



UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Efeito do óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*) no bem-estar de cães durante exame clínico

ANNA JULIA BESSA FERNANDES

2024



UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Efeito do óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*) no bem-estar de cães durante exame clínico

ANNA JULIA BESSA FERNANDES

Sob a Orientação da Professora
Yara Peluso Cid

e Co-orientação da Doutora
Debora Azevedo Borges

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363e Fernandes, Anna Julia Bessa, 1996-
Efeito do óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*) no bem-estar de cães durante exame clínico / Anna Julia Bessa Fernandes. - Rio de Janeiro, 2024.
96 f.: il.

Orientadora: Yara Peluso Cid.
Coorientadora: Debora Azevedo Borges.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2024.

1. comportamento canino. 2. consulta veterinária. 3. óleos essenciais. 4. bem-estar animal. I. Cid, Yara Peluso, 1982-, orient. II. Borges, Debora Azevedo, 1988-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 305/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.008600/2024-24

Seropédica-RJ, 22 de fevereiro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANNA JULIA BESSA FERNANDES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre(a) em Ciências, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2024

(Assinado digitalmente em 28/02/2024 11:11)
FABIO BARBOUR SCOTT
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###736#0

(Assinado digitalmente em 23/02/2024 14:39)
YARA PELUSO CID
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matricula: ###004#7

(Assinado digitalmente em 23/02/2024 16:05)
CARLA FORTE MAIOLINO MOLENTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.309-##

Visualize o documento original em <https://sinc.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 305, ano: 2024, tipo: ATA, data de emissão: 22/02/2024 e o código de verificação: e54496e39e

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luciane e Evaldo e à minha irmã, Julianna.
Sem vocês, não seria possível.

“To understand animal thinking you've got to
get away from a language.”

Para entender o pensamento dos animais, você
precisa se afastar de uma linguagem.

- *Temple Grandi*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado com todas essas pessoas abaixo!

Aos meus pais, Luciane e Evaldo, que, mesmo com muitas dificuldades, investiram nesse sonho e são meu suporte e exemplo de amor e família!

A minha irmã, Julianna, por ser minha melhor amiga em todos os momentos e minha inspiração de mulher independente conquistando cada dia mais seu próprio sucesso com resiliência!

A Polly, minha pinscher, por ter me despertado para a Veterinária, e à Pretinha, através de sua fuga, ter me fortalecido na área do comportamento animal!

A Flora e Xairon, pelos lambeijos nos momentos de retorno para casa e pela companhia nos momentos difíceis, além de serem meus maiores cobaias em observação do comportamento de cães!

A minha avó Vera, que trabalhava em Santa Cruz e disse, por anos, para eu ir para a rural pelo seu nome e beleza! A senhora estava certa!

Aos meus avós maternos, Vera e José, paternos, Elzi e José, tias e tios, Cristiane, Elsilene e Edvaldo, por terem me apoiado lá no início da graduação e dado suporte aos meus pais com as dificuldades!

A Professora Dra. Yara Peluso Cid, pela orientação e pelo aceite de embarcar nesse desafio de unir a farmácia veterinária com o comportamento animal, pelos gritos de empolgação com cada resultado e ideia!

A Dra. Debora Azevedo Borges, pela coorientação, incentivo e estímulo para não desistir dessa área e, pela amizade e parceria da vida! Também pelas correções detalhadas.

Ao Professor Dr. Fábio Barbour Scott, pelo incentivo diário, reconhecimento e confiança no meu trabalho com os animais do biotério!

A Isabelle Vilela, Ramon da Luz, Fernanda Campos, Clara Dutra, Beatriz Fuzii e Guilherme Mota, não só pela participação ativa, sacrificando seus fins de semana, em todo o experimento e se dedicando como se fosse seu próprio experimento, mas também pelo apoio, empolgação e carinho todos os dias dentro e fora do laboratório, por nunca me deixarem desanimar!

Ao Matheus Eduardo, por ter sido o desenvolvedor da formulação entre tentativas, erros e finalmente o acerto, além de ter tido paciência para me explicar diversas vezes a

mesma coisa e, a Taynara Monsores, a idealizadora da técnica para extrair a saliva dos cães do *swab* sem termos o material correto a disposição, além de ter participado ativamente de todo o processo de análise do cortisol salivar dos cães com sua maestria em pipetagem. E à equipe do laboratório de Farmácia do LQEPV por toda estrutura e auxílio.

Ao Ivan Pedrosa, Priscila Cardim e Gabriella Santos, amigos e companheiros de equipe de quando fui bolsista de iniciação científica no setor de bem-estar animal do LQEPV, por terem me inspirado e estimulado a continuar nessa área linda.

As meninas da administração, Aline, Jéssica e Rafaela, por terem paciência para me explicar todos os trâmites burocráticos que um experimento deve passar.

Ao Prof. Dr. Huarrisson e toda a equipe do LASAVE, pela estrutura e dedicação em processar as amostras de saliva para o cortisol salivar, com paciência e esforço.

Aos demais membros da equipe, estagiários, pós-graduandos, professores, funcionários da limpeza, por terem flexibilizado suas rotinas para que o experimento corresse sem interferências e pelas companhias e risadas de cada dia!

Aos beagles, que despertaram em mim o amor pela área de comportamento e bem-estar animal, que me ensinam todo dia a como me comunicar com os animais e até mesmo com as pessoas, que mudaram a minha vida!

Ao curso de Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, seu corpo docente, coordenação e administração, que oportunizaram esse momento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa ofertada.

A Fundação de Apoio a Pesquisa da Universidade Rural (FAPUR), pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

A minha amada UFRRJ, por toda a infraestrutura disponibilizada para concretização do trabalho, por toda sua beleza e paz nos momentos que tínhamos a sós no Lago do Instituto de Agronomia para reflexão!

Ao meu carro, chamado Jesse, comprado com esforço pelo meu pai, que me levou para o laboratório e para casa em segurança e conforto por esses 2 anos.

A Anna Julia de 8 anos, por ter sonhado com tudo que a Anna Julia de 27 anos está tentando e conseguindo realizar e sendo feliz!

BIOGRAFIA

Anna Julia Bessa Fernandes nasceu na cidade do Rio de Janeiro, no dia 19 de julho de 1996, filha mais nova de Luciane Bessa dos Santos Fernandes, ex-professora e atual artesã, e Evaldo Ragozo Fernandes, mecânico de automóveis, e irmã mais nova de Julianna Bessa Fernandes, arquivista.

Cursou o 1º e 2º graus no Colégio Pedro II, no Rio de Janeiro, onde se formou no ano de 2014. Em 2015 cursou 1 ano de curso pré-vestibular e trabalhou como jovem-aprendiz para conseguir ingressar, em 2016, no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a graduação foi estagiária voluntária de clínica de animais de produção, pelo Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFRRJ, no ano de 2017. Bolsista de iniciação científica na área de comportamento e bem-estar animal no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da UFRRJ sob orientação do professor Dr. Fábio Scott nos anos de 2018 a 2021. Graduou-se em Medicina Veterinária em dezembro de 2021 e sua primeira publicação em revista científica foi de seu trabalho de iniciação científica intitulado “Interação de Enriquecimento Ambiental para Cães Beagle de Laboratório Utilizados em Pesquisa”.

Em março de 2022 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ, como mestranda sob orientação da professora Dra. Yara Cid. Desde 2022 é responsável pelo Setor de Bem-estar Animal de Cães e Animais de Produção do LQEPV. Durante este período foi orientadora de três bolsistas de iniciação científica e supervisora de mais de 15 alunos de vivência acadêmica no setor. Atualmente também participa da equipe para a criação da Liga Acadêmica de Bem-estar Animal dos Institutos de Veterinária e Zootecnia da UFRRJ.

RESUMO

FERNANDES, Anna Julia Bessa. **Efeito do óleo essencial de Lavanda (*Lavandula angustifolia*) no bem-estar de cães durante exame clínico.** 2024. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Atualmente o cão é frequentemente visto inserido no núcleo familiar e, por esse motivo, os cuidados com sua saúde e bem-estar vem sendo cada vez mais buscados por seus responsáveis. Entretanto, as idas ao consultório veterinário podem ser estressantes e causadoras de traumas nos animais, o que pode fazer com que seus responsáveis acabem negligenciando a necessidade do atendimento e prejudicando a saúde de seu cão. Há formulações disponíveis no mercado com indicação de acalmar os cães em diversos momentos, mas é necessário que sejam acessíveis, seguras e comprovadamente eficazes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter informações sobre o comportamentos de cães em contexto de consulta veterinária a partir da concepção de seus tutores através de questionário online e avaliar o efeito de uma formulação a base de óleo essencial de *Lavandula angustifolia* nas concentrações de 15 e 30% no comportamento de cães submetidos ao exame clínico. A metodologia adotada para este trabalho contou com a elaboração de um questionário online através do “Google Formulários”, no qual os tutores de cães respondiam a questões desde o perfil dos animais até sobre o seu comportamento exibido no momento em que estavam na sala de espera, consultório veterinário e ao serem manipulados pelos médicos veterinários e, o desenvolvimento e caracterização físico-química da formulação com as duas concentrações, assim como a avaliação comportamental dos cães quando estavam no canil, na sala de espera e na mesa de procedimentos durante o exame clínico, e a avaliação clínica, avaliando parâmetros como frequências cardíaca e respiratória, temperatura corporal, com coleta de saliva para dosagem de cortisol salivar e coleta de sangue. Através do questionário online, foi obtido que a maioria dos cães é considerado como filho(a) em relação ao vínculo com o responsável/grupo familiar e mais da metade dos respondentes relatou a percepção de que seus cães exibiram comportamentos característicos de estresse, ansiedade e medo no contexto de consulta veterinária. No ensaio clínico foi possível observar que os parâmetros vitais como frequências cardíaca, respiratória e temperatura dos cães foram menores em ambos os grupos tratados assim como os níveis de cortisol salivar, mas não foi possível obter diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto, os escores comportamentais dos animais tratados com a formulação a base de óleo essencial de lavanda foram significativamente reduzidos em comparação aos grupos controle ($p < 0,001$). Portanto, a formulação tópica de óleo essencial de lavanda nas concentrações de 15 e 30% foram eficazes em reduzir o estresse mental de cães em situação de consulta veterinária. Além de eficaz, não demonstrou sinais clínicos de toxicidade, tanto tópicos quanto sistêmicos, ao ser administrada na face interna das orelhas dos animais.

Palavras-chave: comportamento canino; consulta veterinária; óleos essenciais; bem-estar animal.

ABSTRACT

FERNANDES, Anna Julia Bessa. **Effect of Lavender essential oil (*Lavandula angustifolia*) on the welfare of dogs during clinical examination.** 2024. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Currently, the dog is often seen as part of the family and, for this reason, care for its health and well-being is increasingly sought after by those responsible for it. However, trips to the veterinary office can be stressful and cause trauma to animals, which can cause their guardians to end up neglecting the need for care and harming their dog's health. There are formulations available on the market that are intended to calm dogs at different times, but they must be accessible, safe and proven to be effective. Therefore, the objective of this work was to obtain information about the behavior of dogs in the context of veterinary consultation based on the conception of their owners through an online questionnaire and to evaluate the effect of a formulation based on *Lavandula angustifolia* essential oil at concentrations of 15 and 30% in the behavior of dogs submitted to clinical examination. The methodology adopted for this work included the development of an online questionnaire using "Google Forms", in which dog owners answered questions ranging from the animals' profile to their behavior displayed when they were in the waiting room, veterinary office and when handled by veterinarians and, the development and physicochemical characterization of the formulation with the two concentrations, as well as the behavioral evaluation of the dogs when they were in the kennel, in the waiting room and on the procedure table during the examination clinical, and clinical assessment, evaluating parameters such as heart and respiratory rates, body temperature, with saliva collection to measure salivary cortisol and blood collection. Through the online questionnaire, it was obtained that the majority of dogs are considered as children in relation to the bond with the guardian/family group and more than half of the respondents reported the perception that their dogs exhibited behaviors characteristic of stress, anxiety and fear in the context of veterinary consultation. In the clinical trial, it was possible to observe that vital parameters such as heart rate, respiratory rate and temperature of the dogs were lower in both treated groups, as well as salivary cortisol levels, but it was not possible to obtain a significant difference ($p>0.05$). However, the behavioral scores of animals treated with the lavender essential oil-based formulation were significantly reduced compared to control groups ($p<0.001$). Therefore, the topical formulation of lavender essential oil at concentrations of 15 and 30% were effective in reducing the mental stress of dogs undergoing veterinary consultation. In addition to being effective, it did not demonstrate clinical signs of toxicity, either topical or systemic, when administered to the inner surface of the animals' ears.

Keywords: dog behavior; veterinary appointment; essential oils; animal welfare.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros comportamentais e suas variações.....	23
Tabela 2: Dados dos cães participantes, em número e porcentagem, da pesquisa conforme respondido por seus responsáveis em relação à faixa etária, porte, sexo, ambiente em que o animal vive, raça, se o animal realiza passeios e o vínculo emocional entre o tutor e o animal.	35
Tabela 3: Dados dos cães pré-selecionados para o experimento.....	48
Tabela 4: Comportamentos exibidos pelos animais na fase de seleção e sua descrição.	49
Tabela 5: Animais pré-selecionados para o experimento divididos em escores comportamentais de acordo com a frequência em porcentagem de exibição dos comportamentos caracterizados como "agitados", "calmos", "neutros" e "fora do contexto".	51
Tabela 6: Animais selecionados divididos nos grupos de tratamento com cada formulação. .	52
Tabela 7: Distribuição dos animais conforme dia experimental e grupo controle ou tratado.	53
Tabela 8: Resultado dos parâmetros da avaliação clínica e comportamental e do cortisol salivar para cada animal conforme foram do grupo controle e tratado.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo para visualização do canil utilizado. (Em grafite escuro = cama do cão; Azul = pote de água; Laranja = pote de comida; Vermelho = câmara).....	19
Figura 2: Fluxograma representativo do delineamento experimental. FC = Frequência Cardíaca; FR = Frequência Respiratória; TPC = Tempo de Preenchimento Capilar.....	24
Figura 3: Momentos de avaliação comportamental dos cães. A e B = Diferentes ângulos dos momentos M2 e M4 de avaliação comportamental do cão na sala de espera do consultório, com auxiliar veterinária na contenção e veterinária observadora comportamental; C = Momento M3 de avaliação comportamental, do cão no momento do exame clínico veterinário, com auxiliar e veterinária clínica dentro do consultório, e veterinária observadora comportamental do lado de fora; D = Momento M1 e M5 de avaliação comportamental do cão em seu próprio canil antes e após exame clínico veterinário.	24
Figura 4: Animal no momento do exame clínico (M3 de avaliação comportamental), com médica e a auxiliar veterinárias.	25
Figura 5: Animal com o SalivaBio Children's Swab no interior da boca para coleta da saliva no momento M3 de avaliação comportamental.....	26
Figura 6: Animal no momento do exame clínico, durante a coleta de sangue pela veia cefálica no momento M3 de avaliação comportamental.....	27
Figura 7: Design das microplacas de imunensaio. Std = padrão; Ctrl-L = controle inferior; Ctrl-H = controle superior; A1 – A48 = amostras de saliva de cada cão; Zero e NSB (Non-Specific Binding) = usados como branco.	28
Figura 8: Solução conjugada diluída sendo adicionada a cada poço da microplaca de imunensaio.....	29
Figura 9: Solução de substrato sendo adicionada aos poços da placa de imunensaio.	30
Figura 10: Coloração dos poços mudando de azul para verde e, sem seguida, amarelo, instantaneamente após a solução de parada.....	30
Figura 11: Placa de imunensaio completa e inserida no leitor de placas a 450nm.	31
Figura 12: Tabela de exemplo de resultados obtidos pelos cálculos extraída do Manual do Kit Salimetrics®.	32
Figura 13: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto estavam na sala de espera (A) e no chão (B) do consultório veterinário, segundo a concepção de seus tutores ao responderem o questionário.	37

Figura 14: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto estavam na mesa de procedimentos do consultório veterinário, segundo a concepção de seus tutores ao responderem o questionário.....	39
Figura 15: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto foram tocados pelo médico veterinário na consulta veterinária.....	40
Figura 16: Porcentagens de participantes ao responderem qual perfil emocional se encaixava com seu cão em contexto de consulta veterinária. A – Apreensivo; B – Ansioso; C – Calmo; D – Envergonhado; E – Pessimista e F – Otimista.....	40
Figura 17: Porcentagem de participantes ao responderem se reduziram a frequência em que visitam o consultório veterinário devido ao comportamento dos seus cães.....	43
Figura 18: Porcentagem de participantes ao responderem se preferem o atendimento à domicílio devido ao comportamento dos seus cães.....	43
Figura 19: Porcentagem de participantes ao responderem se reduziram a frequência em que visitam o consultório veterinário devido ao financeiro.	44
Figura 20: Colaborador aspirando a formulação com a seringa (1 mL) respectiva.	46
Figura 21: Colaborador aplicando 0,5 mL da formulação respectiva ao cão.....	47
Figura 22: Gráfico de Pareto representando o a porcentagem e o número de animais que exibiram cada tipo de comportamento observado nas filmagens.....	50
Figura 23: Relação de cães machos e fêmeas conforme cada escore comportamental.....	52
Figura 24: Resultado dos valores de temperatura corporal por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.	54
Figura 25: Análise de médias das temperaturas ambientais dos dias experimentais. A = Gráfico representante dos períodos do dia, sendo P1 = 01:00 às 09:00; P2 = 10:00 às 17:00 e P3 = 18:00 às 00:00. B = Gráfico representante dos dias experimentais, sendo D1 = D0 da 1ª rodada; D2 = D+15 da 1ª rodada; D3 = D0 da 2ª rodada; D4 = D+15 da 2ª rodada.	55
Figura 26: Resultado dos valores de frequência cardíaca por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.	57
Figura 27: Resultado dos valores de frequência respiratória por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.	58

Figura 28: Gráfico com as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo e cada concentração em relação ao parâmetro de escore comportamental. As letras acima de cada grupo representam as comparações múltiplas (pairwise). Letras maiúsculas especificam diferenças entre grupos para uma mesma concentração. Letras minúsculas especificam diferenças entre concentrações para um mesmo grupo. Pontos que compartilham pelo menos uma letra não possuem diferenças significativas entre si a um nível de significância de 0,05 (5%).	58
Figura 29: Resultado dos valores de escore comportamental por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.	60
Figura 30: Resultado dos valores de cortisol salivar por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.	62
Figura 31: Gráfico representativo da Análise de Componentes Principais (análise multivariada), utilizando os dados de todos os animais e de todas as variáveis numéricas juntos.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Relação entre seres humanos e cães	3
2.2	Indicadores de Estresse Canino ao Exame Clínico.....	4
2.3	Terapias Comportamentais para Cães.....	9
2.4	Óleos Essenciais	9
2.5	Óleo Essencial de Lavanda (OEL).....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Questionário online.....	16
3.2	Formulação	17
3.2.1	Caracterização físico-química da formulação.....	18
3.2.2	Estudo de estabilidade preliminar da formulação.....	18
3.3	Ensaio clínico.....	18
3.3.1	Local	19
3.3.2	Seleção dos cães.....	19
3.3.3	Manejo	21
3.3.4	Avaliação Comportamental	21
3.3.5	Avaliação Clínica.....	25
3.3.5.1	Exame clínico	25
3.3.5.2	Coleta de saliva.....	26
3.3.5.3	Coleta de sangue	26
3.3.6	Cortisol Salivar	27
3.3.6.1	Extração das amostras de saliva.....	27
3.3.6.2	Processamento das amostras e dosagem do cortisol salivar	27
3.3.6.3	Cálculo para obtenção das concentrações de cortisol.....	31
3.4	Análise estatística	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Questionário online.....	33
4.1.1	Perfil dos cães	33
4.1.2	Parâmetros comportamentais dos cães	36
4.1.3	Percepção dos responsáveis	40
4.2	Formulação	45
4.2.1	Tratamento	46
4.3	Ensaio clínico.....	47
4.3.1	Cães.....	47

4.3.2 Avaliação Comportamental e Exame Clínico.....	53
4.3.3 Cortisol salivar	61
4.3.4 Eventos Adversos	65
5 CONCLUSÃO.....	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Se, atualmente, os cães são importantes componentes de grupos familiares, sendo considerados até mesmo como “filhos” de seres humanos, é devido ao processo de domesticação de seus ancestrais há milhares de anos, no qual coabitavam para que um pudesse ter auxílio na caça e proteção, enquanto o outro abrigo e alimento. Com essa relação próxima, a preocupação com a saúde física e mental dos cães passou a ocupar a rotina das famílias e, assim, o médico veterinário se tornou o protagonista desta relação com o juramento de cuidar da saúde dos animais em quaisquer contextos, sendo o profissional capaz de orientar e acompanhar as famílias para que tenham a relação interespecífica mais harmoniosa possível.

