitos anti-inflamatórios, mas também pró-resolutivos no controle dos sinais e sintomas da inflamação.

Produtos naturais fornecem uma fonte imensa de matérias-primas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Neste contexto, a aromaterapia, descrita como sendo uma prática terapêutica secular, consiste no uso de concentrados voláteis extraídos de vegetais, definidos como óleos essenciais. A aromaterapia está inserida na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPICS)²¹, e também é foco de inúmeras pesquisas científicas, as quais comprovam acentuado efeito desta prática em diferentes distúrbios fisiológicos e emocionais²²⁻²⁴. A aromaterapia faz o uso de óleos essenciais (OEs), descritos como misturas complexas de compostos voláteis, produzidos por plantas aromáticas. São compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, os quais incluem em suas atividades biológicas ação sobre o sistema nervoso central (SNC), além de potente efeito anti-inflamatório²⁵.

Neste contexto, para estudo nesta tese, foi utilizado o óleo essencial de *Pogostemon cablin* (OEPc), obtido por destilação a vapor de uma planta aromática, popularmente conhecida como Patchouli. Quimicamente, o OEPc é composto principalmente por sesquiterpenos como o α e β -patchuleno, β -cariofileno, α -guaïeno e álcoois sesquiterpênicos como o patchulol e pogostol. Tradicionalmente, o patchouli é utilizado para o tratamento de processos inflamatórios²⁶⁻²⁸.

A hipótese de que o OEPc poderia produzir efeitos anti-hiperalgésicos, anti-inflamatórios e pró-resolutivos da inflamação, surgiu da observação dos resultados de estudos que têm demonstrado que o tratamento com o OEPc, ou com seus compostos majoritários, apresentam: (i) ação anti-hiperalgésica, em modelos de formalina e contorção abdominal por ácido acético e envolvimento de receptores opioides neste efeito²⁹⁻³¹; (ii) ação anti-inflamatória por reduzir edema de orelha e de pata, induzidos por xileno e carragenina, respectivamente; diminuindo permeabilidade vascular; inibindo vias de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1-Beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), prostaglandina E₂ (PGE₂), fator nuclear kappa B (NF- κ B), interferon 1beta (IFN- γ), óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase induzível (iNOS); reduzindo níveis de enzimas oxidantes e aumentando atividade de enzimas antioxidantes³²⁻³⁴; além disso, apresenta características na (iii) resolução da inflamação, por aumentar a atividade fagocítica de PMN, inibindo o recrutamento e quimiotaxia de neutrófilos, reduz adesão e rolamento de leucócitos na microcirculação³⁵⁻³⁷. Sendo assim, os

resultados destes estudos, trazem suporte para que o OEPc possa ser considerado um agente anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo.

No entanto, a via oral foi via de administração utilizada nos estudos anteriormente citados. Assim, no presente estudo, questionou-se a efetividade da via inalatória nos efeitos (anti-inflamatório, anti-hiperalgésico e pró-resolutivo) do OEPc. Nesse sentido, foram investigados os efeitos da administração do OEPc pela via inalatória/respiratória. Considerada uma importante via de administração de agentes terapêuticos com alvo diretamente no SNC³⁸, além disso, a via inalatória, é a principal via utilizada e difundida no meio clínico para a utilização dos OEs.

Na cavidade nasal, ao inalar as moléculas voláteis presentes nos OEs, estas são rapidamente absorvidas por meio da mucosa, devido a alta vascularização venosa e linfática, além disso, parte dessas moléculas, rapidamente são absorvidas pelos pulmões e distribuídas sistemicamente para a corrente sanguínea. Fazendo com que a via inalatória seja um alvo importante para a distribuição de agentes terapêuticos, tanto para tratamento de patologias do SNC como de origem sistêmica.

Além disso, a inalação dos OEs pode levar a ativação da via olfatória, onde os OEs podem interagir com neurônios olfatórios que possuem projeções de fibras para o bulbo olfatório e então a informação é distribuída por vias aferentes às estruturas encefálicas distintas, como núcleos no tronco encefálico envolvidos no processamento e modulação da dor³⁹⁻⁴².

O crescente interesse dos OEs em diferentes áreas das ciências físicas, naturais e da saúde impulsionou várias pesquisas a fim de compreender as propriedades e seus efeitos. Portanto, na busca de um novo agente analgésico e anti-inflamatório seguro e eficaz, neste trabalho o OEPc foi avaliado em diferentes modelos animais de inflamação, com a hipótese de que o efeito da inalação do OEPc ou de algum de seus componentes, possa ativar vias resolutivas da inflamação, pela liberação de AnxA1 e assim ativar o FPR2, estimulando a liberação de peptídeos opioides, os quais contribuem para o efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo do OEPc. Neste sentido, a partir da inalação do OEPc, é possível estimular vias capazes de produzir um efeito anti-hiperalgésicos, anti-inflamatórios e pró-resolutivos em modelos inflamação persistente? Sendo a via inalatória uma via importante para administração de agentes terapêuticos, segura, eficaz, de rápida absorção e não invasiva.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Inflamação

A inflamação é um complexo processo fisiológico, mediado por uma interação entre o sistema imune inato, sistema imune adaptativo e mediadores inflamatórios em diferentes vias de sinalização⁴³, frente a alterações teciduais que podem ser causadas por agentes químicos e térmicos, microrganismos, traumas, toxinas ou de natureza autoimune. Caracteriza-se por alterações teciduais envolvendo fenômenos angiogênicos, liberação de mediadores inflamatórios e acúmulo de leucócitos^{1,44}. É um mecanismo benéfico e geralmente protetor ao organismo, sua função é manter a homeostase tecidual, remover fatores agressores com potencial dano celular, promover reparação, cicatrização e regeneração do tecido e de sua função fisiológica^{1,2}.

Ao longo da história, estudiosos relataram eventos envolvidos no processo fisiológico da inflamação, chamados de sinais cardinais, descritos como: rubor, tumor, calor, dor e perda de função^{43,45}. Estes sinais e sintomas são caracterizados por aumento do fluxo sanguíneo local que leva a vasodilatação, aumento da permeabilidade dos vasos, levando ao extravasamento de proteínas e conseqüentemente ao aumento da saída de líquido para os espaços intersticiais, migração de leucócitos para o tecido lesionado e sensibilização de nociceptores^{46,47}. Estas alterações bioquímicas, celulares e vasculares são influenciadas por diferentes tipos de células com funções específicas, como as células endoteliais, células residentes do tecido e mediadores inflamatórios⁴⁸.

Após um gatilho inicial, por exemplo: um estímulo nocivo, que leva a lesão do epitélio, rapidamente ativadas células residentes no tecido, como os mastócitos que degranulam liberando mediadores de sinalização rápida que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular⁴⁹. Além disso, outras células residentes (macrófago, células endoteliais e dendríticas) quando ativadas produzem e secretam mediadores inflamatórios quimioatrativos que facilitam a chegada de neutrófilos ao sítio da lesão, os quais desempenham um papel fagocítico com a subsequente liberação de outros mediadores pró-inflamatórios⁵⁰.

A ação desses mediadores pró-inflamatórios sobre as células endoteliais leva a vasodilatação, ao aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Estes

eventos vasculares estão vinculados a liberação especificamente de aminas vasoativas como a histamina e serotonina, produtos da degranulação de mastócitos; produtos do sistema complemento, moléculas de adesão celular, as quimiocinas e citocinas, destacando o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que induz a liberação de outras citocinas como interleucina 1-Beta (IL-1 β). Além disso, os eicosanoides, metabólitos do ácido araquidônico (AA) como as prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) e fator de ativação plaquetária. São considerados mediadores chaves para o evento inflamatório. Outros mediadores como cininas (bradicinina) e neurocininas, substância P, óxido nítrico (NO) e radicais livres superóxidos trabalham juntos de forma organizada e ativa para a modulação do processo inflamatório¹. Com o aumento da concentração de alguns destes mediadores como as PGs, substância P e aminas vasoativas simpatomiméticas como a histamina e serotonina, os neurônios aferentes primários são estimulados, aumentando sua sensibilização e contribuindo para o estímulo nociceptivo⁴⁶.

Com a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e extravasamento de fluidos do sangue para o tecido lesado, o complexo conjunto de substâncias produzidas forma um gradiente de concentração na área lesionada produzindo uma quimioatração de neutrófilos e macrófagos para o local da inflamação. A transmigração dos leucócitos do vaso para o tecido se dá por meio de fases distintas que levam a marginalização, rolamento, adesão ao endotélio, diapedese e migração do vaso para o tecido por meio de quimiotaxia (Figura 1)^{51,52}.

Durante a marginalização o neutrófilo migra da região central do vaso sanguíneo para a periferia, após este processo, as citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) entre outros mediadores agem levando ao aumento da expressão das moléculas de adesão (moléculas de adesão celular vascular [VCAM-1], moléculas de adesão celular plaqueta-endotélio e moléculas de aderência intracelular [ICAM-1, 2, 3], selectinas [L, P, E] e integrinas) expressas nas membranas celulares de leucócitos e do epitélio. Essas moléculas de adesão fazem com que os leucócitos fiquem aderidos ao endotélio, permitindo assim, o seu rolamento pela parede do vaso, em seguida transmigram do vaso para o tecido por meio de junções entre as células, caracterizado como processo de diapedese (Figura 1)^{52,53}.

Os neutrófilos necessitam de moléculas quimioatraentes para facilitar sua transmigração para o tecido lesionado, estas moléculas são geralmente subprodutos

de bactérias, quimiocinas como por exemplo: proteína quimiotática para monócitos -1 (MCP-1), leucotrieno ou fator de ativação plaquetária⁵².

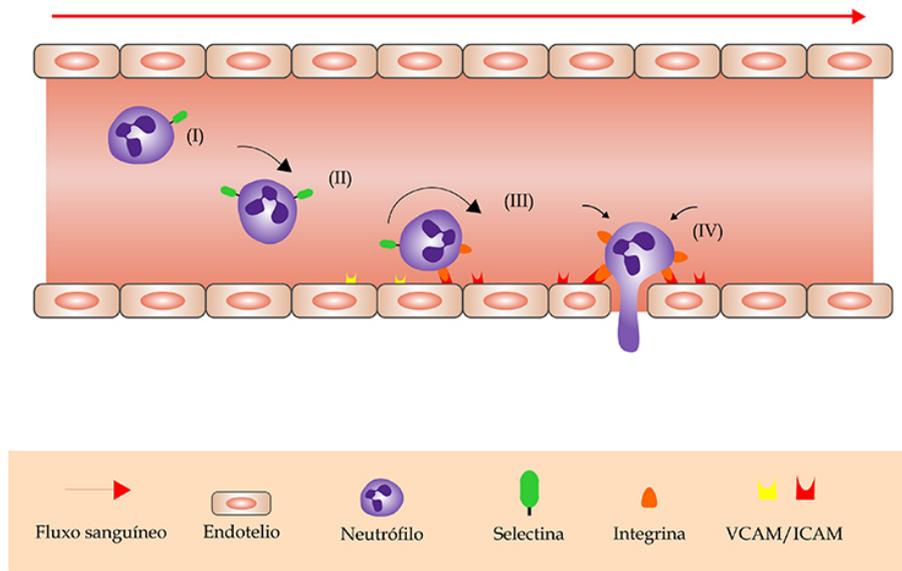


Figura 1 – Transmigração de leucócitos. Processo de marginalização (I), rolamento (II), adesão ao endotélio (III) e transmigração por diapedese (IV). Em resposta a estímulo inflamatório, pela ação de mediadores inflamatórios os neutrófilos (I) migra da região central do vaso para a periferia, em seguida (II) os neutrófilos rolam ao longo da parede endotelial vascular através de interações mediadas por selectinas. Após, (III) aderem ao endotélio através da ligação de integrinas na superfície de neutrófilos a ICAM-1 ou VCAM-1 na superfície de células endoteliais. Após (IV) transmigram do vaso para o tecido por meio de junção celular.

Fonte: Adaptado de Yuan et al., 2015.⁵³

Uma vez no foco inflamatório, os neutrófilos agem como a principal linha de defesa do sistema imune inato e desempenham funções fagocíticas e microbicidas. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e possuem grânulos citoplasmáticos que se inserem na membrana plasmática liberando enzimas proteolíticas no meio extracelular capazes de lisar microrganismos. Nos grânulos estão presentes enzimas como fosfolipase A₂ (PLA₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mieloperoxidase (MPO), ácido hipocloroso (HClO), entre outras. Após a liberação destas enzimas, o neutrófilo finaliza seu ciclo entrando em processo de apoptose (morte celular programada)⁵⁴⁻⁵⁶.

Já os monócitos e macrófagos, estão circulantes no sangue e também presentes no tecido, esses últimos, quando chegam ao tecido tornam-se células maduras capazes de fagocitar quantidades maiores de células necróticas, passando a ser chamados de macrófagos. Sua principal função é fagocitar detritos e neutrófilos

apoptóticos, no entanto, quando existe uma incapacidade de remover estas células apoptóticas produz-se um acúmulo no sítio da lesão podendo levar ao dano do tecido⁴⁷.

As PGs possuem um importante papel como mediadores pró-inflamatórios, agem em diversos receptores específicos, aumentam a permeabilidade vascular por meio de ação sinérgica com mediadores como a histamina e a bradicinina e potencializam suas ações promovendo a estimulação dos nociceptores^{2,57}. As PGs são mediadores lipídicos sintetizados a partir do AA, e são produzidas pela esterificação dos fosfolipídios de membrana pela enzima PLA₂. O AA pode dar origem aos leucotrienos quando sofre ação da enzima lipoxigenase (LOX) ou as PGs (PGI₂, PGE₂ e PGD₂), prostaciclina (PI) e tromboxanos (TXs), quando sofre ação da enzima cicloxigenase (COX). A COX é formada de duas isoformas, a cicloxigenase tipo 1 (COX-1), caracterizada como constitutiva, e está presente em quase todos os tipos de células, geralmente relacionadas com funções fisiológicas do organismo. A cicloxigenase tipo 2 (COX-2), chamada de induzida, está relacionada com estímulos inflamatórios, algésicos ou térmicos e é estimulada pela migração de células no tecido lesionado, presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais². No sítio da lesão a COX-2 é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , interleucina 2 (IL-2), e outros mediadores. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) e glicocorticoides inibem a sua expressão.

As citocinas são importantes mediadores pró-inflamatórios, estas glicoproteínas são produzidas por diferentes tipos de células em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios, modulam funções celulares e sua secreção é regulada e transitória. No processo inflamatório, as citocinas são liberadas a partir da ativação de células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos no tecido, que após reconhecerem o estímulo inflamatório, liberam uma cascata de citocinas as quais contribuem para o desenvolvimento e manutenção dos sinais e sintomas envolvidos na inflamação^{58,59}.

De um modo geral, as citocinas são classificadas em pró ou anti-inflamatórias, de acordo com a função que desempenham. Assim, as citocinas pró-inflamatórias, incluem TNF- α , IL-1 β , IL-2, interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8) e entre as citocinas anti-inflamatórias estão a IL-4, IL-10, IL-13 e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β)^{60,61}. Após lesão tecidual, as citocinas pró-

inflamatórias TNF- α e IL-1 β são as primeiras moléculas a serem produzidas para o foco inflamatório, agem sobre receptores específicos dos neurônios sensoriais e induzem a síntese de outros mediadores. Estas citocinas são mediadores essenciais no desenvolvimento da dor inflamatória⁵⁹. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é sintetizado principalmente por macrófagos e linfócitos T após o estímulo inflamatório. Interage por meio de receptores 1 para o TNF- α (R1TNF- α) e receptores 2 para o TNF- α (R2TNF- α)⁶².

A IL-1 β age por meio do receptor para IL-1 (IL-1R), após ligar-se, induz expressão de outras citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em células endoteliais, sinalizando para células inflamatórias. A IL-1 β contribui para o desenvolvimento de lesão vascular por meio de estimulação da proliferação e diferenciação celular e a liberação de enzimas degradantes⁶³. Após o trauma, a liberação de TNF- α induz a liberação IL-1 β e IL-8, que promovem a indução da enzima COX responsável pela produção das PGs, e atua na liberação local de aminas simpatomiméticas⁴⁶.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que possui atividade inibitória em diferentes funções imunológicas com efeitos anti-inflamatórios bem estudados em macrófagos. Quase todas as células imunes, incluindo células T, células B, monócitos, macrófagos, mastócitos, granulócitos, células dendríticas e queratinócitos, produzem IL-10. A estimulação de células dendríticas, bem como a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, é um efeito observado na IL-10. Com isso, desempenha um importante papel inibitório que limita e previne danos teciduais⁶³⁻⁶⁵.

A MCP-1 tem um importante papel no recrutamento de monócitos e macrófagos. Membro da subfamília de quimiocinas CC, esta quimiocina é sintetizada por monócitos, células endoteliais, musculares lisas, epiteliais, osteoblastos e osteoclastos. MCP-1 exerce seus efeitos por meio de ligação a receptores acoplados à proteína G na superfície de leucócitos direcionados para ativação e migração. O papel da MCP-1 e do seu receptor CCR2 no recrutamento de monócitos durante a infecção ou sob outras condições inflamatórias é bem conhecido⁶⁶.

O TGF- β é uma importante citocina com propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias. Sob condições fisiológicas, o TGF- β tem um papel bem documentado na embriogênese, proliferação celular, diferenciação, apoptose, adesão cicatrização de feridas e inflamação⁶⁷.

De um modo geral, o processo inflamatório é caracterizado por duas fases distintas, uma fase inicial que geralmente permanece por um curto período de tempo, caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios com o objetivo de eliminar o agente agressor, durante este processo ocorre um balanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, esta fase é chamada de inflamação aguda. No entanto, quando o dano tecidual persiste por um período prolongado, ocorre acúmulo excessivo de neutrófilos ou processo inflamatório não apresenta uma resolução adequada, evolui para uma fase crônica, onde ocorre uma deposição de colágeno e cicatrização, muitas vezes levando a perda de função do tecido tornando-se um estímulo prejudicial e contribuindo para a patofisiologia de muitas doenças crônicas. As células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) são as principais células presentes no infiltrado inflamatório na fase crônica^{51,68,69}.

Com o final do estímulo nocivo, a demanda de mediadores pró-inflamatórios é diminuída, somado a este evento, ocorre um aumento de mediadores denominados pró-resolutivos, os quais induzem o aumento de macrófagos responsáveis por fagocitar microrganismos e células apoptóticas e ao aumento da drenagem dos fagócitos pelos vasos linfáticos⁷⁰. Os restos celulares dos neutrófilos apoptóticos são removidos por macrófagos, e após a fagocitose, estes macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 ampliando sua capacidade fagocítica impedindo o recrutamento de neutrófilos adicionais, este processo torna-se essencial na resolução da inflamação. Em seguida os macrófagos M2 mudam seu fenótipo novamente para macrófago resolutivo, passando a apresentar um perfil mais anti-inflamatório produzindo IL-10 e aumentando a produção de outros mediadores anti-inflamatórios, antifibróticos como arginase-1 e pró-resolutivos⁷¹.

1.1.2 Resolução da inflamação

A resolução da inflamação é considerada um processo diferenciado do processo anti-inflamatório, onde, anti-inflamatório refere-se principalmente a uma ação inibitória ou bloqueio da ação, como a inibição do extravasamento de leucócitos para o sítio da lesão, já pró-resolutivo indica uma estimulação e ativação de processos específicos como apoptose ou eferocitose^{72,73}. Assim como se descreve os pilares indicadores do processo inflamatório, no processo resolutivo tem se descrito "os cinco pilares da resolução" como a remoção de microrganismos, células mortas e detritos;

restauração da integridade vascular e perfusão; regeneração tecidual; remissão da febre e alívio da dor inflamatória⁷⁴.

Inicialmente a resolução era considerada um fenômeno passivo, associado a finalização do estímulo inflamatório, redução de moléculas quimioatraentes, do gradiente de quimiocinas e prevenção do recrutamento de leucócitos. Mais tarde, foi relatado a existência de mecanismos endógenos, tais como mediadores quimioatraentes e moléculas de adesão, atuando na inibição da migração de leucócitos para o sítio da lesão. Portanto, a resolução é um processo altamente coordenado e ativo, caracterizado por eventos celulares e moleculares^{3,4,70,75}.

Evidências indicam que os mediadores pró-inflamatórios contribuem para o início da resposta pró-resolutiva. Com isso, o processo de resolução inicia-se logo após o início da resposta inflamatória. Mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos são produzidos endogenamente para mediar os eventos inflamatórios⁵.

O mecanismo para a resolução do processo inflamatório é mediado pela ativação de mediadores endógenos pró-resolutivos e anti-inflamatórios, dentre eles estão as lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas e anexinas (Figura 2)⁷⁶. A resolução quando bem-sucedida, finaliza o processo inflamatório, limitando a lesão excessiva do tecido, garante a recuperação da função fisiológica e restabelece a homeostase tecidual, impedindo assim, o desenvolvimento de um quadro inflamatório crônico⁵. Esse mecanismo ativo estimula vias específicas (regulação de citocinas e quimiocinas), conduzindo a inibição do recrutamento de leucócitos polimorfonucleares; promove apoptose celular programada e remoção dessas células por macrófagos por meio de um processo não-flogístico^{3-5,51,77}.

A inflamação aguda caracteriza-se principalmente pela infiltração de neutrófilos no tecido lesionado, embora este evento seja essencial, o influxo exagerado torna-se nocivo ao organismo. Portanto, a característica histológica chave na resolução da inflamação aguda é a finalização do extravasamento dessas células para o local inflamado e subsequente remoção por meio de eferocitose por macrófagos^{1,3,4}.

As lipoxinas (LXs) são conhecidas como mediadores anti-inflamatórios e também pela sua capacidade em acelerar o processo de resolução por diferentes mecanismos^{4,78}. A LXA4 possui seus efeitos mediados pela ação em receptores

acoplados à proteína G que pertencem à família dos FPR. Em humanos, são conhecidos três receptores diferentes, o FPR1, FPR2 e FPR3^{79,80}.

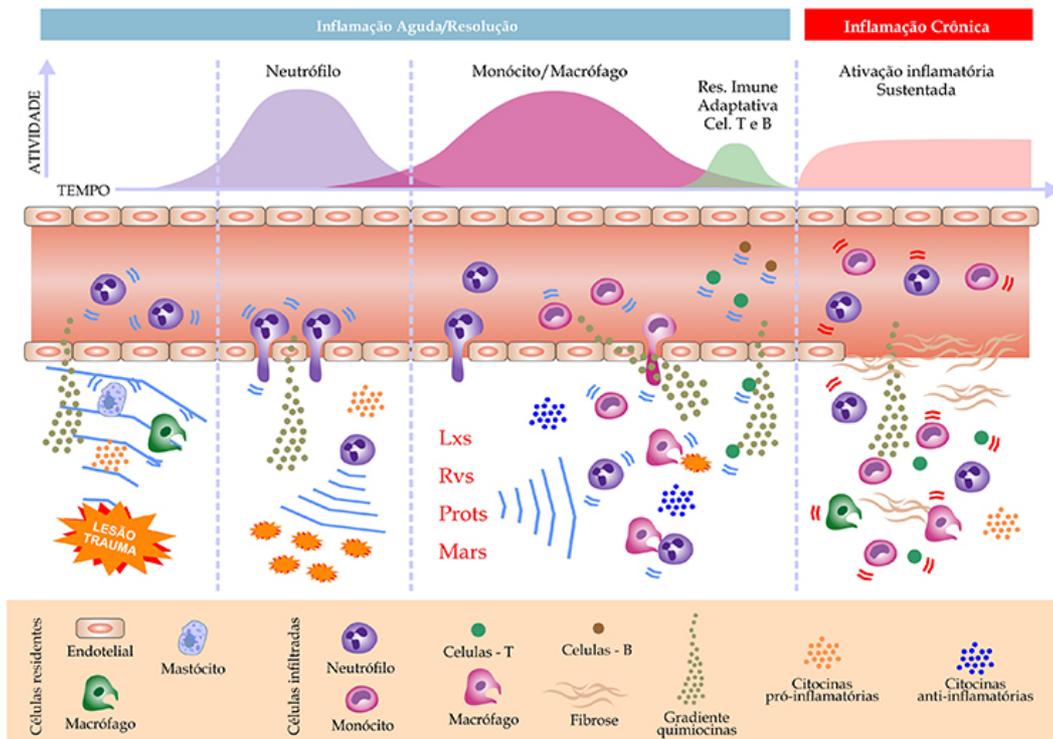


Figura 2 – Processo inflamatório e resolutivo. A partir da lesão tecidual inicia uma cascata inflamatória que consiste em ativação de células residentes e subsequente liberação de mediadores inflamatórios: citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias. Estes mediadores aumentam a permeabilidade vascular, extravasamento e infiltração de leucócitos (macrófagos e neutrófilos), cuja função fagocítica. As respostas anti-inflamatórias e pró-resolutivas são caracterizadas pelo aumento da síntese de mediadores lipídicos incluindo lipoxinas (LXs), resolvinas (Rvs), protectins (Prots) e maresins (Mars). Estes mediadores promovem a resolução do processo inflamatório.

Fonte: Adaptado de Crean e Godson, 2015.⁸¹

O FPR2 é expresso em diferentes células, principalmente em células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos e micróglia, e exerce importantes funções regulatórias do processo inflamatório^{76,82,83}. Sua expressão é induzida tanto por mediadores pró-inflamatórios (TNF- α) quanto anti-inflamatórios, como os glicocorticoides⁸⁰.

A AnxA1 também conhecida como lipocortina 1⁸⁴, é uma proteína de 37 kDa, membro da superfamília das anexinas ligadas a fosfolipídios dependentes de cálcio. A AnxA1 é constituída por pelo menos 13 proteínas identificadas em mamíferos,

estruturalmente semelhantes, porém com funções biológicas específicas, nomeadas de Anexinas A1 – A13^{85,86}.

Estruturalmente, as anexinas são constituídas por dois domínios, um N-terminal que interage com os diferentes ligantes destas proteínas e um central C-terminal responsável pela afinidade com cálcio e consequente ligação aos fosfolipídios^{87,88}. A AnxA1 é constitutivamente expressa em abundância no citoplasma de neutrófilos, monócitos e macrófagos. Durante o processo inflamatório são ativadas intracelularmente e rapidamente mobilizadas e externalizadas ou secretadas do citoplasma para a membrana⁸⁹.

Após a ativação celular, a AnxA1 é então externalizada e/ou secretada através três diferentes mecanismos: (a) ativação do transportador ABC (*ATP-binding cassette*); (b) fosforilação do resíduo de serina no domínio N-terminal, (c) ou através da fusão de grânulos de gelatinase contendo AnxA1 com a membrana plasmática. Na presença de ions Ca^{2+} , a AnxA1 extracelular sofre uma alteração conformacional que leva à exposição da região N-terminal e à ligação ao seu FPR2. Esta sinalização pode ser de forma autócrina, parácrina ou justácrina. A interação justácrina envolve interação entre a AnxA1 na superfície da célula secretora e o FPR2 da célula alvo. Este parece ser o mecanismo de ação mais plausível em condições inflamatórias (Figura 3)⁹⁰.

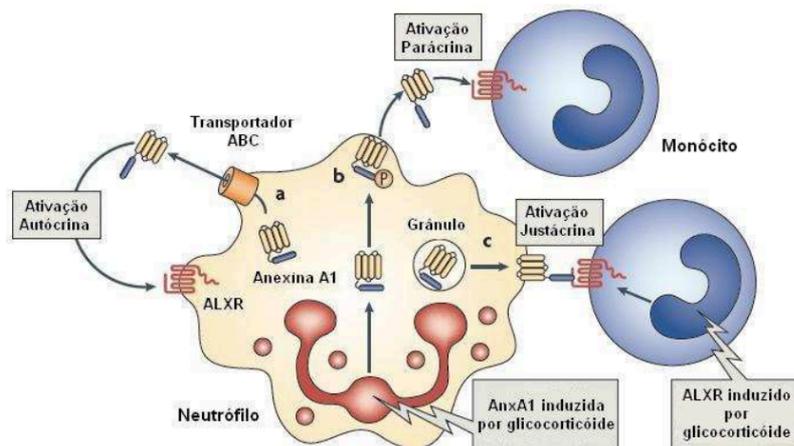


Figura 3 – Mobilização de AnxA1 em células ativadas e seu mecanismo de ação. Após ativação celular, a AnxA1 intracelular é mobilizada para a membrana plasmática e externalizada pela (a) ativação do transportador ABC; (b) fosforilação do resíduo de serina e (c) fusão do grânulo com a membrana plasmática.

Fonte: Adaptado de Perretti e D'acquistio, 2009.⁹⁰

O efeito desta proteína na resolução da inflamação, se deve a inibição do extravasamento de leucócitos para o local da inflamação^{90,91}, devido a inibição da atividade das moléculas de adesão nas interações leucócito-endotélio, principalmente as integrinas e selectinas⁹⁸.