Para que o alto grau de bem-estar dos cães seja garantido, um dos fatores a serem cumpridos é a visitação ao consultório veterinário periodicamente a fim de certificar sua saúde. Entretanto, essa visitação pode ser dificultada pelo próprio comportamento do animal a ser examinado a partir do momento em que manifesta sinais de medo e ansiedade junto ao fato de seus tutores não procurarem auxílio para a redução desse quadro, mas sim o afastamento da situação desencadeadora, que é a consulta veterinária.

Diversos fatores do contexto da consulta veterinária, como por exemplo, sala de espera com outros animais de mesma ou de diferentes espécies, sons e barulhos de equipamentos, cheiros diferentes e até mesmo a postura das pessoas que ali estão podem compor um ambiente que desperte ansiedade e medo nos cães.

Os cães, quando se sentem inseguros, podem reagir com comportamentos que tornem o exame clínico mais difícil de ser realizado, além de ter seus parâmetros vitais, como por exemplo, frequência cardíaca, alterados devido ao estresse do animal e resposta do seu organismo ao mecanismo de “luta ou fuga” que ali foi despertado. Além do exame clínico dificultado por essas alterações comportamentais e fisiológicas, tem-se uma menor precisão no diagnóstico e tratamento de doenças até mesmo por alterações laboratoriais passíveis de ocorrência em amostras coletadas dos animais sob estresse para exames hematológicos, por exemplo. Além disso, os efeitos para a saúde mental dos cães também não são positivos, pois a cada situação deflagrada de medo e insegurança, o estresse aumenta assim como suas experiências e memórias dessas situações, decorrendo em traumas e no desconforto mental cada vez que são repetidas.

Existem diversas técnicas para evitar que o animal já chegue ao consultório sob estresse, como uma prevenção, assim como lidar com o animal já estressado. Entretanto, não são todos os profissionais veterinários e tutores que possuem tal capacidade e instrução e, devido a isso, na maioria das vezes, são aplicados manejos que acabam reforçando ainda mais a insegurança dos cães ao contexto de consulta veterinária. Quando são contidos com coleiras e focinheiras tendo sua força disputada, por exemplo, tal situação sendo acumulada pode deflagrar em uma agressão por parte do cão em sua última esperança de fugir da situação e se defender.

Uma das várias estratégias possíveis de serem utilizadas para contornar o comportamento dificultoso e de desconforto psicológico de cães à consulta veterinária é o uso de aromaterapia, na qual se lança mão de óleos essenciais como o de *Lavandula angustifolia*. Este óleo, por apresentar atividades calmantes, ansiolíticas e relaxantes é uma alternativa promissora para o controle de emoções como medo e ansiedade em cães submetidos ao exame clínico, promovendo conforto psicológico e precisão do exame clínico junto a resultados mais confiáveis, melhorando seu grau de bem-estar.

A administração de óleos essenciais por via inalatória é relatada em humanos, assim como em animais como ratos, camundongos, cavalos e cães, principalmente com o uso de Lavanda em difusores de ambiente, existindo produtos comerciais com este fim. Já a via de administração tópica do óleo essencial de *L. angustifolia* é relatada em humanos de forma considerável, mas ainda pouco em animais, principalmente cães.

Os estudos existentes quanto à segurança clínica do uso tópico do óleo essencial de lavanda em animais não são recentes e são escassos, demonstrando a necessidade de tal pesquisa. Necessária também pelo fato da maior procura por óleos essenciais terapêuticos na modernidade, do uso indiscriminado e desorientado destes por seres humanos e para seus animais, assim como à falta de fiscalização e normatização da produção e comércio destes produtos, os quais são isentos de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para que os benefícios de diagnóstico, cura e prevenção de doenças oferecidos pelo exame clínico veterinário sejam mantidos, é fundamental que haja uma estratégia de obtenção do equilíbrio emocional e prevenção de traumas psicológicos nos animais nessa ocasião.

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar a percepção dos tutores quanto ao comportamento dos cães sob sua responsabilidade em contexto de consulta veterinária;
2. Caracterizar um produto tópico a base de óleo essencial de *L. angustifolia* e avaliar sua influência no comportamento, submetidos ao exame clínico veterinário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relação entre seres humanos e cães

Há mais de 100.000 anos, começou-se a coevolução entre seres humanos e cães, quando os ancestrais do homem passaram a abrigar filhotes de lobos que rondavam seus acampamentos com o intuito do animal ajudar na caça e proteção em troca de comida e abrigo (Beaver, 2001). Ou seja, pode-se dizer que a coevolução configura uma relação mutualista, na qual tanto o homem como a espécie domesticada se beneficiam ao viverem em grupo e, assim, com maior resistência à extinção e auxílio na sobrevivência (Heffner, 1999).

Há algumas décadas os animais de estimação criados em centros urbanos passaram a ser considerados membros do núcleo familiar e cumprem o papel de conforto e companhia (Cohen, 2002).

De acordo com o último índice divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), a população de domicílios que possuíam cães era de 33 milhões em 2019, tal dado sem considerar a quantidade de cães por domicílio e abrigos de cães ou até mesmo animais que viviam em situação de rua. Com a tendência de crescimento apontada no estudo, em 10 anos, o número de cães seria de 70,9 milhões. Com essa expectativa de crescimento na população de animais de companhia, o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) relata que diversos setores devem ser impactados, principalmente no que diz respeito à higiene e saúde desses animais. Junto à valorização cada vez maior dos animais de estimação e seu bem-estar, a participação desse segmento na composição do mercado de saúde animal no Brasil cresce ano a ano, chegando em 2021 ao maior patamar desde 2013, com 25% do total (SINDAN, 2021).

Segundo a Comissão de Animais de Companhia (COMAC) do SINDAN, durante a pandemia, 82% dos canais de informações procurados por tutores de animais de companhia foram os Médicos Veterinários, assim como, no mesmo período, 79% dos responsáveis procuraram dados sobre contágio e transmissibilidade de COVID-19 em pets, 66% leram sobre

saúde dos pets ou medicamentos na internet e 66% assistiram vídeos/lives sobre saúde e bem-estar de seus animais (COMAC-SINDAN, 2022).

Com essa proximidade, os cuidados e zelo são proporcionais e, cabe ao médico veterinário, o papel de contribuir para a melhora dessa interação e, a partir disso, promover o bem-estar de ambos (humanos e animais) através da convivência harmoniosa e da satisfação das necessidades espécie-específicas. O profissional deve estar apto a compreender as diferenças e ajudar as pessoas a serem os melhores guardiões possíveis, com o objetivo de que sejam feitas a prevenção e cura de doenças, sabendo que é devido a esse vínculo que as pessoas trazem seus animais aos consultórios veterinários (Catanzaro, 2002).

2.2 Indicadores de Estresse Canino ao Exame Clínico

O médico veterinário é capaz, com primor, de fazer o que for necessário quando o animal está na mesa para exames. Mas fatores comportamentais devem ser levados em consideração nesse momento, como o transporte desse animal, o momento na sala de espera e sua experiência anterior com tudo que está presente no ambiente. É conhecido na literatura como o estresse e, conseqüentemente, o cortisol podem interferir em diversos parâmetros. Sem levar em conta o estado emocional do animal, alguns diagnósticos podem ser imprecisos, assim como a dificuldade aumentada de se fazer o exame clínico em animais estressados (De Assis, 2018).

Segundo Döring *et al.* (2009) e Mariti *et al.* (2016), a exposição a experiências negativas parece ser um fator que influencia a demonstração de comportamento de medo. Apesar disso, mesmo na ausência de experiências anteriores, a maior parte dos cães que visitam o consultório médico veterinário exibem comportamentos relacionados com medo, sendo esse o motivo para alguns casos de agressividade.

No ato da consulta veterinária, há várias ações que podem influenciar o comportamento do cão, como por exemplo, exposição a outros animais e pessoas desconhecidas (Mills, 2012 e Overall, 2013), odores (por exemplo, desinfetantes e feromônios de alarme de outros animais), ruídos (latidos de cães, tosquiadeiras, alarmes, etc.), superfícies lisas ou escorregadias como revestimentos de piso liso ou mesas de exame de metal (Overall, 2013).

Uma simples consulta de rotina pode ser aprendida como uma experiência negativa, com muitos cães exibindo comportamentos associados ao medo quando dentro de um consultório. Cada experiência negativa tem um efeito cumulativo e as visitas subsequentes tendem a ser mais difíceis e inquietantes (Döring *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, muitos donos de cães consultaram veterinários ou outros profissionais especializados em comportamento animal sobre comportamentos problemáticos (Yamada *et al.*, 2019), sendo estes uns dos principais motivos para o seu abandono pelo proprietário (46,8% dos casos nos Estados Unidos) e eutanásia (Salman *et al.*, 1998; Khoshnegah; Azizzadeh; Gharaie, 2011). Em Taiwan, dentre os fatores pós-aquisição, aqueles com maior associação ao abandono também foram os problemas comportamentais dos animais (Weng *et al.*, 2006). Nos EUA, cerca de 20 milhões de animais de estimação, a cada ano, são abandonados em abrigos e, pelo menos a metade deles sofre eutanásia (Faraco; Lantzman, 2013). Segundo Soares *et al.*, em 2010 ainda não haviam realizado estudos sobre a casuística dos problemas de comportamento dos cães domésticos, mas, recentemente, estudos estão sendo realizados nesse tema como o de Savalli *et al.* (2021), o qual investigou associações entre problemas comportamentais em cães brasileiros e as características demográficas dos cães e de seus donos, bem como a qualidade do relacionamento dono-cão, assim como Melo *et al.* (2024), o qual investigou fatores sociodemográficos e comportamentais possivelmente relacionados às alterações comportamentais em cães de estimação no Brasil, durante a pandemia de Covid-19.

Há evidência de que 5,5% dos cães com comportamentos indesejáveis são ou foram eutanasiados (Lund *et al.*, 1996). Um estudo de cães apresentados em clínicas veterinárias no Sudeste da Inglaterra relatou que uma das mais comuns causas de morte entre cães com menos de três anos de idade foram anomalias comportamentais (14,7%), como por exemplo, agressão, conflito social, ansioso/nervoso, contenção necessária para exame veterinário, destrutivo, vocalização excessiva e eliminação inadequada, além de que a prevalência é de 33,7% sendo superior à prevalência relatada em um estudo comparável anterior, o qual era de 27,4% (O'Neill *et al.*, 2013; Boyd *et al.*, 2018).

Os médicos veterinários, independentemente da área que exerçam, mas especialmente o clínico de pequenos animais, pelo seu contato primário e intenso com a população, deve ser o protagonista na reversão dessa tendência (Landsberg *et al.*, 2003), sendo seu aconselhamento comportamental determinante para a promoção de uma convivência saudável e menos conflituosa (Gazzano *et al.*, 2008).

Segundo Beaver (1999), 60% dos cães levados a uma clínica veterinária para exame de rotina apresentavam comportamento submisso e de medo. Os mesmos comportamentos foram observados por Stanford, em 1981, notando que cerca de 70% dos cães estavam “relutantes” em entrar em um consultório veterinário. A relutância foi evidenciada em um estudo realizado

por Döring *et al.* (2009), o qual demonstrou que 36,3% dos cães caminharam com hesitação ou se esconderam atrás do tutor ao adentrar em um consultório veterinário.

Já no consultório clínico, mais da metade dos cães apresentam taquipneia (56,3%, 76/135). Outros padrões comportamentais possivelmente indicativos de estresse ou situação de conflito do cão incluíam tremer, lamber a boca, choramingar e bocejar. Na mesa de exame, a maioria dos animais exibiu tremores (61,5%, 83/135 cães), comportamento de evitação e postura agachada (77,8%, 105 cães), e tinham a cauda abaixada ou enfiada entre as patas traseiras (75,6%, 102 cães). Assim, 106 cães (78,5%; n = 135) estavam com sinais de medo, ao preencherem no mínimo três dos requisitos para serem considerados “medrosos” e 24 cães (17,8%) estavam “relaxados”, sendo considerado da mesma forma (Döring *et al.*, 2009).

Handelman (2012), observa que, em indivíduos extremamente medrosos, as orelhas podem ser pressionadas tão para trás na cabeça que desaparecem. Ao contrário, as orelhas voltadas para a frente estão associadas a intenções de interesse, atenção e aproximação (Hecht; Horowitz, 2015), enquanto a posição lateral indica um estado interno conflitante.

Outra expressão comportamental observada é a posição da cauda, em que quando erguida é relacionada ao ato de comunicar confiança, excitação ou a vontade do cão de abordar positivamente outro indivíduo, por exemplo cumprimentando e brincando (Hecht; Horowitz, 2015; Bradshaw; Rooney, 2017).

Quando a cauda é mantida rígida, expressa uma ameaça ou a ansiedade do indivíduo, já uma cauda baixa ou dobrada entre os membros sinaliza medo, ansiedade ou apaziguamento, pois contribui para diminuir o tamanho do corpo do indivíduo (Handelman, 2012; Hecht; Horowitz, 2015; Bradshaw; Rooney, 2017). Quando abanadas frouxamente de um lado para o outro, servem para comunicar amizade ou sua excitabilidade (Handelman, 2012).

Os olhos caninos também podem ser relacionados aos estados emocionais dos cães. Podem ser “suaves”, abertos com a musculatura descontraída, em contextos relaxantes e não ameaçadores ou podem ser “duros” quando parcialmente abertos e com sobrelha franzida, expressando um alto nível de tensão. Quando os cães abrem bem os olhos, expondo o branco dos olhos, nomeadamente a esclera (“olhos de baleia”), são em situações agonísticas e estressantes (Handelman, 2012).

As expressões faciais relacionadas à boca variam de acordo com sua posição (aberta ou fechada) e com o formato das comissuras labiais, que transmitem informações importantes sobre as intenções do indivíduo. A comissura labial da boca é puxada para frente (“lábios curtos”) em exibições agonísticas e o grau de abertura da boca relacionado aumenta de acordo

com a intensidade da ameaça (Handelman, 2012). Quando contrário, os cães puxam para trás suas comissuras labiais (“lábios longos”) para comunicar o estresse (Handelman, 2012; Hecht; Horowitz, 2015), cuja intensidade aumenta se as comissuras são puxadas mais para trás e formam uma forma de “C” (Handelman, 2012). Junto a esta configuração da boca, o ato de lambe os lábios (“*lip-licking*”) pode ser para comunicar suas intenções de apaziguamento (Beerda *et al.*, 1997; Handelman, 2012).

Além das expressões faciais e corporais, a vocalização também é um importante fator no contexto de avaliação de um animal em estado de estresse. Semelhante aos latidos, os rosnados também transmitem informações significativas aos cães (Taylor *et al.*, 2009; Faragó *et al.*, 2010a; Faragó *et al.*, 2010b). Segundo Yeon (2007) e Handelman (2012), essas vocalizações de banda larga de baixa frequência, como os rosnados, são produzidas principalmente durante interações agonísticas como um sinal de alerta ou ameaça ou durante interações de brincadeira, devendo ser avaliada em associação com os outros sinais corporais de comunicação canina.

Essa comunicação acústica canina inclui ganidos, que são indicadores de excitação estressante, mas também comportamentos de saudação e busca de atenção, semelhante à ansiedade; os uivos, que mantêm a coesão do grupo; gemidos e ganidos, como sinais de angústia; e grunhidos, considerados sinais de prazer (Yeon, 2007).

Há comportamentos ditos como fora do contexto, os quais são comportamentos característicos da espécie, mas não pertencentes ao momento em que o animal os exibe, como por exemplo, a lambedura excessiva de partes do corpo. No entanto, alguns autores também atribuem esse comportamento, lambedura excessiva no contexto de autolimpeza, ao transtorno obsessivo-compulsivo (Landsberg *et al.*, 2003; Luescher, 2003; Tynes, 2008), ou seja, um comportamento normal realizado de forma inadequada, excessiva ou fora de contexto. Segundo alguns especialistas em comportamento animal, esse ato repetitivo, exagerado e sustentado é provocado por conflito, estresse e ansiedade, podendo ser generalizado fora desse contexto e interferir nas atividades diárias (Luescher, 2003; Tynes, 2008).

Além da lambedura, há bocejo. Alguns pesquisadores demonstraram que essa resposta comportamental, foi acompanhada por aumento da frequência cardíaca e dos níveis de hormônio do estresse. Este comportamento como “se sacudir”, cheirar o ambiente, lambe os lábios ou se coçar, são comportamentos considerados de deslocamento como forma de se confortar com o ambiente e a situação que estão submetidos sob estresse. Ao notar o conjunto

de dois ou mais destes atos, é possível deduzir que o cão, provavelmente, está em desconforto e, que os bocejos, são devido ao estresse e não ao cansaço ou tédio (Beerda *et al.*, 1997).

Além dos parâmetros comportamentais indicativos de estresse, há alterações fisiológicas e endócrinas possíveis de comprovar o baixo grau de bem-estar dos animais. Quando o agente estressor aparece de forma imprevisível, ou seja, de forma aguda, a resposta dada é comandada pelo eixo Simpático Adreno Medular (SAM) que gera uma reação rápida no organismo, conhecida como reação de “luta ou fuga”.

Ocorre, então, a ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) que estimula a liberação de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), causando efeitos no organismo como midríase, vasoconstricção cutânea, estado de alerta, aumento da frequência cardíaca, frequência respiratória, da glicose plasmática e dos ácidos graxos, alterações de pressão arterial, temperatura, a incidência de doenças e do comprometimento imunológico, através da investigação do histórico clínico e exames laboratoriais (Bodnariu, 2008; Hekman *et al.*, 2014).

O conjunto dessas respostas tem efeitos imediatos no aumento da prontidão e atividade do animal, a liberação destes hormônios ocorre rapidamente após a detecção de um estressor.

Já o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA) age quando o organismo permanece em estresse por período maior, nesse caso a reação se inicia no hipotálamo com a liberação de Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) e Arginina Vasopressiva. Estes estimulam a liberação de glicocorticoides através das glândulas adrenais (Hekman *et al.*, 2014). Em contraste com a epinefrina e norepinefrina, os glicocorticoides são mais lentos nos seus efeitos, as concentrações não conseguem ser detectadas em menos de 3-5 minutos (Romero; Butler, 2007). Essa característica faz com que glicocorticoides sejam comumente utilizados em estudos de estresse já que seus efeitos são mais duradouros e potencialmente mais danosos a longo prazo (Vasconcellos, 2016).

É possível de mensurar o estresse a partir das alterações fisiológicas pela quantificação dos hormônios envolvidos nos eixos SAM ou HPA e o método comumente escolhido é a medição do cortisol. O cortisol é um dos glicocorticoides liberado pelas glândulas adrenais, que ao se deparar com o agente estressor se espalha na corrente sanguínea em níveis muitas vezes maiores que o normal (Hekman *et al.*, 2014).

A mensuração do cortisol pode acontecer no sangue e, na saliva, é o método mais recomendado para avaliação das respostas fisiológicas. Quando essa mensuração é feita através do sangue é necessário a coleta, que além de ser um procedimento invasivo que demanda de técnica para a coleta e armazenagem, gera estresse nos animais, podendo alterar os resultados.

Já a avaliação na saliva é pouco invasiva e bem tolerada por cães, tendo resultados semelhantes aos do plasma sanguíneo (Rocha, 2015).

Dentro da estrutura do condicionamento clássico, experiências desagradáveis (por exemplo, tratamentos dolorosos) podem ser associadas a objetos, pessoas ou situações (por exemplo, uma mesa de exame, veterinário, salas de prática etc.), para que estes venham a desencadear o próprio medo (O'Farrell, 1987; Liebermann, 2000; Lindsay, 2000; König, 2002).

É por isso, importante que, nestas fases, o médico veterinário seja capaz de detectar os sinais de medo, alertar o responsável e fazer uma tentativa de dessensibilização e contra condicionamento de forma a evitar problemas e dificuldades em futuras consultas (Guimarães, 2013), como por exemplo, a adesão ao tratamento constituído pelo profissional, a correta execução do exame clínico e, conseqüentemente, o almejado sucesso da terapia com a cura clínica animal.

2.3 Terapias Comportamentais para Cães

Ao perceberem comportamentos tratados como medo, ansiedade, apatia e angústia em cães nos momentos antes, durante e após a visita ao consultório veterinário, os tutores seguem em busca de terapias que possam reduzir esse quadro de estresse e tornar um momento mais harmônico. Com isso, faz-se uso desde medicamentos sintéticos com poder sedativo, calmante e ansiolítico (Rossi, 2016) até terapias alternativas como a aromaterapia, que é definida como o uso de óleos essenciais (OE) no tratamento de doenças físicas e psicológicas do organismo (Segen, 1998).

As terapias de medicina alternativa, incluindo produtos herbáceos naturais ou derivados de plantas para cuidados com a saúde animal ganharam destaque (Genovese, 2012).