A AnxA1 também desempenha um papel importante na modulação da dor inflamatória por meio da ativação do FPR2. A AnxA1 pode exercer sua ação por diferentes formas, incluindo a inibição de citocinas envolvidas na transmissão da dor; por meio da ativação do FPR2; inibir o acúmulo de neutrófilos através da prevenção da migração transendotelial; facilitar a liberação tônica de opioides dos neutrófilos no sítio inflamatório. Além disso, interromper a transmissão nociceptiva periférica pela supressão da excitabilidade neuronal (Figura 4)⁹².

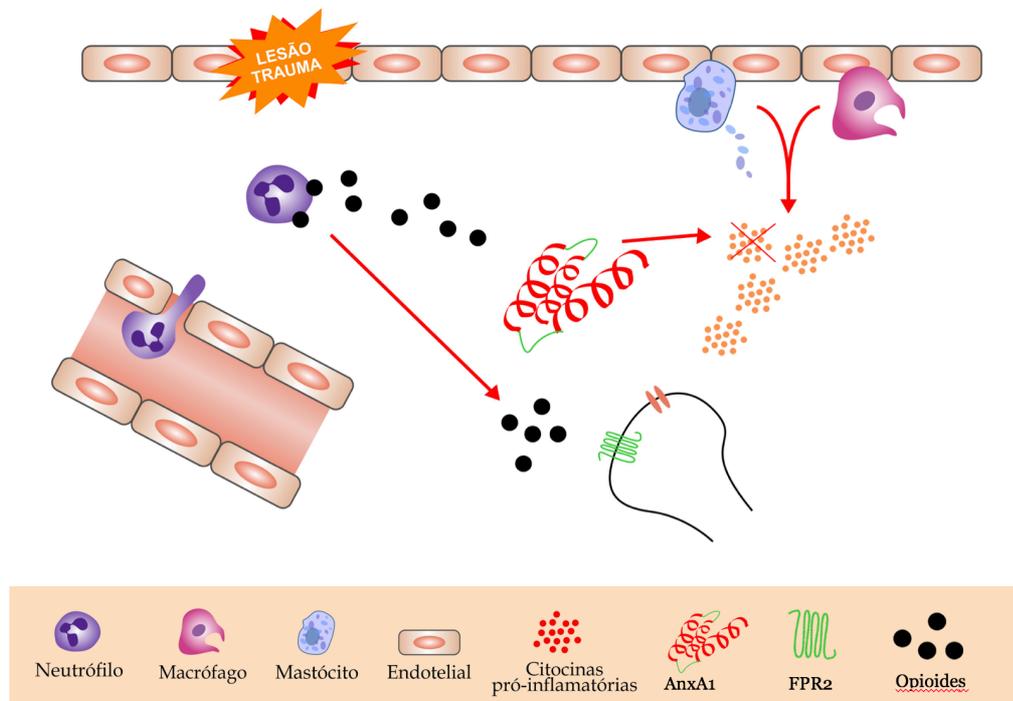


Figura 4 – A AnxA1 desempenha papel na modulação da dor inflamatória por meio da ativação do FPR2. Após a lesão tecidual, mastócitos se degranulam e células do sistema imune migram para o tecido inflamado. Neutrófilos e macrófagos transportam peptídeos opioides. AnxA1 por meio da ativação do receptor FPR2, inibe citocinas envolvidas na transmissão da dor; além disso, inibe o acúmulo de neutrófilos através da prevenção da migração transendotelial.

Fonte: Adaptado de Chen; Lv; Pei, 2014.⁹²

Foi identificado que tanto a AnxA1 como o FPR2 estão expressos em estruturas do sistema nervoso periférico e central de roedores, envolvidas na transmissão nociceptiva. Especialmente, a AnxA1 foi encontrada no gânglio sensorial do nervo espinal⁹³, na medula espinal e encéfalo. A AnxA1 é expressa em altas concentrações

em neurônios e em menor concentração nas células gliais, células endoteliais, células musculares lisas dos vasos sanguíneos e nas células endométriais⁹⁴. A distribuição anatômica da AnxA1 e de seu FPR2 suportam um papel essencial dessa proteína na modulação nociceptiva.

O aumento da AnxA1 pode exercer seus efeitos anti-hiperalgésicos por meio da inibição de citocinas envolvidas na transmissão da dor, seguida da inibição da indução da COX-2, enzima responsável pela produção de PG que contribuem para a hiperalgesia inflamatória⁹⁵.

Evidências indicam que a ativação do FPR2 pela AnxA1 poderia induzir a liberação de opioides pelos neutrófilos. Os peptídeos opioides regulam a transmissão nociceptiva através de ações inibitórias pós-sináptica, produzida parcialmente pelo aumento da condutância do K⁺ e pela inibição pré-sináptica, que reduz a liberação de glutamato, substância P e outros neurotransmissores dos terminais centrais dos neurônios sensoriais¹².

Estudos prévios têm demonstrado que dentre os eventos celulares presentes na inflamação, em 24h após injeção de CFA, considerada a fase precoce e reconhecida pela infiltração de neutrófilos, a liberação tônica de peptídeos opioides destas células leva ativação de receptores opioides expressos nas terminações nervosas periféricas, enquanto os monócitos/macrófagos são predominantes na fase tardia da inflamação que também liberam opioides¹⁶.

Além disso, a AnxA1 possui um importante papel na ação anti-inflamatória produzida por glicocorticoides, acredita-se que esta ação aconteça devido a AnxA1 inibir a atividade da enzima PLA₂⁹⁶, a inibição da atividade desta enzima consequentemente inibe a ativação do AA e bloqueia da síntese de mediadores inflamatórios e pró-resolutivos como PGs, leucotrienos e fator de agregação plaquetária⁸⁸. AnxA1 inibe a síntese de COX-2 e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e estimula a liberação de IL-10 em fagócitos⁹⁷. A modulação da AnxA1, portanto, pode ter potenciais terapêuticos importantes em doença associada à dor inflamatória⁹⁸.

O processo inflamatório descontrolado ou não resolvido adequadamente, pode conduzir a danos teciduais, com eventual perda de função do órgão, contribuindo para o mecanismo fisiopatológico de doenças inflamatórias crônicas, incluindo síndromes metabólicas e patologias de natureza autoimune, como osteoartrite, artrite,

aterosclerose, doenças cardiovasculares, câncer, doenças intestinais, osteoporose, obesidade, Alzheimer e sepse^{43,99-101}.

1.1.3 Uma breve visão sobre dor

A dor, constitui uma experiência inerente ao ser humano, um mecanismo de alerta do organismo, informando que algo está ameaçando o bem-estar. Uma experiência complexa, subjetiva e multifatorial, também associada a uma diversidade de condições clínicas que afeta grande parte da população^{6,102}. Aproximadamente 20% da população adulta europeia apresenta algum tipo de dor crônica¹⁰². No Brasil, a dor lombar é a principal causa de anos vividos com incapacidade¹⁰³. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030, a dor crônica será o sintoma comum associada as principais doenças globais e quando associada a processos inflamatórios, torna-se uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo^{104,105}.

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”¹⁰⁶. A sensação dolorosa não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também de processos emocionais e cognitivos⁶. Importantes mecanismos endógenos são responsáveis pela modulação da resposta nociceptiva e podem atuar tanto como mecanismos de inibição, quanto de facilitação¹⁰⁷.

A nociceção refere-se à transdução do estímulo nocivo do sistema nervoso periférico (SNP) ao sistema nervoso central (SNC). O estímulo nociceptivo ocorre em nível periférico pela estimulação de terminações nervosas livres presentes nos nociceptores, que estão localizadas na porção distal dos neurônios aferentes. Os nociceptores podem ser ativados por diferentes sinais nocivos, incluindo estímulos físicos/mecânicos ou químicos e mediadores inflamatórios, como bradicinina e prostaglandina E₂ (PGE₂)^{6,107,108}. Em seguida, o impulso elétrico é transmitido por fibras do tipo A δ e do tipo C, da periferia à medula espinal, seguido da liberação de neurotransmissores, os quais podem modular a resposta nociceptiva por vias ascendentes para o tálamo e centros superiores no córtex somatossensorial, região onde ocorre a percepção da dor (Figura 5)⁷.

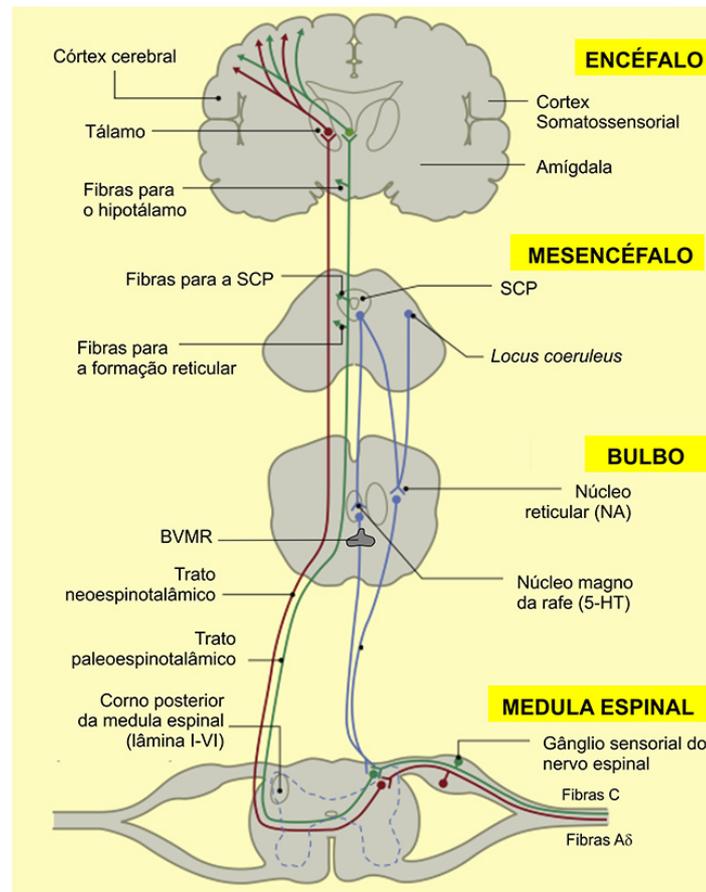


Figura 5 – A nocicepção é um processo bidirecional de vias neuronais ascendentes e descendentes, e pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibidores da dor. A ativação destas vias estimula a liberação de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e opioides, que bloqueiam os estímulos nociceptivos. Esta modulação pode ocorrer a nível periférico, espinal e supra-espinal, em consequência, a liberação de glutamato é reduzida e a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina é aumentada e a percepção da dor é reduzida.

Fonte: Adaptado de Ossipov, Dussor e Porreca, 2010.¹⁰⁸

A nocicepção é um processo bidirecional de vias neuronais ascendentes e descendentes, e pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibidores da dor, como as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas, opioidérgicas, dopaminérgicas, adenosinérgicas e canabinoidérgicas. A ativação destas vias estimula a liberação de neurotransmissores que bloqueiam os estímulos nociceptivos por inibição pós-sináptica direta ou inibição pré-sináptica. Em consequência, a liberação de glutamato é reduzida e a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina é aumentada. Com isso, a percepção da dor é reduzida^{8,9,10}.

Os peptídeos opioides são capazes de regular a transmissão nociceptiva por meio de ações inibitórias, por inibição pós-sináptica, produzida parcialmente pelo

aumento da condutância do K^+ ou por inibição pré-sináptica da liberação de glutamato, substância P e outros neurotransmissores dos terminais dos neurônios sensoriais. A diminuição da liberação de neurotransmissores das fibras aferentes primárias, causada pelo opioide, é resultado de mecanismos efetores que influenciam a modulação de canais de Ca^{2+} e K^+ nos terminais sensoriais, diminuindo a excitabilidade neuronal, explicando assim, os efeitos inibitórios de opioides exógenos^{11,12,13}.

Em condições inflamatórias periféricas, a modulação da excitabilidade neural é um fenômeno primordial para o controle da analgesia^{109,110}. Neste caso, na fase inicial do processo inflamatório, células imunes, principalmente neutrófilos, em fases mais tardia, monócitos/macrófagos e linfócitos, migram para o tecido inflamado transportando peptídeos opioides endógenos^{111,112}, que são liberados e influenciam na transmissão da informação nociceptiva. Além da liberação de peptídeos opioides endógenos, a síntese e expressão dos receptores opioides no gânglio sensorial do nervo espinal também é aumentada, influenciando na resposta analgésica modulada periféricamente (Figura 6)¹¹³.

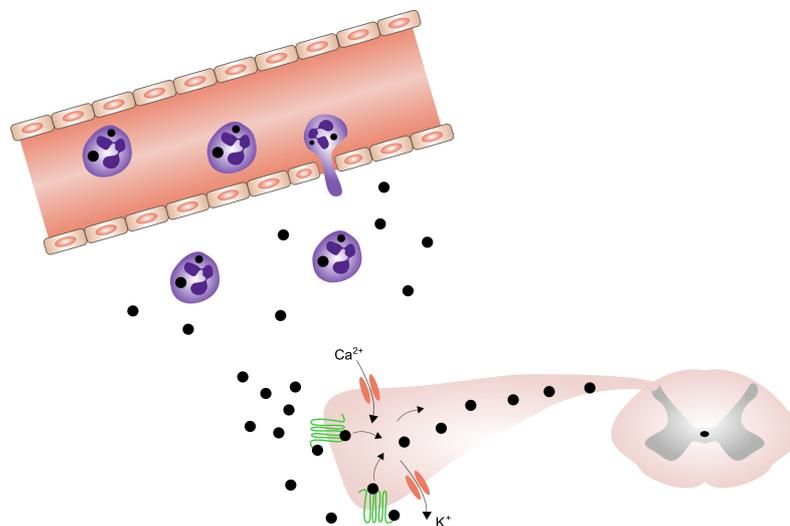


Figura 6 – Neutrófilos migram para o tecido inflamado transportando peptídeos opioides. Os opioides são capazes de regular a transmissão nociceptiva por meio de ações inibitórias, por inibição pós-sináptica e modulação de canais de Ca^{2+} e K^+ nos terminais sensoriais, diminuindo a excitabilidade neuronal.

Fonte: Adaptado de Bodnar, 2005¹¹; Trescot et al., 2008¹²; Al-Hasani e Bruchas, 2011¹³.

1.1.4 Via inalatória

Para compreender como os óleos essenciais atuam no organismo e produzem seus efeitos fisiológicos, é necessário entender o funcionamento da via inalatória/respiratória e a absorção das moléculas voláteis. Quando uma substância é inalada ela pode estimular o sistema olfatório e assim ativar diferentes estruturas do sistema nervoso central (SNC). No sistema respiratório, essa substância também pode ser absorvida pela extensa rede de capilares pulmonares e assim alcançar a corrente sanguínea produzindo um efeito sistêmico^{114,115}.

O sistema olfatório reconhece e discrimina moléculas voláteis no ambiente e possui papel fundamental para a sobrevivência e comportamento das espécies¹¹⁶. No entanto, a fisiologia desse sistema, ainda não é bem compreendida. O sistema olfatório é capaz de discriminar uma grande quantidade de moléculas químicas odorantes que são codificadas pelo SNC. Essa acuidade perceptiva deriva de uma série de eventos, onde após o estímulo olfatório ativa múltiplas áreas do encéfalo que recebem e modulam a informação sensorial olfatória¹¹⁷.

Fica estabelecido pela literatura que, após a inalação, as moléculas de odor podem desempenhar diferentes ações fisiológicas por diferentes vias. A partir da inalação de moléculas voláteis, o estímulo olfatório se dá (i) pela ativação de sinais elétricos, os quais transmitem informações para núcleos superiores no sistema nervoso central (SNC); além disso, por meio da absorção das moléculas voláteis (ii) a via inalatória contorna a barreira hematoencefálica e as substâncias chegam ao SNC e (iii) pelos pulmões e mucosa nasal são levados para a corrente sanguínea sistêmica^{38,118}.

O sentido do olfato é mediado por inervações dos nervos olfatório e trigêmeo (I e V pares de nervos cranianos, respectivamente), os quais inervam a mucosa e os seios nasais, e posterior transmitem sinais elétricos para núcleos do tálamo e áreas corticais^{38,117,119-123}. As fibras nervosas do nervo trigêmeo ramificam-se dentro da mucosa nasal, através do epitélio (tanto respiratório como olfatório), a informação sensorial é conduzida para os núcleos trigeminais localizados no bulbo olfatório, tronco encefálico e medula espinal¹²⁴⁻¹²⁶. Adicionalmente, as moléculas de odor também podem atingir o epitélio olfatório através da boca, o que se refere a via retronasal¹²⁷⁻¹²⁹.

A partir do trato olfatório, as informações olfatórias são levadas por vias aferentes a estruturas encefálicas distintas, incluindo o núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório, córtex piriforme, núcleo amigdalóide, córtex periamigdalóide e córtex entorrinal. As informações transmitidas fazem projeções diretas para estruturas como o hipotálamo, o hipocampo, amígdala, córtex cingulado anterior, córtex orbitofrontal e insula, que manipula processos de pensamento consciente ou o sistema límbico, que processa as emoções^{40,129-131}. As projeções das fibras nervosas passam pelo bulbo olfatório e chegam a regiões como a substância negra, núcleos da rafe e *locus coeruleus*, núcleos envolvidos com o processamento e modulação da dor³⁹. Notavelmente, a inalação de óleos essenciais, pode ativar receptores de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, dopamina, opioides e canabinóides^{40-42,132,133}.

A via inalatória tem sido utilizada como uma abordagem para a administração de fármacos com alvo diretamente no SNC³⁸. Sabe-se que a barreira hematoencefálica (BHE) garante a entrada seletiva de nutrientes e outras moléculas essenciais ao SNC, limitando o acesso de toxinas ou agentes causadores de potenciais danos. Assim, a BHE limita a distribuição de substâncias terapêuticas administradas sistemicamente e permite que apenas as moléculas lipofílicas e de baixo peso molecular cheguem no SNC¹¹³⁴⁻¹³⁶. Sendo assim, os óleos essenciais devido sua estrutura molecular é capaz de penetrar a BHE^{28,137}.

A via inalatória é uma forma eficaz de administrar agentes terapêuticos como uma alternativa as vias oral e intravascular, uma vez que é de rápida absorção e ação por meio da mucosa, devido a alta vascularização venosa e linfática da cavidade nasal, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem e reduzindo possíveis efeitos adversos e colaterais^{119,120,138,139}. Estudos realizados em modelos animais demonstraram evidências para a absorção inalatória de moléculas de fármacos como uma via potencial de transporte direto para o SNC¹⁴⁰. Isso é possível porque a cavidade nasal é o único local no corpo humano onde o sistema nervoso está em contato direto com o ambiente circundante. Assim, após a inalação, as moléculas lipofílicas são diretamente transportadas para o espaço subaracnóideo que se estende para dentro da cavidade nasal e chegam ao compartimento do líquido cefalorraquidiano. Pesquisas têm enfatizado a importância da absorção do líquido cefalorraquidiano através da via olfatória, desencadeando resposta imune do SNC¹⁴¹⁻¹⁴³.

Devido as características das vias aéreas superiores, podem tornar a administração inalatória uma superfície mais adequada para administração de fármacos. Estudos demonstram que a administração de insulina por via inalatória pode oferecer um método inovador capaz de, não apenas controlar a glicose no sangue, mas também controlar os efeitos da insulina no metabolismo energético neuronal e a secreção de substâncias melhorando a alça de retroalimentação da liberação da insulina¹⁴⁴. Dessa forma, pode ser utilizada não apenas para o tratamento de diabetes, mas também para retardar a progressão da doença de Alzheimer e regulação de neurotransmissores como a acetilcolina^{145,146}.

Além disso, a administração intranasal de interferon 1beta (IFN-1 β) uma citocina anti-inflamatória, resultou em níveis significativos aumentados dessa citocina no bulbo olfatório, núcleo olfatório anterior, nervos trigêmeos e óptico, gânglios linfáticos cervicais, tronco encefálico, cerebelo e medula espinal¹⁴⁷.

Em estudo experimental, com intuito de verificar o papel da via olfatória no efeito ansiolítico do óleo essencial de lavanda, um estado de anosmia foi induzido em camundongos pela injeção intranasal da solução de zicam (acetato de zinco + gluconato de zinco). Em conclusão, este estudo afirma que a condição de anosmia não interferiu no efeito ansiolítico da inalação de óleo de lavanda, sugerindo que o sistema olfatório não desempenha um papel central nos efeitos ansiolíticos, no entanto, o efeito da inalação do óleo essencial pode ter sido mediada através de absorção pela mucosa pulmonar, o que leva os compostos ativos para a circulação sistêmica e, conseqüentemente, para o SNC¹⁴⁸.

Estudos tem relatado que a administração intranasal da solução de zicam, uma substância comercialmente utilizada para aliviar sintomas do resfriado, produz citotoxicidade significativa no tecido nasal, levando a dano no tecido nasal de humanos e de roedores. Após análise histológica, foi constatado grande perda do epitélio e da mucosa olfatória. Além da perda de sensibilidade dos neurônios sensoriais olfatórios à estimulação de odorantes, leva ao rompimento das fibras aferentes do epitélio olfatório para o bulbo olfatório, resultando assim, numa significativa disfunção do olfato, o qual pode permanecer por longo tempo, ou mesmo ser irreversível¹⁴⁸⁻¹⁵⁴.

Os OEs também podem produzir seus efeitos biológicos sistêmicos por meio da absorção das moléculas odoríficas via pulmonar/respiratória. A via pulmonar é considerada uma via para a distribuição sistêmica de agentes terapêuticos. Este

sistema inclui as vias aéreas superiores e inferiores, cavidade oral, traqueia, brônquios, incluindo bronquíolos, dutos e sacos alveolares. Por possuir grande área de superfície de absorção, boa vascularização e capacidade de troca de soluto, são características únicas que facilitam o fornecimento sistêmico das substâncias inaladas^{114,155}. A administração de morfina pela via inalatória, indica o sistema pulmonar como uma importante via de administração para opioides¹⁵⁶.

A utilização da via inalatória para administração de agentes terapêuticos possui vantagens e benefícios para o tratamento de diferentes patologias, principalmente com alvo o SNC. A via inalatória oferece rápida absorção, acesso a BHE, além de ser um método não invasivo e de baixo custo econômico. Apresenta redução dos efeitos colaterais associados à administração sistêmica, evitando o metabolismo hepático e também a necessidade de doses mais elevadas^{38,138,157}.

Em estudos prévios, foi observado que o tratamento de camundongos com óleo essencial *Cedrus atlantica* por via inalatória, foi capaz de reduzir o comportamento de dor por meio da ativação de sistemas opioidérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos e canabinoidérgicos^{41,42}. Esses estudos corroboram com a hipótese de que a inalação de substâncias terapêuticas pode ser uma via eficaz para a modulação de mediadores envolvidos no processo de dor e inflamação.

1.1.5 Aromaterapia

As plantas medicinais e aromáticas utilizadas para fins religiosos e medicinais acompanham a evolução de diversas culturas. Acredita-se que nos períodos Paleolítico (10.000 a.c.) e Neolítico (4.000 a.c.) algumas tribos já cultivavam plantas e extraíam óleos graxos vegetais. Na Índia e China, berço das medicinas tradicionais, os OEs eram utilizados com base em indicações dos textos sagrados, onde continham fórmulas sobre o uso das plantas medicinais. O incenso provavelmente é uma das formas mais antigas de utilização das essências aromáticas pela humanidade^{158,159}.

Os egípcios utilizavam substâncias aromáticas com fins medicinais, cosméticos e também eram especialistas na prática de embalsamar corpos, onde faziam o uso de OEs com propriedades antissépticas¹⁵⁸⁻¹⁶². Os gregos adquiriram dos egípcios grande parte do seu conhecimento médico e posteriormente inspiraram os romanos. No que diz respeito as substâncias aromáticas, eram utilizadas na higiene pessoal, como cosméticos e tratamentos de saúde. Entre gregos e romanos, alguns nomes se

destacam pelo aprimoramento do uso das plantas aromáticas em prol da saúde: Hipócrates e Dioscórides, descreveram um grande número de fitoterápicos; Teofrasto, escreveu o tratado sobre os odores, onde analisa os efeitos de diversos aromas sobre o sistema orgânico e Galeno, escreveu sobre a teoria da medicina vegetal onde classificou as plantas em categorias medicinais^{158,159,162}.

Na idade média, as ervas aromáticas foram de grande valia, utilizadas como antissépticas e bactericidas para evitar infecções e minimizar os efeitos da epidemia (HOARE, 2010). No final do século X, o médico árabe Avicena, descreveu um grande número de plantas medicinais e seus efeitos sobre o corpo humano, porém sua maior contribuição para a aromaterapia foi a descoberta do método de destilação dos óleos essenciais, principal método empregado atualmente. No século XVI, Paracelso foi o primeiro a utilizar o termo OE se referindo as substâncias químicas ativas presentes nas plantas¹⁵⁸⁻¹⁶³.

No entanto, a aromaterapia como atualmente se conhece deve-se a personalidades como o químico francês Maurice René Gattefossé, que por volta de 1927 criou o termo *aromathérapie* para descrever a utilização terapêutica dos OEs. Posteriormente desenvolveu pesquisas observando seus efeitos no combate de doenças, infecções, queimaduras e na cicatrização da pele^{159,163}. Mais tarde em 1946, ainda na França, Dr. Jean Valnet, médico do exército francês, utilizava OE como antissépticos e anti-infecciosos para tratar soldados com ferimentos de guerra. Após a guerra, com sua equipe Dr. Valnet progrediu em estudos sobre OEs com propriedades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e antissépticas¹⁶³. Outra personalidade em destaque, a enfermeira Marquerite Maury, por volta de 1950 foi pioneira nos estudos dos OEs observando seus efeitos por meio de inalação e absorção da pele^{159,164}.

O termo aromaterapia é definido como o uso de OEs naturais e puros, aplicados por inalação, topicamente, oralmente e outros meios, com o objetivo de promover saúde, higiene, bem-estar e qualidade de vida^{164,165}. Os OEs possuem efeitos farmacológicos, no entanto, sabe-se que através da via inalatória, são potentes agentes que influenciam o SNC⁴⁰.

A aromaterapia tem sido utilizada em diversas partes do mundo em diferentes abordagens terapêuticas. Na Inglaterra os OEs são empregados terapeuticamente por meio de inalação, massagem ou tratamentos estéticos; na França a aromaterapia é considerada uma especialidade médica, além do uso clínico, os OEs são empregados

como fitoterápicos^{163,167}. A França e a Inglaterra são precursores no uso da aromaterapia, desde a década de 30 pesquisas são realizadas sobre o uso terapêutico dos óleos essenciais. Sendo assim, considerada como uma prática integrante da aromaterapia, conceito que define uma ciência que estuda os óleos essenciais e as matérias aromáticas com respeito ao seu uso terapêutico em diferentes segmentos, como a psicologia, cosmética, perfumaria, veterinária, agronomia, marketing e além de outras áreas¹⁶⁸.

Nos Estados Unidos a aromaterapia é utilizada principalmente dentro da psiquiatria e psicologia; e no Brasil a aromaterapia está dentro do contexto das práticas integrativas e complementares, crescendo como terapêutica sendo foco de estudos e pesquisas científicas^{163,167,168}.

No Brasil, após a 8ª Conferência Nacional de Saúde em 1986, intensificou-se a discussão sobre medicinas naturais e terapias complementares. Em 2002-2005 foi lançado a Estratégia mundial sobre Medicina Tradicional, trazendo as definições sobre medicina tradicional e alternativa¹⁶⁹. Apenas em 2006 foi implantado no SUS a PNPIC com a aprovação da portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, regulamentando o uso da Medicina Tradicional Chinesa e Acupuntura, Medicina Antroposófica, Homeopatia, Fitoterapia e Termalismo¹⁷⁰.

Recentemente o Ministério da Saúde considerando que a OMS preconiza o reconhecimento e incorporação das Medicinas Tradicionais e Complementares nos sistemas nacionais de saúde, incluiu duas novas portarias ampliando a PNPICS, em 2017 a portaria nº 849, de 27 de março, incluindo a arteterapia, ayurveda, biodança, dança circular, meditação, musicoterapia, naturopatia, osteopatia, quiropraxia, reflexoterapia, reiki, shantala, terapia comunitária integrativa e yoga, sendo naturopatia um conjunto de recursos terapêuticos como: plantas medicinais, águas minerais e termais, aromaterapia, trofologia, massagens, recursos expressivos, terapias corpo-mente e mudanças de hábitos¹⁷¹; e em 2018 incluiu a portaria nº 702 de 21 de março onde consolida as práticas como aromaterapia, apiterapia, bioenergética, constelação familiar, cromoterapia, geoterapia, hipnoterapia, imposição de mãos, medicina antroposófica/antroposofia aplicada à saúde, ozonioterapia, terapia de florais e termalismo social/crenoterapia²¹ (BRASIL, 2018).