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas de origens naturais, a partir, dos isolados de OE para o tratamento e profilaxia de enfermidades que acometem cães e gatos, é uma alternativa em potencial em relação aos produtos sintéticos existentes no mercado. Como as expectativas do segmento *pet* no mercado brasileiro continuam tendo um crescimento acima da média mundial, propicia o aumento das exigências de inovações de medicamentos e produtos veterinários, e conseqüentemente, oportuniza a necessidade e espaço no mercado para novas propostas de formulações (COMAC-SINDAN, 2022).

2.4 Óleos Essenciais

Os OE são definidos, segundo a norma 9235 da *International Organization for Standardization* (ISO), como “...produtos obtidos de matérias-primas naturais de origem vegetal, por destilação a vapor, por processos mecânicos a partir do epicarpo de frutos cítricos, ou por destilação a seco, após a separação da fase aquosa - se houver - por processos físicos”.

A ISO possui, atualmente, 143 normas publicadas referentes a OE, além de oito em desenvolvimento. Esses documentos contêm as especificações técnicas para a maioria dos OE com importância comercial, bem como seus métodos de análise e aspectos de rotulagem (ISO, 2022).

A normatização objetiva fazer com que se tenha um padrão, ao usar um nome ou termo normatizado, estejam, todos, referindo-se a um mesmo produto, evitando equívocos entre as partes. Obviamente, há variações na composição ao tratar-se de um produto natural, sujeito às respostas do metabolismo secundário da planta (Figueiredo *et al.*, 2008), entretanto, essas variações devem estar dentro de faixas de tolerância também normatizadas e reguladas. Assim, segundo a ISO 3515/2002, para fins de comércio internacional, um OE só pode ser rotulado como “óleo essencial de lavanda” (*essential oil of lavender*), por exemplo, se for obtido por destilação a vapor de flores recentemente colhidas da espécie *Lavandula angustifolia* Mill.

Na Europa, os OEs são autorizados em rações animais pela Diretiva do Conselho 70/524/EEC Cap. III, que se refere a substâncias aromáticas e apetentes. Nos Estados Unidos – a *Food and Drug Administration* (FDA) reconhece o grupo dos OE como substâncias seguras para o uso na alimentação de animais e humanos, dentre os 172 óleos essenciais reconhecidos estão os de Alfafa, Manjeriço, Citronela, Gerânio, Lavanda, Alfazema, Melissa e Rosa absoluta (FDA. 21CFR182.20).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) editou normas para OEs desde a década de 1970. Entretanto, todas foram canceladas entre 2010 e 2011 e, no presente, não há normas nacionais vigentes para OEs (Bizzo; Rezende, 2022).

Óleos produzidos no país em pequena escala, a partir de espécies nativas ou mesmo exóticas, não possuem especificações pré-definidas. Somando-se a isso a variedade na composição dos metabólitos secundários de plantas em função de sua herança genética e das condições do ambiente nas quais são cultivadas (Figueiredo *et al.*, 2008), não é raro encontrar OEs, supostamente da mesma espécie, de duas ou mais procedências com composições qualitativa e quantitativamente diferentes (Da Silva *et al.*, 2016). Tal falta de padronização se torna uma questão importante para os produtores e as indústrias interessadas no seu emprego (Bizzo; Rezende, 2022).

Os fitoterápicos (OEs incluídos), no Brasil, são considerados como medicamentos. Portanto, para fins medicinais, OEs devem seguir as avaliações de segurança e eficácia previstas na RDC 26/2014 e em outras normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2014a). Para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os óleos essenciais são considerados aditivos sensoriais e isentos de registro (Brasil, 2010)

Segundo Carvalho *et al.*, 2018, se usados como excipientes, os estudos de segurança e eficácia deverão ser realizados nos produtos finais (medicamento ou cosmético), também seguindo regulamento específico através da RDC 69/2014 (ANVISA, 2014b).

No início do século XX, o químico francês René-Maurice Gattefossé, com base em sua experiência pessoal e estudos dos OEs publicou o livro intitulado "Aromatherapy: Les Huilles Essentielles Hormones Végétales", onde relatava suas pesquisas, inaugurando assim, o termo "aromaterapia" (Lawless, 1995).

A aromaterapia é uma prática terapêutica que faz a utilização das ações fisiológicas, farmacológicas e psicológicas dos OEs por meio de inalação, ingestão ou aplicação tópica para a prevenção e cura de doenças e alívio de seus sintomas (Horowitz, 2011). No Brasil, não há uma regulação para produção, a comercialização e a utilização terapêutica desse produto que possa proteger o consumidor de forma mais objetiva (Silva *et al.*, 2023).

As principais formas de administração dos OEs são a inalação, absorção cutânea através de massagens, banhos aromáticos e até mesmo por ingestão. O médico, ou profissional da área da saúde, especializado em aromaterapia, é o responsável por receitar a forma de administração adequada para cada tratamento, bem como a quantidade utilizada do OE (Andrei, 2005). O mesmo autor, também descreve que a principal via de administração utilizada é a inalação, na qual o óleo volatilizado é difundido pelo sistema olfativo, que posteriormente é transformado em estímulo elétrico, sendo transportado até o cérebro, tais estímulos atingem o sistema límbico, responsável pelo processamento das memórias olfativas, especificamente com importante atuação no hipocampo, o qual é responsável pela operacionalização das memórias de curto e longo prazo, desencadeando uma sequência de reações químicas no organismo capazes de reestabelecer o equilíbrio, reduzindo os sintomas e tratando as doenças psíquicas.

Dias, 2013, menciona a aplicação tópica, que geralmente é associada à massagem, o OE é diluído em óleo carreador, e é absorvido pelos poros até atingir a corrente sanguínea. Também relata que os OEs são agressivos para a mucosa gástrica, devido a isso, a ingestão é mais restrita, sendo geralmente administrados em cápsulas.

Assim como em humanos, a via de administração mais utilizada com animais é a inalatória a partir do uso de difusores no ambiente, principalmente com o objetivo de obtenção de efeitos psicofisiológicos. Mas também há o uso da via tópica de óleos essenciais diluídos com a finalidade antimicrobiana, antiinflamatória e até analgésica. Mas ainda são escassos os estudos científicos acerca dos efeitos psicofisiológicos da ingestão dos OEs por animais, exceto para os já permitidos no Brasil, como aromatizantes naturais na alimentação animal como os óleos de Açafraão e Alfada, conforme Anexo V da IN 42 de 17 de dezembro de 2010.

No Brasil, durante a pandemia de COVID-19, aumentou a procura pelos OEs como uma solução natural para o controle de estresse, depressão e ansiedade. Estima-se um crescimento global do setor de óleos essenciais de aproximadamente 12% até 2023 (Soares, 2021).

2.5 Óleo Essencial de Lavanda (OEL)

Quando se fala em aromaterapia para fins ansiolítico, relaxante e tranquilizante, o óleo essencial de lavanda (OEL) entra em cenas de diversos estudos e experimentos científicos para comprovar e testar seu efeito psicológico (Linck, 2010; Poutaraud *et al.*, 2018). Dentre as espécies mais conhecidas de *Lavandula* estão *L. angustifolia* (também conhecida por *L. officinalis*), *L. latifolia*, *L. stoechas*, *L. dentata*, e existe também a comercialização de formas híbridas. No Brasil, a lavanda pode ser referida como alfazema (Cunha *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2011; Woronuk *et al.*, 2011).

Segundo a Farmacopeia Europeia os constituintes majoritários do OEL são o linalol, o acetato de linalila, o terpine-4-ol e outros em menores concentrações. O composto linalol possui atividades biológicas comprovadas, como analgésico, ansiolítico, antidepressivo e outros (Hoferl *et al.*, 2006).

Os OE's são capazes de atravessar membranas celulares e exibir efeitos farmacológicos, tornando-os *drug like* e aumentando seu potencial para produtos farmacêuticos (Schuwald *et al.*, 2013).

Poucos estudos relacionados ao OE de *L. angustifolia* são publicados no Brasil, mas em 2012 um estudo caracterizou OE extraído dessas plantas, apresentando desta forma os compostos necessários para o uso em aromaterapia (Machado *et al.*, 2013).

L. angustifolia é a espécie mais usada em produtos aromáticos e cosméticos assim como em trabalhos que estudam o efeito ansiolítico da lavanda (Woronuk *et al.*, 2011). Acredita-se que isso seja devido à composição dessa espécie, que apresenta alta concentração de linalol e

acetato de linalil e baixa concentração de cânfora (Takahashi *et al.*, 2011; Woronuk *et al.*, 2011).

O OEL é aparentemente bem tolerado e é frequentemente aplicado topicamente ou administrado por via oral em um formato não diluído (Prashar *et al.*, 2004). Em uma pesquisa da Universidade de Coimbra, as doses que não causaram efeito adverso ou que causaram efeito adverso mínimo após exposição dérmica humana ao linalol foram 250 mg/kg de peso corporal (pc)/dia e 1000 mg/kg pc /dia, respectivamente (Pereira *et al.*, 2018).

O óleo essencial de lavanda foi concedido *status Generally Recognized as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration*, o que significa que é seguro quando usado para o fim a que se destina como alimento aditivo (FDA, 2016).

Muitos OEs são inadequados para administração oral em sua forma não diluída por malefícios à saúde, mas o envenenamento por lavanda é incomum (Letizia *et al.*, 2003). A administração oral de OE em camundongos mostrou nenhuma mortalidade em doses de 2.000 mg/kg, indicando baixa toxicidade em conformidade com a OCDE (*Organisation for Economic Co-Operation and Development*) 425, 2001. No entanto, os camundongos mostraram comportamento passivo na primeira hora do ensaio, sugerindo efeitos analgésico e sedativo, além de que não foram observados sinais clínicos de toxicidade, também sem alterações macroscópicas induzidas por substâncias tóxicas (Arantes *et al.*, 2016).

Letizia *et al.*, 2003, relata que para aplicações dérmicas, a DL₅₀ era maior que 5 g/kg, sem sintomas sistêmicos ou mortes em coelhos observadas até 14 dias.

Além dos efeitos centrais, o OEL parece ter efeitos periféricos que podem ser importantes para seu mecanismo de ação, apresentando aumento da atividade parassimpática bem como diminuição hemodinâmica de parâmetros em ratos, cães e humanos (Cha *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2005).

No Reino Unido, em 2014, um estudo resultou que os pacientes humanos tratados com o óleo através de massagem em uma dosagem de 4 gotas de óleo essencial para 15 ml de óleo transportador, em comparação com um grupo controle, apresentaram um menor nível de ansiedade e depressão, indicando que o OE de *L. angustifolia* possui atividades ansiolíticas e antidepressivas (Lemon, 2004).

O efeito ansiolítico do OEL foi observado em esquilos da Mongólia (Bradley *et al.*, 2007) e em camundongos (Takahashi *et al.*, 2011) expostos ao labirinto em cruz elevado, no qual ocorre o evento chamado de “conflito de aproximação-esquiva” (*approach-avoidconflict*) do animal avaliado diante de ambiente desconhecido somado à tendência natural de esquiva em

relação às regiões abertas, potencialmente perigosas, e ao teste de Geller-Seifter e de Vogel, nos quais ratos com privação de comida e água, respectivamente, recebem acesso, mas o comportamento de consumi-los é punido (Umezu *et al.*, 2006). Estes dois últimos testes são reconhecidos pelas suas baixas incidências de falsos positivos, mas são incapazes de detectar a ação ansiolítica de medicamentos ansiolíticos mais recentes como no caso dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Cryan; Sweeney, 2011). O teste de Geller-Seifter não tem sido amplamente utilizado e não tem sido utilizado na última década, provavelmente devido a essas desvantagens (Acikgoz *et al.*, 2022)

Existem diversos produtos à base de OE de lavanda para humanos e animais. Na Alemanha, um extrato de óleo essencial padronizado de *L. angustifolia* para administração oral foi desenvolvido e aprovado para uso em ansiedade. O produto está disponível em cápsulas de gel de 80 mg de uma ou a duas administrações ao dia e é comercializado como um suplemento dietético de venda livre chamado Calm Aid® nos Estados Unidos. Silexan®, um medicamento europeu a base de óleo essencial de *L. angustifolia*, foi aprovado na Alemanha e em diversos outros países para o tratamento oral da ansiedade. Em uma dose diária de 80mg se mostrou com efeitos ansiolíticos em casos clínicos (Kasper *et al.*, 2010, 2015; Uehleke *et al.*, 2012), revisões recentes (Müller *et al.*, 2015; Kasper *et al.*, 2015, 2018) e em recentes metanálises (Donelli *et al.*, 2019; Yap *et al.*, 2019; Möller *et al.*, 2019). A eficácia clínica também fora demonstrada em pacientes alemães com ansiedade em doses diárias de 160mg (Woelk; Schläpke, 2010; Kasper *et al.*, 2014). Em testes com camundongos com dose de 10mg/kg ou 30mg/kg, Silexan teve atuação perto de 5mg/kg de Lorazepam (Kumar, 2013).

No Brasil, não há produtos à base de OEL por via oral para humanos ou animais. Mas em humanos, por via tópica, existem diversos produtos com o objetivo de promover ação antiinflamatória, antisséptica, antioxidante, cicatrizante e relaxante, como promete o grupo de produtos Botica Lavanda®, da marca Bio Extratus. Para cães, o Spray Antiestresse®, da marca DNAmazon, promete sensação de tranquilidade e bem-estar ao ser borrifado nos pelos do animal.

Mas a via de administração mais comum é a inalatória, na qual a maior parte dos produtos de uso humano tem registro da ANVISA, como alguns OEs de lavanda puros, mas os produtos destinados aos animais são isentos de registro pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como por exemplo o produto Spray Stress Away®, da marca Soft Care, que promete bem-estar e conforto ao ser borrifado no ambiente, assim como o Kit Relaxante®, da marca Animal Flower.

Segundo o *Safety data sheet* (Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)), revisado em 2021, ao se tratar da toxicidade do OE de lavanda em relação à sua ingestão oral, tem-se o valor de DL₅₀ do seu maior componente (Linalool) de 2.790 mg/kg em ratos e, em relação à absorção tópica o valor de 5.610 mg/kg em coelhos. O mesmo documento orienta que o OEL não deve ser considerado como cancerígeno e tóxico para o sistema reprodutivo. No entanto, há algumas evidências de efeitos adversos após o uso de lavanda, como reações alérgicas ou dermatite cutânea (Koulivand *et al.*, 2013).

Um estudo em animais relatou que o OEL oral teve alguns efeitos tóxicos em doses de até 1,5 g/kg (Lucas *et al.*, 2015). Para feridas, abscessos e queimaduras, os óleos de lavanda são usados por aplicação tópica. Erupções cutâneas podem ser tratadas com óleos de *tea tree*, lavanda e camomila (Buchbauer; Baser, 2020). Segundo Komiya *et al.*, 2009, a avaliação de cães quanto à sensibilidade ao óleo de lavanda aplicado no abdômen não revelou sinais de irritação, além disso, aplicações sucessivas de óleo de lavanda no pavilhão interno de cada orelha, neste estudo, não resultaram em lesões dermatológicas graves, ao uso de uma concentração de 4% e sem resultar em irritação da pele.

A falta de normas nacionais vigentes associada a escassez de estudos científicos sobre a segurança do uso de OEs para humanos e animais contribuem para o uso indiscriminado e inconsciente de tais produtos, podendo decorrer em prejuízos à saúde coletiva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em duas partes: sendo uma a análise de um questionário online, com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº 61584022.4.0000.9047 e a segunda um ensaio clínico, também com aprovação do Comitê de Ética ao Uso de Animais da UFRRJ sob o nº 6326160623, ambas com o objetivo de obter informações sobre o comportamento de cães no momento da consulta clínica veterinária.

O questionário foi elaborado através da ferramenta “Google Formulários” com questões sobre o perfil dos cães e dos tutores e o comportamento deles no contexto de consulta veterinária sob a concepção dos seus responsáveis. Foi divulgado amplamente através das redes sociais e as respostas obtidas quantificadas.

O ensaio clínico consistiu no desenvolvimento de uma formulação tópica a base de óleo essencial de *Lavandula angustifolia* e a avaliação do seu efeito no comportamento de cães, da

raça beagle, submetidos ao exame clínico veterinário. Além de parâmetros vitais, foi realizada a quantificação do cortisol salivar e a observação do comportamento dos cães.

3.1 Questionário online

Há diversos estudos fora do Brasil que relatam o comportamento dificultoso de cães em contexto de consulta veterinária. Entretanto, ao se tratar sobre os dados brasileiros acerca do tema, são escassos os estudos. Mas Faraco (2021) observa que a maioria dos cães e gatos já chegam para atendimento estressados ou ansiosos devido às ações do tutor previamente à consulta, como perseguir o animal e colocá-los em uma caixa de transporte que não estão acostumados.

É possível localizar pesquisas brasileiras sobre o comportamento de cães em diversos contextos, como por exemplo, a diferença no comportamento de cães sob tutoria de mulheres e de homens pela perspectiva do médico veterinário (Boere *et al.*, 2011), também um estudo sobre as técnicas a serem utilizadas para redução do estresse de cães em atendimento clínico (Pozzatto *et al.*, 2022). São pesquisas que demonstram a importância do comportamento canino ao exame clínico veterinário, mas que não evidenciam quais sejam esses comportamentos.

Devido a essa necessidade, de obter dados referentes ao comportamento canino em contexto de consultas veterinárias (sala de espera, mesa de procedimentos e manipulação veterinária) no Brasil, foi elaborado, através do “Google Formulários”, um questionário online, anônimo, de abrangência nacional intitulado de “Comportamento de cães à consulta veterinária por seus responsáveis”, no qual foi esperado obter dados comportamentais e epidemiológicos sobre cães que foram pelo menos uma vez ao consultório veterinário sob a visão de seus responsáveis. Na primeira página, abaixo do título, para informar aos respondentes, há a descrição da pesquisa, bem como o pesquisador principal, seu orientador e o local de estudo. Há a breve explicação do porquê do estudo, seu objetivo e condições para participação. Também apresenta que os dados serão utilizados apenas para fins acadêmico-científicos.

O questionário é dividido por sessões. Antes da primeira sessão, há a pergunta “Você autoriza o uso acadêmico e científico dos dados que fornecerá ao longo desse questionário?”, assim serão utilizadas apenas os preenchimentos em que o participante respondeu que “sim” a esta.

Na primeira sessão, contém as perguntas que se referem a informações sobre os cães, como faixa etária, porte, sexo, ambiente em que vive, se é sem raça definida (SRD), se o responsável realiza passeios com o animal e como esse considera o vínculo com o cão.

Já na segunda sessão, contém perguntas que se referem ao momento em que o responsável e o animal aguardam em sala de espera o atendimento pelo médico veterinário, com o objetivo de caracterizar o comportamento nesse momento.

A terceira sessão contém perguntas que se referem ao momento em que o responsável e o animal foram chamados para o atendimento pelo médico veterinário, com o animal ainda sem estar na mesa de procedimentos, estando na mesa e ao ser tocado pelo profissional, com o objetivo de caracterizar o comportamento nesses momentos.

Na última sessão, há perguntas que se referem à percepção do responsável pelo cão, como o sentimento que essa pessoa possui ao presenciar o comportamento do animal no processo da consulta veterinária, tendo a possibilidade de não se expor ao responder “não sei responder”.

É inclusa a pergunta sobre a frequência que essa pessoa leva seu animal ao consultório veterinário, se ele(a) prefere que o atendimento seja em domicílio e se frequenta o consultório menos que gostaria por questões financeiras, esta última pergunta possui a chance do participante não se expor ao responder “prefiro não responder”.

Ao final das sessões, havia a possibilidade, não obrigatória, do participante preencher seu contato de e-mail para que receba os resultados da pesquisa após análise dos dados.

Este questionário, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 61584022.4.0000.9047, teve seu link de acesso divulgado amplamente por meio das redes sociais (Facebook, Whatsapp, Instagram, Twitter) para uma maior obtenção de participantes, também sendo divulgado através das plataformas de notícias e e-mails pelos colegiados de Graduação, Pós-graduação, Departamentos, Coordenações de curso e Pro-reitoria da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para acesso de um maior número de participantes.

3.2 Formulação

Trata-se de três formulações líquidas de uso tópico, sendo duas compostas por óleo essencial de *L. angustifolia* nas concentrações de 15% e 30% e uma sem óleo, compondo a formulação placebo.

A seleção de excipientes farmacotécnicos (antioxidantes, tampões, tensoativos, etc.) para estes ensaios ocorreu com base nos resultados da fase de pré-formulação conforme metodologia desenvolvida pelo nosso grupo e está apresentada na Tabela 1.

Quadro 1: Composição das formulações com o princípio ativo.