A portaria nº 702 ainda descreve, aromaterapia como sendo uma prática terapêutica secular que consiste no uso de concentrados voláteis extraídos de vegetais, definidos como óleos essenciais, com o objetivo de promover ou melhorar a

saúde, o bem-estar e a higiene. Com amplo uso individual e podendo ser associada a outras práticas, a qual pode possibilitar a potencialização dos resultados do tratamento. Além disso, a aromaterapia pode ser adotada por diferentes profissionais da área da saúde e empregada como prática complementar com o objetivo de restabelecer o equilíbrio físico ou emocional do indivíduo. E ainda, é avaliada como uma prática com matéria-prima com custo relativamente baixo refletindo uma economia de gastos públicos com tratamentos de saúde²¹.

1.1.6 Óleos essenciais

A agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) define OEs como “produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os OEs podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados”¹⁷².

Os OEs são um princípio ativo natural proveniente de plantas medicinais e aromáticas e possuem funcionalidade para aplicação terapêutica. As plantas são capazes de sintetizar dois tipos de óleos: os óleos fixos, constituídos de ésteres de glicerol e ácidos graxos; e os OEs, que são complexas misturas de compostos orgânicos voláteis, extremamente concentradas, produzidos como metabólito secundário. Possuem atividades importantes para o metabolismo da planta, como proteção e conservação da espécie vegetal, atuam na polinização das plantas e agem como ferormônios, além disso contribuem para o sabor e aroma das plantas^{28,173}.

Os OEs são extraídos de diversas partes das plantas: flores, folhas, frutos, sementes, capins, raízes, rizomas, madeira, cascas, resinas e bulbos. São geralmente líquidos, sólidos ou semissólidos à temperatura ambiente. Possuem dezenas de substâncias químicas distintas, são solúveis em lipídeos e solventes orgânicos, sua densidade é menor que a água, com cor e odor característicos e amplos efeitos biológicos, são obtidos por meio de destilação, prensagem a frio ou extração por meio de solvente^{28,137}. As plantas aromáticas, naturalmente contêm moléculas voláteis em sua composição. Quando isolado por destilação dos OEs, há um aumento das

concentrações de alguns componentes, tornando sua atividade biológica ainda mais evidente²⁸.

Segundo a ANVISA os OEs poder ser considerados fitoterápicos, sendo fitoterápico um produto obtido a partir de matéria-prima vegetal ativa, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, englobando assim ativos hidrossolúveis, lipossolúveis, extratos e soluções mães. A utilização terapêutica da aromaterapia está amparada pelas medicinais tradicionais^{165,173}.

Como qualquer composto orgânico, os OEs são compostos principalmente de átomos de carbono e hidrogênio, ligados a um ou mais grupos funcionais, que geralmente incluem grupos de oxigênio, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres entre outros²⁸.

1.1.7 Óleo essencial *Pogostemon cablin*

O Patchouli (*Pogostemon cablin* [Blanco] Benth.) é uma planta aromática originária da Ásia tropical e amplamente cultivada nas Filipinas, Malásia, Índia, Indonésia e Singapura^{174,175}. O gênero *Pogostemon*, pertence a família *Lamiaceae* da classe das Angiospermas (do grego *angeos* - bolsa e *sperma* – semente); são plantas vasculares que produzem sementes e suas estruturas reprodutivas são flores. São conhecidas cerca de 130 espécies diferentes. Morfologicamente, o Patchouli é considerado um arbusto perene, resistente, com tronco ereto, adaptado a condições climáticas de calor e umidade. Chega a medir 1,2 m de altura, possui pequenas flores rosas esbranquiçadas e folhas largas que possuem alto teor de óleo essencial (Figura 7)¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

O OEPC é obtido por destilação a vapor a partir das folhas frescas, possui odor característico terroso, balsâmico e amadeirado, comercialmente é utilizado em perfumes e cosméticos pela propriedade de suas moléculas serem fixadoras¹⁸⁰. É uma substância aromatizante natural utilizada como flavorizante em alimentos para consumo humano, autorizado na seção 172.510 pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos¹⁸¹. O patchouli é uma planta aromática com importância não só comercial, mas também na indústria alimentícia e de perfumaria, como para a indústria farmacêutica. Possui diversas propriedades terapêuticas e é

tradicionalmente utilizado como componente nas fórmulas para o tratamento de doenças inflamatórias dentro das medicinas Chinesa¹⁸² e Ayurvédica¹⁷⁷.

Quimicamente, o OEPC contém principalmente sesquiterpenos como o α , β , γ e δ -patchuleno, α e β -cariofileno, α , β e δ -guaiano, seicheno e álcoois sesquiterpênicos como o patchulol e pogostol²⁶⁻²⁸.



Figura 7 – Folhas de *Pogostemon cablin*
Fonte: Adaptado de Sharma; Sarma, 2015.¹⁷⁹

Pesquisas pré-clínicas recentes têm demonstrado que o OEPC possui acentuada atividade antibacteriana, antifúngica¹⁸³⁻¹⁸⁵ e potencial antivirótico com amplo espectro de ação^{182,186-188}. Além do mais, estudos demonstram diferentes ações biológicas como: antiemética¹⁸⁹, imunomodulação¹⁹⁰, atividade antioxidante por inibir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁹¹ e impedir fotoenvelhecimento da pele causados por radiação ultravioleta (UV)¹⁹².

A literatura indica que as atividades biológicas do OEPC estão fortemente associadas a seus constituintes químicos majoritários, tais como patchoulol (24-46%), pogostone (0-3,8%), pogostol (2-4%) e α e β -patchuleno (3-5%)²⁶⁻¹⁸.

O tratamento com o OEPC ou com seus compostos majoritários mostraram ação anti-hiperalgésica e anti-inflamatória / resolutive em estudos *in vitro* e *in vivo*. Na Tabela 1 são apresentadas as principais publicações indexadas na base de dados PubMed a partir de 2011, as quais utilizaram OEPC, seus componentes patchoulol, β -patchoulene, pogostone e extratos de *Pogostemon cablin*.

Tabela 1 - Revisão bibliográfica de estudos mostrando os efeitos anti-hiperalgésicos e/ou anti-inflamatórios utilizando o OEPc ou seus compostos majoritários em ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo*.

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	Modelo / indução	Análises comportamentais	Análises bioquímicas	Conclusão do estudo	Referência Bibliográfica
Patchoulol		10, 20 e 40mg/kg	oral	colite (dextran sulfato de sódio) camundongos		↓ índice de atividade da doença ↓ lesão colônica ↓ TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, MPO	Anti-inflamatório	QU et al., 2017 ³²
Patchoulol		200mg/kg	oral	contorção abdominal (ácido acético) camundongos	↓ período de latência de dor visceral e contorções		Antinociceptivo	YU et al., 2017 ²⁹
				algesia da pata (formalina) camundongos	↓ tempo de lambida	↓ COX-2 Modula receptores opioides μ		
		1 - 25 μ l/mL		<i>in vitro</i> célula tronco de cerebelo de rato		↓ COX-2 Modula receptores opioides μ ↓ TNF- α , IL-1 β ↓ via NF-kB ↓ concentração de íon cálcio intracelular		
β -Patchoulene		10mg/kg	oral	lesão pulmonar aguda (LPS) camundongos	↓ taxa de mortalidade ↓ edema pulmonar	↓ TNF- α , IL-6 e IL-1 β ↓ MPO, MDA ↓ via NF-kB Ativa via Nrf2	Anti-inflamatório	CHEN et al., 2017 ³³

Continuação

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	de Modelo / indução	Analises comportamentais	Analises bioquímicas	Conclusão do estudo	do Referência Bibliográfica
Patchoulol		40mg/kg	intragástrica	aterosclerose camundongos nocautes para apolipoproteína E		↓ placa aterosclerótica tanto na aorta ↓ MCP-1, iNOS, IL-1 β , IL-6, CXCL9, CXCL11	Anti-inflamatório	WANG et al., 2016 ³⁴
Óleo essencial <i>Pogostemon cablin</i>		270 mg/kg	retal	colite (ácido tribritrobenzeno sulfônico TNBS) ratos		↓ escore de dano colônico ↓ ulceração ↓ MPO ↓ infiltrado de neutrófilos	Anti-inflamatório, imunomodulador e antimicrobiano	YU et al., 2016 ³⁷
Óleo essencial <i>Pogostemon cablin</i>	patchoulol (38,5%), α -bulneseno (20,3%), α -guaiene (12,3%), seicheleno (8,3%), α -patchouleno (4,9%)	1, 3, 10, 30, 60 e 90 μ g/ml		<i>in vitro</i> neutrófilos		↓ quimiotaxia de neutrófilos ↑ atividade fagocítica de células PMN		
		100, 200 e 300mg/kg	oral	Peritonite (zimosan) camundongo		↓ recrutamento de leucócitos ↓ NO ↓ número de leucócitos rolantes e aderentes na microcirculação	Anti-inflamatório e pró-resolutivo	SILVA-Filho et al., 2016 ³⁶
		10 mg em 20 μ l de acetona /orelha	tópica			↑ edema de orelha	↑ MPO	

Continuação

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	Modelo / indução	Análises comportamentais	Análises bioquímicas	Conclusão do estudo	Referência Bibliográfica
β-patchoulene		10, 20 40mg/kg	e oral	edema de orelha (xileno) camundongos	↓ edema de orelha		Anti-inflamatório	ZHANG et al., 2016 ³⁵
				permeabilidade vascular (ácido acético) camundongos	↓ permeabilidade capilar			
				edema de pata (carragenina) camundongo	↓ edema de pata	↓ infiltrado celular ↓ MDA, MPO ↓ TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, iNOS, PGE ₂ , COX-2 ↓ via NF-kB		
Pathoulol		10, 20 40mg/kg	e oral	lesão pulmonar aguda (LPS) camundongo	↓ mortalidade ↓ dano histológico e edema de pulmão	↓ TNF-α, IL-6 ↓ MPO, MDA ↑ SOD, GPx	Anti-inflamatório e antioxidante	SU et al., 2015 ¹⁹³
Extrato aquoso de <i>Pogostemon cablin</i>		1 mg/ml		<i>in vitro</i> células epiteliais de cólon humano (TNF-α)		↓ via NF-kB		
		10 e 50mg/kg	oral	Colite (ácido tribritrobenzeno sulfônico TNBS) ratos	suprimiu sinais clínicos de colite, movimentos lentos, fezes com sangue, recuperação do peso corporal	↓ MPO ↓ COX-2, MCP-1, IL-6, IL-8	Anti-inflamatório	PARK et al., 2014 ¹⁹⁴

Continuação

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	Modelo / indução	Análises comportamentais	Análises bioquímicas	Conclusão do estudo	Referência Bibliográfica
Pathoulol		10, 20 e 40mg/kg	oral	lesão pulmonar aguda (LPS) camundongos	↓ peso molhado e edema dos pulmões	↓ neutrófilos e macrófagos ↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6 ↓ via NF-kB	Anti-inflamatório	YU et al., 2014 ¹⁹⁵
Pogostone		1, 10 e 30 μ M		<i>in vitro</i> macrófagos de células de murinos (LPS)		↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO, iNOS, PGE ₂ , COX-2 ↓ via NF-kB	Anti-inflamatório	LI et al., 2014 ¹⁹⁶
		5, 10 e 20mg/kg	intravenoso	Choque edotóxico (LPS) camundongos	↓ mortalidade ↓ dano hepático e pulmonar ↑ enzimas protetoras de dano hepático			
Pathoulol		10, 20 e 40 mg/kg	oral	Mastite (LPS) camundongos		↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6 ↓ MPO ↓ via NF-kB ↓ sinais histológicos	Anti-inflamatório e preventivo	LI et al., 2014 ¹⁹⁷
Pathoulol		10, 20 e 40 mg/kg	oral	úlceras gástricas (etanol, indometacina, água) ratos		↓ dano da mucosa gástrica, edema ↓ área da úlcera ↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6 ↓ MDA ↑ CAT, glutathione	Gastroprotetor, Anti-inflamatório e antioxidante	ZHENG et al., 2014 ¹⁹⁸

Continuação

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	Modelo / indução	Análises comportamentais	Análises bioquímicas	Conclusão do estudo	Referência Bibliográfica
Óleo essencial <i>Pogostemon cablin</i>	patchoulol (26,5%), β-guaiene (14,2%), α-patchouleno (8,6%), β-patchouleno (7,0%), Iso-cariofileno (6,3%)	20, 40 e 80mg/kg	oral	contorção abdominal (ácido acético) camundongos	↑ período de latência ↓ frequência de contorção ↑ período de latência no teste da placa quente	Envolvimento dos receptores opioides	Antinociceptivo	HE et al., 2013 ³⁰
				anafilaxia cutânea passiva (anti-ovalbumina) ratos	↓ permeabilidade vascular ↓ hipersensibilidade	Antialérgico		
Extrato etanólico da raiz e rizoma de <i>Pogostemon cablin</i>	verbascosídeo (26,88mg/g), ácido rosmarínico (28,35mg/g) pogostone (46,43 mg/g)	120, 240 e 480mg/kg	oral	edema de orelha (xileno) camundongos	↓ edema de orelha			LI et al., 2013 ¹⁹⁹
				permeabilidade vascular peritoneal (ácido acético) camundongos	↓ permeabilidade capilar			
				pleurisia (carragenina) camundongos	↓ recrutamento de neutrófilos	Anti-inflamatório		
				edema de pata (carragenina) camundongos	↓ edema de pata	Pata: ↓ NO, iNOS, PGE ₂ , COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 Fígado: ↓ MPO, MDA ↑ SOD, GPx, GRD		

Continuação

OEPc ou componente	Constituintes majoritários	Doses / concentrações	Via de administração	Modelo / indução	Analises comportamentais	Analises bioquímicas	Conclusão do estudo	Referência Bibliográfica
Patchoulol		25, 50 e 75 μ M		<i>in vitro</i> macrófagos de células de camundongos (LPS) <i>in vitro</i> células de câncer colorretal humano (TNF- α)		↓ iNOS, IL-6 ↓ via NF-kB	Anti-inflamatório	JEONG et al., 2013 ²⁰⁰
Patchoulol		10, 20 e 40mg/kg	oral	edema de orelha induzido (xileno) camundongos edema de pata (carragenina) ratos	↓ edema de orelha ↓ edema de pata	↓ TNF- α , IL-1 β , PGE ₂ , NO, iNOS, COX- 2	Anti-inflamatório	LI et al., 2011 ²⁰¹
Extrato metanólico padronizado de <i>Pogostemon cablin</i>		0,5 e 1,0g/kg	oral	edema de pata (carragenina) camundongos contorção abdominal (ácido acético) camundongos Algesia de pata (formalina) camundongos	↓ edema de pata ↓ contorção abdominal ↓ tempo de lambida (segunda fase)	Pata: ↓ MDA, TNF- α , COX- 2 Fígado: ↑ SOD, GPx, GRD	Analgésico e Anti-inflamatório	LU et al., 2011 ³¹
Patchoulol		10, 20 e 40 μ m		<i>in vitro</i> macrófagos de células de murinos (LPS)		↓ TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE ₂ , NO, iNOS, COX- 2	Anti-inflamatório	XIAN et al., 2011 ²⁰²

Na aromaterapia, na indicação empírica o OEPC é utilizado como hidratante, regenerador e cicatrizante da pele; flebotômico vascular e linfático; em casos de ansiedade e insônia, age como sedativo e relaxante do sistema nervoso; antisséptico, bactericida, antifúngico, repelente de insetos, antitérmico, anti-inflamatório, afrodisíaco^{159,163} e também para obesidade como modulador do apetite^{26,173,176}.

Em estudos com humanos foi observado que a inalação do OEPC modula efeitos estimulantes sobre a fisiologia humana, foram registrados parâmetros fisiológicos de pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca, índice de estresse e ondas cerebrais que foram reduzidas após inalação²⁰³, além disso, observou-se a capacidade de reduzir em 40% a atividade relativa do sistema nervoso autônomo simpático²⁰⁴.

A aromaterapia pode ser utilizada como tratamento complementar de pacientes com distúrbios psiquiátricos. Foi demonstrado que a inalação do OEPC produz efeitos calmantes e sedativos²⁰⁵. Já a sinergia de OE de patchouli, tangerina, laranja, *ylang ylang* e tanaceto reduzem distúrbios de comportamento em pacientes com demência²⁰⁶. Além disso, outro estudo demonstrou a redução de comportamentos relacionados com a demência, após 4 semanas recebendo massagens com a sinergia dos óleos essenciais de lavanda, manjerona, patchouli e vetiver²⁰⁷.

Na literatura são encontradas indicações de baixa toxicidade deste óleo essencial²⁶ (ULRICH, 2004), no entanto, pode apresentar interação medicamentosa com anticoagulantes devido à efeitos vasculares e reações alérgicas na pele. Possui dose letal mediana (LD₅₀) >5g/kg em doses oral e dermal agudas²⁸.

O presente estudo buscou investigar por meio da via inalatória, uma via extremamente comum e efetiva para administração de agentes terapêuticos - verificar a efetividade de um importante OE com utilização clínica – como uma alternativa inovadora para redução do processo inflamatório. Sendo que a inflamação está presente em inúmeras doenças parecendo ser um denominador comum. A participação da via inalatória no efeito da inalação do OEPC também foi analisada. Além disso, a parte desta tese que apresenta grande ineditismo, são os testes voltados a demonstrar, pela primeira vez na literatura, o possível envolvimento de mediadores que modulam a ação anti-hiperalgésica, anti-inflamatória e pró-resolutiva a partir da inalação do OEPC.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo da inalação do OEPC em modelos pré-clínicos de inflamação: análise da via AnxA1/FPR2/opioides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil fitoquímico do OEPC;
2. Verificar o efeito da inalação do OEPC sobre a hiperalgesia mecânica, atividade locomotora espontânea e sobre o edema de pata induzidos pelo CFA;
3. Avaliar o envolvimento da via AnxA1/FPR2/opioide no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPC
4. Avaliar o efeito da inalação do OEPC sobre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias em modelos animais de inflamação;
5. Avaliar o efeito da inalação do OEPC sobre o envolvimento de células inflamatórias na inflamação pleural.
6. Avaliação do papel da via olfatória no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPC.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A presente pesquisa caracteriza-se por experimental de natureza quantitativa^{208,2019}. Possui caráter de pesquisa básica e foi utilizado um modelo pré-clínico.

3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho:

Óleo essencial *Pogostemon cablin* (Penny Price Aromatherapy®, Leicestershire, UK). Solução salina 0,9% (NaCl), Carragenina, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), Tween® 80%, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Phosphate buffered saline (PBS), Aprotinina A, cloreto de benzametônio, Morfina, Naloxona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.). Fosfato de dexametasona (Ariston Inds. Químs. e Farms. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Zicam Oral Mist (Iniciativas Matrixx, Scottsdale, AZ, EUA). Heparina (Blau Farmacêutica S.A., Cotia, SP, Brasil). Kits para Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) (BioLegend Inc., San Diego, CA, EUA e R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, EUA). WRW4 foram adquiridos da Cayman Chemical Company (Ann Harbor, MI, USA).

Os seguintes equipamentos foram utilizados: cromatógrafo gasoso da Agilent 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA); micrômetro (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil); leitor de microplacas DNM-9602 Perlong Medical (Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, Chinacentrífuga refrigerada NT 815 (Nova Técnica Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), Micro-seringa de 10 µl (Hamilton, USA).

3.3 ANIMAIS

Nessa pesquisa foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25 a 35 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Adicionalmente, foram utilizados camundongos fêmeas (20 a 30 g) da espécie *Mus musculus* e linhagem C57BL/6 selvagens (*wild type*, *AnxA1^{+/+}*) e animais geneticamente modificados com ablação do gene da *AnxA1* (*knockout*, *AnxA1^{-/-}*), gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Sandra Helena Farsky, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). A procriação desses animais foi realizada no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx). Os animais foram aclimatados a 22±2°C, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6h), com acesso livre a ração e água. Os animais foram homogeneamente distribuídos entre os grupos e aclimatizados no laboratório por pelo menos 1h antes dos testes.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Na primeira etapa do estudo foi determinado o perfil fitoquímico do óleo essencial por meio de análise cromatográfica.

No delineamento do 1º conjunto de experimentos realizados em animais, referente ao modelo de inflamação periférica induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de CFA. Para cada grupo, foram utilizados 8 animais (N=8). Um dia antes da indução da inflamação, foram registradas as informações basais de hiperalgisia e edema de todos os animais. Com o objetivo de avaliar o processo inflamatório em dois momentos, na fase precoce e tardia, os testes foram realizados no primeiro e quinto dia após a injeção de CFA. Os tratamentos iniciaram 24h após a injeção de CFA e permaneceram por um ou até cinco dias, uma vez ao dia.

O principal desfecho foi a hiperalgisia mecânica avaliada pelo teste de von Frey. Vinte e quatro horas após a indução do modelo de inflamação, diferentes grupos de animais foram tratados por diferentes tempos com OEPc (3'; 10'; 30', 100' e 240') e então foram avaliados em diferentes tempos após os tratamentos, a fim de, determinar o tempo que produziu o melhor efeito anti-hiperalgésico. Após a determinação desse tempo, os demais desfechos foram analisados usando somente os grupos OEPc 30' e 240'. Após os 5 dias de tratamento foi realizado um teste de campo aberto, para avaliar a atividade locomotora. As avaliações de edema foram

realizadas do primeiro ao quinto dia após a injeção de CFA, em 4h após o tratamento com OEPc 30' e 240'.

Após a caracterização do efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc, o passo seguinte foi analisar o mecanismo neurobiológico subjacente a esse defeito por meio da análise do envolvimento dos receptores opioides e FPR2. Para isso, no primeiro e quinto dia após a injeção i.pl. de CFA, camundongos foram pré-tratados com antagonistas WRW4 ou naloxona (i.pl. ou i.t. ou s.c.) e receberam tratamento por via inalatória com OEPc e após foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Com o intuito de identificar o envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios no efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc, foi verificado o envolvimento da AnxA1 por meio da utilização de camundongos selvagens e nocautes. Esses animais foram submetidos a injeção i.pl. de CFA e no primeiro e quinto dia após a hiperalgesia mecânica e edema foram avaliados. As amostras para análises de citocinas pró e anti-inflamatórias foram coletadas no quinto dia após a injeção de CFA e tratamento diário com OEPc (Figura 8).

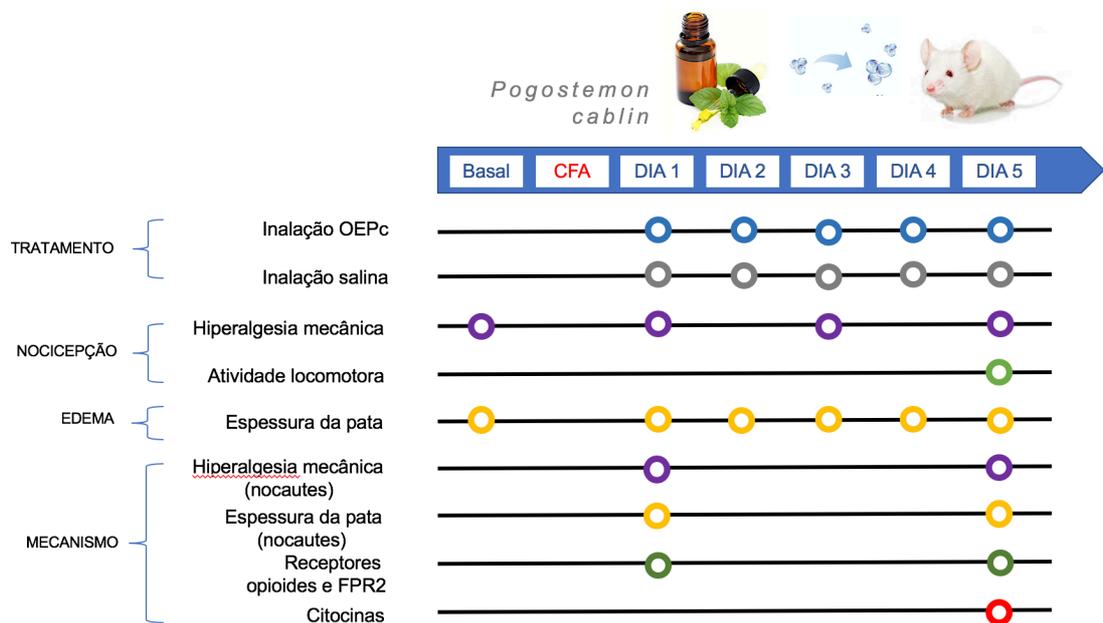


Figura 8 – Desenho experimental. Primeiro conjunto de experimentos, modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA.

No delineamento do 2º conjunto de experimentos, referente ao modelo de inflamação pleural induzido por carragenina. Os animais inalaram o OEPc ou salina por 30 min antes e por 240 min após a injeção de carragenina. Os animais do grupo

controle receberam dexametasona 30 min antes da indução do modelo. Quatro horas após foram coletadas amostras do lavado pleural para quantificação de citocinas, leucócito total e diferencial (Figura 9).

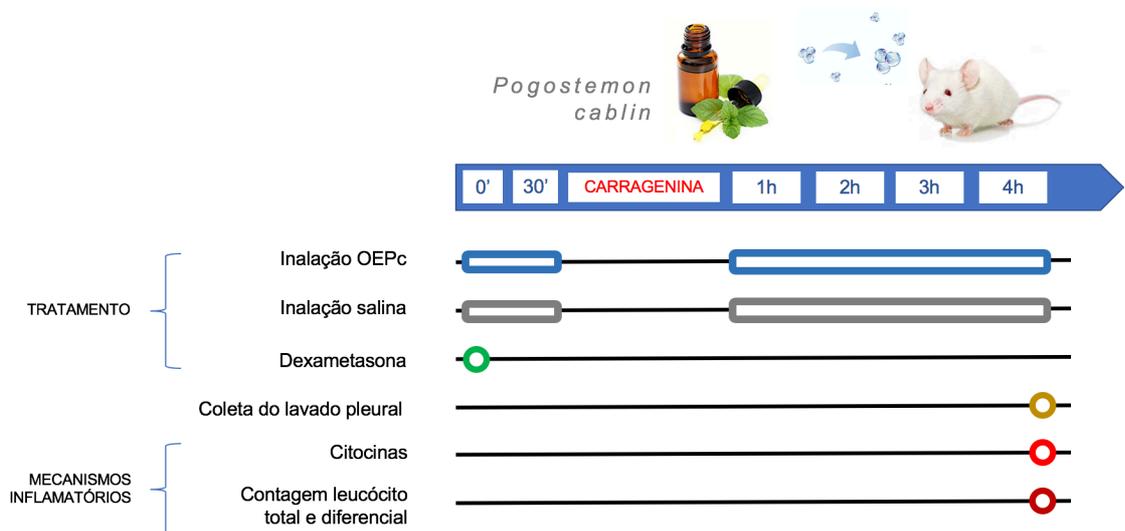


Figura 9 – Desenho experimental. Segundo conjunto de experimentos, modelo de inflamação pleural induzida pela Carragenina.

No delineamento do 3º conjunto de experimentos, com o objetivo de confirmar se o efeito produzido pelo óleo essencial, seria a partir da ativação de estruturas do SNC ou por meio da via pulmonar, atingindo a via circulatória sistêmica, foi realizado o teste de anosmia. Os animais foram isolados individualmente nas caixas moradias, receberam injeção intranasal de zicam e foram avaliados no teste de discriminação olfativa. Em seguida, esses animais receberam injeção de CFA, 24h após receberam tratamento diário com OEPC ou salina, do primeiro ao quinto dia a hiperalgesia mecânica foi avaliada. No dia seguinte os animais foram submetidos ao teste de atividade locomotora e 24h após ao teste de suspensão pela cauda (Figura 10).

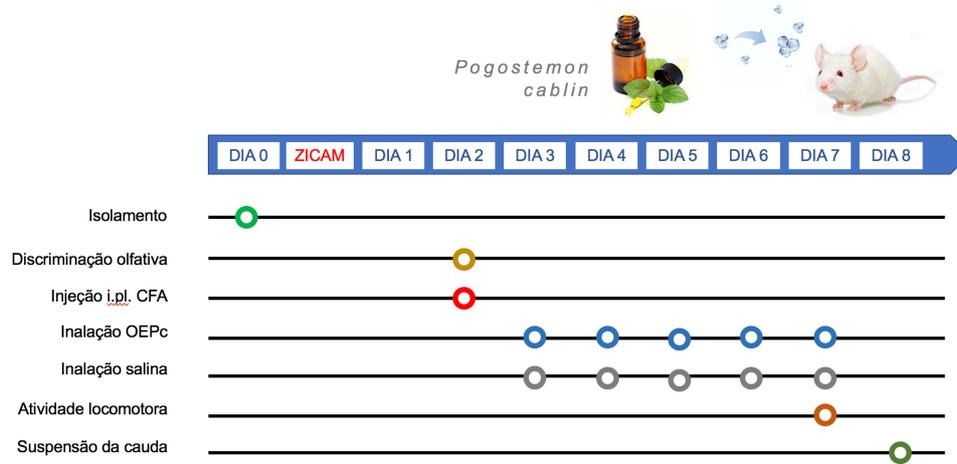


Figura 10 – Desenho experimental. Terceiro conjunto de experimentos, animais com anosmia e modelo de inflamação periférica induzida pelo CFA.

3.5 TESTES

3.5.1 Caracterização do OEPc por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A análise cromatográfica do OEPc foi realizada no Departamento de Química da UFSC, por meio de um cromatógrafo gasoso da Agilent 5975 por cromatografia gasosa acoplado por espectrometria de massa (GC-MS). Foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições da análise foram: gás carreador: He, (1 mL/min.); temperatura da coluna programada de 60-290°C (3°C/min) com isoterma a 290°C por 5/min; temperatura do injetor em 260°C e temperatura do detector em 280°C. Razão de split de 1:10. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. As amostras foram diluídas em clorofórmio. As concentrações dos componentes do óleo essencial foram calculadas utilizando as áreas individuais dos picos de cada componente que foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos com os dados descritos na literatura²¹⁰. Os índices de retenção (IR) foram calculados através da co-injeção de uma mistura de n-alcenos de série (C5 - C30), usando a equação descrita por Vandendool e Kratz (1963)²¹¹.

3.5.2 Tratamento inalatório com óleo essencial

O tratamento por via inalatória foi realizado utilizando 200 µl de OEPc ou salina^{41,42}. Para inalação do OE foi utilizado uma caixa plástica semelhante a caixa moradia dos animais (20 cm de altura, 30 cm de largura e 20 cm de profundidade) com uma tampa de acrílico com 4 pequenos furos de 5 mm de diâmetro para entrada de oxigênio. No interior da caixa foi colocada uma placa de petri contendo óleo essencial, por um período de 30 minutos antes de receber os animais. Cada grupo (n = 8 animais) foi colocado dentro da caixa onde permaneceram inalando o ar do ambiente interno da caixa com os vapores do OE ou de salina.

Os animais do grupo controle foram colocados dentro da caixa nas mesmas condições, com o mesmo volume de salina^{41,42,212}. Afim de definir o melhor tempo de inalação, inicialmente os animais foram submetidos a inalação de 200 µL de OEPc por diferentes tempos (3'; 10'; 30', 100' e 240') e após foi avaliado o decurso temporal desse efeito quanto a hiperalgesia mecânica nos tempos de 0,5h, 1h, 2h, 4h ou até se

restabelecerem os valores de respostas basais. Após definido o melhor tempo, os animais foram tratados diariamente por até 5 dias consecutivos.

3.5.3 Modelo de inflamação persistente induzida pelo CFA

O modelo de inflamação crônica foi induzido pela administração de 20 µl via intraplantar (i.pl.) de solução de CFA diluído em salina e Tween® 80 (CFA, 50%). Esse modelo foi utilizado para avaliar o possível efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório, bem como, para as análises do mecanismo de ação do OEPc²¹³⁻²¹⁵. Nesse modelo de inflamação foram utilizados tanto camundongos *Swiss* fêmeas quanto camundongos C57BL/6 selvagens (*AnxA1*^{+/+}) e nocautes para *AnxA1* (*AnxA1*^{-/-}) fêmea. Os animais receberam o tratamento por via inalatória com OEPc e posteriormente foram avaliados quanto a hiperalgesia mecânica e edema. Posteriormente, os tecidos foram coletados para análises bioquímicas e imunológicas.

3.5.4 Modelo de inflamação pleural induzida pela carragenina

Para indução da pleurisia foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas que foram anestesiados com isoflurano 2% a 100% de O₂. Após a confirmação da anestesia, 100 µl de salina estéril ou de uma solução contendo 1% de carragenina foi administrada no espaço intercostal na cavidade pleural direita dos animais. Quatro horas após a injeção de carragenina, os animais foram eutanasiados e colocados em mesa cirúrgica, com declive de 30° a 45°, onde foi realizada uma incisão transversal na pele e dos músculos abdominais. Em seguida o apêndice xifóide foi pinçado e por meio de uma incisão abaixo do osso esterno, os pulmões e a cavidade pleural foram expostos. Logo após este procedimento, a cavidade pleural foi lavada com 1,0 ml de PBS heparinizado (20 UI/ ml). A seguir, uma amostra líquida da cavidade pleural foi coletada com auxílio de micropipeta automática e armazenada em tubos eppendorfs e para posterior determinação do número total e diferencial de leucócitos²¹⁶. Para a realização do tratamento no modelo agudo de pleurisia, os animais inalaram o OEPc por 30 min antes e por 240 min após a injeção de carragenina. Os animais do grupo controle receberam dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de carragenina.

3.5.5 Testes comportamentais

3.5.5.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Para avaliação da hiperalgesia mecânica foi utilizado o monofilamento de von Frey. Para aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente sobre um aparato de acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberto com tampa, posicionado sobre uma tela de arame com malha de 6 mm (70 x 40 cm). O teste foi aplicado utilizando um filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Aplicações repetidas do filamento foram realizadas na superfície ventral da pata posterior direita do animal (pata com injeção de CFA); as aplicações foram realizadas perpendicularmente à superfície plantar, efetuando uma pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento; as aplicações do filamento foram realizadas quando o animal permaneceu com as quatro patas acomodadas sobre a tela. A resposta de retirada somente foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da superfície da tela de apoio^{41,42,217}.

A frequência de retirada da pata foi expressada em valores percentuais com 100% sendo 5/5 e 0% sendo 0/5 de resposta. Um aumento na frequência de resposta foi interpretado como hiperalgesia mecânica. No dia anterior à injeção i.pl. de CFA os animais foram submetidos ao teste para obtenção de uma resposta basal, onde apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta entre 0 a 20% foram selecionados²¹⁴.

3.5.5.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea

Para descartar um possível efeito inespecífico do OEPc sobre o SNC, que afete a atividade locomotora dos animais, foi utilizado o teste do campo aberto. O teste foi realizado em um aparato de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm com o assoalho da caixa dividido (pintado) em 12 quadrados iguais. O teste consistiu na contagem do número de cruzamentos (com as quatro patas) que o animal realizou durante 6 min. Os animais foram tratados diariamente com 200 µl de OEPc por 30 min ou 240 min, em um período de 5 dias e o teste foi aplicado apenas no 5º dia, 30 min após a inalação⁴¹.

3.5.5.3 Avaliação do edema de pata

Para verificar o edema da pata, foi utilizado um micrômetro (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O edema foi determinado pela diferença da espessura em micrômetros da pata esquerda tratada com salina e da pata direita tratada com CFA, obtidas de cada grupo²¹³. A primeira avaliação foi realizada 24h após a injeção i.pl. de CFA e então realizadas avaliações do decurso temporal em 0,5h, 1h, 2h, 4h ou até se restabelecerem os valores de respostas basais. Para verificar o efeito dos tratamentos repetidos serão realizadas avaliações nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 após a injeção de CFA. Como controle positivo, foi utilizado o fármaco padrão dexametasona na dose de 1 mg/kg administrada por via i.p.

3.5.5.4 Avaliação de fenômenos relacionados ao mecanismo de ação da inalação do OEPc

3.5.5.4.1 Avaliação do envolvimento da AnxA1 no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPc

Para investigar o papel da AnxA1 no efeito anti-hiperalgésico e antiedematoso induzido pela inalação do OEPc 30' foi utilizado o modelo animal de inflamação causada pelo CFA. Foram utilizados nesses experimentos camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (AnxA1^{+/+}) e animais geneticamente modificados com ablação do gene da AnxA1 (AnxA1^{-/-}). No primeiro e quinto dia após a injeção i.pl. de CFA os animais foram tratados com OEPc 30' ou salina por via inalatória. Avaliações da hiperalgesia mecânica, bem como do edema (espessura da pata) foram realizadas 30 min após os tratamentos, respectivamente.

3.5.5.4.2 Avaliação do envolvimento dos FPR2 no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPc

O envolvimento dos FPR2 sistêmicos, periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico induzida pela inalação do OEPc também foi investigado no modelo de hiperalgesia inflamatória induzido pelo CFA, assim foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas. No primeiro e quinto dia após a injeção i.pl. de CFA os animais foram

pré-tratados com WRW4 (antagonista para FPR2, 10 µg/kg, s.c., 10 µg/20µl, i.pl. ou 5 µg/5µl, i.t.) ou salina (10 ml/kg, s.c; 20 µl/i.pl; 5 µl/i.t). Após 15 ou 20 min os animais receberam tratamentos com OEPc 30' ou salina por via inalatória. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi avaliada 30 min após os tratamentos.

3.5.5.4.3 Avaliação do envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPc

Com o objetivo de investigar a participação de receptores opioide sistêmicos, periféricos e espinais sobre a atividade anti-hiperalgésica do OEPc, os animais foram submetidos a injeção de CFA na pata posterior direita e 24h após foram pré-tratados com salina (10 ml/kg, i.p.) ou naloxona (antagonista para os receptores opioides, 1 mg/kg, i.p.; 5 µg/20µl, i.pl. ou 5 µg/5µl, i.t., respectivamente). Após 20 min (para a administração por via i.p.) ou 15 min (para as administrações por via i.pl. ou i.t.) os animais receberam tratamento com OEPc por via inalatória durante 30 min ou com morfina (controle positivo, 5 mg/kg - injeção subcutânea [s.c.] ou 5µg/20µl, i.pl. 5µg/5µl, i.t.) conforme descrito anteriormente⁴¹. A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada 30 min após os tratamentos.

3.5.6 Ensaios bioquímicos e imunológicos

3.5.6.1 Quantificação das concentrações teciduais de citocinas inflamatórias

As dosagens das concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias foram realizadas em dois modelos animais de inflamação. No modelo de inflamação induzida pelo CFA, as análises foram realizadas no setor de bioquímica e biologia molecular do LaNEx localizado no campus Grande Florianópolis, unidade Pedra Branca da UNISUL. Para a coleta de tecidos, os animais foram previamente eutanasiados e amostras de tecidos (pele e músculo da pata e medula espinal) foram coletadas e armazenadas no freezer -80°C para posteriores análises. O sacrifício dos animais foi realizado no quinto dia após a injeção de CFA e 30 min após o quinto tratamento diário com a inalação do OEPc. Para quantificação, as amostras de tecido das patas (pele) e medula espinal (L4-L6) foram homogeneizadas e colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina (2

ng/ml), cloreto de benzetônio (0,1 mM). As amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 min a 4°C, em seguida o sobrenadante foi obtido e estocado a -80°C para as análises posteriores. No sobrenadante, a quantidade de proteínas foi determinada usando albumina de soro bovino como padrão de acordo com o método de Bradford (1976). Alíquotas de 100 µl foram utilizadas para mensurar as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-4, MCP-1 e TGF- β por meio de Kits de ELISA, de acordo com as instruções dos fabricantes. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido à 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA. Assim todos os resultados foram expressos em picogramas/mg de proteína^{213,214}.

No modelo de inflamação pleural induzida pela carragenina, as análises foram realizadas no setor de bioquímica do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) do departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC. Amostras de exsudato pleural foram obtidas, utilizando a mesma solução tampão (PBS). A coleta da amostra foi realizada 4h após a injeção intrapleural de carragenina. Neste modelo foram analisadas as citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5 e IL-10 por kits de ELISA de acordo com metodologia descrita acima^{213,214,216}.

3.5.6.2 Avaliação do envolvimento de células inflamatórias na inflamação pleural induzida pela carragenina

No modelo de inflamação pleural induzida pela carragenina, a contagem celular foi realizada de acordo com o descrito previamente^{219,220}, com algumas adaptações. A contagem total foi realizada utilizando a câmara de Neubauer espelhada e microscópio óptico (aumento de 400 vezes), com uma prévia diluição de 10 µl do exsudato em 200 µl do líquido de Türk (2% de ácido acético). Para a contagem diferencial, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e o depósito de leucócitos formado foi ressuspendido em 200 µl de albumina bovina à 3 %, sendo secados à temperatura ambiente e corados com auxílio do kit para coloração hematológica. A contagem diferencial foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão com aumento de 1.000 vezes, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina²¹⁶.

3.5.7 Avaliação do papel da via inalatória no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPC

Para determinar a contribuição da via inalatória no efeito anti-hiperalgésico induzido pela inalação do OEPC foi necessário induzir anosmia nos animais.

3.5.7.1 Procedimento para indução de anosmia nos camundongos

A anosmia nos animais foi induzida por meio da administração intranasal de uma solução contendo gluconato de zinco (1x) + acetato de zinco (2x), comercialmente vendido como Zicam Oral Mist (Iniciativas Matrixx, Scottsdale, AZ, EUA). Para realização da administração intranasal, os animais foram levemente anestesiados com 1-2% de isoflurano à 100% de O₂ e 30 µl de Zicam ou salina (grupo controle) foi administrado lentamente na metade direita da cavidade nasal por meio de uma seringa Hamilton com a agulha de calibre 30 conectada a um tubo de polietileno da mesma espessura. A agulha foi inserida 7 mm dentro da narina direita com o objetivo de irrigar o epitélio olfatório. Após um intervalo de 5 min, para que os animais recuperassem a função respiratória, o procedimento foi repetido na metade esquerda da cavidade nasal. Durante a respiração, parte da solução (Zicam ou salina) foi expelida pela narina e secada com papel absorvente para permitir que o animal continue respirando normalmente^{148,221}.

3.5.7.2 Teste de discriminação olfatória após administração intranasal de Zicam

O teste de discriminação olfatória foi realizado seguindo o método descrito por Prediger et al. (2010)²²¹. Um dia antes da administração intranasal do Zicam, cada animal foi colocado individualmente numa caixa moradia pequena de polipropileno (28 cm x 17 cm x 12 cm) permanecendo isolado por 3 dias antes do teste. Para realizar o teste, uma nova caixa foi utilizada, adaptado uma divisória do mesmo material separando a caixa em duas áreas (ambientes) iguais, apenas foi mantido uma abertura (5 cm x 5 cm). Em um dos lados da caixa foi denominado ambiente não familiar onde foi colocado maravalha limpa, o outro lado da caixa foi denominado de ambiente familiar onde foi colocado maravalha na qual o animal permaneceu por pelo menos 2 dias contendo seus restos de fezes e urina. No teste, os animais foram

colocados individualmente dentro da caixa posicionados na abertura da divisória direcionados para o ambiente familiar. Durante 5 min foi contabilizado o tempo em que os animais permaneceram em cada ambiente (familiar e não-familiar) e o número de vezes que eles cruzaram os ambientes. Este teste foi realizado no 2º e 5º dias após a administração de Zicam.

3.5.7.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica após administração intranasal de Zicam

Para verificar o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc após indução da anosmia, foi realizado a avaliação da hiperalgesia mecânica como descrito na sessão 3.5.5.1. A injeção i.pl. de CFA na pata posterior direita foi administrado no 2º dia após a administração intranasal de Zicam, logo após o teste de discriminação olfatória. Vinte e quatro horas após os animais receberam o tratamento diário com OEPc por 30 min e foram avaliados 30' após quanto a hiperalgesia mecânica por até 5 dias.

3.5.7.4 Teste da atividade locomotora espontânea após administração intranasal de Zicam

A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada utilizando o teste do campo aberto, como descrito previamente^{221,222}. O teste foi realizado 7 dias após a administração intranasal de Zicam. O aparato utilizado foi uma caixa de madeira medindo 40 cm x 40 cm x 30 cm, pintado de cor escura. Os animais foram colocados individualmente no centro da caixa e exploraram livremente o aparato durante 5 min. A caixa foi limpa com álcool 10% após o teste de cada animal. Os comportamentos realizados pelos animais durante o período que permaneceram dentro da caixa foram gravados a partir uma câmera adaptada e depois avaliados pelo software ANYmaze® (Stoelting, EUA). A distância total percorrida, velocidade máxima, tempo total gasto no centro e o número de entradas nesta zona central foram registrados para posterior análise.

3.5.7.8 Teste de suspensão pela cauda após administração intranasal de Zicam

Afim de excluir um possível efeito tipo depressivo dos animais que permaneceram isolados em caixas individuais, no 8º dia após a administração

intranasal de Zicam foi realizado o teste de suspensão pela cauda. O teste consistiu em suspender cada animal pela cauda, na bancada de experimentos com o auxílio de uma fita adesiva, a uma altura de 1 m do chão, de forma tal que o animal permanecesse com a porção ventral do corpo voltada para a câmera de registros. Cada animal permaneceu nesta posição durante 5 min sendo filmado por uma câmera. Foi então contabilizado o tempo em que o animal permaneceu imóvel (ausência de movimentos), caracterizando um comportamento do tipo depressivo²²³.

3.5.8 Morte Indolor Assistida (MIA) dos animais

Para realizar o método de MIA, após os experimentos foram obedecidas as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 12 de maio de 2012, bem como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20 de setembro de 2013, sendo o procedimento realizado pelo Médico Veterinário responsável pelo Biotério do LaNEx Geraldo Jorge Severgnini Bernardes, Matrícula na UNISUL-7068 e CRMV 0452-SC, por sobredose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de dextrocetamina 150 mg/kg, IM) seguida de aplicação de solução eutanásica T61®, por via intraperitoneal.

Os animais utilizados no estudo conforme item 3.5.6 foram previamente anestesiados com 10% de isoflurano a 100% de O₂ e em seguida decapitados por uma guilhotina, devido a interferência nas análises bioquímicas do método de eutanásia padrão.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 3 – Variáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Tratamentos com o OEPc	Independente	Quantitativa Contínua	Tempo de inalação (minuto) Sim ou Não
Modelo de CFA	Independente	Quantitativa contínua de razão	Média ± Desvio padrão da média

Hiperálgia mecânica	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Frequência de retirada da pata (%) Média ± Desvio padrão
Edema de pata	Dependente	Quantitativa contínua	Espessura da pata (µm) Média ± Desvio padrão
Atividade locomotora espontânea	Dependente	Quantitativa discreta	Número de cruzamentos Média ± Desvio padrão
Participação dos receptores opioides	Dependente	Qualitativa	Sim ou Não
Participação dos FPR2	Dependente	Qualitativa	Sim ou Não
Participação da AnxA1	Dependente	Quantitativa	Sim ou Não
Modelo de Pleurisia	Independente	Quantitativa contínua de razão	Média ± Desvio padrão da média
Contagem de células inflamatórias	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína Média ± Desvio padrão
Concentrações de citocinas	Dependente	Quantitativa contínua de razão	pg/mg de proteína Média ± Desvio padrão
Envolvimento da via inalatória	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Média ± Desvio padrão

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Todos os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism na versão 6.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Nas análises estatísticas foram avaliadas a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-wilk. Desta forma, os resultados poderão ser apresentados como média ± desvio padrão. Os dados paramétricos foram comparados usando teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os experimentos foram conduzidos após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) com os protocolos nº 15.035.2.07.IV e 16.025.2.07.IV. Os experimentos foram

desenvolvidos no LaNEx – Campus Universitário da Pedra Branca, Bloco I2, na UNISUL. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes²²⁴.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO OEPc

A análise dos componentes voláteis do OEPc foi obtida por meio de GC-MS, comparando os índices de retenção (IR) calculados com a dados da literatura^{210,225}. As substâncias identificadas com a análise estão apresentadas na Tabela 1 e os dados espectrais na Figura 11. Após a análise foram identificados treze elementos constituintes (89,2%), sendo onze deles hidrocarbonetos sesquiterpênicos (α -copaeno 0,5%, β -patchouleno 2,8%, β -elemeno 0,9%, Cicloseicheleno 0,6%, Trans- β -cariofileno 3,1%, α -guaieno 14,2%, Seicheleno 6,5%, α -patchouleno 3,9%, γ -patchouleno 1,3%, Guai-4,11-dieno 3,5%, α -bulnesene 18,3%) e dois sesquiterpenos oxigenados (pogostol 2,5% e patchoulol 31,1%). Dos compostos analisados foram identificados como compostos majoritários o patchoulol (31,1%), α -bulnesene (18,3%), α -guaieno (14,2 %).

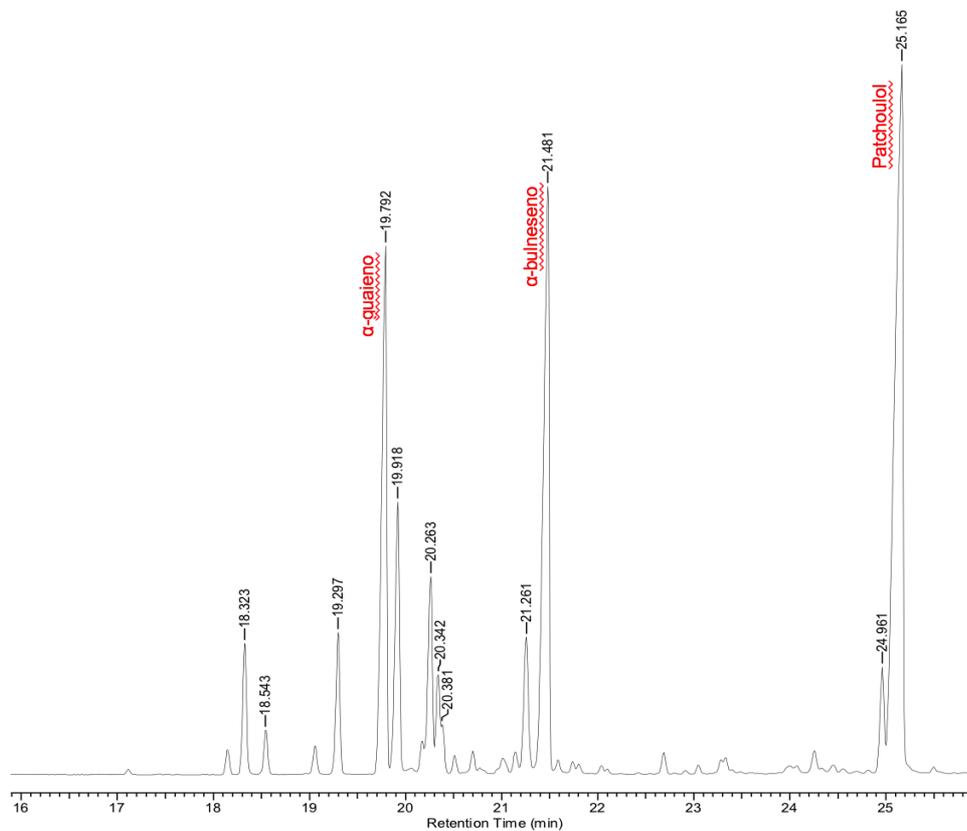


Figura 11 – Perfil fitoquímico do OEPc

Tabela 2 - Componentes identificados no OEPc por GC-MS

Componentes	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção (IR)	Concentração (%)
α -copaeno (1)	18.134	1373	0.5
β -patchouleno (2)	18.323	1384	2.8
β -elemeno (3)	18.535	1390	0.9
Cicloseicheleno (4)	19.054	1411	0.6
Trans- β -cariofileno (5)	19.297	1421	3.1
<u>α-guaieno (6)</u>	<u>19.792</u>	<u>1436</u>	<u>14.2</u>
Seicheleno (7)	19.918	1443	6.5
α -patchouleno (8)	20.263	1458	3.9
γ -patchouleno (9)	20.342	1461	1.3
Guai-4,11-dieno (10)	21.261	1498	3.5
<u>α-bulneseno (11)</u>	<u>21.481</u>	<u>1506</u>	<u>18.3</u>
Pogostol (12)	24.961	1650	2.5
<u>Patchoulol (13)</u>	<u>25.165</u>	<u>1656</u>	<u>31.1</u>

4.2 EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPc NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CFA

4.2.1 Determinação do melhor tempo de inalação do OEPc

Os resultados da Figura 12 indicam que os animais que receberam a injeção i.pl. de CFA apresentaram hiperalgesia mecânica 24h após à injeção, constatada pelo aumento ($p < 0,001$) da frequência de resposta de retirada da pata quando comparados com os animais que receberam uma injeção i.pl. de salina (painel A). O painel B, demonstra os resultados dos diferentes tempos de tratamento 3' a 240' de inalação do OEPc. Os animais que receberam tratamento com OEPc durante 10' apresentaram um efeito anti-hiperalgésico em 0,5h após a inalação ($p = 0,009$) quando comparado com os animais do grupo controle. Nos animais do grupo OEPc 30' houve

uma redução da hiperalgesia mecânica por 0,5h ($p = 0,009$) e 1 h ($p = 0,01$) após o tratamento, quando comparado com os animais do grupo controle. Definiu-se assim, que 30' de inalação do OEPc apresentou o melhor efeito anti-hiperalgésico (que perdurou por mais tempo).

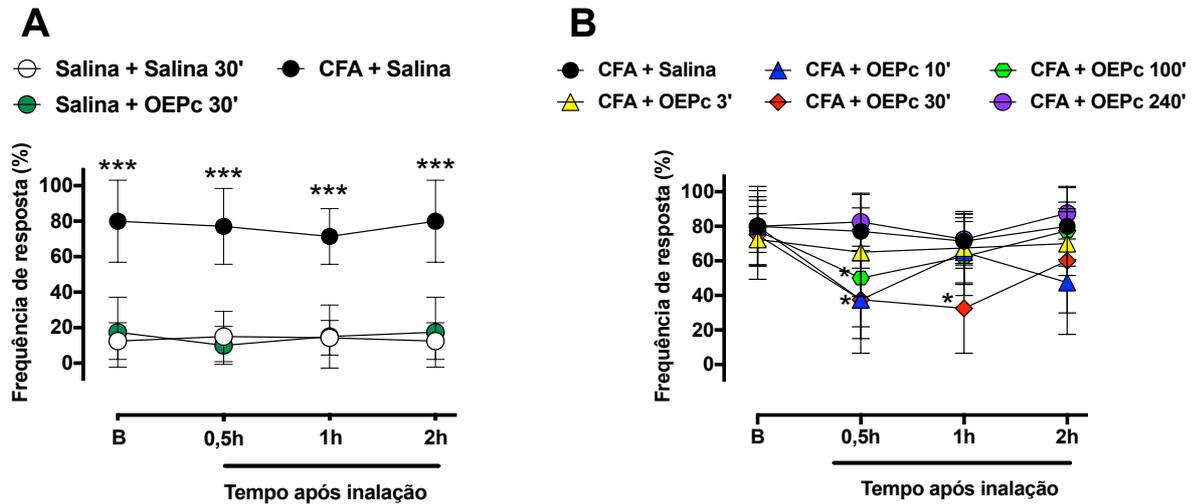


Figura 12 – Avaliação do melhor tempo de inalação do OEPc sobre a hiperalgesia mecânica. Legenda: Avaliação do efeito de diferentes tempos de inalação do OEPc na hiperalgesia mecânica. Cada ponto representa a média dos valores obtidos de 8 animais e as linhas verticais indicam o desvio padrão (D.P.) * $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle (CFA + Salina). *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina + Salina 30' ou Salina + OEPc 30'. A diferença estatística significativa foi determinada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*. B: valores basais 24h após a injeção de CFA na pata. h: horas.

4.2.2 Avaliação do efeito da inalação diária do OEPc

Os resultados da figura 13 demonstram a avaliação do decurso temporal do efeito da inalação diária do OEPc por 30' ou 240'. Nos painéis A e B foram verificados que os animais não submetidos a injeção de CFA na pata e tratados com salina ou OEPc por 30' ou OEPc 240' por via inalatória durante 5 dias consecutivos não apresentaram alterações ($p > 0,05$) da frequência de resposta de retirada da pata.

No 1º dia após a injeção de CFA, observa-se que na avaliação do decurso temporal após o tratamento com OEPc 30' houve uma diminuição significativa da hiperalgesia mecânica em 0,5h ($p < 0,001$) e 1h ($p = 0,008$) após o tratamento, quando comparados com os animais do grupo controle (painel C). No entanto, após o

tratamento com OEPc 240' não houve alterações na hiperalgesia mecânica em relação ao grupo controle (painel D).

No 5º dia após a injeção de CFA, na avaliação do decurso temporal observou-se que o grupo de animais OEPc 30' ainda apresentaram redução da hiperalgesia mecânica somente em 0,5h ($p = 0,006$) após o tratamento com o OE, quando comparados com os animais do grupo controle (painel E). Além disso, após o tratamento com OEPc 240' não houve alterações na hiperalgesia mecânica em relação ao grupo controle (painel F).

Os painéis G e H, apresentam os resultados da inalação do OEPc no 1º, 3º e 5º dias. Os animais do grupo OEPc 30' apresentaram um efeito anti-hiperalgésico em 0,5h após o tratamento nos dias 1º ($p < 0,001$), 3º ($p < 0,001$) e 5º ($p = 0,04$) em relação aos animais do grupo controle. E os animais do grupo OEPc 240' não houve alterações na hiperalgesia mecânica em relação ao grupo controle após os tratamentos.