Substância	Função	15%	30%	Placebo
Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	Ativo	15%	30%	0%
Etanol	Co-solvente	10%	10%	10%
Polivinilpirrolidona (PVP)	Agente filmogênico	5%	5%	5%
Ácido Cítrico	Agente acidificante e quelante	0,3%	0,3%	0,3%
Tween 80	Tensoativo	5%	5%	5%
Butil-hidroxi-tolueno (BHT)	Agente antioxidante e conservante	0,5%	0,5%	0,5%
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Agente penetrante e solubilizante	2%	2%	2%
Propilenoglicol (PPG)	Agente umectante e veículo	q.s.p	q.s.p	q.s.p

q.s.p. (quantidade suficiente para)

Os ingredientes foram misturados a frio e homogeneizados com auxílio de vórtex e ultrassom para garantir a solubilização completa dos componentes adicionados a formulação.

3.2.1 Caracterização físico-química da formulação

As propriedades físico-químicas avaliadas da formulação não-aquosa foram: características organolépticas e pH. A variação de peso e o pH foram observados ao longo de um período de 5 dias seguidos após a preparação. A variação de peso da solução envasada foi feita com o auxílio de uma balança calibrada (+/- 0,0002g); o pH foi aferido com o auxílio de um pHmetro.

3.2.2 Estudo de estabilidade preliminar da formulação

Para o estudo de estabilidade preliminar, as formulações foram submetidas a ensaios de centrifugação, onde foram centrifugadas por 30 minutos a 705,6m/s² e 5 horas a 1132,1m/s²; ciclo de congelamento e aquecimento e subsequentemente observadas quanto ao aspecto e homogeneidade. O ciclo foi feito alternando a formulação em 24h no freezer, 24h na bancada, 24h na geladeira e 24h na incubadora shaker (CienLab®) com temperatura fixa de 40°C durante cinco dias corridos após o preparo.

3.3 Ensaio clínico

3.3.1 Local

O estudo foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob o número 6326160623, nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Animal do IV da UFRRJ, localizada no Km 07 da BR 465, Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizadas as instalações e os animais da área do canil do Biotério do LQEPV devidamente registrado junto ao CONCEA/CIUCA. As instalações ficam localizadas no Anexo I do Instituto de Veterinária.

Os animais foram mantidos em canis de alvenaria com dimensões de 2,12m de altura x 1,48m de largura x 1,80m de comprimento na área de cobertura e 2,00m na área de solário, com muro de 0,60m e continuação em grade de ferro para que os animais se vejam e ouçam. Os canis utilizados possuíam 1(uma) câmera (VHL1120D Intelbras) em cada (Figura 1).

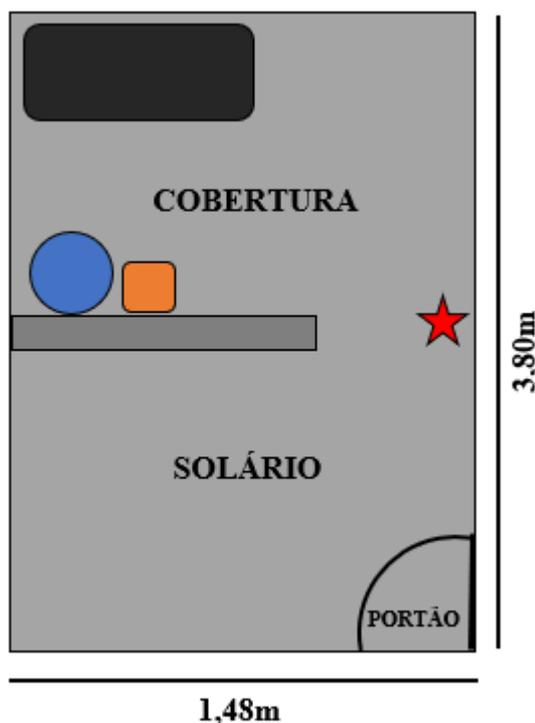


Figura 1:Esquema representativo para visualização do canil utilizado. (Em grafite escuro = cama do cão; Azul = pote de água; Laranja = pote de comida; Vermelho = câmera)

3.3.2 Seleção dos cães

Para a pré-seleção, os cães deveriam ser da raça beagle, de pelagem tricolor ou bicolor, estarem na faixa etária de 6 a 18 meses, pois é a faixa em que ainda não ingressaram em estudos

de pesquisa no LQEPV, portanto, ainda não foram manipulados em sentido de pesquisa ou rotina clínica mais intensa, de ambos os sexos e com peso em 5 e 10kg.

Para o tratamento, os cães possuir os mesmos critérios de inclusão da pré-seleção quanto a faixa etária e peso, mas deveriam possuir apenas a pelagem tricolor e mesma proporção de sexo como forma de padronizar os grupos. Como critério de exclusão dos animais pré-selecionados para os selecionados para o tratamento, o histórico clínico de manipulação intensa pela rotina clínica devido a alguma lesão ou afecção anterior foi considerado.

Foram pré-selecionados, então, 38 cães da raça Beagle, sendo 21 machos e 17 fêmeas, com idade entre 11 e 15 meses, de pelagem tricolor e bicolor e peso entre 5 e 10kg.

Para a avaliação e caracterização comportamental dos animais pré-selecionados, os 38 cães foram individualizados nos canis que possuem câmera digital (VHL1120D Intelbras) e suas imagens foram gravadas. Para cada animal, foram registradas 9 horas de imagens em 1 dia, compreendendo o período das 8:00 às 17:00.

Cada dia de gravação de cada animal foi analisado através do aplicativo de gravação ISIC Lite® pelo mesmo observador. A cada 10 minutos era anotado qual comportamento o animal estava exibindo, caracterizando assim 1(uma) captura comportamental. Portanto, foram obtidas 6 capturas por hora, totalizando 54 capturas de comportamento por animal por dia de gravação.

Os comportamentos capturados e anotados não foram predefinidos, sendo anotados conforme os animais os exibiam e quantificada a sua frequência.

A partir da classificação dos comportamentos agrupados em “Agitados”, os comportamentos em que os cães mais demonstravam mobilidade corporal, “Calmos”, os comportamentos em que os cães menos demonstravam mobilidade corporal, “Neutros”, os comportamentos em que os cães apresentavam a mesma proporção de mobilidade corporal, e “Fora do contexto”, os comportamentos em que eram exibidos pelos cães sem justificativa ambiental correspondente, foi possível separar os 38 animais em 4 níveis de escores comportamentais através da obtenção da porcentagem de exibição desses grupos comportamentais por animal junto ao cálculo da média da amplitude dos grupos (%mín e %máx). A média da amplitude do grupo “Agitados” foi dividida pelo número de escores (quatro) e então os animais foram classificados nos escores conforme estavam inclusos em cada faixa da divisão.

Foram selecionados para o ensaio, então, 24 cães da raça Beagle, entre machos e fêmeas, filhotes não esterilizados com idade entre 14 e 18 meses no momento do experimento, todos de

pelagem tricolor, vermifugados e vacinados com as vacinas óctupla, contra raiva e contra gripe canina. Como critério de exclusão, foi utilizado o histórico clínico do animal, ou seja, dos 38 cães, foram excluídos os que haviam sido manipulados rotineiramente pelo setor de clínica veterinária do LQEPV, para que a experiência de consulta veterinária dos animais fosse proporcional.

A distribuição dos animais seguiu em relação às suas porcentagens de exibições de comportamentos agitados e então divididos nos grupos de tratamentos devendo haver homogeneidade destas porcentagens de exibições de comportamentos agitados e de sexo. Foi realizado o Teste-T, para comparar as médias dos escores comportamentais de 1 a 4 dos animais e não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de escores estabelecidos.

3.3.3 Manejo

Os canis individuais possuíam disponíveis um comedouro e um bebedouro, nos quais foi oferecida ração Three Dogs® para cães filhotes duas vezes ao dia e água *ad libitum*, potável e oriunda do Grupo Águas do Rio e AGENERSA (Agência Reguladora de Energia e Saneamento do Estado do Rio de Janeiro).

Os animais foram alojados individualmente. Apesar de serem animais que vivem em grupos, eles foram mantidos individualizados, para garantir que cada animal não teria seu comportamento influenciado pela companhia de outro animal no mesmo ambiente bem como contaminação com a formulação, além de evitar brigas que iriam comprometer o estudo, tendo que excluir o animal.

Para minimizar o estresse pela individualização, os canis são dispostos no mesmo ambiente, de modo que eles possam ver e ouvir uns aos outros, bem como passaram por atividades de bem-estar animal com solturas para exercício e socialização e enriquecimento ambiental.

3.3.4 Avaliação Comportamental

Para avaliação comportamental, foi elaborada uma ficha contendo os itens a serem respondidos em relação aos parâmetros comportamentais (Tabela 1) selecionados e adaptados, os quais, segundo segundo Sheppard e Mills (2003), Schilder e Van Der Borg (2004), Väisänen *et al.* (2005), Hiby *et al.* (2006), Horváth *et al.* (2007), são os sinais mais frequentemente

demonstrados por cães em situação de estresse. Foi atribuída pontuação para cada parâmetro comportamental, a fim de que sua análise seja quantitativa, realizada por meio de escores.

Cada parâmetro comportamental foi subdividido em quatro variações (escores), as quais foram relacionadas a escores crescentes conforme mais distante ou mais próximo do significado de comportamento relacionado ao estresse, medo ou ansiedade da seguinte forma:

- 1 foi atribuído ao animal relaxado;
- 2 ao menos relaxado;
- 3 ao menos estressado e;
- 4 ao mais estressado. Os escores atribuídos são defendidos pela literatura aqui representada na revisão.

O delineamento do experimento é ilustrado na Figura 2. A avaliação comportamental foi realizada em 5 momentos distintos (Figura 3), sendo esses:

- M1 (animal em seu canil, 20 minutos antes do exame clínico e após 5 minutos do tratamento);
- M2 (animal no chão da sala de espera, 10 minutos antes do exame clínico e após 15 minutos do tratamento);
- M3 (animal durante o exame clínico, após 20 minutos do tratamento);
- M4 (animal no chão da sala de espera, 5 minutos após o exame clínico e 35 minutos após o tratamento);
- M5 (animal em seu canil, 15 minutos após exame clínico e 45 minutos após o tratamento).

Cada momento foi avaliado por 5 minutos, totalizando um tempo de execução de todo o procedimento de mimetização da consulta veterinária (canil, sala de espera e consultório) de 50 minutos por animal.

Os animais foram divididos em 2 parcelas do experimento, sendo cada uma com 12 cães e executadas em 2 dias experimentais com um intervalo de 15 dias entre cada um, nos quais os cães foram do grupo controle em um dia e do grupo tratado no outro. O experimento foi executado no formato de delineamento chamado “Fatorial 2x2 com Medidas Repetidas”, sendo cada animal controle dele mesmo, ou seja, cada animal participou de 2 dias experimentais, sendo um participando do grupo controle e no outro participando do grupo tratado, incluso ou no grupo de concentração de 15% ou de 30%.

Tabela 1: Parâmetros comportamentais e suas variações.

Parâmetros comportamentais	Variações	Escore
Posição corporal geral	Peso distribuído nas 4 patas (relaxado)	1
	Deitado ventralmente	2
	Sentado	3
	Peso distribuído nas 4 patas (musculatura rígida)	4
Ao ser tocado	Relaxado	1
	Treme	2
	Tenta afastar-se	3
	Paralisado	4
Orelhas	Relaxadas	1
	Laterais atentas	2
	Viradas para frente	3
	Viradas para trás	4
Cauda	Relaxada	1
	Abanando	2
	Ereta	3
	Entre as patas traseiras	4
Olhos	Relaxados	1
	Semifechados	2
	Fixo em alguém ou algo	3
	Esclera aparente (“olhos de baleia”)	4
Boca	Relaxada	1
	Fechada e rígida	2
	“Sorriso”	3
	Lábios levantados	4
Vocalização	Grunhir	1
	Latir	2
	Rosnar	3
	Ganir	4
Fora de contexto	Autolimpeza	1
	Bocejar	2
	Lamber o focinho	3
	Hiperventilar	4

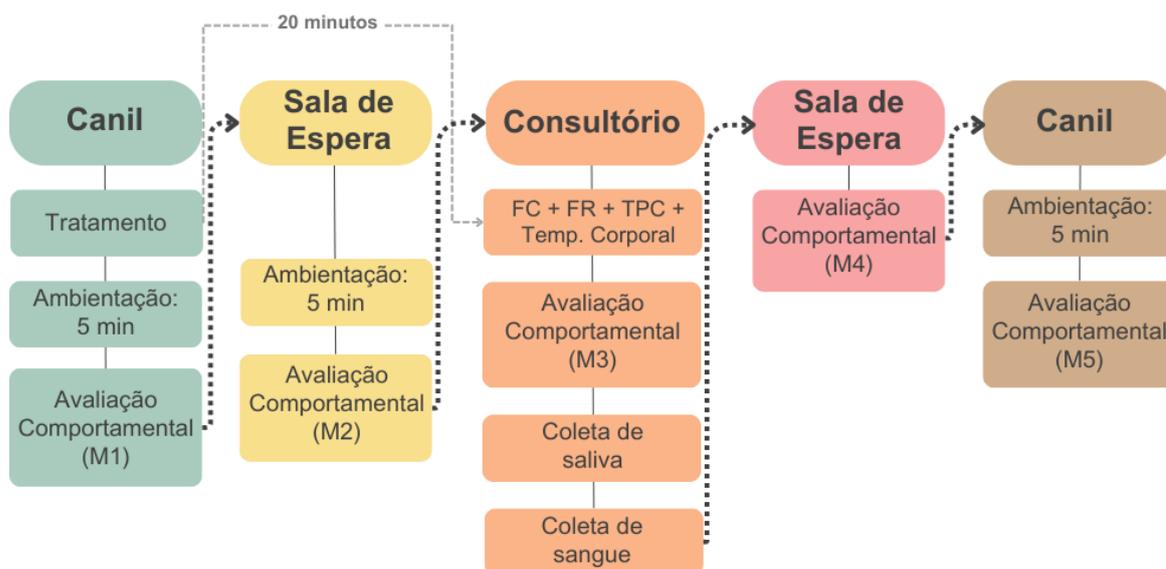


Figura 2: Fluxograma representativo do delineamento experimental. FC = Frequência Cardíaca; FR = Frequência Respiratória; TPC = Tempo de Preenchimento Capilar.



Figura 3: Momentos de avaliação comportamental dos cães. A e B = Diferentes ângulos dos momentos M2 e M4 de avaliação comportamental do cão na sala de espera do consultório, com auxiliar veterinária na contenção e veterinária observadora comportamental; C = Momento M3 de avaliação comportamental, do cão no momento do exame clínico veterinário, com auxiliar e veterinária clínica dentro do consultório, e veterinária observadora comportamental do lado de fora; D = Momento M1 e M5 de avaliação comportamental do cão em seu próprio canil antes e após exame clínico veterinário.

3.3.5 Avaliação Clínica

Para mimetização do contexto de consulta clínica, assim como acompanhamento do efeito das formulações em questão de eventos adversos e do seu efeito a nível comportamental foram mensurados os parâmetros fisiológicos de frequência cardíaca e frequência respiratória por minuto utilizando-se um estetoscópio (*Littmann Classic III*); movimentos respiratórios por inspeção; temperatura corporal, aferida por termômetro digital; mensuração do TPC (tempo de preenchimento capilar) por palpação direta da mucosa gengival e coloração das mucosas (ocular e gengival) por inspeção (Feitosa, 2014). Tais parâmetros foram registrados na Ficha de Avaliação Clínica e ocorreram todos no momento M3 de avaliação comportamental, quando o animal estava em cima da mesa de procedimentos dentro do consultório veterinário (Figura 4).

3.3.5.1 Exame clínico

Os cães foram colocados em cima da mesa de procedimentos pelo auxiliar e examinados clinicamente, com os parâmetros acima citados sendo aferidos pelo médico veterinário, ± 20 minutos após a aplicação da formulação, seja controle ou tratado.



Figura 4: Animal no momento do exame clínico (M3 de avaliação comportamental), com médica e a auxiliar veterinárias.

3.3.5.2 Coleta de saliva

As amostras de saliva foram coletadas usando o SalivaBio Children's Swab (Exclusivamente da Salimetrics, State College, PA), um esfregaço sintético, especificamente projetado para melhorar a coleta de volume. A coleta foi realizada logo após a mensuração de todos os parâmetros do exame clínico, no momento M3 de avaliação comportamental (Figura 5), a fim de obter o nível de cortisol exatamente no processo do exame clínico. O swab foi inserido pela lateral da boca do animal, repousado entre a língua e os dentes, durante 2 minutos e 30 segundos para absorver o máximo de saliva que fosse possível. Após isso, foi armazenado em tubos tipo Falcon de 15 ml e refrigerados a 4° C por no máximo 2 horas, após isso foram congelados a -20° C até o momento da análise. Tal metodologia seguiu o manual de instruções do próprio produto.



Figura 5: Animal com o SalivaBio Children's Swab no interior da boca para coleta da saliva no momento M3 de avaliação comportamental.

3.3.5.3 Coleta de sangue

Adicionalmente os animais foram avaliados com relação aos parâmetros hematológicos como hemograma completo e bioquímica sérica. A auxiliar conteve amigavelmente cada animal para que a médica veterinária pudesse realizar a punção venosa da veia cefálica (Figura 6), coletando cerca de 3 mL de sangue e preenchendo os tubos com EDTA (tampa roxa) e com ativador de coágulo (tampa vermelha). As amostras foram refrigeradas a 4° C e processadas 4 horas após a coleta pelo Setor de Análises Clínicas do LQEPV.



Figura 6: Animal no momento do exame clínico, durante a coleta de sangue pela veia cefálica no momento M3 de avaliação comportamental.

3.3.6 Cortisol Salivar

Para a dosagem de cortisol salivar, foi utilizado o Kit Salimetrics® (Item no. 1-3002, Single 96 Well Kit).

3.3.6.1 Extração das amostras de saliva

As amostras, ainda armazenadas nos swabs em tubos tipo Falcon, foram descongeladas em temperatura ambiente (20-26° C) e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. Os swabs foram inseridos no interior de seringas de 5mL e então pressionados com o êmbolo para extrair toda a saliva possível nos tubos tipo Falcon. Os tubos contendo apenas a saliva foram centrifugados novamente a 1500 rpm por 15 minutos e, então, 100 µL de saliva foram pipetados em duas microplacas para Elisa com 96 poços sem tratamento e estas foram congeladas novamente.

3.3.6.2 Processamento das amostras e dosagem do cortisol salivar

As duas microplacas foram descongeladas em temperatura ambiente (20-26° C) e centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos para que as amostras fossem transferidas para as microplacas de ensaio do kit.

Os passos seguintes seguiram de acordo com o guia de execução do próprio kit de imunoenensaio, sendo adaptados apenas os designs das microplacas (Figura 7).

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3000 Std	1000 Std	0,333 Std	0,111 Std	0,037 Std	0,012 Std	Ctrl-L	Ctrl-H	A1	A2	A3	A4
B	3000 Std	1000 Std	0,333 Std	0,111 Std	0,037 Std	0,012 Std	Ctrl-L	Ctrl-H	A1	A2	A3	A4
C	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16
D	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16
E	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28
F	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28
G	Zero	Zero	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36	A37	A38
H	NSB	NSB	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36	A37	A38

Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	A41	A42	A43	A44	A45	A46	A47	A48				
F	A41	A42	A43	A44	A45	A46	A47	A48				
G	Zero	Zero	3000 Std	1000 Std	0,333 Std	0,111 Std	0,037 Std	0,012 Std	Ctrl-L	Ctrl-H	A39	A40
H	NSB	NSB	3000 Std	1000 Std	0,333 Std	0,111 Std	0,037 Std	0,012 Std	Ctrl-L	Ctrl-H	A39	A40

Figura 7: Design das microplacas de imunoenensaio. Std = padrão; Ctrl-L = controle inferior; Ctrl-H = controle superior; A1 – A48 = amostras de saliva de cada cão; Zero e NSB (Non-Specific Binding) = usados como branco.

As microplacas foram preenchidas, primeiramente, com 25µL das soluções padrões, controles, amostras de saliva e de diluente de ensaio nos poços apropriados conforme o design estabelecido. Após isso, a solução de conjugado enzimático foi diluída no diluente de ensaio e essa solução conjugada diluída foi adicionada a cada poço através de pipeta multicanais (Gilson® 12 canais - 20-300µL), em um volume de 200µL (Figura 8).



Figura 8: Solução conjugada diluída sendo adicionada a cada poço da microplaca de imunoensaio.

As placas foram agitadas em um vórtex a 500 rpm durante 5 minutos e incubadas à temperatura ambiente (20-23,3° C) por 1 hora. Após esse tempo, as placas foram vertidas para descarte do seu conteúdo e então foram 4 vezes lavadas com tampão de lavagem, tendo cada poço esguichado com 300 μ L do tampão e esse conteúdo descartado. Após cada lavagem, as placas foram batidas ligeiramente em uma camada grossa de papel toalha, a fim de extrair o máximo do conteúdo.