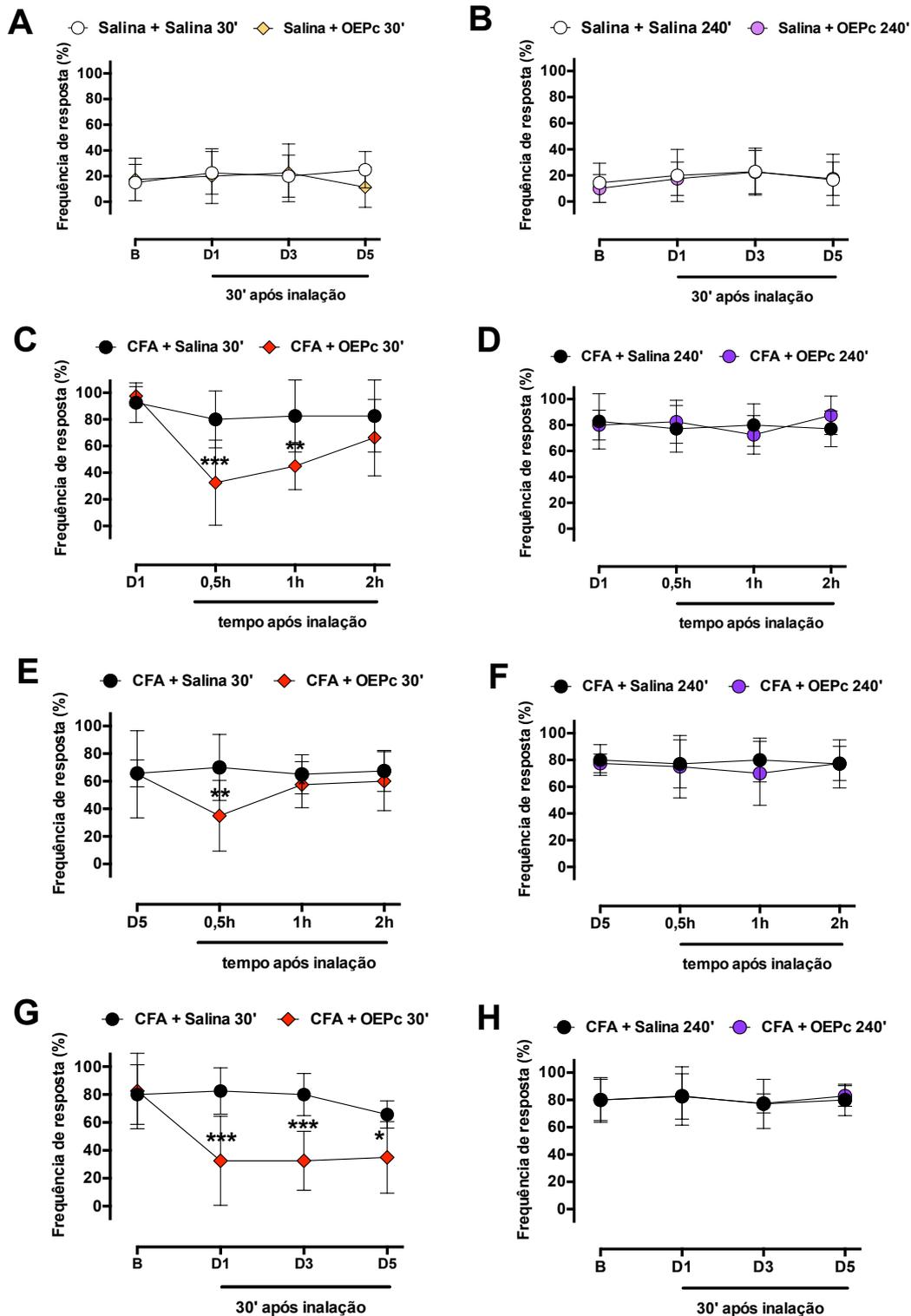


Figura 13 – Efeito da inalação diária do OEPc sobre a hiperalgesia mecânica.

Legenda: Efeito *per se* da inalação de OEPc 30' e 240' nos 1º, 3º e 5º dias na hiperalgesia mecânica (painel A e B). Avaliação do decurso temporal no efeito da inalação do OEPc 30' (painel C, E e G) ou OEPc 240' (painel D, F e H) na hiperalgesia mecânica. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (CFA + Salina). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*. B: valores basais. D: dias.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPc SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os resultados da Figura 14 demonstra que não houveram diferenças estatísticas no número de cruzamento da atividade locomotora entre os grupos de animais avaliados. Descartando assim, um possível efeito sedativo sobre o SNC.

O tratamento por via inalatória do OEPc 30' ou OEPc 240' administrados por 5 dias consecutivos, não afetou ($p > 0,05$) a atividade locomotora no teste de campo aberto, quando comparado com os animais do grupo controle (Salina 30' ou Salina 240'). No painel A, as médias dos cruzamentos foram $125,1 \pm 15,09$ para o grupo OEPc 30' e $143,0 \pm 12,0$ para o grupo Salina 30'. No painel B, as médias dos cruzamentos foram $119,3 \pm 5,21$ para o grupo OEPc 240' e $105,6 \pm 3,57$ para o grupo Salina 240'.

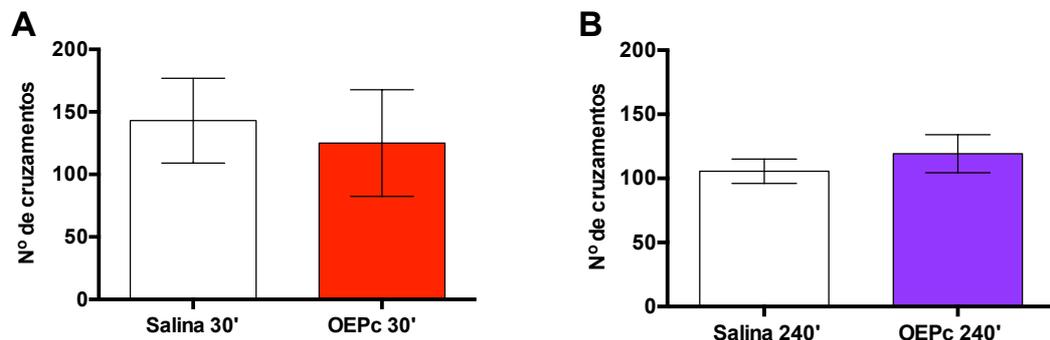


Figura 14 – Efeito da inalação do OEPc sobre a atividade locomotora dos camundongos. Legenda: Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais. A análise estatística foi realizada pelo teste t de *Student*, cada coluna indica desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Salina 30' ou 240'. N°: número. OEPc: Óleo essencial *Pogostemon cablin*.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OEPc NO EDEMA INDUZIDO POR CFA

Os resultados da Figura 15, demonstram um aumento ($p < 0,001$) na espessura da pata dos animais que foram submetidos a injeção i.pl. de CFA, quando comparados aos animais do grupo Salina, caracterizando o modelo pré-clínico de dor inflamatória (painel A). Os painéis B, C e D apresentam os resultados após os tratamentos por 5

dias consecutivos com OEPc 30' ou 240' ou dexametasona (1 mg/kg i.p.) e avaliados 4h após os tratamentos.

No painel B, os resultados demonstram que no 3º dia o grupo OEPc 30' não houveram alterações na espessura da pata em relação aos animais do grupo controle. No painel C, nos 3º ($p = 0,01$) e 4º ($p = 0,02$) dias houveram uma redução estatisticamente significativa da espessura da pata dos animais do grupo OEPc 240' quando comparados com o grupo controle.

No painel D, o tratamento com dexametasona (1 mg/kg i.p.) utilizada como um controle positivo, produziu redução do edema de pata no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia ($p < 0,001$).

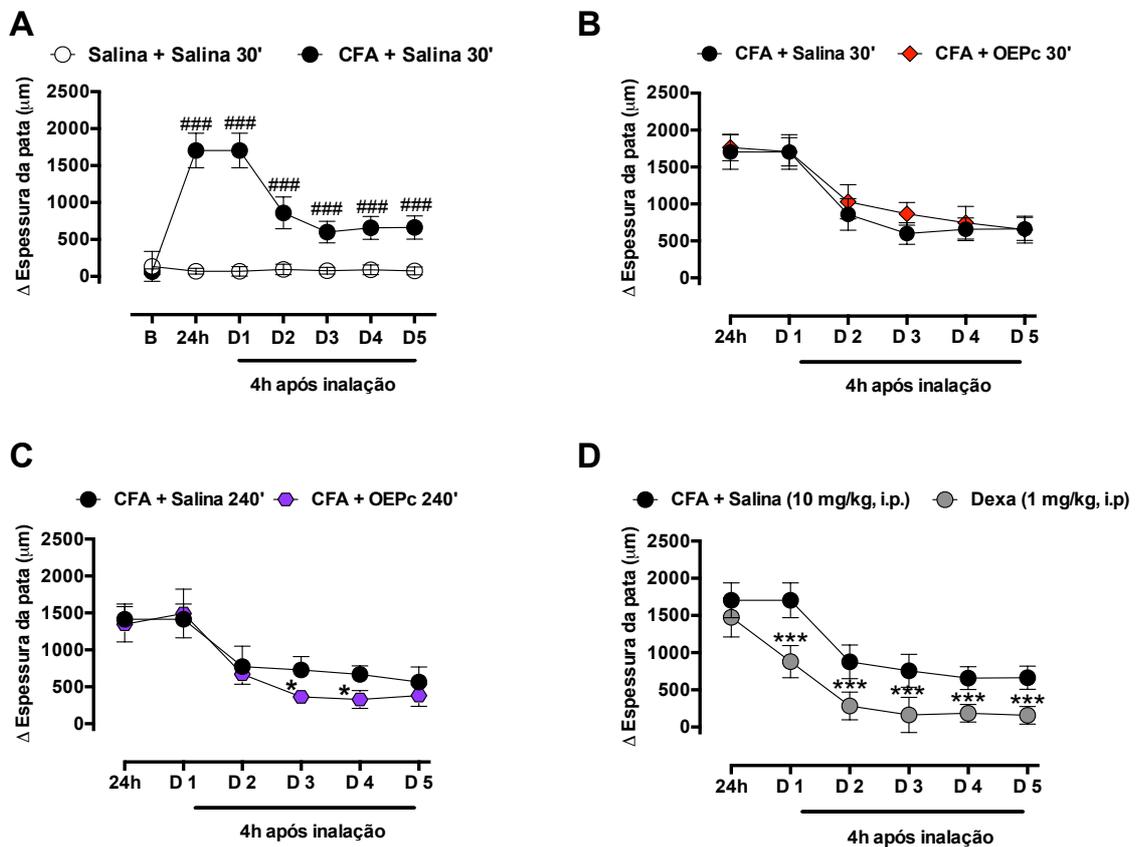


Figura 15 – Efeito da inalação do OEPc no edema de pata.

Legenda: Avaliação do edema de pata induzido por CFA (painel A) após tratamento com OEPc 30' (painel B), OEPc 240' (painel C) ou dexametasona (painel D). Cada ponto representa a média dos valores obtidos de 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CFA + Salina. ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina + Salina 30'. A diferença estatística significativa foi determinada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. OEPc: Óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*. B: valores basais antes da injeção de CFA na pata. 24h: valores basais 24h após a injeção de CFA na pata D: dias. Dexa: Dexametasona.

4.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA ANEXINA A1 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E ANTI-EDEMATOSO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que o tratamento com OEPc 30' por via inalatória reduziu ($p = 0,009$) de maneira significativa a frequência de retirada da pata de camundongos selvagens ($AnxA1^{+/+}$) 24h após a injeção i.pl. de CFA. No entanto, quando o tratamento com OEPc 30' foi realizado em animais nocautes ($AnxA1^{-/-}$) o efeito anti-hiperalgésico do OEPc 30' foi prevenido ($p = 0,03$). Além disso, foi observado que o tratamento dos animais com inalação de salina 30' ($p = 0,$) não alterou a frequência de resposta dos animais (painel A).

Além disso, foi observado que a espessura da pata dos animais selvagens ($AnxA1^{+/+}$) que receberam o tratamento com OEPc 30' apresentaram uma tendência ($p = 0,14$) em reduzir da espessura da pata inflamada. No entanto, esse efeito não foi observado nos animais nocautes ($AnxA1^{-/-}$), pelo contrário, eles apresentaram um aumento da espessura da pata ($p < 0,001$) (painel B).

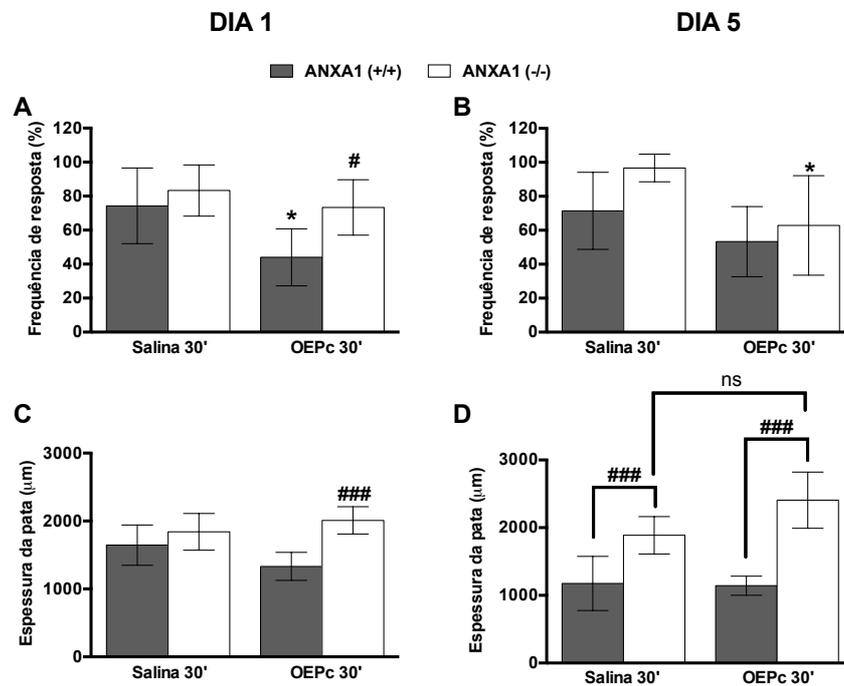


Figura 16 – Envolvimento da Anexina A1 no efeito anti-hiperalgésico do OEPc.

Legenda: Avaliação do efeito envolvimento da Anexina A1 no efeito anti-hiperalgésico (painéis A e B) e no efeito antiedematoso (painéis C e D) do OEPc 30' no 1º e 5º dias. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e indicam desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo $AnxA1^{+/+}$ + Salina 30'. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo $AnxA1^{+/+}$ + OEPc 30'. ns: não apresenta diferença estatística. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*. $AnxA1^{+/+}$: animais selvagens. $AnxA1^{-/-}$: animais nocautes com ablação para o gene Anexina A1.

4.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO FPR2 NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc

Os resultados apresentados na Figura 17 ilustram o envolvimento do FPR2 na inalação do OEPc 30' no modelo de inflamação induzida pelo CFA. Os painéis A e B, apresentam o envolvimento do FPR2 sistêmico no efeito da inalação do OEPc 30' no 1º e 5º, respectivamente. Onde observou-se que a administração de WRW4 (10 µg/s.c.) não apresentou modificações ($p > 0,05$) na frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparado com os animais do grupo controle salina (20 µg/i.pl.). Após o tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no 1º dia ($p < 0,001$) e no dia 5 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle. No entanto, o tratamento com WRW4 (10 µg/s.c.) preveniu o efeito produzido pelo OE tanto no 1º ($p = 0,007$) quanto no 5º ($p = 0,001$) dia após o tratamento.

Além disso, nos painéis C e D, observou-se que a administração de WRW4 (10 µg/i.pl.) não modificou ($p > 0,05$) a frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparados com animais do grupo controle receberam uma injeção i.pl. com salina (20 µg/i.pl.). Nos animais que receberam tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no dia 1 ($p < 0,01$) e dia 5 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle. No entanto, o tratamento com WRW4 (20 µg/i.pl.) não foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico produzido pelo OEPc 30' tanto no 1º ($p > 0,99$) como no 5º ($p > 0,70$) dia após o tratamento.

Nos painéis E e F, representam a avaliação do envolvimento do FPR2 espinal no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc 30' no 1º e 5º dias, respectivamente. Observou-se que a administração de WRW4 (5 µg/i.t.) nesses animais não modificou ($p > 0,05$) a frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparados com animais do grupo controle receberam uma injeção i.t. com salina (20 µg/i.t.). Nos animais que receberam tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no dia 1 ($p < 0,001$) e dia 5 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle. O tratamento com WRW4 (5 µg/i.t.) foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico produzido pelo OEPc 30' tanto no 1º ($p < 0,001$) quanto no 5º ($p = 0,006$) dia após o tratamento. Assim, sugere-se o envolvimento dos FPR2 sistêmicos e espinais no efeito anti-hiperalgésico causado pela inalação do OEPc 30'.

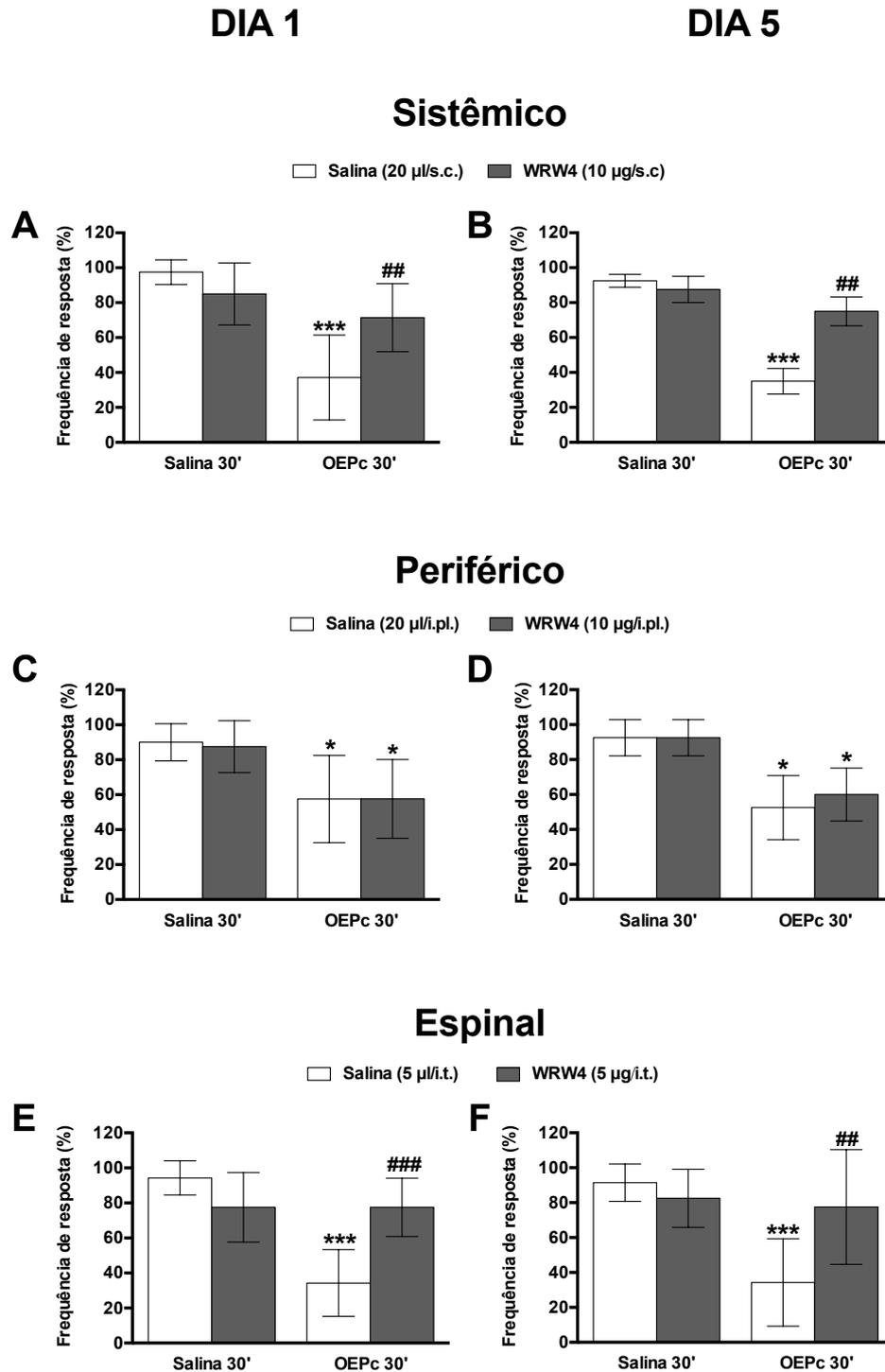


Figura 17 – Envolvimento do FPR2 no efeito anti-hiperalgésico do OEPC.

Legenda: Avaliação do envolvimento dos FPR2 sistêmicos (painéis A e B), periféricos (painéis C e D) e espinais (painéis E e F) no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPC 30'. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo Salina 20µl/i.pl. + Salina 30'. ### $p < 0,01$ ou #### $p < 0,001$ quando comparados com o grupo Salina 20µl/i.pl. + OEPC 30'. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPC: óleo essencial *Pogostemon cablin*. s.c.: injeção subcutânea. i.pl.: injeção intraplantar. i.t.: injeção intratecal.

4.7 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIOIDES NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEPc

A Figura 18 ilustra o envolvimento dos receptores opioides periféricos e espinais na inalação do OEPc 30' no modelo de inflamação induzida pelo CFA. Os painéis A e B, apresentam o envolvimento dos receptores opioides periféricos no efeito da inalação do OEPc 30' no 1º e 5º, respectivamente. Onde observou-se que a administração de naloxona (5 µg/i.pl.) não apresentou modificações ($p > 0,05$) na frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparado com os animais do grupo controle salina (20 µg/i.pl.). Após o tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no dia 1 ($p = 0,002$) e no dia 5 ($p = 0,002$) quando comparado com o grupo controle. No entanto, o tratamento com naloxona (5 µg/i.pl.) preveniu o efeito produzido pelo OE tanto no 1º ($p = 0,002$) quanto no 5º ($p = 0,002$) dia após o tratamento.

Nos painéis C e D, representam a avaliação do envolvimento dos receptores opioides espinais no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc 30' no 1º e 5º dias, respectivamente. Observou-se que a administração de naloxona (5 µg/i.t.) nesses animais não modificou ($p > 0,05$) a frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparados com animais do grupo controle receberam uma injeção i.t. com salina (20 µg/i.t.). Nos animais que receberam tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no dia 1 ($p < 0,001$) e dia 5 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle. O tratamento com naloxona (5 µg/i.t.) foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico produzido pelo OEPc 30' tanto no 1º ($p < 0,001$) quanto no 5º ($p < 0,001$) dia após o tratamento. Assim, sugere-se o envolvimento dos receptores opioides periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico causado pela inalação do OEPc 30'.

Além disso, foi observado o envolvimento dos receptores opioides sistêmicos no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc 30' no 1º dia. A administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.) não alterou ($p > 0,05$) a frequência de retirada da pata (hiperalgesia mecânica) quando comparados com animais do grupo controle receberam uma injeção i.p. com salina (10 mg/kg, i.p.). Nos animais que receberam tratamento com OEPc 30' foi observado uma redução na hiperalgesia mecânica no dia 1 ($p = 0,004$) comparado com o grupo controle. O tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico produzido pelo OEPc 30'.

tanto no 1º dia ($p = 0,003$). Assim como, o tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico ($p < 0,001$) da morfina (5 mg/kg, s.c.) (dados não mostrados).

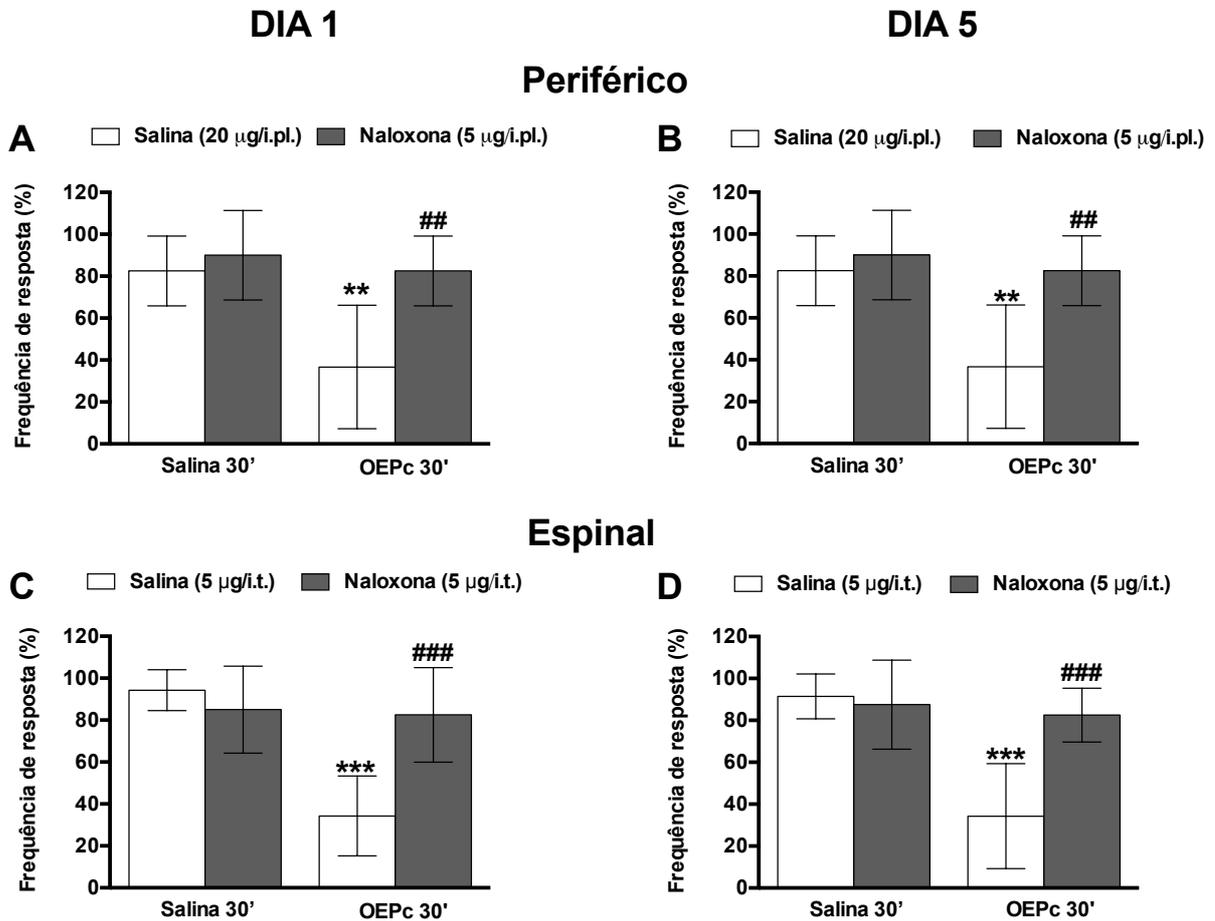


Figura 18 – Envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico do OEPc. Legenda: Avaliação do envolvimento dos receptores opioides periféricos (painéis A e B) e espinais (painéis C e D) no efeito anti-hiperalgésico do OEPc 30' no 1º e 5º dias. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.). ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina 20 µg/i.pl. + Salina 30'. *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina 5 µg/i.t. + Salina 30'. ### $p < 0,01$ quando comparado com o grupo Salina 20 µg/i.pl. + OEPc 30'. #### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina 5 µg/i.t. + OEPc 30'. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*. i.pl.: intraplantar. i.t.: intratecal.

4.8 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS

4.8.1 Efeito da inalação do OEPc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação na pata

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram o efeito da inalação do OEPc sobre as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias no modelo de inflamação crônica da pata. As amostras de medula e pata foram coletadas para análise 5 dias após a injeção i.pl. de CFA e 5 dias consecutivos de inalação do OEPc 30'.

Nos animais que receberam injeção i.pl. de CFA, as concentrações das citocinas TNF- α e IL-1 β e da quimiocina MCP-1 na pata (painéis A, C, G; $p < 0,001$) foram significativamente maiores do que o grupo controle (salina). Também foi observado que o tratamento com OEPc por 5 dias consecutivos não foi capaz de reduzir as concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocinas MCP-1 ($p < 0,001$).

A Figura 19 também demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados nas concentrações de IL-4 na pata (painel E; $p > 0,05$). No entanto, as concentrações de TGF- β na pata após injeção i.pl. de CFA foram significativamente reduzidas ($p < 0,04$) em relação ao grupo de animais controle. E o tratamento com OEPc foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,002$) as concentrações desta citocina anti-inflamatória (painel I).

Na análise das concentrações de citocinas na medula não apresentaram alterações significativas relevantes entre os grupos (painéis B, D, F, H e J; $p > 0,05$).