Com a mesma pipeta multicanal, o substrato foi adicionado com uma pipeta multicanais (Eppendorf Research® 12 canais), no volume de 200 μ L, em cada poço (Figura 9), mudando a coloração de rosa claro (conjugado diluído) para azul claro, e as placas agitadas em vórtex a 500 rpm por 5 minutos e incubadas à temperatura ambiente, mas envolvidas em papel alumínio para proteção contra a luminosidade durante 25 minutos.

Para finalizar, as placas foram preenchidas com a solução de parada da reação, alterando a coloração de azul para verde instantaneamente (Figura 10) e, em seguida, amarelo conforme à reação, no volume de 50 μ L, e agitadas no vórtex a 500 rpm por 3 minutos. Ao final, foram levadas ao leitor de placas a 450 nm (Figura 11).



Figura 9: Solução de substrato sendo adicionada aos poços da placa de imunoenensaio.

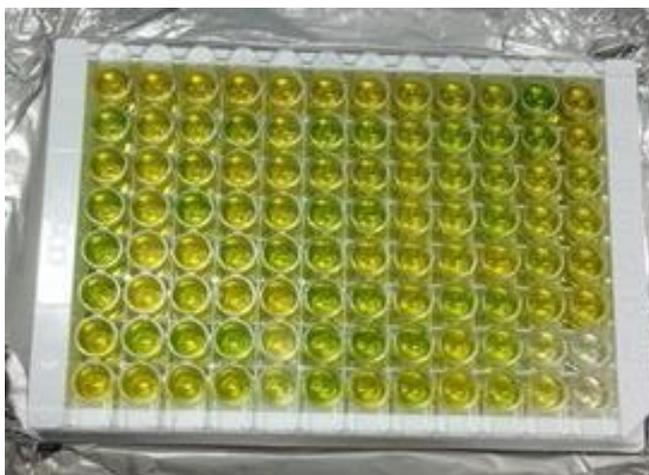


Figura 10: Coloração dos poços mudando de azul para verde e, sem seguida, amarelo, instantaneamente após a solução de parada.



Figura 11: Placa de imunoenensaio completa e inserida no leitor de placas a 450nm.

3.3.6.3 Cálculo para obtenção das concentrações de cortisol

O cálculo para obtenção das concentrações de cortisol salivar de cada amostra foi realizado conforme o manual de uso do Kit Salimetrics® (Item no. 1-3002, Single 96 Well Kit) (Figura 12). Sendo o primeiro passo, o cálculo da densidade óptica (DO) média para todos os poços duplicados.

Após isso, o percentual de ligação foi calculado através da divisão de cada poço padrão, controle e de amostra de saliva pela DO média do zero. E foi feita, então, a construção da curva de regressão linear e obtenção da equação da reta para cálculo das concentrações de cortisol nas amostras.

Well	Standard	Average OD	B	B/Bo	Cortisol (µg/dL)
A1,A2	S1	0.094	0.071	0.048	3.000
B1,B2	S2	0.236	0.213	0.145	1.000
C1,C2	S3	0.524	0.501	0.340	0.333
D1,D2	S4	0.897	0.874	0.593	0.111
E1,E2	S5	1.219	1.196	0.812	0.037
F1,F2	S6	1.379	1.356	0.921	0.012
G1,G2	Bo	1.496	1.473	NA	NA
H1,H2	NSB	0.023	NA	NA	NA

Figura 12: Tabela de exemplo de resultados obtidos pelos cálculos extraída do Manual do Kit Salimetrics®.

O manual orientou que as amostras com valores de cortisol superiores a 3,0 µg/dL (82,77 nmol/L) deveriam ser diluídas com diluente de ensaio e analisadas novamente para obter resultados precisos. Entretanto, não foram obtidas amostras com essa característica. As amostras com valores de cortisol abaixo do limite de leitura do equipamento foram consideradas como ND (Não Detectável) e, estatisticamente, foram convertidos para o valor de 0,001.

3.4 Análise estatística

Para testar as diferenças entre concentrações, levando em consideração as medidas repetidas no mesmo animal (controle e tratado), foram ajustados modelos de equações de estimativas generalizadas para cada variável resposta. Estes modelos de regressão são adequados a dados longitudinais, com realização de medidas repetidas no mesmo indivíduo ao longo do tempo, sendo bastante flexíveis quanto à distribuição de probabilidade da variável resposta (Guimarães & Hirakata, 2012).

Foi ajustado um modelo separado para cada variável resposta mensurada, sendo que o grupo (controle ou tratado) e a concentração, juntamente com a interação entre essas duas variáveis, foram utilizados como preditores (variáveis independentes). Para todas as variáveis foi utilizada uma estrutura de autocorrelação temporal de simetria composta. Apesar de algumas variáveis resposta não apresentarem distribuição normal, a análise dos resíduos de cada modelo demonstrou que essa distribuição foi adequada.

Após o ajuste do modelo, testaram-se os efeitos dos grupos, do tempo, da interação entre elas, de forma global (*overall*), e calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos

de 95% de confiança para cada concentração e para cada grupo. Para verificar a significância da diferença entre concentrações para cada grupo, ou da diferença entre grupos para cada concentração, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (*pairwise*). Para estes testes aplicou-se a correção de Sidak.

A correlação entre as variáveis foi avaliada utilizando-se a correlação não paramétrica de *Spearman* em função de algumas relações serem não lineares. Aplicou-se uma Análise de Componentes Principais, após padronização das variáveis (transformação escore padronizado).

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 4.3.1 (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Questionário online

Foram obtidas 227 respostas, sendo o questionário respondido para cada animal, é possível considerar que as respostas correspondem a 227 cães que foram ao consultório veterinário pelo menos uma vez.

4.1.1 Perfil dos cães

A partir das informações básicas do questionário foi possível traçar o perfil dos cães participantes da pesquisa (Tabela 2).

Obteve-se que 48% estavam na faixa etária adulta, ou seja, de 2-6 anos e 11 meses, 40% estavam na faixa etária acima de 7 anos, ou seja, classificados como idoso, enquanto apenas 11% dos cães possuíam até 1 ano e 11 meses, sendo classificados como filhotes a jovens.

Quanto ao porte, 45% dos cães eram de pequenos, ou seja, possuíam até 10kg de peso, enquanto 33% eram de porte médio, entre 10,1 e 25kg e, 22% de grande porte, com mais de 25kg.

Dos 227 participantes, 23 (10%) relataram que seus cães apresentaram escores comportamentais desfavoráveis ao seu bem-estar em todo o contexto de consulta veterinária (sala de espera, chão do consultório, em cima da mesa de procedimentos e quando manipulados pelo médico veterinário) e, destes, 13 estavam na faixa etária adulta, enquanto 7 na faixa etária de idosos e 3 na faixa etária considerada de filhotes a jovens. Tal resultado é compatível com o estudo, também através de questionário, realizado por Döring *et al.* (2009), no qual os cães

jovens eram significativamente menos medrosos do que os cães de meia-idade e os cães mais velhos.

Em relação ao sexo dos animais, foi obtida uma relação próxima da metade, sendo 52% fêmeas. Dos 23 (10%) que relataram que seus cães apresentaram escores comportamentais desfavoráveis ao seu bem-estar em todo o contexto de consulta veterinária, 15 eram fêmeas. Tal resultado está de acordo com as observações de Lund *et al.* (1996) e Askew (1997), que descobriram que cães machos pareciam ter menor risco de ansiedade geral ou reações de ansiedade excessiva.

Acredita-se que a castração reduz a agressão, a marcação urinária e a perambulação nos machos (Hopkins, *et al.*, 1976; Heidenberger; Unshelm, 1990; Kuhne, 2012). Porém, alguns estudos demonstraram que a castração pode aumentar os níveis de ansiedade em cães e, conseqüentemente, o risco de comportamento agressivo em relação aos humanos (Chung *et al.*, 2011; Puurunen *et al.*, 2020). No questionário, não foi incluída a questão a respeito da fertilidade dos cães, porém, seria um dado relevante para que houvesse discussão acerca dos cães serem castrados ou inteiros e seu comportamento em contexto de consulta veterinária em futuros estudos.

Ao se tratar sobre o ambiente em que os cães viviam com seus responsáveis, apenas 7% viviam em sítio, chácara, fazenda ou similares, enquanto 63% viviam em casa com quintal, tornando possível a observação de que o questionário alcançou uma área mais urbana do que rural.

Em questão da raça dos animais, foi obtido que mais da metade, 56% eram cães com raça definida. Neste questionário não foram discriminadas as raças para que os respondentes pudessem responder em quais seus cães se encaixam por causa da possibilidade do conhecimento dessas pessoas sobre as raças poder ser questionável. E, ao serem questionados se realizavam passeios com seus cães, consideráveis 30,8% dos participantes responderam que não saíam com os cães, com raça definida ou não, para ambientes fora da residência com o intuito de passear e lazer. Dos 23 (10,1%) que relataram que seus cães apresentaram escores comportamentais desfavoráveis ao seu bem-estar em todo o contexto de consulta veterinária, todos não realizavam passeios para o ambiente externo ao lar familiar. Tal resultado demonstra a hipótese de que cães que não realizam passeios para ambientes diferentes do lar familiar apresentam desequilíbrios comportamentais que são desfavoráveis ao seu bem-estar, como

medo e ansiedade, em contexto de visita ao veterinário, por apenas permanecerem em seus lares e não conhecerem ambientes novos.

Tabela 2: Dados dos cães participantes, em número e porcentagem, da pesquisa conforme respondido por seus responsáveis em relação à faixa etária, porte, sexo, ambiente em que o animal vive, raça, se o animal realiza passeios e o vínculo emocional entre o tutor e o animal.

	Características	n	%
Faixa etária	0 - 6 meses	5	2,2
	7 meses - 1 ano e 11 meses	21	9,3
	2 - 6 anos e 11 meses	109	48,0
	7 - 10 anos e 11 meses	53	23,3
	11 anos ou mais	38	16,7
Porte	Pequeno (até 10kg)	102	44,9
	Médio (10,1kg a 25kg)	74	32,6
	Grande (mais de 25,1kg)	51	22,5
Sexo	Fêmea	119	52,4
	Macho	108	47,6
Ambiente em que o animal vive	Apartamento	59	26,0
	Casa sem quintal	15	6,6
	Casa com quintal	143	63,0
	Sítio, chácara, fazenda ou similares	10	4,4
Raça	Sem Raça Definida	99	43,6
	Com Raça Definida	128	56,4
Se realiza passeios com o animal	Sim	155	68,3
	Não	70	30,8
Vínculo	Filho(a)	104	45,8
	Membro da família	89	39,2
	Animal de estimação	34	15,0

Ao serem questionados sobre qual relação de vínculo consideravam ter com seus cães, 46% responderam ter uma relação de filho(a).

De acordo com a Comissão de Animais de Companhia, 2022, em uma pesquisa feita com 750 brasileiros, 31% dos tutores de cães os consideravam como filhos, seguidos de 28% que os consideravam como membro da família. Resultado compatível com a pesquisa aqui realizada através do questionário online, na qual 46% dos 227 participantes responderam que consideravam seus cães como filhos, seguidos de 39% que os consideravam como membros da família. Ao comparar os dois estudos, com a diferença de apenas 1 ano entre eles, foi possível observar o aumento da porcentagem de tutores que consideram os cães tanto como filhos quanto como membros da família, significando que os animais estão cada vez mais próximos dos seres humanos, formando laços e compondo os grupos familiares e em pouco tempo.

4.1.2 Parâmetros comportamentais dos cães

Nesta sessão, os responsáveis responderam em qual escore comportamental seus cães se encaixavam no contexto da consulta veterinária (sala de espera, chão do consultório, em cima da mesa de procedimentos e ao ser manipulado pelo médico veterinário).

Foi possível reunir cada escore comportamental em grupos, sendo um a categoria de escores desfavoráveis ao bem-estar do animal, incluindo os escores “Ansioso”, “Tenso”, “Congelado” e “Agressivo”, e outro a categoria de escores favoráveis, a qual incluía os escores “Receptivo” e “Calmos”.

Alguns estudos sugerem que os tutores são capazes de identificar com precisão sinais evidentes de estresse em um contexto de sala de espera (Mariti *et al.*, 2015; Lind *et al.*, 2017), embora possam perder alguns dos sinais mais sutis de estresse (Mariti *et al.*, 2015), sendo utilizadas como uma medida subjetiva de estresse no contexto veterinário.

Dentre todas as respostas, 59,5% dos participantes responderam que os cães apresentaram comportamentos desfavoráveis ao bem-estar animal de acordo com sua concepção (Figura 13A), o que demonstra que a exposição aos fatores estressores da sala de espera veterinária como ruídos, grande circulação de humanos e outros animais desconhecidos diminui o grau de conforto do indivíduo. Estudos indicam que a grande maioria dos cães e gatos apresenta sinais de medo ao visitar o veterinário (Döring *et al.*, 2009; Mariti *et al.*, 2015 e 2016).

Comportamentos como arfar, lambem os lábios e nariz e bocejar indicam um quadro de ansiedade pontual (Guimarães, 2013), além de que os cães podem reduzir os tamanhos percebidos por outros indivíduos, abaixando o corpo e a cauda e achatando as orelhas para trás, em uma postura submissa, para evitar conflitos ou durante interações estressantes (Handelman, 2012; Hecht; Horowitz, 2015). Ainda como uma resposta ao desconforto, alguns cães podem reagir mantendo-se imobilizados (Lindsay, 2001). Tais definições vão de encontro aos scores desfavoráveis “Ansioso”, “Tenso” e “Congelado”, responsáveis por 33,5%, 18,10% e 7,9%, respectivamente, das respostas obtidas e os caracteriza como nocivos ao bem-estar animal, de forma que interfere negativamente na saúde mental do indivíduo, colocando-o em situações de estresse.

Os scores favoráveis corresponderam a 41% das respostas, significando que 21,6% dos animais apresentaram sinais como olhos semicerrados, abano de cauda de forma ampla e lenta e orelhas relaxadas (Case, 2010) e 18,9% apresentaram sinais como abano de cauda e o

ímpeto de cheirar o ambiente (Stanford, 1981), correspondendo respectivamente aos scores “Calmo” e “Receptivo”.

Um total de 55,9% dos tutores respondeu que os cães, quando estão no chão do consultório veterinário, permaneceram sem conforto mental com a situação (Figura 13B). Tal resultado é compatível com a pesquisa de Beaver (1999), na qual 60% dos cães levados a uma clínica veterinária para exame de rotina apresentavam comportamento submisso e de medo. Os mesmos comportamentos foram observados por Stanford, em 1981, notando que cerca de 70% dos cães estavam “relutantes” em entrar em um consultório veterinário. A relutância foi evidenciada em um estudo realizado por Döring *et al.*, em 2009, o qual demonstrou que 36,3% dos cães caminharam com hesitação ou se esconderam atrás do tutor ao adentrar em um consultório veterinário.

Já no consultório clínico, mais da metade dos tutores responderam que seus cães ofegaram (56,3%, 76/135), segundo as respostas ao questionário. Outros padrões comportamentais possivelmente indicativos de estresse ou situação de conflito do cão incluíam tremer, lambe a boca, choramingar e bocejar.

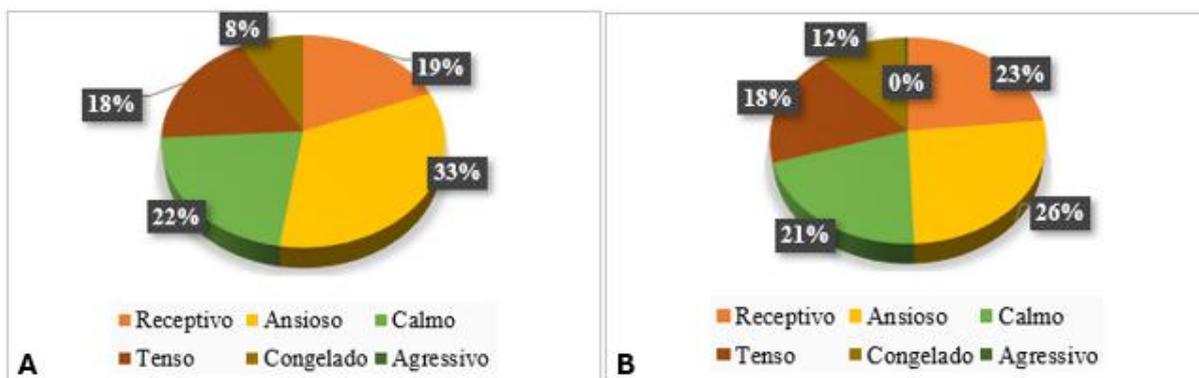


Figura 13: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto estavam na sala de espera (A) e no chão (B) do consultório veterinário, segundo a concepção de seus tutores ao responderem o questionário.

De todos os participantes, 73,6% responderam que seus cães manifestaram os scores comportamentais desfavoráveis (Figura 14), evidenciando que estes cães têm seu grau de bem-estar diminuído ao serem colocados na mesa de procedimentos durante uma consulta veterinária. Resultado compatível com Döring *et al.*, 2009, ao relatar que, na mesa de exame, a maioria dos animais exibiu tremores (61,5%, 83/135 cães), 'comportamento de evitação' e postura agachada (77,8%, 105 cães), e tinham a cauda abaixada ou enfiada entre as patas traseiras (75,6%, 102 cães). Assim, 106 cães (78,5% de n = 135) estavam 'com medo', ao

preencherem no mínimo 3 dos requisitos para serem considerados “medrosos” e 24 cães (17,8%) estavam 'relaxados', sendo considerado da mesma forma. Tais scores foram descritos na questão e defendidos na literatura.

Hendelman (2012), afirma que, em situações estressantes, o cachorro abre seus olhos, expõe a esclera branca e abaixa as orelhas, gestos que indicam aviso de uma ameaça iminente. Bem como Stanford, 1981, ao evidenciar uma postura submissa dos cães, que incluía ter a cauda dobrada entre as patas traseiras, levando a cabeça para baixo e evitando o contato visual. Lindsay, 2001, acrescentou que o cão pode reagir a um estímulo que lhe provoca medo de três formas: luta, fuga ou imobilização. No caso de uma ameaça ligeira ou longínqua, o cão tende a imobilizar-se. O que vai de encontro com os escores “Tenso” e “Congelado”, responsáveis por 29% e 27%, respectivamente, das respostas e os inclui como prejudicial ao animal à medida que afeta sua saúde mental ao lhe colocar em uma situação de estresse agudo, reduzindo seu grau de bem-estar.

Apenas 25,1% dos respondentes disseram que seus cães apresentaram os scores comportamentais benéficos e, Stanford, 1981, também evidenciou a postura corporal dos cães que entravam no consultório veterinário de acordo com tais, ao abanarem a cauda e cheirarem o novo ambiente, acrescentou que os cães cumprimentavam as pessoas e, tipicamente, se posicionavam de modo a apresentar a região de flanco, indo de encontro ao score “Receptivo”, o qual foi responsável por 11% das respostas. Ou mesmo apresentavam sinais de calma em que, segundo Case, 2010, as orelhas ficam relaxadas ou viradas para trás, os olhos estão

semicerrados e a cauda abana num movimento amplo e lento, compatível ao score “Calmo” e observado em 14% das respostas.

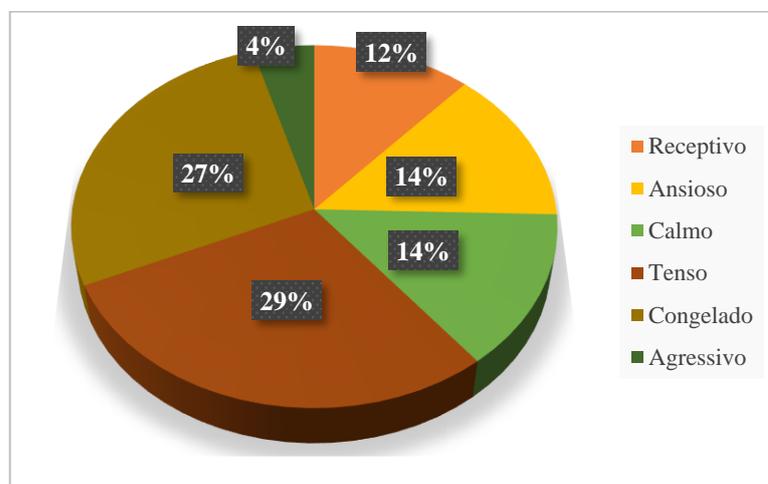


Figura 14: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto estavam na mesa de procedimentos do consultório veterinário, segundo a concepção de seus tutores ao responderem o questionário.