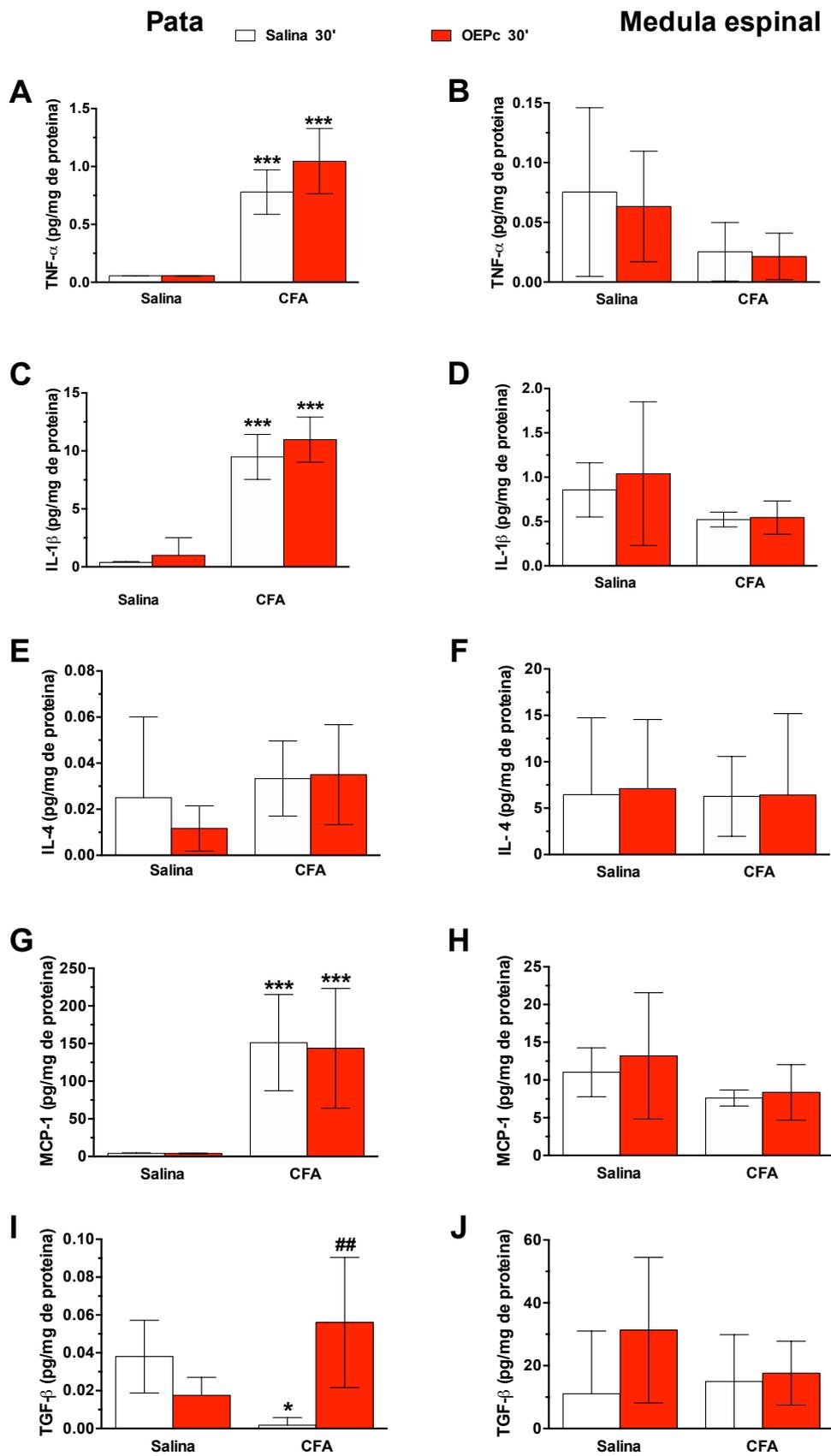


Figura 19 – Efeito da inalação do OEPc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação na pata.

Legenda: Determinação das concentrações de TNF- α (painel A e B), IL-1 β (painel C e D), IL-4 (painel E e F), MCP-1 (painel G e H) e TGF- β (painel I e J) na medula e pata, respectivamente. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 8 animais e indicam desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Salina 30' + Salina. ## $p < 0,01$ quando comparado com Salina 30' + CFA. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*.

4.8.3 Efeito da inalação do OEPc nas concentrações de citocinas no modelo de inflamação pleural

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram o efeito da inalação do OEPc sobre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo de pleurisia. A figura A ilustra um aumento nas concentrações de TNF- α em animais do grupo controle (Carragenina 1%, 100 μ l, intrapleural) em relação aos animais do grupo controle Salina (100 μ l, intrapleural) ($p < 0,001$). Em seguida foi observado que tanto o pré-tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., $p < 0,001$) quanto com OEPc ($p < 0,001$) apresentaram uma acentuada redução nas concentrações de TNF- α quando comparado ao grupo controle carragenina (painel A).

Além disso, houve um aumento nas concentrações de IL-1 β nos animais do grupo controle carragenina quando comparado ao grupo controle Salina (100 μ l, i.pl.) ($p < 0,001$) e redução das concentrações desta citocina após o tratamento com dexametasona ($p = 0,01$) e com OEPc ($p = 0,002$) em relação ao grupo controle carragenina (painel B). Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas concentrações de IL-4 entre os grupos avaliados (painel C). Observou-se também um aumento nas concentrações de IL-5 no grupo controle carragenina em relação ao grupo controle Salina (100 μ l, i.pl.) ($p = 0,04$), os animais que receberam tratamento com dexametasona apresentaram uma redução nas concentrações de IL-5 ($p = 0,005$), no entanto, no grupo OEPc foi observado apenas uma redução parcial, porém não significativa ($p = 0,054$) quando comparado ao grupo controle carragenina (painel D).

Observa-se ainda, que os animais do grupo controle carragenina apresentavam concentrações de IL-10 significativamente menores ($p = 0,001$), quando comparado ao grupo controle salina. Assim como, após o tratamento com dexametasona foi observado um aumento significativo ($p < 0,04$) nas concentrações de IL-10 em relação aos animais do grupo controle carragenina, mas não pelo tratamento com OEPc ($p = 0,66$) (painel E).

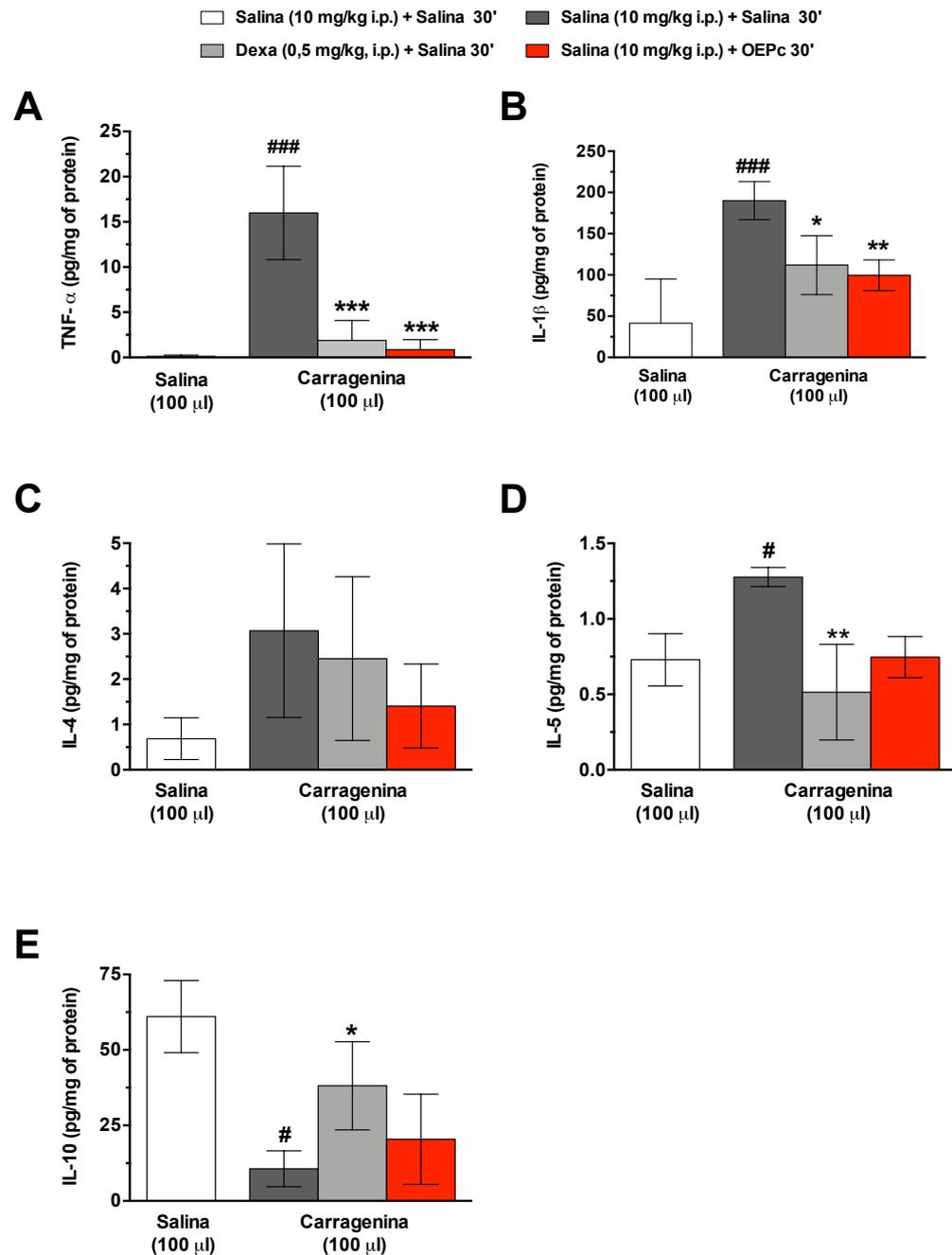


Figura 20 – Efeito da inalação do OEPC sobre as concentrações de citocinas no modelo de inflamação pleural.

Legenda: Efeito da inalação do OEPC sobre as concentrações das citocinas TNF- α (painel A), IL-1 β (painel B), IL-4 (painel C), IL-5 (painel D), e IL-10 (painel E) no lavado pleural no modelo de pleurisia induzido pela carragenina. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Salina (100 μ l, i.pl.). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. Salina: Salina 100 μ l, i.pl. Controle: Carragenina 1%, 100 μ l, i.pl. Dexa: Dexametasona 0,5 mg/kg, i.p. OEPC: óleo essencial *Pogostemon cablin*.

4.8.4 Efeito da inalação do OEPc na contagem de leucócitos no modelo de inflamação pleural

A Figura 21 demonstra que nos animais do grupo controle (Carragenina 1%, 100 μ l, intrapleurar) houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da contagem total de leucócitos em relação ao grupo controle salina (100 μ l, intrapleurar). No entanto, os grupos de animais que receberam o tratamento com dexametasona ($p < 0,001$) ou com OEPc ($p < 0,001$) apresentaram uma redução significativa dos números totais de leucócitos quando comparados com o grupo controle (painel A). Além do mais, houve um aumento significativo de neutrófilos ($p < 0,001$) mas não de células mononucleares no grupo controle carragenina quando comparado ao grupo controle salina. Nos animais tratados com dexametasona ($p < 0,001$) ou OEPc ($p < 0,001$) houve uma acentuada redução do número de neutrófilos, mas não houve mudanças significativas ($p > 0,05$) no número de células mononucleares em relação aos animais do grupo controle carragenina.

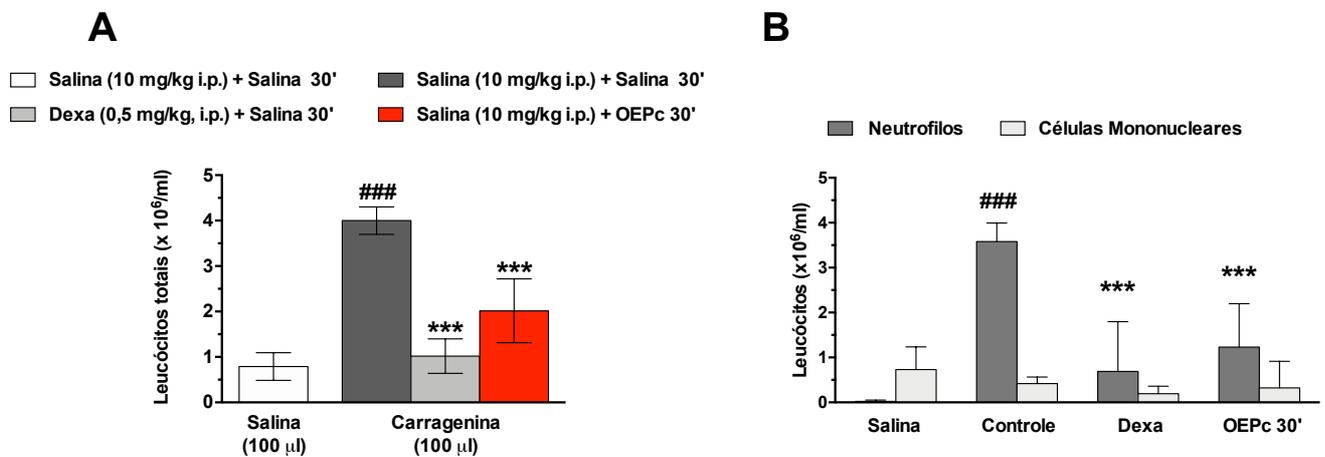


Figura 21 – Efeito da inalação do OEPc na contagem de leucócitos no modelo de inflamação pleural. Legenda: Contagem total de leucócitos (painel A) e contagem diferencial de leucócitos (painel B), na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo Sham. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. Sham: Salina 100 μ l, i.pl. Controle: Carragenina 1%, 100 μ l, i.pl. Dexa: Dexametasona 0,5 mg/kg, i.p. OEPc: óleo essencial *Pogostemon cablin*.

4.9 PAPEL DA VIA INALATÓRIA NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO INDUZIDO PELA INALAÇÃO DO OEP_c

4.9.1 Teste de discriminação olfatória

A Figura 22 ilustra o efeito sobre a discriminação olfatória em camundongos 2 dias após a administração intranasal de Zicam (30 µl) ou salina (30 µl). Após os animais receberem administração intranasal de salina foi constatado que eles permaneceram um tempo significativamente maior no compartimento familiar ($p < 0,001$). Por outro lado, o grupo de animais que recebeu administração de Zicam apresentou um prejuízo significativo na discriminação olfativa, não apresentando diferença significativa ($p = 0,14$) no tempo gasto entre os dois compartimentos (painel A). Além disso, foi constatado uma diminuição significativa ($p < 0,001$) do número de cruzamentos entre os compartimentos no grupo Zicam em relação ao grupo salina (painel C).

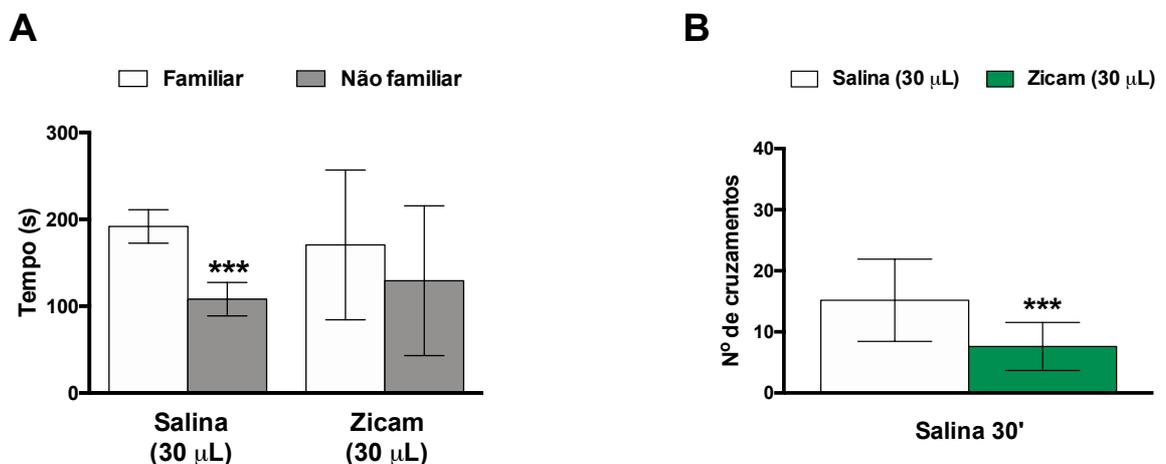


Figura 22 – Efeito da administração de Zicam sobre a discriminação olfatória.

Legenda: Avaliação do tempo de permanência nos compartimentos familiar ou não familiar após a administração intranasal de Zicam. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 8 animais e indicam desvio padrão (D.P.). *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina (30 µl). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey (A) ou teste t de Student (B).

4.9.2 Efeito da administração intranasal de Zicam na atividade locomotora espontânea

Na Figura 23, os resultados indicam que os animais que receberam a administração intranasal de Zicam (30 μ L), dois dias após a injeção i.pl. de CFA e a inalação do OEPC 30' por 5 dias consecutivos, não foram observadas alterações significativas em relação aos animais do grupo controle (salina), nos parâmetros locomotores abordados no teste de campo aberto, incluindo a distância total e velocidade máxima percorrida ($p > 0,05$) (painéis A, B e C).

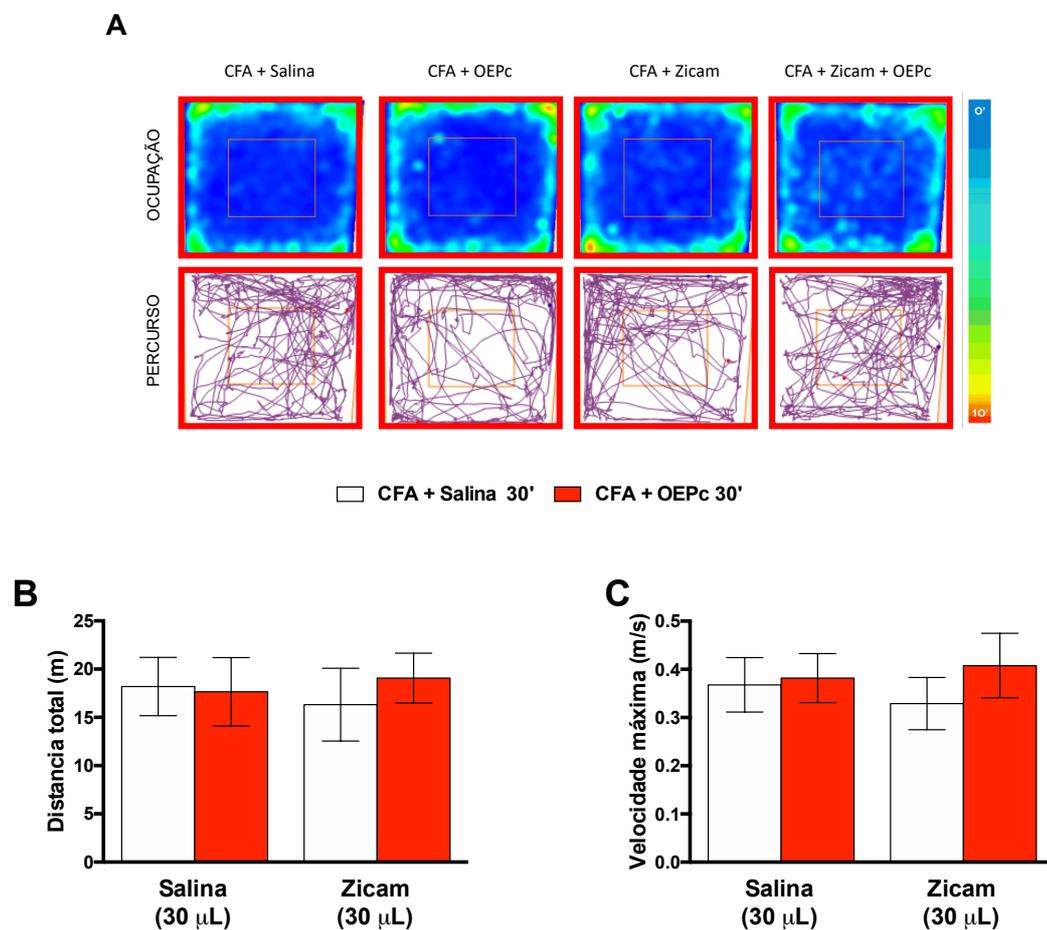


Figura 23 – Efeito da administração intranasal de Zicam e da inalação do OEPC na atividade locomotora. Legenda: Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 8 animais e indicam desvio padrão (D.P.). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPC: óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*.

4.9.3 Efeito da administração intranasal de Zicam na anti-hiperalgesia induzida pela inalação do OEPC

Na Figura 24, os resultados indicam que os animais que receberam administração intranasal de Zicam (30 μ l) e dois dias após receberam a injeção i.pl. de CFA, apresentaram hiperalgesia mecânica constatada pelo aumento ($p < 0,001$) da frequência de resposta de retirada da pata (valores basais) 24h após a injeção. Os animais que receberam tratamento com Salina (30 μ l) + OEPC 30' ($p < 0,05$) e administração intranasal de Zicam (30 μ l) + OEPC 30' ($p < 0,001$) apresentaram uma redução na hiperalgesia mecânica em 0,5h após a inalação quando comparado com os animais do grupo controle, do 1º ao 5º dias, respectivamente.

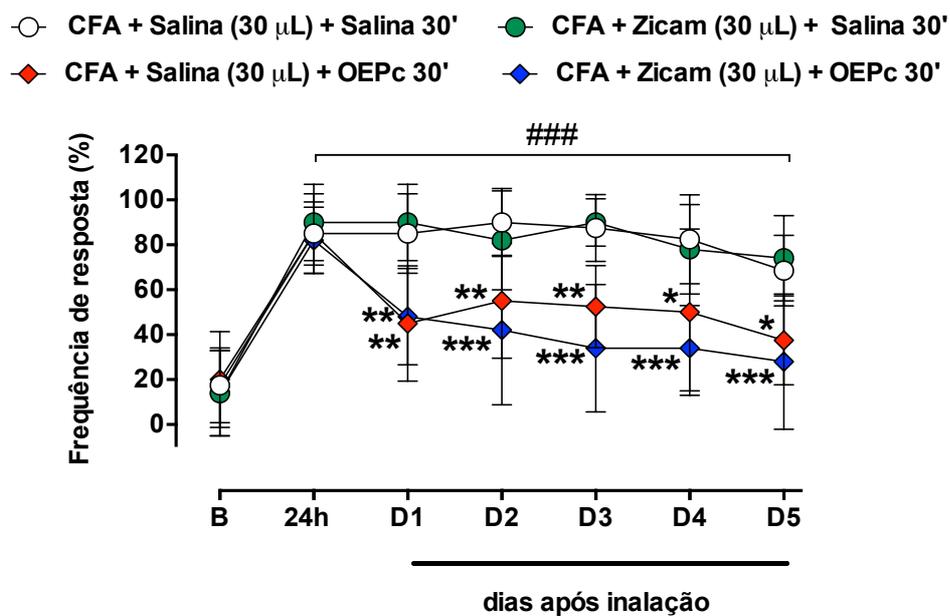


Figura 24 – Efeito da administração intranasal de Zicam na anti-hiperalgesia induzida pela inalação do OEPC.

Legenda: Cada ponto representa a média dos valores obtidos de 8 animais e as linhas verticais indicam desvio padrão (D.P.) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina. ### $p < 0,001$ quando comparado com valores basais, antes da injeção de CFA. A diferença estatística significativa foi determinada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. OEPC: óleo essencial *Pogostemon cablin*. CFA: *Complete Freund's Adjuvant*. B: valores basais 24h antes da injeção de CFA na pata. 24h: valores basais 24h após da injeção de CFA na pata. D: dia.

4.9.4 Efeito da administração intranasal de Zicam e da inalação do OEPC no teste da suspensão pela cauda

Os resultados da Figura 25 indicam que os animais que receberam a administração intranasal de Zicam (30 µl) ou de Salina (30 µl) e ainda foram tratados com a inalação de OEPC 30' ou Salina 30' por 5 dias consecutivos, não apresentaram diferença estatística entre eles no tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.

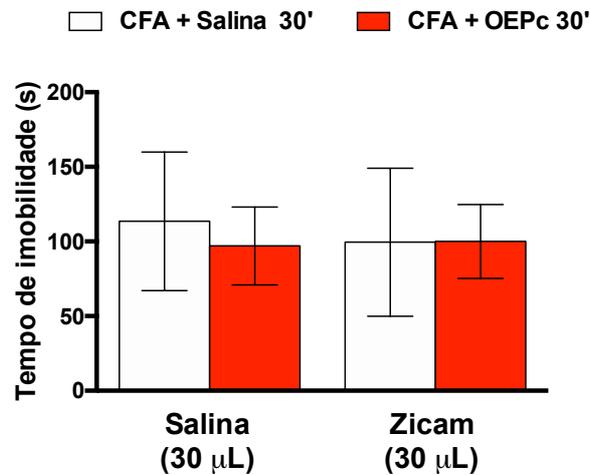


Figura 25 – Efeito da administração intranasal de Zicam e da inalação do OEPC no teste da suspensão da cauda.

Legenda: Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 8 animais e indicam desvio padrão (D.P.). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. OEPC: óleo essencial *Pogostemon cablin*.

5. DISCUSSÃO

Óleos essenciais têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de diversas doenças inflamatórias^{36,226,227}. Estudos sugerem que o uso de produtos naturais pode ser mais seguro e eficaz, uma vez que apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais²⁵. Assim, se faz de grande relevância investigar o mecanismo de ação de novas substâncias que apresentem um potencial analgésico e anti-inflamatório / pró-resolutivo.

Neste trabalho foi identificado o perfil fitoquímico do OEPc por meio de análise cromatográfica. Dentre treze elementos constituintes, foram identificados como compostos majoritários o patchoulol, α -bulneseno, α -guaieno e outros compostos em menores quantidades, como: α -copaeno, β -patchouleno, β -elemeno, cicloseicheleno, trans- β -cariofileno, seicheleno, α -patchouleno, γ -patchouleno, guai-4,11-dieno e pogostol. Estes resultados são consistentes com dados encontrados na literatura, o patchoulol, patchoulene, guaieno e seicheleno são constituintes encontrados em maior quantidade no OEPc. As atividades biológicas deste óleo estão fortemente associadas aos seus constituintes químicos^{27,30,176,225,228}.

Em paralelo, nos experimentos comportamentais, foi demonstrado por meio da avaliação da hiperalgesia mecânica - decurso temporal - o efeito de diferentes tempos de inalação do OEPc. Além disso, foi demonstrado que na fase precoce da inflamação, um único tratamento com inalação do OEPc produziu efeito anti-hiperalgésico dependente do tempo de inalação. No tratamento diário com OEPc, o efeito anti-hiperalgésico se manteve até a fase tardia da inflamação. Os resultados do presente estudo são os primeiros da literatura a mostrar que a inalação do OEPc reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.

A injeção i.pl. de CFA induz dor inflamatória persistente por semanas, reproduzindo um modelo semelhante a doença articular inflamatória crônica, como a artrite reumatoide, que envolve uma interação complexa entre dor e inflamação²²⁹. O modelo de artrite induzida por CFA tem sido amplamente utilizada em laboratório para avaliação da dor crônica²³⁰. Os mediadores inflamatórios liberados neste modelo também são responsáveis pela sensibilização de neurônios aferentes, resultando em dor artrítica²³¹.

Estudos relatam as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória do patchouli e seu principal componente ativo, patchoulol. Tanto o patchouli quanto o patchoulol foram investigados em diferentes modelos experimentais e exibiram atividades anti-inflamatórias inibindo vias de mediadores inflamatórios, modulando citocinas pró e anti-inflamatórias e enzimas antioxidantes^{29-32,36,174,194,199-201}.

O patchoulol foi identificado em diversos estudos como o principal constituinte do OEPc^{176,204}, e seu mecanismo de ação foi parcialmente estabelecido^{32,182,200}. Nesse sentido, tem sido demonstrado que o patchoulol exerce efeito antinociceptivo devido a redução da expressão de COX-2 e modulação de receptores opioides do tipo μ . Também foi mostrado no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, que a administração subcutânea de patchoulol, prolongou o período de latência e reduziu a frequência das contorções abdominais. No teste de injeção de formalina na pata, o tratamento com patchoulol diminuiu significativamente o tempo de lambida da pata. Além disso, diminuiu a transcrição e expressão de COX-2 no cérebro de camundongos e regulou positivamente a expressão de receptores opioides do tipo μ . O patchoulol reduziu níveis de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e fator de transcrição NF-KB²⁹.

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do OEPc foi investigada em diferentes modelos animais^{29,30,36,176}. A administração oral do OEPc em camundongos exerceu atividade antinociceptiva, aumentando significativamente o período de latência e diminuindo a frequências das contorções no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. No teste de placa quente, aumentou significativamente o período de latência e foi constatado o envolvimento de receptores opioides no efeito antinociceptivo do óleo³⁰. Além disso, o extrato metanólico de *Pogostemon cablin* administrado por via oral em camundongos, também foi capaz de reduzir contorções abdominais induzida por ácido acético e tempo de lambida da pata no teste de formalina, caracterizando um perfil antinociceptivo do extrato³¹.

Alguns estudos com seres humanos mostraram que a inalação do OEPc pode induzir sedação²⁰³⁻²⁰⁵. Na aromaterapia, o OEPc popularmente é utilizado para ajudar a reduzir tensões, insônia e ansiedade^{28,159,163}. Em estudos, com indivíduos adultos saudáveis, após inalação do OEPc por 3 minutos observou-se uma redução de 40% da atividade relativa do sistema nervoso autônomo simpático, além disso, após a inalação do OEPc por 7 minutos não alterou os níveis de adrenalina e noradrenalina

no plasma²⁰⁴. Interessantemente, no presente estudo os animais que inalaram OEPc por 30' ou 240' e não apresentaram alterações na atividade locomotora espontânea, não apresentaram nenhum efeito sedativo sobre o SNC. Não foram encontrados na literatura estudos com animais, com resultados semelhantes ao deste estudo (com inalação do OEPc).

O edema de pata de camundongo induzido por CFA é um modelo confiável e reproduzível para avaliar o efeito anti-inflamatório de produtos naturais^{199,230}. O desenvolvimento do edema de pata induzido pelo CFA está relacionado com a população de células predominantes, granulócitos (65-70%) na fase precoce (2h e 6h após) e monócitos ou macrófagos (60%) na fase tardia (96h). O aumento dos níveis de NO, PGs, TNF- α , IL-1 β e IL-6, estão envolvidos na migração de neutrófilos na inflamação induzida pelo CFA⁶⁸.

Assim, no presente estudo a medida da espessura da pata foi utilizada como indicativo de edema. Os resultados observados aqui indicam que os tratamentos diários, por 5 dias consecutivos com inalação de OEPc 30', o tempo de inalação o qual melhor reduziu a hiperalgesia mecânica, não foi capaz de reduzir a espessura da pata. No entanto, a inalação de OEPc 240', reduziu levemente o edema de pata em 4h após os tratamentos. Não foram encontrados na literatura, estudos que utilizaram o mesmo desenho experimental da presente pesquisa (mesmo modelo, via de administração do óleo essencial, tempos de avaliação) para que fosse possível uma comparação direta dos achados.

No entanto, um estudo em modelo animal de edema de pata induzido por carragenina, mostrou que o extrato etanólico da raiz e rizoma do patchouli administrado por via oral reduziu o edema de pata de forma dose dependente da 2^a à 6^a hora após o tratamento. Na análise histológica foi observado que no grupo de animais tratados com extrato de patchouli, as fibras de colágeno estavam de forma regulares; os espaços intercelulares, leucócitos e infiltração celular estavam diminuídos em comparação com o grupo controle. Nesse mesmo estudo, o extrato reduziu de forma dose dependente, o edema de orelha induzido por xileno¹⁹⁹. Além disso, o patchoulol²⁰¹, β -patchoulene³⁵ e extrato metanólico de patchouli³¹ administrados oralmente em camundongos, também foram capazes de reduzir edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por xileno. No teste de permeabilidade vascular induzido por ácido acético, foi observado a redução o extravasamento plasmático peritoneal por Azul de Evans, sugerindo que o efeito anti-

inflamatório do extrato etanólico de patchouli esta associado a prevenção da vasodilatação e à inibição da liberação de mediadores inflamatórios na fase aguda da inflamação¹⁹⁹. Além disso, o patchoulol³¹, β -patchoulene³⁵ e extrato metanólico de patchouli³¹ administrados oralmente em camundongos, também foram capazes de reduzir edema de pata induzido por caragenina e edema de orelha induzido por xileno.

É possível que a inalação do OEPc não tenha sido efetiva ao reduzir o edema de pata, devido a baixa disponibilidade dos constituintes do OE distribuídos sistemicamente. Alguns estudos reportaram que após a inalação de diferentes OE, verificou-se baixos percentuais dos constituintes químicos presentes no plasma, pois o percentual de moléculas presentes no plasma é tempo dependente do tempo da inalação^{232,233}. Uma vez que cada constituinte é metabolizado de forma distinta e possuem farmacocinética, velocidade de absorção e eliminação diferentes, para que os constituintes do OE cheguem até a periferia em quantidade suficiente para produzir um efeito celular e vascular e contribuam para a redução do edema, outras formas de administração devem ser utilizadas, pois a inalação não se mostrou efetiva.

No entanto, nesta tese quando analisado o perfil celular no pulmão, no modelo de inflamação pleural, visto que a via inalatória possui uma íntima ligação com a via pulmonar, facilitando a ação do OE, verificou-se que o efeito da inalação do OEPc levou a uma diminuição da migração de leucócitos totais e neutrófilos, dos vasos sanguíneos para os tecidos durante a resposta inflamatória aguda. Possivelmente uma ação local dos constituintes químicos presentes no OEPc, antes de serem metabolizados permitiu que a ação anti-inflamatória do OEPc fosse identificada neste modelo. Assim, sugere-se que as propriedades anti-inflamatórias do OEPc no modelo de pleurisia provavelmente estão relacionadas à inibição do recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos.

A cavidade pleural, considerada um compartimento intersticial, está localizado entre a pleura visceral que cobre a superfície do pulmão e a pleura parietal que cobre o mediastino, o diafragma e a superfície interna do tórax. A cavidade pleural contém um pequeno volume, além de linfócitos, granulócitos e células mesoteliais²¹⁶. A injeção de carragenina na cavidade pleural induz uma resposta inflamatória aguda caracterizada por migração de leucócitos, em especial os neutrófilos, exsudação pleural e aumento da liberação de IL-1 β e TNF- α ^{216,220,234}.

É comumente conhecido o papel dos neutrófilos nos sítios de inflamação. A pleurisia induzida por carragenina é um modelo útil para avaliar a contribuição de

mediadores envolvidos em alterações vasculares e na migração de leucócitos associada à inflamação pleural aguda^{216,220}. Corroborando com essas informações, dados encontrados na literatura demonstram que o extrato etanólico da raiz e rizoma de patchouli administrado por via oral, foi capaz de reduzir recrutamento de neutrófilos em modelo de pleurisia induzida por carragenina¹⁹⁹.

Outro estudo recente vem de acordo com os resultados da presente tese, em análises realizadas *in vitro*, o OEPc foi capaz de reduzir a quimiotaxia de neutrófilos e aumentar a atividade fagocítica de células polimorfonucleares. Em modelo animal de peritonite, o tratamento por via oral reduziu produção de NO, recrutamento de leucócitos e número de leucócitos rolantes e aderentes na microcirculação. Este estudo concluiu que o OEPc possui efeito anti-inflamatório por afetar o comportamento leucocitário e sugere seu mecanismo de ação como a redução de NO e de citocinas pró-inflamatórias, influenciando assim na resolução do processo inflamatório³⁶.

Além disso, o OEPc administrado por via retal em camundongos no modelo de colite, foi capaz de reduzir dano colônico, além de infiltrado celular de neutrófilos³⁷. O β -patchoulene em modelo de edema de pata induzido por carragenina, foi capaz de reduzir infiltrado celular³⁵, assim como o patchoulol em modelo de lesão pulmonar aguda por LPS, foi capaz de diminuir significativamente o peso molhado dos pulmões, indicando redução de edema, além disso em análise histológica reduziu contagem de células totais (neutrófilos e macrófagos)¹⁹⁵.

Farmacologicamente, a estimulação de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, produzem um aumento da resposta inflamatória. TNF- α um marcador do processo inflamatório, potente estimulador da produção de outros mediadores pró-inflamatórios, como NO, IL-1 β e IL-6. Portanto, acredita-se que a inibição da produção e liberação de mediadores inflamatórios seja eficaz no tratamento de doenças inflamatórias crônicas²³⁶. Com isso, foi demonstrado nesta tese, que no modelo de pleurisia, a inalação do OEPc reduziu as concentrações de TNF- α , como também de IL-1 β , mas não alterou as concentrações de IL-10.

Estudos em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina, tem demonstrado que quatro horas após a indução do modelo, ocorre o pico da resposta inflamatória pleural, induzindo a liberação de mediadores químicos, como histamina, bradicinina, substância P e prostaglandinas, seguida por exsudação, liberação de citocinas, como TNF- α e IL-1 β , e infiltração de neutrófilos no local da inflamação^{216,220}.

Assim, confirmou-se essas observações e demonstrou-se que o tratamento por via inalatória com OEPc reduziu as principais características da inflamação aguda, incluindo citocinas pró-inflamatórias e número de leucócitos, caracterizados principalmente pela redução na contagem de células diferenciais de neutrófilos, na cavidade pleural, sugerindo que o OEPc tem um papel no controle de eventos inflamatórios agudos neste modelo.

O modelo de CFA, induz a produção e liberação de mediadores químicos inflamatórios. Macrófagos ativados são responsáveis pela expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e enzimas que mediam a ativação e diferenciação de leucócitos e células endoteliais^{235,236}. Está estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β contribuem direta e indiretamente para a formação de edema^{59,63}. Por meio da estimulação da COX-2, TNF- α e IL-1 β aumentam a produção de PGI₂ a qual possui atividade vasodilatadora⁶.

Como existe uma correlação direta entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e a formação de edema, no presente estudo também se analisou as concentrações de citocinas inflamatórias, afim de confirmar ou refutar a hipótese do efeito anti-inflamatório da inalação do OEPc. Assim, um dos resultados encontrados no presente estudo, no modelo de inflamação crônica induzida por CFA, observou-se que no quinto dia houve um aumento das concentrações de TNF- α , IL-1 β , MCP-1 e que a inalação do OEPc não modificou as concentrações dessas citocinas. Em acordo com estes dados, estudos demonstraram que após injeção de CFA na pata de camundongos, houve um aumento nas concentrações de TNF- α e IL-1 β paralelo ao desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica^{213,214}. As concentrações dessas citocinas não foram alteradas na medula espinal. Com base nos dados do presente estudo, é possível, também, concluir que a falha da inalação do OEPc em reduzir o edema esteja associada ao fato da inalação não diminuir a produção periférica de citocinas como o TNF- α e IL-1 β . Por fim, análise das citocinas inflamatórias na pata definitivamente refuta a hipótese de que a inalação do OEPc possa produzir efeito anti-inflamatório periférico no modelo de inflamação crônica induzida por CFA.

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* relataram que o patchouli^{29,32,34,193,195-198,200-202}, β -patchoulene^{33,35}, pogostone¹⁹⁶, extrato aquoso¹⁹⁴ e extrato etanólico da raiz e rizoma de patchouli¹⁹⁹, administrados oralmente em camundongos, foram

capazes de modular mediadores inflamatórios, como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, NF-KB, iNOS, COX-2, PGE₂, em diferentes modelos experimentais de inflamação, como colite, lesão pulmonar aguda, aterosclerose, edema de pata, mastite e úlcera gástrica. Neste sentido, fica evidente que a via de administração é um fator determinante para se produzir um efeito anti-inflamatório significativo, modulando citocinas e outros mediadores em patologias de origem sistêmicas.

No entanto, neste estudo foi observado que a injeção i.pl. de CFA diminuiu as concentrações de TGF- β e a inalação do OEPc foi capaz de aumentar. TGF- β apresenta uma potente atividade reguladora no sistema imune, modula células T^{237,238} e desempenha um importante papel sob condições inflamatórias. É proposto que na resolução da inflamação, macrófagos em processo de eferocitose apresentem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores potentes, através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β ₁ e PGE₂, e a supressão da liberação de mediadores pró-inflamatórios^{239,240}. Em neutrófilos, após ser estimulado pelo TNF- α , ocorre a liberação da AnxA1 a qual produz seu efeito por meio da ativação de FPR2, induzindo a liberação TGF- β ²⁴¹.

Está estabelecido, após injeção i.pl. de CFA, que diferentes mediadores endógenos nociceptivos e inflamatórios são liberados, resultando em hiperalgesia persistente, por aumento da descarga de fibras nociceptivas primárias que modificam o fenótipo e função de neurônios e células neurogliais. Estas alterações podem ocorrer em diferentes níveis (transcricional ou pós-transcricional) afetando receptores, canais iônicos, mediadores solúveis e mediadores envolvidas na sinalização celular²¹⁵. Nesse contexto, os efeitos da inalação do OEPc em diminuir a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA estão possivelmente associados à sua capacidade de interferir na sinalização celular, particularmente a relacionada com as vias nociceptivas e inflamatórias.

A partir dos primeiros resultados com a inalação do OEPc sobre a hiperalgesia mecânica, o próximo passo da presente pesquisa foi investigar a participação dos FPR2 sistêmicos, periféricos e espinais no efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc, nas fases precoce e tardia da inflamação induzida pelo CFA. Um achado interessante do presente estudo, foi a demonstração do envolvimento dos FPR2 sistêmicos e espinais (central), mas não periférico no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc pelo fato de que a administração s.c. e i.t. do antagonista dos

FPR2 preveniu o efeito anti-hiperalgésico do OEPc na fase precoce e tardia da inflamação.

Em relação ao sítio espinal, foi demonstrado que o FPR2 não está expresso somente em neutrófilos, monócitos e células T, mas também no sistema nervoso^{242,243}. Além disso, os FPR2 estão expressos constitutivamente na medula espinal de ratos e camundongos *naives*. A injeção i.pl. de carragenina, é capaz de aumentar a expressão desses receptores em células astrogliais, mas não em células microgliais ou neurônios. Além do mais, a injeção i.t. de LXA₄ produz um efeito anti-hiperalgésico. A ativação do FPR2 por peptídeos exógenos análogos a AnxA1, mostrou inibir a nocicepção induzida pela formalina, levantando a hipótese de que a ativação do FPR2 pela AnxA1 tem participação ativa na modulação da dor inflamatória¹⁵. No modelo de dor inflamatória persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA de camundongos, foi observada uma regulação positiva de AnxA1 no gânglio sensorial do nervo espinal (L4/L5)²⁴³.

Camundongos nocautes (AnxA1^{-/-}) são mais suscetíveis à dor nociceptiva induzida pela injeção i.p. de ácido acético em comparação com o camundongos selvagens (ANXA1^{+/+}), sugerindo que o AnxA1 modula a dor nociceptiva. Além disso, o aumento dos níveis de PGE₂ na medula espinhal de animais nocautes (AnxA1^{-/-}) em comparação com animais selvagens (ANXA1^{+/+}) sugere que AnxA1 pode modular o processamento nociceptivo a nível espinal, pela regulação negativa da PGE₂²⁴⁴. Interessantemente, no presente estudo o envolvimento da AnxA1 foi constatado, uma vez que quando os animais nocautes (AnxA1^{-/-}) não apresentaram o efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc, como foi observado em animais selvagens.

Como mencionado anteriormente o sistema opioide participa do efeito anti-hiperalgésico do OEPc³⁰ e do patchoulool²⁹. Além disso, está claro que AnxA1 exerce efeitos analgésicos na dor inflamatória e a ativação dos FPR2 contribuem para esse efeito. Sua ação pode estar associada a diferentes eventos celulares, como a inibição de citocinas envolvidas na transmissão da dor e seu mecanismo está envolvido na liberação de opioides por neutrófilos, os quais facilitam a inibição da transmissão nociceptiva periférica pela supressão da excitabilidade neuronal^{14,15}. A ativação dos FPR2 pela ANXA1 pode induzir a liberação de opioides a partir de neutrófilos²⁴⁵. Estes estudos, vem de encontro com um interessante achado desta tese, pela primeira vez na literatura foi demonstrado que a administração de naloxona administrada na pata

ou medula espinal preveniu o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc tanto na fase precoce, quanto na fase tardia da inflamação induzida por CFA.

Ao contrário do esperado, apesar do bloqueio dos receptores opioides prevenir o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc, o bloqueio dos FPR2 periféricos não foi capaz de prevenir este efeito. Isso sugere que o efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc seja mediado pelos receptores opioides periféricos e que os FPR2 periféricos não participam da liberação de opioides e portanto, desse efeito. Assim, sugere-se que outros sistemas periféricos já conhecidos possam mediar essa ativação de receptores opioides periféricos, tais como o sistema endotelinérgico (via ativação do receptor ET_B)²⁴⁶ ou endocanabinoide (via ativação do receptor CB₂)²⁴⁷. Ou mesmo pela ativação direta do receptor opioide periférico por meio da ligação de algum composto do OEPc. Por outro lado, futuros estudos com a administração i.pl. de diferentes doses do antagonista dos FPR2 podem confirmar ou refutar a hipótese que realmente não existe o envolvimento desses receptores na ativação do sistema opioide induzida pela inalação do OEPc.

A ativação dos FPR2 pela ANXA1 pode induzir a liberação de opioides a partir de neutrófilos²⁴⁵. Após injeção i.pl. de CFA na pata de camundongos, foi constatado que a depleção de neutrófilos no local da inflamação diminui o limiar de dor térmica, mas sem alteração significativa do volume da pata ou da produção local de PGE₂²⁴⁸⁻²⁵⁰. Este estudo vem de encontro com os resultados desta tese, onde a inalação do OEPc produziu um pronunciado efeito anti-hiperalgésico após a injeção i.pl. de CFA na pata, no entanto, não se mostrou eficiente em reduzir o edema da pata. Este dado pode indicar um possível envolvimento dos neutrófilos pela inibição da nocicepção e por não alterar o edema. Em estudos prévios, foi demonstrado que dentre as células imunes, os neutrófilos são as principais células fontes de peptídeos opioides durante a fase precoce da inflamação produzida pela injeção i.pl. de CFA (até 24h após), enquanto os monócitos/macrófagos sintetizam peptídeos opioides na fase mais tardia¹⁶.

Em relação a investigação do papel da via olfatória no efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc, foi observado neste trabalho que a indução de anosmia nos animais não prejudicou ou preveniu o efeito da inalação. A condição de anosmia foi induzida em camundongos, pela administração intranasal de zicam que prejudicou a discriminação olfatória, indicando perda do sentido do olfato nos camundongos. Esse resultado corrobora com dados da literatura, que mostraram que

a administração intranasal de zicam causa anosmia, devido ao rompimento das fibras aferentes do epitélio olfatório para o bulbo olfatório, resultando assim, na perda significativa do olfato^{148,149,152,153}. Estudos mostram que a condição de anosmia em camundongos, pode permanecer por até 60 dias após a administração intranasal de zicam, além da perda substancial do epitélio e mucosa olfatórios que podem ser irreversíveis¹⁴⁹.

Na avaliação da hiperalgisia mecânica foi observado que os animais que foram pré-trados pela administração intranasal de zicam e posteriormente receberam injeção i.pl. de CFA e a inalação do OEPc por 5 dias consecutivos, que o estado de anosmia não alterou o efeito anti-hiperalgésico produzido pela inalação do OEPc. Esses resultados sugerem que ativação do sistema olfatório pela inalação do OEPc não é o mecanismo pelo qual o OE exerce seu efeito anti-hiperalgésico.

No presente estudo, considerando que alterações da atividade locomotora espontânea podem interferir do efeito anti-hiperalgésico, foram realizados testes para descartar a possibilidade de um efeito sedativo ou depressor do SNC, tanto da administração intranasal de zicam como da inalação do OEPc. Foi observado que a indução de anosmia e inalação do OEPc não alteraram a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto, além de não alterar o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Esses resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura^{118,148}. A anosmia induzida pela administração intranasal de zicam, não prejudicou o efeito do tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda¹⁴⁸. Em outro estudo, verificaram que a anosmia, não interferiu no efeito da inalação de cedrol (um componente do óleo essencial de junípero), no tempo de sono induzido por pentobarbital¹¹⁸.

Assim, acredita-se que no presente estudo, os compostos voláteis do OEPc podem ter exercido efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório através de absorção pela mucosa pulmonar, o que possibilitou a ação dos compostos ativos na circulação sistêmica e, conseqüentemente, para o SNC. Portanto, o efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório induzido pela inalação do OEPc nos modelos de inflamação crônica, parece ter seu efeito mediado via pulmonar.

Em resumo, este trabalho analisou a composição química do OEPc, investigou o potencial anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e pró-resolutivo da inalação do OEPc usando dois modelos animais. Os resultados mostraram que no modelo de inflamação persistente induzida por CFA a administração por via inalatória de OEPc produziu um

potente efeito anti-hiperalgésico, porém não reduziu edema e não apresentou efeitos sobre as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias (não produziu efeito anti-inflamatório nesse modelo). Além disso, foi demonstrado que os receptores FPR2 (sistêmicos e espinais) e opioides (sistêmicos, periféricos e espinais), assim como, a participação da AnxA1, estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc. No entanto, o mecanismo de ação pelo qual o OEPc atua ainda não foi totalmente esclarecido. Ainda assim, este estudo forneceu evidências experimentais para a aplicação da inalação do OEPc em modelo de pleurisia, o qual a inalação do OEPc possibilitou redução de infiltrados celulares e redução de citocinas inflamatórias. Por fim, demonstrou-se que ativação da via olfatória não é necessária para o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc, sugerindo assim, que a via pulmonar sejam a principal via de absorção das moléculas voláteis dos OEs que alcançam na sequência a corrente sanguínea produzindo os efeitos por influenciar diferentes sítios de modulação da dor.

Assim, se corroborou a hipótese de que a inalação do OEPc é efetiva em reduzir a hiperalgisia mecânica no modelo de inflamação persistente, no qual a via AnxA1/FPR2/opioide está envolvida, mas não a ativação da via olfatória.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados aqui, conclui-se:

1. Foi definido o perfil fitoquímico do OEPc. Foram identificados como compostos majoritários o patchoulol, α -bulneseno, α -guaieno e outros compostos em menores quantidades, como: α -copaeno, β -patchouleno, β -elemeno, cicloseicheleno, trans- β -cariofileno, seicheleno, α -patchouleno, γ -patchouleno, guai-4,11-dieno e pogostol.
2. O tratamento dos animais com a inalação do OEPc apresenta pronunciado efeito anti-hiperalgésico dependente do tempo de inalação no modelo animal de inflamação persistente induzida por CFA, na fase precoce e tardia da inflamação;
3. O tratamento dos animais com a inalação do OEPc, não apresentou redução edema de pata induzida pelo CFA;
4. A inalação do OEPc não apresenta efeito sedativo ou depressor do SNC, evidenciado pelo teste de atividade locomotora espontânea;
5. A inalação do OEPc não apresentou efeitos significativos sobre as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias em modelo animal de inflamação persistente induzida por CFA;
6. A inalação do OEPc reduziu infiltrados celulares e modulou citocinas inflamatórias em modelo animal de inflamação pleural induzida por carragenina;
7. O bloqueio farmacológico dos FPR2 ou dos receptores opioides sistêmicos e centrais (espinal) preveniu o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc na fase precoce e tardia da dor inflamatória persistente;
8. Nos animais nocautes ($AnxA1^{-/-}$), o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc foi prevenido, demonstrando a participação da AnxA1.
9. A indução do estado de anosmia, não prejudicou o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OEPc em modelo de inflamação persistente.

Assim o presente estudo mostrou que a inalação do OEPc produziu efeito anti-hiperalgésico, principalmente no modelo de inflamação persistente. No modelo de pleurisia apresentou efeito anti-inflamatório. Além disso, os receptores FPR2 (sistêmicos e espinais) e opioides (sistêmicos, periféricos e espinais), assim como, a AnxA1 participam desse efeito.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras desse trabalho, pretende-se analisar amostras de plasma, pulmão, bulbo olfatório e tronco encefálico, por meio de análise cromatográfica, a fim de identificar os componentes voláteis do OE presente nestas estruturas. Dar continuidade a investigação do perfil resolutivo do OEPc, por meio de análise histológica identificar o perfil celular, e por análise imunoistoquímica identificar o fenótipo dos macrófagos de animais submetidos ao tratamento inalatório com OEPc na fase precoce e tardia da inflamação persistente. No modelo de inflamação pleural crônica, estudar o efeito da inalação do OEPc e perfil celular envolvido. Além disso, fazer um estudo comparativo sobre as diferentes vias de administração do OEPc, inalatória/respiratória, oral e tópica, em relação aos efeitos anti-hiperalgésico, anti-inflamatório e resolutivo.

REFERÊNCIAS

1. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420(6917):846-52.
2. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(5):986-1000.
3. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008a; 8(5):349-61.
4. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*. 2008b; 3:279-312.
5. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005; 6(12):1191-7.
6. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001; 413(6852):203-10.
7. Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery*. 2009; 27(12):507-11.
8. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002; 66(6):355-474.
9. Benarroch EE. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology*. 2008; 71(3):217-21.
10. Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 38(1):97-105.
11. Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2007. *Peptides*. 2008; 29(12):2292- 2375. 2008.
12. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 2008; 11(2):133-53.
13. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011; 115(6):1363-81.
14. Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ, Poole S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1997; 121:883-8.
15. Pieretti S, Di Giannuario A, De Felice M, Perretti M, Cirino G. Stimulus-dependent specificity for annexin 1 inhibition of the inflammatory nociceptive response: the involvement of the receptor for formylated peptides. *Pain*. 2004; 109(1-2):52-63.

16. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Schäfer M, et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain*. 2004;112(3):229-38.
17. Leite AA, Costa AJG, Lima BAM, Padilha AVL, Albuquerque EC, et al. Comorbidades em pacientes com osteoartrite: frequência e impacto na dor e na função física. *1Rev Bras Reumatol* 2011;51(2):113-23.
18. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-87.
19. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16072.
20. Cutolo M, Berenbaum F, Hochberg M, Punzi L, Reginster JY. Commentary on recent therapeutic guidelines for osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;44(6):611-7.
21. Brasil. Ministério da saúde. Portaria nº 702 de 21 de março de 2018. Acesso em: outubro de 2018. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt0702_22_03_2018.html
22. Bahra T, Allreda K, Martineza D, Rodriguez D, Wintertonb P. Effects of a massage-like essential oil application procedure using Copaiba T and Deep Blue oils in individuals with hand arthritis. *Compl Ther in Clinical Practice*. 2018;33:170-176.
23. Greenberg MJ, Slyer JT. Effectiveness of Silexan oral lavender essential oil compared to inhaled lavender essential oil aromatherapy on sleep in adults: a systematic review protocol. *JB I Database System Rev Implement Rep*. 2017;15(4):961-970.
24. Lee MS, Lee HW, Khalil M, Lim HS, Lim HJ. Aromatherapy for Managing Pain in Primary Dysmenorrhea: A Systematic Review of Randomized Placebo-Controlled Trials. *J Clin Med*. 2018 Nov 10;7(11). pii: E434.
25. da Silveira e Sá Rde C, Andrade LN, de Sousa DP. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Nat Prod Commun*. 2015; 10(10):1767-74.
26. Ulrich HNA. Manual prático de aromaterapia. Porto Alegre, 2004.
27. Donelian A, Carlson LHC, Lopes TJ, Machado RAF. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *J Supercrit Fluids*, 2009; 48:15-20.
28. Tisserand R, Young R. *Essential Oil Safety*. Second Edition. United Kingdom: Churchill Livingstone Elsevier, 2014.

29. Yu X, Wang XP, Yan XJ, Jiang JF, Lei F, Xing DM, et al. Anti-nociceptive effect of patchouli alcohol: Involving attenuation of cyclooxygenase 2 and modulation of mu-opioid receptor. *Chin J Integr Med.* 2017; 9.
30. He Jing-Jin, Chen Hai-Ming, Li Chu-Wen, Wu Dian-Wei, Wu Xiao-Li, Shi Shu-Jiang, et al. Experimental study on antinociceptive and anti-allergy effects of patchouli oil. 2013; 488-96.
31. Lu TC, Liao JC, Huang TH, Lin YC, Liu CY, Chiu YJ. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanol extract from *Pogostemon cablin*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011; 2011:671741.
32. Qu C, Yuan ZW, Yu XT, Huang YF, Yang GH, Chen JN, et al. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism. *Pharmacol Res.* 2017; 121:70-82.
33. Chen XY, Dou YX, Luo DD, Zhang ZB, Li CL, Zeng HF, et al. β -Patchoulene from patchouli oil protects against LPS-induced acute lung injury via suppressing NF- κ B and activating Nrf2 pathways. *Int Immunopharmacol.* 2017; 50:270-8.
34. Wang HT, Wang ZZ, Wang ZC, Wang SM, Cai XJ, Su GH, et al. Patchouli alcohol attenuates experimental atherosclerosis via inhibiting macrophage infiltration and its inflammatory responses. *Biomed Pharmacother.* 2016; 83:930-35.
35. Zhang Z, Chen X, Chen H, Wang L, Liang J, Luo D, et al. Anti-inflammatory activity of β -patchoulene isolated from patchouli oil in mice. *Eur J Pharmacol.* 2016; 781:229-38.
36. Silva-Filho SE, Wiirzler LAM, Cavalcante HAO, Uchida NS, de Souza Silva-Comar FM, Cardia GFE, et al. Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on in vitro and in vivo leukocytes behavior in acute inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2016; 84:1697-704.
37. Yu X, Yang G, Jiang H, Lin S, Liu Y, Zhang X, et al. Patchouli oil ameliorates acute colitis: A targeted metabolite analysis of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced rats. *Exp Ther Med.* 2017; 14(2):1184-92.
38. Hanson LR; WH 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.* 2008; 9(3):5.
39. Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol.* 2008; 63(1):7-15.
40. Lv XN, Liu ZJ, Zhang HJ, Tzeng CM. Aromatherapy and the central nerve system (CNS): therapeutic mechanism and its associated genes. *Curr Drug Targets.* 2013; 14(8):872-9.
41. Martins DF, Emer AA, Paula Batisti A, Donatello N, Carlesso MG, Mazzardo-Martins L et al. Inhalation of *Cedrus atlantica* essential oil Alleviates pain behavior

through activation of descending pain modulation Pathways in a mouse model of postoperative pain. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:30-8.