Ao considerar o comportamento do animal quando foi tocado pelo médico veterinário no momento do exame clínico, 59,5% dos tutores responderam que seus cães apresentaram escores desfavoráveis ao seu bem-estar, em sua concepção (Figura 15), ou seja, se portaram de modo a apresentar “Corpo tremendo”, “Pelos eriçados” e “Vocalização”. Enquanto 2% dos participantes preferiram não responder, 38,5% responderam que os seus cães se mantiveram calmos.

É observado que a piloereção ao redor da região do ombro pode sugerir que o cão está com medo, e os pêlos levantados tanto nos ombros quanto na base da cauda podem indicar “um estado emocional ambivalente e sentimento de conflito” (London, 2012). As observações comportamentais indicativas de estresse incluem postura corporal abaixada, respiração ofegante, vocalização, levantamento de patas, tremores corporais e comportamentos repetitivos ou estereotipados (Beerda *et al.*, 2000B). Tais comportamentos vão de encontro com os escores desfavoráveis da saúde mental dos cães.

De acordo com as observações realizadas pelos tutores, quase 60% dos cães participantes da pesquisa manifestaram comportamentos descritos como prejudiciais ao seu bem-estar quando estavam sendo manipulados por médicos veterinários em contexto de exame

clínico, o que pode comprometer a qualidade do exame e, conseqüentemente, a precisão no diagnóstico.

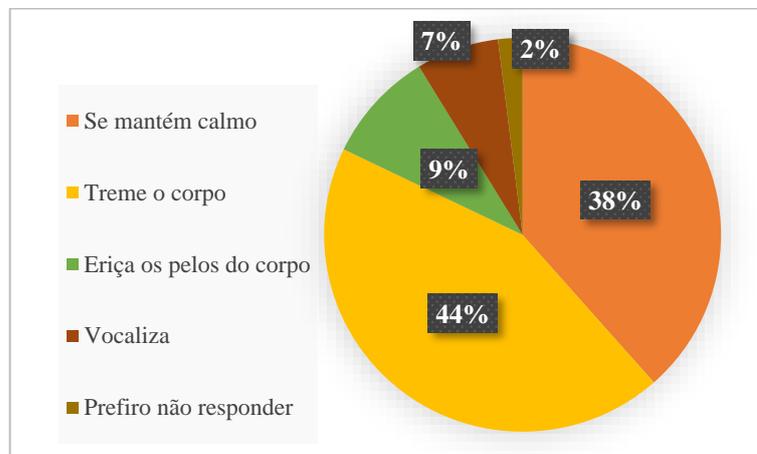


Figura 15: Porcentagem de cães que exibiram cada escore comportamental enquanto foram tocados pelo médico veterinário na consulta veterinária.

4.1.3 Percepção dos responsáveis

Nesta sessão, os participantes foram questionados quanto à sua percepção em relação ao contexto da consulta veterinária (Figura 16).

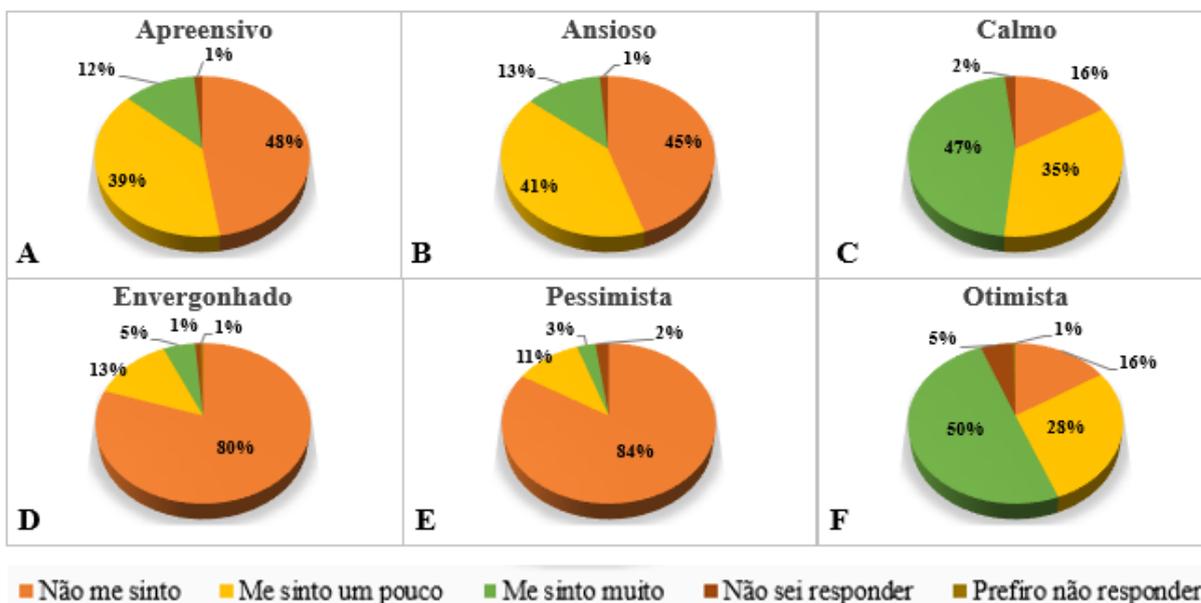


Figura 16: Porcentagens de participantes ao responderem qual perfil emocional se encaixava com seu cão em contexto de consulta veterinária. A – Apreensivo; B – Ansioso; C – Calmo; D – Envergonhado; E – Pessimista e F – Otimista.

Os participantes deveriam graduar em “Não me sinto”, “Me sinto um pouco”, “Me sinto muito” e “Não sei responder” ou que preferiam não responder em relação ao sentimento referente ao perfil emocional que exibiam quando o cão estava em contexto de consulta

veterinária, sendo os sentimentos como “Apreensivo”, “Ansioso”, “Calmo”, “Envergonhado”, “Pessimista” e “Otimista”.

Em relação aos sentimentos considerados positivos (“Calmo” e “Otimista”), 47% e 50% dos respondentes, respectivamente, se sentiam muito, em contrapartida, 32% não se sentiam desta forma.

Já sobre os sentimentos considerados negativos como “Apreensivo”, “Ansioso”, “Envergonhado” e “Pessimista”, obteve-se que 12%, 13%, 1% e 3%, respectivamente, dos participantes se sentiam muito, mas 39% e 41% dos respondentes se sentiam um pouco “Apreensivos” e “Ansiosos”.

Em contrapartida, quase metade dos respondentes não se sentiam “Apreensivos” ou “Ansiosos” e mais de 80% não se sentiam “Pessimistas” ou “Envergonhados”. Portanto, em contexto de consulta veterinária, é possível observar que cerca de 40% dos tutores de cães se sentem um pouco apreensivos e ansiosos e apenas cerca de 13% se sentem um pouco envergonhados e pessimistas, enquanto cerca de 80% deste mesmo público se sente, seja pouco ou muito, calmos e otimistas.

A balança desses resultados pende para o lado dos sentimentos positivos que os tutores de cães exibem sobre seus animais durante consulta veterinária, mas tal fato não anula a preocupação com o grupo, considerável, de tutores que exibem sentimentos negativos.

Estudos indicam que a grande maioria dos cães e gatos apresenta sinais de medo ao visitar o veterinário (Döring *et al.*, 2009; Mariti *et al.*, 2015 e 2016), tornando as visitas veterinárias estressantes também para seus donos (Volk *et al.*, 2011). E estudos sobre saúde mental humana demonstram que cuidar de crianças com doenças mentais tem um efeito negativo na qualidade de vida dos pais (Foldemo *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2011; Hoefman *et al.*, 2014), demonstrando que, quando um membro da família está doente, pode afetar todo o sistema familiar. Como muitos tutores de animais de companhia consideram seus animais de estimação parte da família (Planchon *et al.*, 2002; Arahori *et al.*, 2017; Cassels *et al.*, 2017), é possível que os tutores de animais de estimação com problemas comportamentais encontrem problemas semelhantes.

Segundo Buller e Ballantyne, 2020, os responsáveis que cuidam de animais com desequilíbrios comportamentais podem ser afetados de forma semelhante às pessoas que

cuidam de familiares humanos com doenças mentais e aos que cuidam de animais de estimação com doenças crônicas, e muitos podem sentir sobrecarga dos cuidadores.

Em seu estudo, Buller e Ballantyne, 2020, relatam que os tutores experimentaram emoções positivas e negativas ao possuírem a guarda de cães com desequilíbrios comportamentais, mas muitas mais emoções negativas foram expressas. As emoções negativas relatadas no estudo incluíram raiva, frustração, estresse, preocupação, medo e tristeza, e a maioria dos entrevistados relatou sentir múltiplas emoções negativas. Apesar disso, eles também relataram muitas emoções positivas em relação ao seu animal de estimação e ao seu vínculo. Vários participantes da pesquisa expressaram preocupações sobre o futuro, que chegaria um ponto em que não poderiam mais cuidar do seu animal de estimação ou que a qualidade de vida deles não melhorariam. Esses donos destes animais também descreveram como era difícil considerar a realocação ou a eutanásia. Tanto aqueles que ainda tinham seu animal de estimação quanto aqueles que os realojaram ou sacrificaram por causa do problema comportamental relataram o quanto lutaram com essas decisões (Buller; Ballantyne, 2020).

Apesar da pesquisa ter relatado que mais de 70% dos cães exibiram comportamentos desfavoráveis ao seu bem-estar quando estavam em cima da mesa de procedimentos e quase 60% quando foram manipulados por médicos veterinários, apenas 17% dos participantes disseram ter reduzido a frequência de visita ao médico veterinário pelo motivo de comportamento dos seus cães (Figura 17). Tal resultado levanta a hipótese de que os tutores de cães estão tendenciosos a relevar o comportamento exibido pelos animais em nome de não reduzir as consultas veterinárias em preocupação com sua saúde, já que 83% não reduziram as visitas. Mas não anula a preocupação com os que reduziram, tornando o assunto ainda em debate e como objetivo de pesquisa para que este resultado seja ainda menor futuramente.

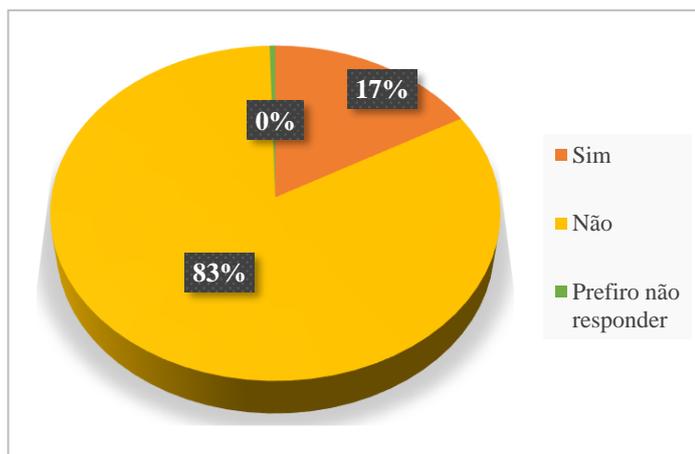


Figura 17: Porcentagem de participantes ao responderem se reduziram a frequência em que visitam o consultório veterinário devido ao comportamento dos seus cães.

Junto a este resultado, ao serem questionados se preferiam o atendimento em domicílio por causa do comportamento exibido por seus cães em ambiente de consultório veterinário, 72% dos respondentes disseram não preferir, mas 25% optaram pelas consultas em domicílio devido ao comportamento dos animais (Figura 18).

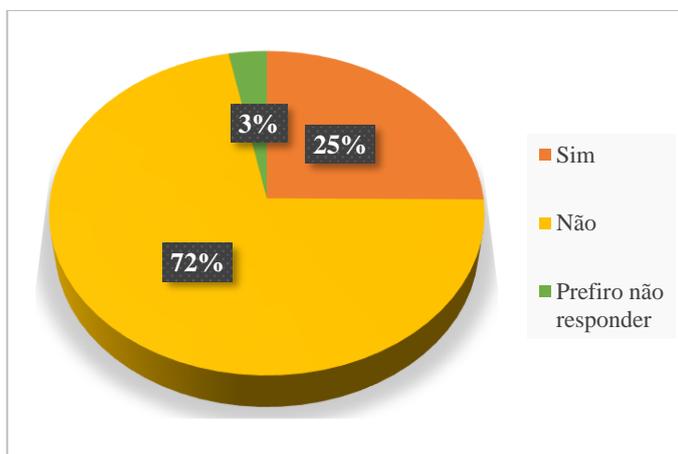


Figura 18: Porcentagem de participantes ao responderem se preferem o atendimento à domicílio devido ao comportamento dos seus cães.

No ato da consulta veterinária, há várias ações que podem influenciar o comportamento do cão, como por exemplo, exposição a outros animais e pessoas desconhecidas (Mills, 2012; Overall, 2013), odores (por exemplo, desinfetantes e feromônios de alarme de outros animais), ruídos (latidos de cães, tosquiadeiras, alarmes, etc.) e superfícies lisas ou escorregadias como revestimentos de piso ou mesas de exame de metal (Overall, 2013) e até mesmo a postura do médico veterinário. Todos esses fatores podem ser anulados quando as visitas do médico veterinário são realizadas em domicílio, sendo executado o exame clínico no próprio ambiente

do cão, no qual se sente confortável e com uma probabilidade reduzida de eventos estressores imprevisíveis.

O estudo de Buller e Ballantyne (2020), um questionário online feito nos Estados Unidos, relatou que vários entrevistados indicaram que a falta de tempo e dinheiro os impediu de seguir os tratamentos recomendados. O nosso questionário pôde apoiar tal literatura ao trazer o resultado, a nível do Brasil, que 59% dos participantes disseram reduzir a frequência que visitam o consultório veterinário por motivos financeiros (Figura 19).

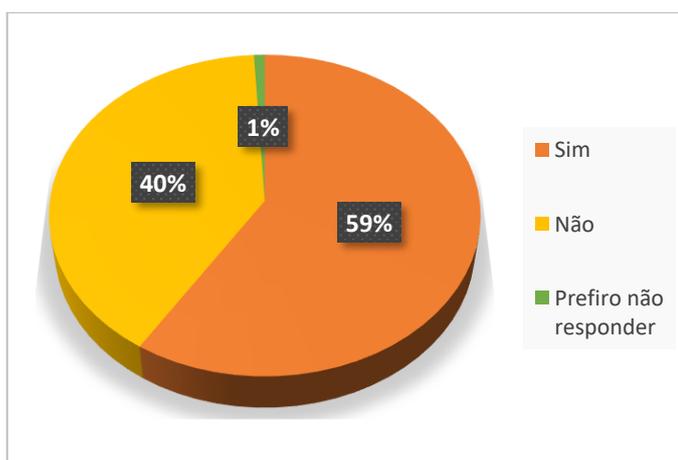


Figura 19: Porcentagem de participantes ao responderem se reduziram a frequência em que visitam o consultório veterinário devido ao financeiro.

Segundo LaValle *et al.* (2017) e Mueller (2018), as limitações financeiras e o custo dos cuidados veterinários são as barreiras mais frequentemente comunicadas à obtenção de cuidados com a saúde dos animais. Os tutores de animais de estimação ficam muitas vezes surpreendidos com o custo dos cuidados veterinários e 59% concordam ou concordam totalmente que os custos das visitas de rotina são superiores ao esperado (AAHA, 2014; Volk, 2011). Além disso, os donos de animais de estimação de todas as faixas de renda consideram os cuidados veterinários caros, e 29% dos donos de animais de estimação relataram pelo menos um caso de não conseguirem pagar pelos serviços veterinários (Lue, 2008). Entretanto, os dados da literatura mencionada, bem como do estudo aqui defendido, não são para culpabilizar o atendimento veterinário reduzido por motivação financeira, mas sim para evidenciar que este é um fator a ser considerado e mais pesquisado. Afinal, se Lue, 2008, relata que todos os tutores de todas as faixas de renda, considerando os tutores encaixados nas classificações mais altas de renda, consideram o atendimento veterinário caro, talvez seja possível pensar em uma questão

de prioridade financeira da vida da população, na qual os animais não se encaixem no topo da lista, apesar do vínculo emocional que representam nas famílias interespecie.

Ao pensar no contexto brasileiro, para os cuidados com a saúde humana, há o Sistema Único de Saúde (SUS), o qual é constituído pelo “conjunto de ações e serviços de saúde, prestados por órgãos e instituições públicas federais, estaduais e municipais, da administração direta e indireta e das fundações mantidas pelo poder público” (Brasil, 1990, p.1), este possui todos os serviços como sendo gratuitos à população, e esta, caso não realize pesquisas em portais de transparência, acabam por desconhecer os custos dos serviços de saúde humana individualmente. Para o cuidado com a saúde dos animais de estimação, não há um programa unificado nacionalmente em que a população brasileira tenha acesso aos serviços de forma gratuita, estando expostos, assim, aos serviços veterinários privados e, devido a esta ser, possivelmente, a única forma de atendimento, acabam por obter mais informações sobre os custos deste atendimento. O desconhecimento do custo com a própria saúde junto ao conhecimento dos custos variados com a saúde dos cães e gatos sob sua responsabilidade pode ocasionar em uma sensação de que o preço do atendimento veterinário é acima do preço que consideram justo.

4.2 Formulação

Durante os testes, foi possível perceber que a formulação apresentou estabilidade se mantendo límpida, transparente, sem formação de precipitados e separação de fases, quando submetida aos ensaios de estabilidade física.

A formulação desenvolvida apresentou adequadas características físico-químicas e estabilidade se tornado viável para aplicação tópica em animais de companhia.

Durante os cinco dias seguidos de avaliação do pH, observou-se a média de 6,16, estando adequado à faixa de referência de aplicação tópica em animais de 5,5 a 7,0.

A formulação na bancada mostrou aumento 0,0587% em frasco âmbar e 0,0828% em frasco transparente; em aquecimento teve aumento de 0,1831% em frasco âmbar e 0,4139% em frasco transparente; na geladeira apresentou aumento de 0,1439% e 0,0186% nos frascos âmbar e transparente, respectivamente; e no freezer teve perda de 0,0683% no frasco âmbar e aumento de 0,0027% no frasco transparente. Todos os valores se mantiveram inferiores a 0,5%, estando, assim, dentro da faixa aceitável de perda.

4.2.1 Tratamento

A equipe envolvida na avaliação comportamental e no exame clínico não teve conhecimento do tratamento, o estudo foi cego, apenas o colaborador que realizou a randomização, o qual formulou uma codificação para informar ao colaborador que trataria os animais sem que este soubesse qual tipo de tratamento faria.

Foram definidas 3 cores (vermelha, verde e azul), cada uma representando uma formulação (placebo, [30%] e [15%]), então o colaborador da randomização definiu a cor para cada animal conforme o tipo de tratamento e repassou desta forma para o colaborador do tratamento, fazendo com que apenas uma pessoa fosse não-cega em todo o experimento.

A formulação foi aplicada através de uma seringa de 1mL. Foram separadas 3 seringas (vermelha, verde e azul), uma para cada formulação (placebo, [30%] e [15%]). O colaborador aplicou 0,5 mL da formulação respectiva na face interna de cada orelha do cão e massageou em direção horária para maior distribuição e aderência (Figuras 20 e 21).



Figura 20: Colaborador aspirando a formulação com a seringa (1 mL) respectiva.



Figura 21: Colaborador aplicando 0,5 mL da formulação respectiva ao cão.

Não foram observados quaisquer sinais dermatológicos nos cães nas horas e dias após a aplicação das formulações. Em 2009, Komiya *et al.*, aplicaram óleo de lavanda, como teste, no abdômen de 5 cães da raça beagle de 2 anos e meio e não observaram irritações. Após esse teste, realizaram a aplicações sucessivas de óleo de lavanda no pavilhão interno de cada orelha e não resultaram em lesões dermatológicas graves, com uma concentração de 4%. Os autores acreditaram que os componentes químicos do óleo penetrariam na pele e entrariam na corrente sanguínea por esses serem presumivelmente solúveis em lipídios. O aroma do óleo de lavanda também poderia ter estimulado quimicamente o sistema olfativo, resultando em uma resposta fisiológica, ou alguns componentes do óleo poderiam ter sido inalados.

Não houve a necessidade de contenção dos animais, à medida que o colaborador se aproximou e os tocou, estes aceitaram a manipulação sem hesitação.

4.3 Ensaio clínico

4.3.1 Cães

Na Tabela 3, são reunidas as informações de nome, número do microchip, sexo, pelagem, peso e idade dos 38 animais pré-selecionados para o experimento, os quais se encaixavam nos critérios exigidos, como a idade entre 6 e 18 meses e que não tivessem sido manejados para pesquisas clínicas até o momento do experimento no biotério.

Após análise de todas as filmagens dos 38 cães, foram obtidos 13 comportamentos (Tabela 4).

Tabela 3:Dados dos cães pré-selecionados para o experimento.

Animal	Microchip	Sexo	Pelagem	Peso (kg)	Idade (Meses)
Isa	385606	Fêmea	Tricolor	6,35	15
Ivan	385603	Macho	Tricolor	7,95	15
Jandira	285601	Fêmea	Tricolor	6,50	15
Juquinha	385602	Macho	Tricolor	9,80	15
Jurema	385610	Fêmea	Tricolor	6,15	15
Jussara	385617	Fêmea	Tricolor	7,35	15
Keila	787846	Fêmea	Tricolor	7,30	14
Klaus	787754	Macho	Tricolor	8,60	14
Loba	787760	Fêmea	Tricolor	8,40	14
Luar	787776	Fêmea	Bicolor	9,90	14
Magali	787765	Fêmea	Tricolor	7,85	14
Neville	787839	Macho	Tricolor	9,15	13
Nikita	787803	Fêmea	Tricolor	7,40	13
Núbia	787818	Fêmea	Tricolor	7,70	13
Nugget	787822	Macho	Tricolor	8,40	13
Orégano	787772	Macho	Tricolor	6,95	13
Palmito	787759	Macho	Tricolor	8,30	12
Pandeiro	787757	Macho	Tricolor	7,90	12
Paula	787750	Fêmea	Tricolor	6,90	12
Pedrita	787749	Fêmea	Tricolor	6,60	12
Pericles	787755	Macho	Tricolor	7,25	12
Picles	787777	Macho	Tricolor	7,60	12
Quasar	787819	Macho	Tricolor	7,95	12
Queen	787817	Fêmea	Tricolor	6,20	12
Ramon	787837	Macho	Tricolor	6,25	11
Rayane	787813	Fêmea	Tricolor	6,30	11
Romero	787836	Macho	Bicolor	6,30	11
Roxanne	787807	Fêmea	Tricolor	5,50	11
Saquê	787766	Macho	Tricolor	7,00	11
Sashimi	787770	Macho	Tricolor	5,08	11
Shitaki	787769	Macho	Tricolor	6,25	11
Sunomono	787758	Macho	Tricolor	7,30	11
Sushi	787763	Macho	Tricolor	7,00	11
Tatá	787773	Fêmea	Tricolor	5,60	11
Taynara	787792	Fêmea	Tricolor	5,80	11
Theodoro	787774	Macho	Tricolor	6,65	11
Tierry	787797	Macho	Tricolor	6,35	11
Tobias	787789	Macho	Tricolor	7,50	11

Tabela 4: Comportamentos exibidos pelos animais na fase de seleção e sua descrição.

<i>Comportamento</i>	<i>Descrição</i>
<i>Em pé na grade</i>	Quando o cão se posiciona em pé na grade do canil, pulando e podendo vocalizar e/ou jogar a cabeça para trás.
<i>Em pé na parede</i>	Quando o cão se posiciona em pé na parede interna do canil, na área de cobertura.
<i>Andando</i>	Quando o cão anda por toda a extensão do canil, seja na área de solário ou coberta.
<i>Entrou para cobertura</i>	Quando o cão entra para a área de cobertura e permanece olhando para cima e investigando o ambiente, farejando.
<i>Sentou</i>	Quando o cão senta, flexionando as patas traseiras e estendendo as patas dianteiras, seja na área de solário ou na área de cobertura.
<i>Coceira ou Autolimpeza</i>	Quando o cão realiza movimentos de coceira ou autolimpeza, se lambendo pelo corpo.
<i>Deitou no solário</i>	Quando o cão estende todo o corpo, realizando decúbito lateral ou ventral na área de solário do canil.
<i>Mordeu a grade</i>	Quando o cão realiza movimentos de morder a grade do canil.
<i>Interação com a cama</i>	Quando o cão realiza movimentos de mordida, arranhadura e/ou qualquer toque que tire a cama do lugar.
<i>Andando na grade</i>	Quando o cão anda de um canto a outro de um dos lados da grade do canil mais de 6 voltas seguidas.
<i>Deitou na área coberta</i>	Quando o cão estende todo o corpo, realizando decúbito lateral ou ventral na área coberta do canil.
<i>Vocalização</i>	Quando o cão emite sons como uivo ou grunhido por mais de 4 segundos.
<i>Acuado</i>	Quando o cão se posiciona em algum canto do canil com postura a tentar diminuir seu tamanho, se encolhendo, recolhendo a cauda e abaixando a cabeça.

Conforme apresentado na Figura 22, dos 13 comportamentos observados, 4 foram exibidos por todos os animais, sendo 2 deles considerados como os comportamentos mais agitados, como “Em pé na grade” e “Andando pelo canil”, e os outros 2 considerados como mais calmos, como “Sentou na área de solário” e “Deitou na área de solário”. A representação é baseada em Pareto, uma ferramenta de priorização, auxiliando na justificativa para escolha desses parâmetros para a randomização dos animais. Exibidos por cerca de 80% dos animais foram os 2 comportamentos considerados neutros como “Entrou para cobertura” e “Se coçou ou realizou autolimpeza”. Em menor proporção, foram os comportamentos considerados como outros: “Em pé na parede”; “Mordeu a grade”; “Interação com a cama”; “Andando de um lado para o outro”; “Deitou na área coberta”; “Vocalização” e “Acuado” com, respectivamente, 26,32%; 13,16%; 18,42%; 2,63%; 13,16%; 2,63% e 2,63% de animais que os exibiram.

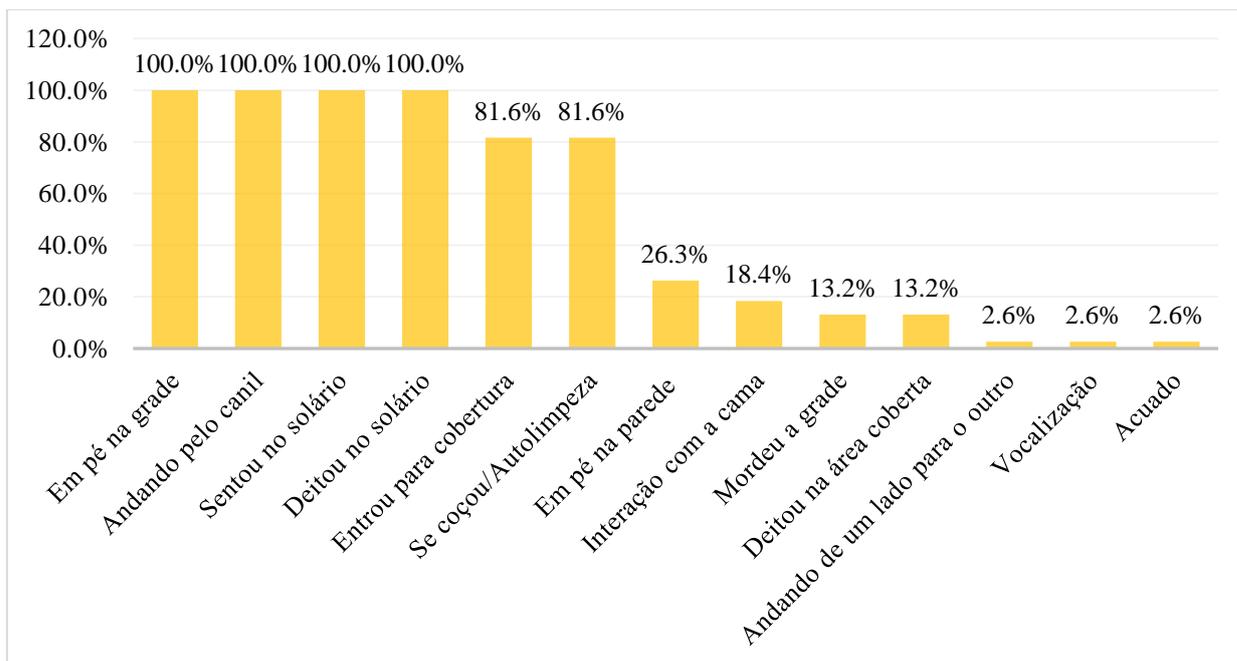


Figura 22: Gráfico de Pareto representando o a porcentagem e o número de animais que exibiram cada tipo de comportamento observado nas filmagens.

Através da porcentagem de comportamentos agitados que cada animal apresentou e da sua amplitude, os 38 cães foram divididos em 4 escores comportamentais (Tabela 5).

Tabela 5: Animais pré-selecionados para o experimento divididos em escores comportamentais de acordo com a frequência em porcentagem de exibição dos comportamentos caracterizados como "agitados", "calmos", "neutros" e "fora do contexto".

Animal	Sexo	% Agitados	% Calmos	% Neutros	% Fora do contexto	Escore
Tatá	Fêmea	66.67%	18.52%	14.81%	0.00%	ESCORE 4
Saquê	Fêmea	66.67%	27.78%	3.70%	1.85%	
Shitaki	Fêmea	61.11%	35.19%	3.70%	0.00%	
Pericles	Macho	57.41%	33.33%	9.26%	0.00%	
Pedrita	Fêmea	57.41%	24.07%	16.67%	1.85%	
Tobias	Macho	55.56%	42.59%	1.85%	0.00%	
Keila	Fêmea	53.70%	25.93%	16.67%	3.70%	
Magali	Fêmea	51.85%	29.63%	18.52%	0.00%	ESCORE 3
Picles	Macho	50.00%	40.74%	5.56%	3.70%	
Luar	Fêmea	50.00%	40.74%	9.26%	0.00%	
Juquinha	Macho	50.00%	37.04%	7.41%	5.56%	
Romero	Macho	50.00%	40.74%	9.26%	0.00%	
Jandira	Fêmea	48.15%	33.33%	16.67%	1.85%	
Queen	Fêmea	48.15%	35.19%	16.67%	0.00%	
Rayane	Fêmea	48.15%	40.74%	9.26%	1.85%	ESCORE 2
Isa	Fêmea	46.30%	25.93%	16.67%	11.11%	
Jussara	Fêmea	46.30%	33.33%	20.37%	0.00%	
Theodoro	Macho	46.30%	46.30%	7.41%	0.00%	
Tierry	Macho	44.44%	55.56%	0.00%	0.00%	
Jurema	Fêmea	42.59%	42.59%	11.11%	3.70%	
Loba	Fêmea	42.59%	29.63%	27.78%	0.00%	
Neville	Macho	42.59%	40.74%	12.96%	3.70%	ESCORE 1
Ramon	Macho	42.59%	31.48%	25.93%	0.00%	
Sushi	Macho	42.59%	48.15%	9.26%	0.00%	
Ivan	Macho	40.74%	40.74%	11.11%	7.41%	
Nikita	Fêmea	40.74%	37.04%	22.22%	0.00%	
Núbia	Fêmea	40.74%	40.74%	11.11%	7.41%	
Pandeiro	Macho	38.89%	22.22%	20.37%	18.52%	
Quasar	Macho	38.89%	38.89%	20.37%	1.85%	ESCORE 1
Taynara	Fêmea	38.89%	40.74%	20.37%	0.00%	
Sashimi	Macho	38.89%	51.85%	9.26%	0.00%	
Paula	Fêmea	37.04%	53.70%	9.26%	0.00%	
Roxanne	Fêmea	35.19%	38.89%	22.22%	3.70%	
Orégano	Macho	33.33%	51.85%	14.81%	0.00%	
Nugget	Macho	31.48%	42.59%	22.22%	3.70%	
Klaus	Macho	31.48%	42.59%	20.37%	5.56%	ESCORE 1
Sunomono	Macho	31.48%	53.70%	9.26%	5.56%	
Palmito	Macho	25.93%	27.78%	20.37%	25.93%	
Amplitude		40.74%	37.04%	13.89%	12.96%	

Cada escore comportamental obteve uma quantidade variável de animais e de sexo (Figura 23), sendo os escores 1 e 2, ou seja, com maior proporção de exibição de comportamentos “Calmos”, com maior concentração de animais machos e os escores 3 e 4, ou seja, com maior proporção de exibição de comportamentos “Agitados”, com maior concentração de animais fêmeas.

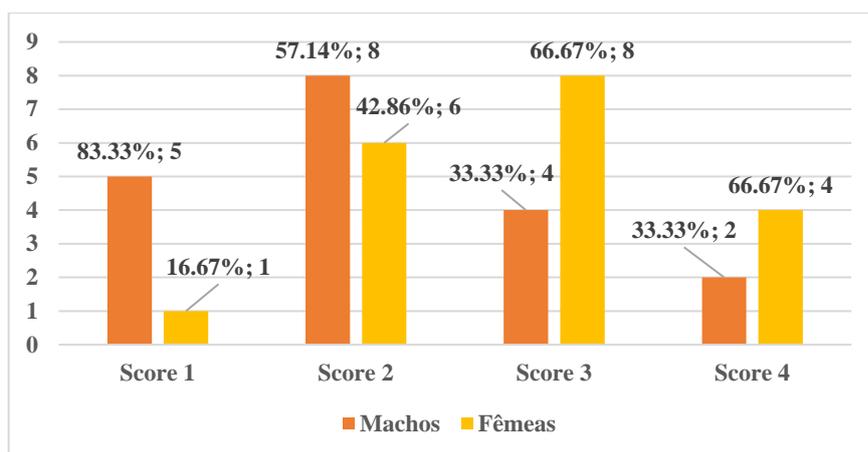


Figura 23: Relação de cães machos e fêmeas conforme cada escore comportamental.

Após a divisão em escores, foram então selecionados 24 animais e estes divididos nos grupos de tratamentos de acordo com as suas exibições de comportamentos agitados (Tabela 6).

Tabela 6: Animais selecionados divididos nos grupos de tratamento com cada formulação.

Grupo 15%			Grupo 30%		
Sexo	Nome	Score (%)	Sexo	Nome	Score (%)
F	Tatá	66.67	F	Saquê	66.67
M	Pericles	57.41	F	Shitaki	61.11
M	Juquinha	50	M	Tobias	55.56
F	Queen	48.15	F	Rayane	48.15
F	Isa	46.3	M	Tierry	44.44
M	Picles	50	M	Theodoro	46.3
F	Núbia	40.74	F	Loba	42.59
M	Palmito	25.93	F	Nikita	40.74
M	Sushi	42.59	M	Ramon	42.59
F	Taynara	38.89	F	Paula	37.04
F	Roxanne	35.19	M	Sunomono	31.48
M	Nugget	31.48	M	Orégano	33.33
	Soma	533.35		Soma	550.00
	Média	44.45		Média	45.83
	DP	11.22		DP	10.69

DP = Desvio padrão

De acordo com tais grupos, foi montada a logística do experimento, conforme os grupos de tratamento e os dias experimentais para que fossem controles em um e tratados em outro (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos animais conforme dia experimental e grupo controle ou tratado.

TRATAMENTO 1ª RODADA			TRATAMENTO 2ª RODADA		
D0		D+15	D0		D+15
Controle	Tatá	Tratado	Controle	Pericles	Tratado
	Juquinha	15%		Isa	15%
	Saquê	Tratado		Shitaki	Tratado
	Tobias	30%		Tierry	30%
Tratado 15%	Queen	Controle	Tratado 15%	Palmito	Controle
	Sushi			Roxanne	
	Taynara			Picles	
	Nugget			Núbia	
Tratado 30%	Rayane	Tratado 30%	Tratado 30%	Nikita	Tratado
	Ramon			Sunomono	
	Paula			Theodoro	
	Orégano			Loba	

4.3.2 Avaliação Comportamental e Exame Clínico

O exame clínico foi realizado 20 minutos após o tratamento, tempo defendido por Poutaraud *et al.*, em 2018, em que realizaram um experimento com a aplicação em forma de “roll-on” de 2 mL de óleo de lavanda em uma concentração de 10% nos focinhos de cavalos e, neste estudo, também foi coletado o sangue dos animais e a farmacocinética do linalol no plasma apresentou um pico 20 minutos após a aplicação do óleo essencial de lavanda.

Inferir níveis de estresse apenas a partir de respostas fisiológicas é difícil, pois a excitação biológica por si só não é sinônimo de estado emocional negativo. Como tal, as medidas comportamentais também são comumente utilizadas em investigações de estresse (Beerda *et al.*, 1998, 2000; Hekman *et al.*, 2012; Mariti *et al.*, 2015).

As medidas de estresse usadas para investigar a experiência em um contexto veterinário incluem: cortisol salivar, frequência cardíaca, temperatura retal, temperatura máxima da

superfície ocular, frequência respiratória e pressão arterial, bem como sinais comportamentais, como resposta a abordagem de humanos ou interação e disposição para entrar na sala de espera ou consultório (Petra *et al.*, 2019).

Para elucidar os resultados estatisticamente, algumas perguntas são necessárias de serem respondidas como: “Existe diferença entre o grupo controle e tratado, independente da concentração utilizada?”; “Existe diferença entre cada concentração independente de grupo?” e “O efeito do tratamento é afetado pelo tipo de concentração?”.

Em relação à temperatura corporal dos animais (Figura 24), foi possível observar que, 8 dentre os 12 animais tratados com a concentração de 15%, tiveram sua temperatura corporal maior quando foram do grupo controle e 1 animal manteve a temperatura igual em ambos os momentos. Ao olhar o grupo dos animais tratados com a concentração de 30%, apenas 2 animais tiveram seu valor de temperatura corporal maior quando foram do grupo controle e 2 animais mantiveram os valores iguais em ambos os momentos.

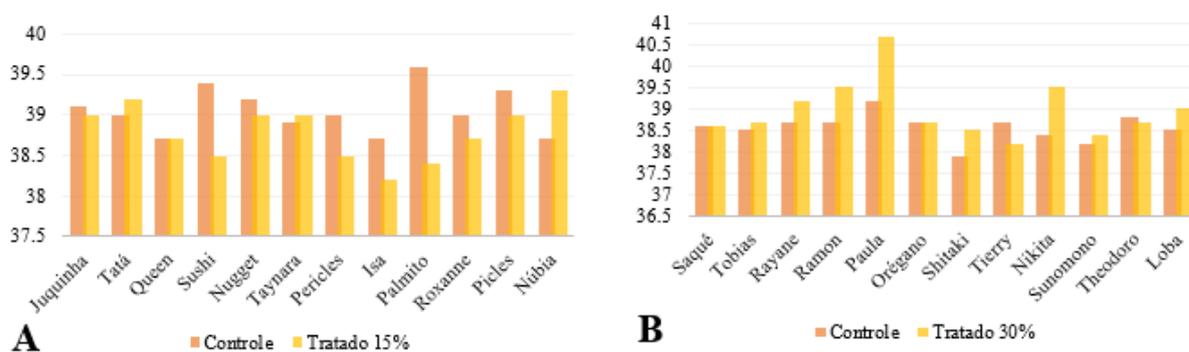


Figura 24: Resultado dos valores de temperatura corporal por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.

Foi observado um efeito significativo da interação entre grupo controle e concentração ($P = 0,007$), mas também entre as concentrações apenas para o grupo controle, com a concentração de 15% apresentando um valor médio significativamente maior que a concentração de 30%. Além disso, o grupo tratado com a concentração de 15% apresentou uma queda significativa da temperatura média corporal em relação ao grupo controle de mesma concentração. É possível que tal resultado seja explicado pela influência da temperatura ambiental nos dias do experimento (Figura 25).

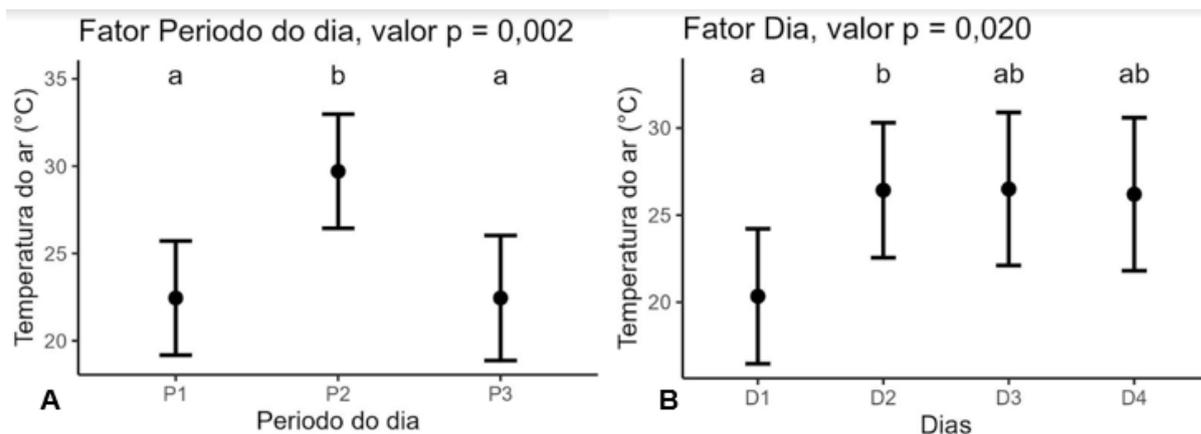


Figura 25: Análise de médias das temperaturas ambientais dos dias experimentais. A = Gráfico representante dos períodos do dia, sendo P1 = 01:00 às 09:00; P2 = 10:00 às 17:00 e P3 = 18:00 às 00:00. B = Gráfico representante dos dias experimentais, sendo D1 = D0 da 1ª rodada; D2 = D+15 da 1ª rodada; D3 = D0 da 2ª rodada; D4 = D+15 da 2ª rodada.