42. Emer AA, Donatello NN, Batisti AP, Oliveira Belmonte LA, Santos ARS, Martins DF. The role of the endocannabinoid system in the antihyperalgesic effect of *Cedrus atlantica* essential oil inhalation in a mouse model of postoperative pain. *J Ethnopharmacol.* 2018; 210:477-84.

43. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev. Nutr Rev* 2007; 65(2):S140-6.

44. Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 12.ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

45. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation *Nature.* 2008; 454:428-35.

46. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009; 139(2):267-84.

47. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013; 63(1):149-64.

48. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004; 18(3):385-405.

49. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med.* 2010; 16(11):1267-76.

50. Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol.* 2005; 6(1):17-21.

51. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3,401-16.

52. Simon SI, Green, CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev BiomedEng.* 2005; 7:151-85.

53. Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* 2012; 83(1):82-8.

54. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001; 99(1):7-17.

55. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31(8):318-24.

56. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets.* 2011; 12(4):556-62.

57. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004; 18(3):385-405.
58. Verri Jr WA, Cunha TM, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Cytokine inhibitors and pain control. *Rev. Bras. Reumatol.* 2007; 47(5):341-53.
59. Verri Jr WAJ, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics.* 2006; 112:116-38.
60. Cufers JH, Meis JF, Hoogkamp-korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:742-80.
61. Sommer C, White F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F. et al. *Pharmacology of Pain.* 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010.
62. Zhang L, Berta T, Xu ZZ, Liu T, Park JY, Ji RR. TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain.* 2011; 152(2):419-27.
63. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008; 79(3):360-76.
64. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol.* 2010; 185(11):6413-9.
65. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(5):331-44.
66. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(21-22):1570-9.
67. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011; 121(6):233-51.
68. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology.* 2001; 95(2):500-8.
69. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress-implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res.* 2014; 34(11):907-29.
70. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill L A. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007; 21(2):325-32.

71. Ariel A, Serhan CN. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol.* 2012; 3:4.
72. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001; 2(7):612-9.
73. Perretti M, Leroy X, Bland EJ, Montero-Melendez T. Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(11):737-55.
74. Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(1):51-67.
75. Perretti M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18(11):418-25.
76. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel anti-inflammatory-pro-resolving mediators and their receptors. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(6):629-47.
77. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013; 5(5):661-74.
78. Scannel M, Maderna P. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. *Scientific World J.* 2006; 6(6):1555-73.
79. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009; 61(2):119-61.
80. Dufton N, Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther.* 2010; 127(2):175-88.
81. Crean D, Godson C. Specialised lipid mediators and their targets. *Semin Immunol.* 2015; 27(3):169-76.
82. Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3): 463-87.
83. Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med.* 2007; 204(2):245-52.
84. Crumpton MJ, Dedman JR. Protein terminology tangle. *Nature.* 1990; 345(6272):212.
85. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 2002; 82(2):331-71.

86. Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol.* 2004; 5(4):219.
87. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(6):449-61.
88. Kim SW, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS. Differential effects of annexins I, II, III and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Lett.* 2001; 489:243-48.
89. Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol.* 2000; 165(3):1573-81.
90. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:62-70.
91. Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S, et al. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:976-84.
92. Chen L, Lv F, Pei L. Annexin 1: a glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *Eur J Pain.* 2014; 18(3):338-47.
93. Becker EL, Forouhar FA, Grunnet ML, Boulay F, Tardif M, Bormann BJ, et al. Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell Tissue Res.* 1988; 292, 129–135.
94. Naciff JM, Kaetzel MA, Behbehani MM, Dedman JR. Differential expression of annexins I-VI in the rat dorsal root ganglia and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1996; 368, 356-370.
95. Ayoub SS, Yazid S, Flower RJ. Increased susceptibility of annexin-A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin-A1. *Br J Pharmacol.* 2008; 154:1135-42.
96. Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature.* 1979; 278(5703):45.
97. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res.* 2004; 53:125-32.
98. Wang XM, Hamza M, Wu TX, Dionne RA. Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain. *Pain.* 2009; 142(3):275-83.
99. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16(6):358-72.

100. Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – a matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol.* 2015; 27(3):184-93.
101. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 2004; 36(3):233-9.
102. Wall PD. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. *Text book of pain.* Churchill Livingstone: Londres. 1999:1-8.
102. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain.* 2006; 10(4):287-333.
103. Ferreira G, Costa LM, Stein A, Hartvigsen J, Buchbinder R, Maher CG. Tackling low back pain in Brazil: a wake-up call. *Braz J Phys Ther.* 2018; S1413-3555(18)30734-2.
104. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017; 390(10100):1211-59.
105. WHO. The global burden of disease: 2004 update. In: Mathers C, Fat D, eds, 2008. Acesso em: novembro de 2018. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
106. van Hecke O, Torrance N, Smith BH. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *Br J Anaesth.* 2013; 111(1):13-8.
107. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008; 137(3):473-7.
108. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010; 120:3779–87.
109. Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol.* 2006; 4(3):197-206.
110. Stein C, Hassan AH, Przewłocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(15):5935-9.
111. Rittner HL, Stein C. Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. *Eur J Pain.* 2005; 9(2):109-12.
112. Rittner HL, Hackel D, Yamdeu RS, Mousa SA, Stein C, Schäfer M, et al. Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun.* 2009; 23(4):548-57.

113. Stein C, Machelska H, Schäfer M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol.* 2001; 60(6):416-24.
114. Henkin RI. Inhaled insulin-intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: mechanisms of action. *Nutrition.* 2010; 26(1):33-9.
115. Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of Lavandula essential oil constituents. *Planta Med.* 2011; 77(1):7-15.
116. Buck LB. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:517-44.
117. Pinto J. Olfaction. *Proc Am Thorac Soc.* 2011; 8:46-52.
118. 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.* 2003; 69:637-641.
119. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH 2nd. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience.* 2004; 127(2):481-96.
120. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. Novel vasoconstrictor formulation to enhance intranasal targeting of neuropeptide therapeutics to the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(1):312-20.
121. de Castro F. Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. *Front Neurosci.* 2009; 3:52.
122. Frasnelli J, Albrecht J, Bryant B, Lundström JN. Perception of specific trigeminal chemosensory agonists. *Neuroscience.* 2011; 189:377-83.
123. Gizurason S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Curr Drug Deliv.* 2012; 9(6):566-82.
124. Schaefer ML, Böttger B, Silver WL, Finger TE. Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J Comp Neurol.* 2002; 444(3):221-6.
125. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(7):614-28.
126. Chapman CD, Frey WH 2nd, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, Benedict C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res.* 2013; 30(10):2475-84.
127. Small DM1, Gerber JC, Mak YE, Hummel T. Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron.* 2005; 47(4):593-605.

128. Lannilli E, Bult JH, Roudnitzky N, Gerber J, de Wijk RA, Hummel T. Oral texture influences the neural processing of ortho- and retronasal odors in humans. *Brain Res.* 2014; 1587:77-87.
129. Shepherd GM. Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature.* 2006; 444(7117):316-21.
130. Su CY, Menuz K, Carlson JR. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell.* 2009; 139(1):45-59.
131. Soudry Y, Lemogne C, Malinvaud D, Consoli SM, Bonfils P. Olfactory system and emotion: common substrates. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011; 128(1):18-23.
132. Chemuturi NV, Donovan MD. Role of organic cation transporters in dopamine uptake across olfactory and nasal respiratory tissues. *Mol Pharm.* 2007; 4(6):936-42.
133. Takemoto H, Omameuda Y, Ito M, Fukuda T, Kaneko S, Akaike A, et al. Inhalation administration of valerena-4,7(11)-diene from *Nardostachys chinensis* roots ameliorates restraint stress-induced changes in murine behavior and stress-related factors. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37(6):1050-5.
134. Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008; 5(10):1159-68.
135. Miyake MM, Bleier BS. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. *Am J Rhinol Allergy.* 2015; 29(2):124-7.
136. Bleier BS, Kohman RE, Feldman RE, Ramanlal S, Han X. Permeabilization of the blood-brain barrier via mucosal engrafting: implications for drug delivery to the brain. *PLoS One.* 2013; 8(4):e61694.
137. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
138. Ali J, Ali M, Baboota S, Sahani JK, Ramassamy C, Dao L, Bhavna. Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(14):1644-53.
139. Gizurason S. Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Curr Drug Deliv.* 2012; 9(6):566-82.
140. Miyake MM, Bleier BS. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29(2):124-7.
141. Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Ushiki T. The olfactory route for cerebrospinal fluid drainage into the peripheral lymphatic system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32(4):388-96.

142. Prediger RD, Aguiar AS Jr, Matheus FC, Walz R, Antoury L, Raisman-Vozari R, et al. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2012; 21(1):90-116.
143. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH 2nd. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience.* 2004; 127(2):481-96.
144. Dailey G, Ahmad A, Polsky S, Shah V. A novel option for prandial insulin therapy: inhaled insulin. *Postgrad Med.* 2016; 128(8):839-47.
145. Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J Alzheimers Dis.* 2008; 13(3):323-31.
146. Sood S, Jain K, Gowthamarajan K. Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer's disease. *J Drug Target.* 2014; 22(4):279-94.
147. Ross TM, Martinez PM, Renner JC, Thorne RG, Hanson LR, Frey WH 2nd. Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004; 151(1-2):66-77.
148. Chioca LR, Antunes VD, Ferro MM, Losso EM, Andreatini R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. *Life Sci.* 2013; 92(20-21):971-5.
149. Lim JH, Davis GE, Wang Z, Li V, Wu Y, Rue TC, et al. Zicam- induced damage to mouse and human nasal tissue. *PLoS One.* 2009; 4:7647.
150. Alexander TH, Davidson TM. Intranasal zinc and anosmia: the zinc-induced anosmia syndrome. *Laryngoscope.* 2006; 116: 217-20.
151. Jafek BW, Linschoten MR, Murrow BW. Anosmia after intranasal zinc gluconate use. *Am J Rhinol.* 2004; 18:137-41.
152. McBride K, Slotnick B, Margolis FL. Does Intranasal Application of Zinc Sulfate Produce Anosmia in the Mouse? An Olfactometric and Anatomical Study. *Chem Senses.* 2003; 28;659-70.
153. 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.* 2010; 31:1108-16.
154. Slotnick B, Sanguino A, Husband S, Marquino G, Silberberg A. Olfaction and olfactory epithelium in mice treated with zinc gluconate. *Laryngoscope.* 2007; 117: 743-49.

155. Onoue S, Suzuki H, Seto Y. Formulation Approaches to Overcome Biopharmaceutical Limitations of Inhaled Peptides/Proteins. *Curr Pharm Des.* 2015; 21(27):3867-74.
156. Xu X, Wang X, Ge W, Pan L, Zheng M. The pharmacokinetics of inhaled morphine delivered by an ultrasonic nebulizer in ventilated dogs. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2012; 25(1):41-6.
157. Türker S, Onur E, Ozer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci.* 2004; 26(3):137-42.
158. Corazza S. *Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros.* São Paulo: SENAC São Paulo, 2004.
159. Hoare J. *Guia completo de aromaterapia: um curso estruturado para alcançar a excelência profissional.* Tradução Claudia Gerpe Duarte. São Paulo: Pensamento, 2010.
160. Bockley SA, Evershed RP. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature.* 2001; 413(6858):837-41.
161. Clark KA, Ikram S, Evershed RP. Organic chemistry of balms used in the preparation of pharaonic meat mummies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(51):20392-5.
162. Edris, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research,* 2007, 21(4), 308-23
163. Amaral F. *Técnicas de Aplicação de Óleos Essenciais.* São Paulo: Cengage Learning, 2015.
164. Stevensen CJ. Aromatherapy in Dermatology. *Clin Dermatol.* 1998; 16(6):689-94.
165. Wolffenbüttel AN. *Base química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica.* São Paulo: Roca, 2010.
166. Lis-Balchin M. Aromatherapy with Essential Oils. In: Baser KHC, Buchbauer G. (Org.). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* London: CRC Press, 2010.
167. Lyra CS. *A aromaterapia científica na visão psiconeuroendocrinoimunológica: Um panorama atual da aromaterapia clínica e científica no mundo e da psiconeuroendocrinoimunologia. [dissertação].* Universidade de São Paulo (USP). São Paulo; 2009.
168. Brasil. Ministério da saúde. *Manual de implantação de serviços de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.* Acesso em: julho 2018. Disponível em:

http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/manual_implantacao_servicos_pics.pdf

169. WHO, World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005. 2002.

170. Brasil. Ministério da saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Acesso em: outubro de 2018. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html

171. Brasil. Ministério da saúde. Portaria nº 849, de 27 de março de 2017. Acesso em: outubro de 2018. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt0849_28_03_2017.html

172. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil – Resolução da Diretoria Colegiada, RDC no 2, de 15 de janeiro de 2007. Anexo: Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, 2007.

173. Davis P. Aromaterapia. São Paulo: Martins Fontes, 1996.

174. Hu LF, Li SP, Cao H, Liu JJ, Gao JL, Yang FQ, Wang YT. GC–MS fingerprint of Pogostemon cablin in China, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006; 46:200–206.

175. Swamy MK, Balasubramanya S, Anuradha M. In vitro multiplication of Pogostemon cablin Benth through direct regeneration. Afr. J. Biotechnol. 2010;9:2069-75.

176. Swamy MK, Sinniah UR. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Pogostemon cablin Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. Molecules. 2015; 20(5): 8521-47.

177. Chakrapani P, Venkatesh K, Singh CSB, Jyothi AB, Kumar P, Amareshwari.P, Rani R. Phytochemical, Pharmacological importance of Patchouli (Pogostemon cablin (Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant, Int J Pharm Sci Rev Res, 2013; 21(2):7-15.

178. Guo J, Yuan Y, Liu Z, Zhu J. Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in Pogostemon cablin. PLoS One. 2013; 8(10):e77862.

179. Sharma P, Sarma J. Pogostemon cablin (Blanco) Benth. (Lamiaceae): It's Ethnobotany & in vitro regeneration. Phcog J. 2015; 7(3):152-6.

180. Bauer K, Garbe D, Surburg H. Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Used, 6 ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

181. Federal Regulations Code. Food and Drugs Administration, from the U.S. Government Printing Office via GPO Access [Citação: 21CFR172.510], U.S.A. 2016; 49–52.

182. Li YC, Peng SZ, Chen HM, Zhang FX, Xu PP, Xie JH. et al. Oral administration of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* augments protection against influenza viral infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2012; 12:294-301.
183. Bilcu M, Grumezescu AM, Oprea AE, Popescu RC, Mogoşanu GD, Hristu R. et al. Efficiency of Vanilla, Patchouli and Ylang Ylang essential oils stabilized by Iron Oxide@C14 Nanostructures against bacterial adherence and biofilms Fformed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains. *Molecules* 2014; 19:17943-56.
184. Pullagummi C, Rao VB, Singh CS, Bheemagani AJ, Kumar P, Venkatesh K et al. Comparitive studies on antibacterial activity of Patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth] and Geranium (*Pelargonium graveolens*) aromatic medicinal plants. 2014; 13(23):2379-84.
185. Vázquez-Sánchez D, Cabo ML, Rodríguez-Herrera JJ. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Sci Technol Int.* 2015; 21(8):559-70.
186. Wu H, Li B, Wang X, Jin M, Wang G. Inhibitory effect and possible mechanism of action of patchouli alcohol against Influenza A (H2N2) virus. *Molecules.* 2011; 16:6489-501.
187. Kiyohara H, Ichino C, Kawamura Y, Nagai T, Sato N, Yamada H. Patchouli alcohol: in vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. *J Nat Med.* 2012; 66:55-61.
188. Wu XL, Ju DH, Chen J, Yu B, Liu KL, He JX, et al. Immunologic mechanism of patchouli alcohol anti-H1N1 influenza virus may through regulation of the RLH signal pathway in vitro. *Curr. Microbiol.* 2013; 67:431-36.
189. Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Tai T, Nunoura Y, Watanabe K. Anti-emetic principles of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Phitomed.* 1999; 6(2):89-93.
190. Qi SS, Hu Ip, Nhen Wn, Sun HB, Ma XD. Immunological regulation effects of essential oil in leaves of *cablin* patchouli herbal on mice. *Chin Arch Tradit Chin Med.* 2009; 27:774-76.
191. Kim HW, Cho SJ, Kim BY, Cho SI, Kim YK. *Pogostemon cablin* as ROS scavenger in oxidant-induced cell death of human neuroglioma cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2010; 7:239-47.
192. Lin RF, Feng XX, Li CW, Zhang XJ, Yu XT, Zhou JY, et al. Prevention of UV radiation-induced cutaneous photoaging in mice by topical administration of patchouli oil. *J. Ethnopharmacol.* 2014; 154:408-18.
193. Su Z, Liao J, Liu Y, Liang Y, Chen H, Chen X, et al. Protective effects of patchoualcohol isolated from *Pogostemon cablin* on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Exp Ther Med.* 2016; 11(2):674-82.

194. Park SY, Neupane GP, Lee SO, Lee JS, Kim MY, Kim SY. et al. Protective effects of Pogostemon cablin Bentham water extract on inflammatory cytokine expression in TNBS-induced colitis in rats. *Arch. Pharmacol. Res.* 2014; 37:253-62.
195. Yu JL, Zhang XS, Xue X, Wang RM. Patchouli alcohol protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *J Surg Res.* 2015; 194(2):537-43.
196. Li YC, Xian YF, Su ZR, Ip SP, Xie JH, Liao JB, et al. Pogostone suppresses proinflammatory mediator production and protects against endotoxic shock in mice. *J Ethnopharmacol.* 2014; 157:212-21.
197. Li YP, Yuan SF, Cai GH, Wang H, Wang L, Yu L. et al. Patchouli alcohol dampens lipopolysaccharide induced mastitis in mice. *Inflammation* 2014; 37:1757-62.
198. Zheng YF, Xie JH, Xu YF, Liang YZ, Mo ZZ, Jiang WW, et al. Gastroprotective effect and mechanism of patchouli alcohol against ethanol, indomethacin and stress-induced ulcer in rats. *Chem Biol Interact.* 2014; 222:27-36.
199. Li CW, Wu XL, Zhao XN, Su ZQ, Chen HM, Wang XF. et al. Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of Pogostemon cablin (Blanco) Benth. *Sci. World J.* 2013; 2013:434151.
200. Jeong JB, Shin YK, Lee SH. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol in RAW264.7 and HT-29 cells. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:229-33.
201. Li YC, Xian YF, Ip SP, Su ZR, Su JY, He JJ, et al. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from Pogostemonis Herba in animal models. *Fitoterapia.* 2011; 82(8):1295-301.
202. Xian YF, Li YC, Ip SP, Lin ZX, Lai XP, Su ZR. Anti-inflammatory effect of patchouli alcohol isolated from Pogostemonis Herba in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Exp Ther Med.* 2011; 2(3):545-50.
203. Pujiarti R, Ohtani Y, Widowati TB, Wahyudi K, Herath NK, Wang CN. Effect of Melaleuca leucadendron, Cananga odorata and Pogostemon cablin oil odors on Human physiological responses. *Wood Res. J.* 2012; 3:100-5.
204. Haze S, Sakai K, Gozu Y. Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002; 90:247-53.
205. Perry N, Perry E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders-Clinical and neuropharmacological perspectives. *CNS Drugs* 2006; 20:257-80.
206. Beshara MC, Giddings D. Use of plant essential oils in treating agitation in a dementia unit: 10 case studies. *Int. J. Aromather.* 2003; 12:207-12.

207. Bowles-Dilys EJ, Griffiths M, Quirk L, Brownrigg A, Croot K. Effects of essential oils and touch on resistance to nursing care procedures and other dementia-related behaviours in a residential care facility. *Int J Aromather* 2002; 12:1-8.
208. Gil AC. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.
209. Prestes MLM. A pesquisa e a construção do conhecimento científico: do planejamento aos textos, da escola à academia. 2. ed. São Paulo: Rêspel, 2003.
210. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.
211. Vandendool H; Kratz PD. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr.* 1963; 11:463-71.
212. Barocelli E, Calcina F, Chiavarinia M, Impicciatorea M, Brunib R, Bianchi A et al. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sci.* 2004; 76(2):213-23.
213. Martins DF, Turnes BL, Cidral-Filho FJ, Bobinski F, Rosas RF, Danielski LG, et al. Light-emitting diode therapy reduces persistent inflammatory pain: Role of interleukin 10 and antioxidant enzymes. *Neuroscience.* 2016; 324:485-95.
214. Rosas RF, Emer AA, Batisti AP, Ludtke DD, Lenfers BT, Bobinski F, et al. Far infrared-emitting ceramics decrease Freund's adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in mice through cytokine modulation and activation of peripheral inhibitory neuroreceptors. *J Integr Med.* 2018; pii: S2095-4964(18)30084-0.
215. Meotti FC, Missau FC, Ferreira J, Pizzolatti MG, Mizuzaki C, Nogueira CW, et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochem Pharmacol.* 2006 Dec 15;72(12):1707-13.
216. Lapa FDR, da Silva MD, de Almeida Cabrini D, Santos AR. Anti-inflammatory effects of purine nucleosides, adenosine and inosine, in a mouse model of pleurisy: evidence for the role of adenosine A2 receptors. *Purinergic Signal.* 2012; 8(4):693-704.
217. Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neurosci.* 2011; 194:337-48.
218. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Houlst JR. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol.* 1988; 40(11):787-92.

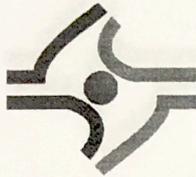
219. Henriques MG, Rae GA, Cordeiro RS, Williams TJ. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw oedema and pleurisy in the mouse. *Br J Pharmacol*, 1992; 106(3):579-82.
220. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(3):811-19.
221. Prediger RD, Aguiar AS Jr, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginestet L, et al. 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*. 2010; 17(2):114-29.
222. Mack JM, Moura TM, Lanznaster D, Bobinski F, Massari CM, Sampaio TB, et al. Intranasal administration of sodium dimethyldithiocarbamate induces motor deficits and dopaminergic dysfunction in mice. *Neurotoxicology*. 2018; 66:107-20.
223. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(9):775-90.
224. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16(2):109-10.
225. Deguerry F, Pastore L, Wu S, Clark A, Chappell J, Schalk M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 454(2):123-36.
226. Han X, Parker TL. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. *Pharm Biol*. 2017; 55(1):1619-22.
227. Han X, Beaumont C, Stevens N. Chemical composition analysis and in vitro biological activities of ten essential oils in human skin cells. *Biochim Open*. 2017; 5:1-7.
228. Hu LF, Li SP, Cao H, Liu JJ, Gao JL, Yang FQ, et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 42(2):200-6.
229. Jia P, Chen G, Qin WY, Zhong Y, Yang J, Rong XF. Xitong Wan attenuates inflammation development through inhibiting the activation of nuclear factor- κ B in rats with adjuvant-induced arthritis. *J Ethnopharmacol*. 2016; 193:266-71.
230. Rasheed H, Afridi R, Khan AU, Ullah MZ, Khalid S, Atiq A, et al. Anti-inflammatory, anti-rheumatic and analgesic activities of 2-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-N-propylbenzenesulphonamide (MOPBS) in rodents. *Inflammopharmacology*. 2018; 26(4):1139-1140.
231. Muley MM, Krustev E, McDougall JJ. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. *CNS Neurosci Ther*. 2016; 22(2):88-101.

232. Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W, Dietrich H, Plank C. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch C*. 1991; 46(11-12):1067-72.
233. Muchtaridi M, Musfiroh I. Off-Line SPE-GC/MS Analysis of Lead Compounds Aromatherapy in Blood Plasma of Mice of Essential Oils Materials from Indonesian Aromatic Plants. *Asian Journal of Chemistry*. 2012; 24:5124-28.
234. Nardi GM, Siqueira Junior JM, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Phytomedicine*. 2007; 14(2-3):115-22.
235. Hess A, Axmann R, Rech J, Finzel S, Heindl C, Kreitz S, et al. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(9):3731-6.
236. Brennan FM, Hayes AL, Ciesielski CJ, Green P, Foxwell BM, Feldmann M. Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(1):31-41.
237. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):447-53.
238. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 121(6):233-51.
239. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998; 101(4):890-8.
240. Maderna P, Yona S, Perretti M, Godson C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J Immunol*. 2005; 174(6):3727-33.
241. Rhys HI, Dell'Accio F, Pitzalis C, Moore A, Norling LV, Perretti M. Neutrophil Microvesicles from Healthy Control and Rheumatoid Arthritis Patients Prevent the Inflammatory Activation of Macrophages. *EBioMedicine*. 2018; 29:60-9.
242. Dalpiaz A, Spisani S, Biondi C, Fabbri E, Nalli M, Ferretti ME. Studies on human neutrophil biological functions by means of formyl-peptide receptor agonists and antagonists. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003; 3(1):33-42.

243. Pei L, Zhang J, Zhao F, Su T, Wei H, Tian J, et al. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. *Br J Anaesth*. 2011; 107(6):948-58.
244. Ayoub SS, Yazid S, Flower RJ. Increased susceptibility of annexin-A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin-A1. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(5):1135-42.
245. Chen L, Lv F, Pei L. Annexin 1: a glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2014; 18(3):338-47.
246. Khodorova A, et al: Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med*, 1055-61, 2003.
247. Leite-Avalca MC, Lomba LA, Bastos-Pereira AL, Brito HO, Fraga D, Zamprônio AR. Involvement of Central Endothelin ETA and Cannabinoid CB1 Receptors and Arginine Vasopressin Release in Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture in Rats. *Shock*. 2016; 46(3):290-6.
248. Rittner HL, Mousa SA, Labuz D, Beschmann K, Schaefer M, Stein C, et al. Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *J Leukoc Biol*. 2006; 79:1022–1032.
249. Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, et al. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J*. 2006; 20(14):2627-9.
250. Andrade A, Denome S, Jiang YQ, Marangoudakis S, Lipscombe D. Opioid inhibition of N-type Ca²⁺ channels and spinal analgesia couple to alternative splicing. *Nat Neurosci*. 2010; 13(10):1249-56.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 16 de novembro de 2016
 Registro na CEUA (código): 16.025.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

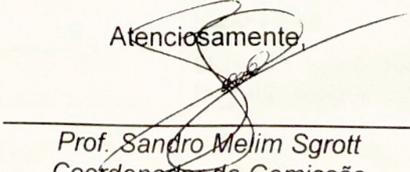
Prezado(a),

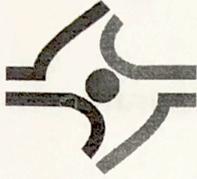
Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação de efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais *Cedrus atlantica* e *Pogostemon cablin* administrados pela via inalatória em modelos pré-clínicos de inflamação crônica.”, registrada com o nº 16.025.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13/12/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,


 Prof. Sandro Mejim Sgrott
 Coordenador da Comissão



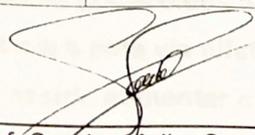
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 16 de novembro de 2016

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação de efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais *Cedrus atlantica* e *Pogostemon cablin* administrados pela via inalatória em modelos pré-clínicos de inflamação crônica”, registrada com o nº 16.025.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 13/12/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2016 a 20/12/2018.
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênicos <i>Mus Musculus</i> / Camundongos <i>Knockout Mus Musculus</i> .
No de animais	288
Peso/Idade	Heterogênicos – 25-30 / 25-30g <i>Knockout</i> – 25-30 / 20-30g
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


 Prof. Sandro Melim Sgrott
 Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br

Parecer Aprovação do Comitê de Ética



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 13 de setembro de 2018
Registro na CEUA (código): 15.035.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel F. Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que o pedido de emenda do estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação dos efeitos da inalação de diferentes óleos essenciais em um modelo pré-clínico de inflamação periférica", registrada com o 15.035.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel F. Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 21 de setembro de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,


Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



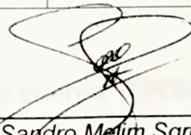
Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
 Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 13 de setembro de 2018

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação dos efeitos da inalação de diferentes óleos essenciais em um modelo pré-clínico de inflamação periférica", registrada com o nº 15.035.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel F. Martins- que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 21 de setembro de 2018

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/04/2016 a 10/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Mus Musculus
Nº de animais	60
Peso/Idade	25 a 35g e 40 a 60 dias
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da UFSC


 Prof. Sandro Melim Sgrott
 Coordenador da Comissão