O D1, ou seja, D0 da 1ª rodada do experimento, apresentou uma média significativamente menor que os outros 3 dias do período 2, ou seja, das 10:00 às 17:00, apresentou uma média significativamente maior que os outros dois períodos. Para obter tal análise, foi realizado o teste estatístico ANOVA de 2 fatores sem interação, já que não havia réplicas das medidas em cada período em cada dia.

O experimento aconteceu ao longo do período do dia das 8:00 às 17:00, com cada animal ocupando ± 40 min e tendo seu horário de avaliação igual tanto no D0 quanto no D+15. Portanto, o período 2 corresponde a maior parte do experimento, sendo então considerado como principal na análise. A temperatura média com desvio padrão do dia D0 ($21.6^{\circ}\text{C} \pm 5.4^{\circ}\text{C}$) da 1ª rodada foi significativamente menor quando comparada aos outros dias experimentais: D+15 ($25.8^{\circ}\text{C} \pm 5.3^{\circ}\text{C}$) da 1ª rodada, D0 ($26.5^{\circ}\text{C} \pm 3.3^{\circ}\text{C}$) e D+15 ($26.5^{\circ}\text{C} \pm 3.3^{\circ}\text{C}$) da 2ª rodada (Figura 25). Tal discrepância entre as temperaturas ambientais pode ser a justificativa para a média dos animais do grupo tratado com 15% serem maiores quando foram controles.

Ao considerar os outros parâmetros avaliados, a Tabela 8 reúne os resultados e a suas médias obtidos tanto no exame clínico (Frequências Cardíaca e Respiratória) quanto na avaliação comportamental realizada no momento que o animal estava sendo examinado (M3) e do cortisol salivar de cada animal quando este foi controle e quando foi tratado.

Tabela 8: Resultado dos parâmetros da avaliação clínica e comportamental e do cortisol salivar para cada animal conforme foram do grupo controle e tratado.

ANIMAIS			CONTROLE				TRATADO				
Sexo	Nome	Microchip	FC	FR	COMP	CORT	[]	FC	FR	COMP	CORT
M	Juquinha	385602	152	28	15	0,234	15%	148	28	7	0,001
F	Tatá	787773	148	24	20	0,536	15%	136	44	14	0,001
F	Queen	787817	120	44	15	0,001	15%	108	32	9	0,133
M	Sushi	787763	112	44	19	0,001	15%	120	36	8	0,433
M	Nugget	787822	108	36	15	0,001	15%	92	28	7	0,045
F	Taynara	787792	112	36	16	0,001	15%	128	24	10	0,001
M	Pericles	787755	108	28	16	0,610	15%	128	32	13	0,832
F	Isa	385606	100	24	15	1,752	15%	104	28	13	0,418
M	Palmito	787759	84	28	11	0,883	15%	136	32	14	0,373
F	Roxanne	787807	76	28	17	0,066	15%	116	48	12	0,625
M	Picles	787777	84	28	17	0,685	15%	96	32	11	0,805
F	Núbia	787818	96	36	11	0,638	15%	128	36	13	0,646
	Média±dp		108±23 ^a	32±7 ^a	15±2 ^a	0,45±0,5 ^a		120±17 ^a	33±6 ^a	10±2 ^b	0,36±0,3 ^a
F	Saquê	787766	84	24	17	0,689	30%	136	40	17	0,679
M	Tobias	787789	104	20	11	0,521	30%	128	28	6	0,599
F	Rayane	787813	96	24	12	0,758	30%	92	32	9	0,629
M	Ramon	787837	144	36	10	0,755	30%	116	28	10	0,698
F	Paula	787750	112	32	22	0,667	30%	100	44	18	0,452
M	Orégano	787772	128	48	14	0,734	30%	128	36	7	0,43
F	Shitaki	787769	114	36	19	0,514	30%	84	32	12	0,442
M	Tierry	787797	112	32	14	0,204	30%	100	24	9	0,467
F	Nikita	787803	112	28	20	0,502	30%	120	28	12	0,281
M	Sunomono	787758	72	32	10	0,001	30%	108	28	6	0,339
M	Theodoro	787774	148	40	22	0,001	30%	104	28	13	0,001
F	Loba	787760	92	32	8	0,001	30%	116	40	14	0,001
	Média±dp		109±22 ^a	32±7 ^a	15±5 ^a	0,45±0,3 ^a		111±16 ^a	32±6 ^a	11±4 ^b	0,42±0,2 ^a

Valores seguidos pela mesma letra na linha da média não diferiram significativamente entre si, com nível de significância de 5%; valores seguidos por letras diferentes na coluna dos dias, diferiram entre si, com nível de significância de 5%. FC = Frequência Cardíaca; DP = Desvio Padrão; COMP = Comportamento e CORT = Valor de Cortisol Salivar

Ao analisar os resultados em média, foi possível observar que a média da frequência cardíaca (Tabela 8) foi discretamente maior nos grupos controle em relação aos dois grupos tratados, e menor no grupo tratado com 30% em relação ao grupo tratado com 15%. Enquanto a média dos resultados de frequência respiratória foi similar em todos os grupos (Tabela 8). Com isso, não foram observados efeitos significativos entre os controles, entre os grupos tratados e nem entre grupos controles e tratados para os parâmetros de frequências cardíaca e respiratória ($p>0,05$).

Em relação ao parâmetro de frequência cardíaca avaliado de forma individual dos animais (Figura 26), pode-se observar que, no grupo dos animais tratados com 15%, apenas 3 de 12 animais tiveram sua frequência cardíaca menor quando fora do grupo tratado e 2 mantiveram iguais quando controles e quando tratados. No grupo dos animais tratados com 30%, 6 de 12 animais tiveram seus valores menores quando tratados, enquanto apenas 1 manteve igual em ambos os momentos. Ou seja, a formulação, seja de 15% ou 30%, não pôde reduzir a frequência cardíaca de forma significativa dos cães quando submetidos ao exame clínico.

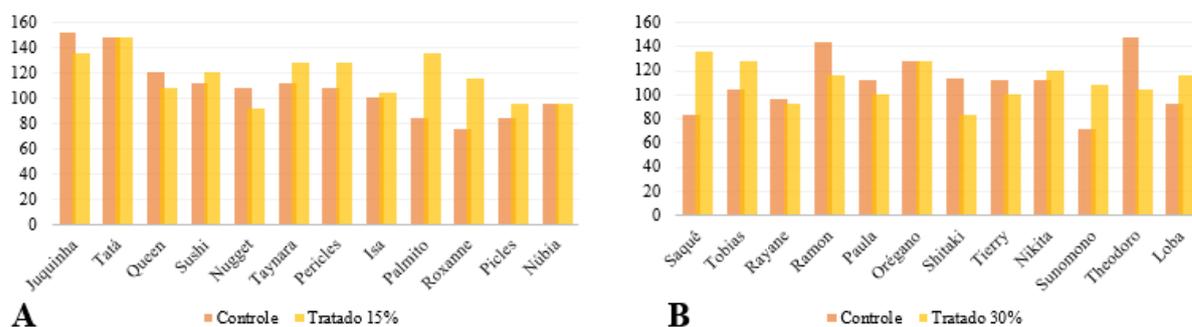


Figura 26: Resultado dos valores de frequência cardíaca por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.

Quando observados os resultados da frequência respiratória dos animais (Figura 27), no grupo tratado com 15%, apenas 4 animais tiveram sua frequência diminuída quando tratados em relação à quando foram do grupo controle e 1 animal se manteve igual. Já os animais do grupo tratado com 30%, 6 de 12 animais tiveram seus valores de frequência respiratória menores quando tratados a quando foram do grupo controle e 1 animal se manteve igual. Ou seja, a formulação não obteve a redução da frequência respiratória como resultado em cães submetidos ao exame clínico comparados ao seu momento sob uso de placebo.

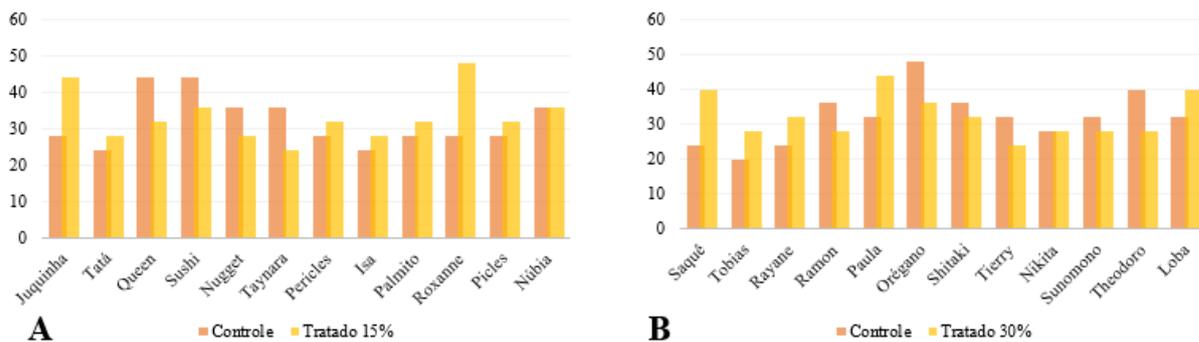


Figura 27: Resultado dos valores de frequência respiratória por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.

No caso do parâmetro escore comportamental avaliado, em relação aos resultados de média, foram significativamente menores ($p < 0,001$) em ambos os grupos tratados ao compará-los com os grupos controles, ou seja, existe diferença entre controles e tratados, independente da concentração utilizada, porém não houve efeito significativo ao comparar os grupos tratados entre si ($p > 0,05$) (Figura 28).

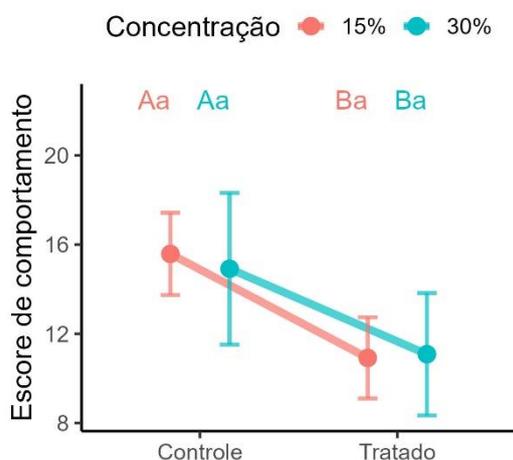


Figura 28: Gráfico com as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo e cada concentração em relação ao parâmetro de escore comportamental. As letras acima de cada grupo representam as comparações múltiplas (pairwise). Letras maiúsculas especificam diferenças entre grupos para uma mesma concentração. Letras minúsculas especificam diferenças entre concentrações para um mesmo grupo. Pontos que compartilham pelo menos uma letra não possuem diferenças significativas entre si a um nível de significância de 0,05 (5%).

Apenas os valores de escore comportamental resultaram como o esperado, sendo reduzidos quando os animais foram tratados com o óleo essencial de *L. angustifolia*, a frequência cardíaca e respiratória fugira ao esperado, sendo reduzidas quando os animais foram

do grupo controle. Os dois últimos parâmetros avaliados responderam negativamente às perguntas estatísticas, resultando em não haver diferença significativa entre os grupos e concentrações.

Um estudo realizado por Komiya *et al.* (2009), relatou a observação da diminuição da frequência cardíaca em cães após a aplicação de óleo essencial de *L. angustifolia* em seus pavilhões auditivos em relação aos cães que receberam aplicação de placebo. A reação de estresse do animal vai depender da duração e intensidade do estímulo estressor, da experiência prévia com o estímulo, com o status fisiológico e com a resiliência do animal. Um animal pode reagir com respostas fisiológicas ou comportamentais, mas também uma combinação de ambos (Stull, 1997). De acordo com Grandin, 1997, para avaliar com precisão a reação de um animal, uma combinação de medidas comportamentais e fisiológicas oferecerá os melhores parâmetros de desconforto animal. O sistema nervoso central coleta informações externas (por meio dos órgãos sensoriais) e internas, dá significado a esta informação em termos de perigo ou ameaça, relacionada com expectativas pessoais, experiências passadas e oportunidades de controle; finalmente, inicia as respostas adaptativas, incluindo ajustes comportamentais e alterações neuroendócrinas para atender às necessidades de energia para o comportamento e para manter a homeostase (Dantzer; Mormede, 1983).

As respostas fisiológicas ao estresse têm sido mais do que perfis comportamentais. No entanto, nenhum parâmetro fisiológico foi identificado para quantificar uma resposta ao estímulo estressor (Friend, 1980). Tanto em humanos quanto animais, os parâmetros que têm sido utilizados no estudo da resposta ao estresse incluem a medição de níveis de hormônios liberados pelo cérebro e outros órgãos, flutuações nos glóbulos brancos, alterações nos batimentos cardíacos e pode causar constrição dos vasos sanguíneos. Um estressor que dura de vários segundos a um minuto pode aumentar a frequência cardíaca, a frequência respiratória e causar problemas digestivos ou diminuição da ingestão de alimentos (Stull, 1997).

A resposta ao estresse produzida para ajudar um animal a escapar de um predador é útil, pois ativa a resposta de fuga ou luta que apoia ações que ajudam a aumentar as chances de sobrevivência. Em contrapartida, a resposta ao estresse ao manuseio durante os procedimentos de manejo pode ser prejudicial, pois pode causar situações que o animal se machuque ou a um trabalhador, e os hormônios do estresse elevados podem inibir sistemas como reprodução e imunidade (Burdick *et al.*, 2011). Além disso, a resposta ao estresse de um animal pode protegê-lo contra certos desafios, mas torná-lo suscetível a outros (McEwen *et al.*, 1997).

A Tabela 8 reúne o resultado dos valores absolutos e das médias dos parâmetros avaliados e obtidos no momento que os animais estavam sendo examinados por um médico veterinário, tanto quando foram do grupo controle quanto do grupo tratado de forma individual. Ao se tratar sobre o parâmetro do escore comportamental (Figura 29), pode-se observar que, no grupo de animais tratados com a concentração de 15%, apenas 2 de 12 animais tiveram os valores de escore comportamental maiores quando foram tratados do que quando foram controle, ou seja, exibiram mais parâmetros comportamentais de estresse na consulta clínica quando tratados do que quando controles. Já no grupo de animais tratados com a concentração de 30%, apenas 1 de 12 animais apresentou mais parâmetros comportamentais de estresse quando tratado e, apenas 2 de 12 animais, apresentaram os valores de escore comportamental igual tanto controle quanto tratado.

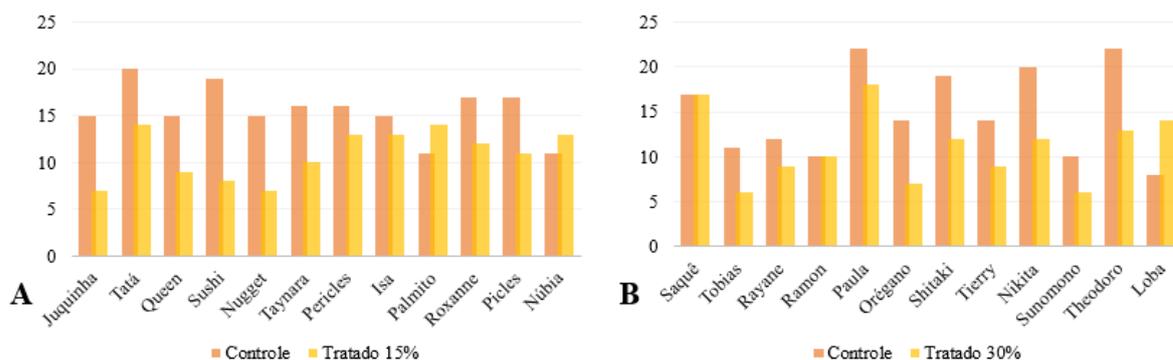


Figura 29: Resultado dos valores de escore comportamental por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.

O restante dos animais dos dois grupos tratados apresentou redução dos valores absolutos de escores comportamentais quando foram de ambos os grupos tratados, ou seja, quando foram examinados por um médico veterinário 20 minutos após aplicação da formulação tópica a base de óleo essencial de lavanda nas faces internas das orelhas, os cães apresentaram menos comportamentos de estresse.

Tal resultado pode ser explicado pelo efeito calmante do óleo essencial de lavanda através da sua ação no sistema nervoso central. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do óleo essencial de lavanda, Lopez *et al.*, 2017, realizaram um estudo no qual foi testada a capacidade do óleo de interagir com alvos neurofarmacológicos, como MAO-A, SERT e receptores ionotrópicos (GABAA e NMDA). Foi surpreendente que o OEL tivesse a capacidade

de se ligar ao receptor NMDA, os quais são classificados neuroquimicamente como receptores ionotrópicos de glutamato (iGLURs) e estão envolvidos em certos distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como epilepsia, dano convulsivo sustentado, parkinsonismo etc. Por esta razão, os iGLURs são considerados alvos farmacológicos na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. O OEL foi capaz de se ligar em um modo dependente da dose, o que significa que esse óleo pode exercer efeitos calmantes por meio da modulação dos receptores NMDA. Esta é a primeira vez que esta afinidade é relatada e este fato poderia explicar as propriedades anti-agitação que foram encontradas para estes produtos em animais e alguns estudos clínicos (Bradley *et al.*, 2009; Faturi *et al.*, 2010; Kasper *et al.*, 2010; Tsang e Ho, 2010; Woelk e Schlaefke, 2010; Chioca *et al.*, 2011; Goes *et al.*, 2012; Hritcu *et al.*, 2012; Schuwald *et al.*, 2013).

Em um estudo de 2013, Schuwald *et al.* identificaram um óleo essencial de lavanda padronizado (Silexan®) como um potente ansiolítico inibidor de canais de cálcio dependentes de voltagem em sinaptossomas, neurônios primários do hipocampo e linhas celulares de superexpressão estável, na mesma faixa que a pregabalina, um anticonvulsivante e ansiolítico. O óleo essencial de lavanda é conhecido por conter monoterpenos como linalol e acetato de linalil, que parecem ser os responsáveis por essa atividade de acordo com trabalhos anteriores (Cline *et al.*, 2008; Linck *et al.*, 2010; Souto-Maior *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2017). Lopez *et al.*, 2017, relatam parecer que os efeitos ansiolíticos do OEL se devem ao fato de seus principais monoterpenos, linalol e acetato de linalila, interagirem com o receptor NMDA além de também ter sido observado que a lavanda e o linalol inibem os alvos serotoninérgicos, como o SERT, o que pode explicar por que a lavanda mostrou efeitos semelhantes aos antidepressivos em animais e modelos humanos (Cavanagh; Wilkinson, 2002; Akhondzadesh *et al.*, 2003; Hritcu *et al.*, 2012). No entanto, os autores não observaram efeitos no receptor GABAA, o que está de acordo com os resultados de um estudo realizado em 2013 (Chioca *et al.*, 2013). De acordo com seus resultados, os autores afirmaram que as atividades anti-agitação e antidepressiva da lavanda podem ser atribuídas, pelo menos em parte, à modulação do receptor NMDA, bem como à inibição do SERT (Lopez *et al.*, 2017).

4.3.3 Cortisol salivar

O cortisol salivar reflete as alterações no cortisol sérico livre (não ligado) e, semelhante ao cortisol urinário, é considerado uma alternativa confiável para medir o cortisol livre no soro (Casals; Hanzu, 2020). Hoje, o cortisol salivar é rotineiramente usado como biomarcador de

estresse psicológico e doenças mentais ou físicas relacionadas. A maioria dos estudos considera os níveis de cortisol salivar uma medida confiável da adaptação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPAA) ao estresse (Hellhamer *et al.*, 2009).

Ao analisar os resultados das concentrações de cortisol salivar de cada animal quando foram controles e quando foram tratados, a 15% ou a 30% (Tabela 8), pode-se observar, na figura 30 que, no grupo tratado com 15% do óleo essencial, apenas quatro dos 12 animais tiveram a concentração de cortisol salivar diminuída em relação ao momento que foram do grupo controle, ou seja, sete de 12 animais apresentaram mais estresse quando foram tratados, e um animal apresentou resultado não detectável pelo equipamento leitor. Já no grupo tratado com 30% de óleo essencial de lavanda, sete de 12 animais tiveram a concentração de cortisol salivar diminuída em relação ao momento que foram do grupo controle, ou seja, apenas três de 12 animais apresentaram mais estresse quando foram tratados, e dois animais apresentaram resultados não detectáveis pelo equipamento leitor.

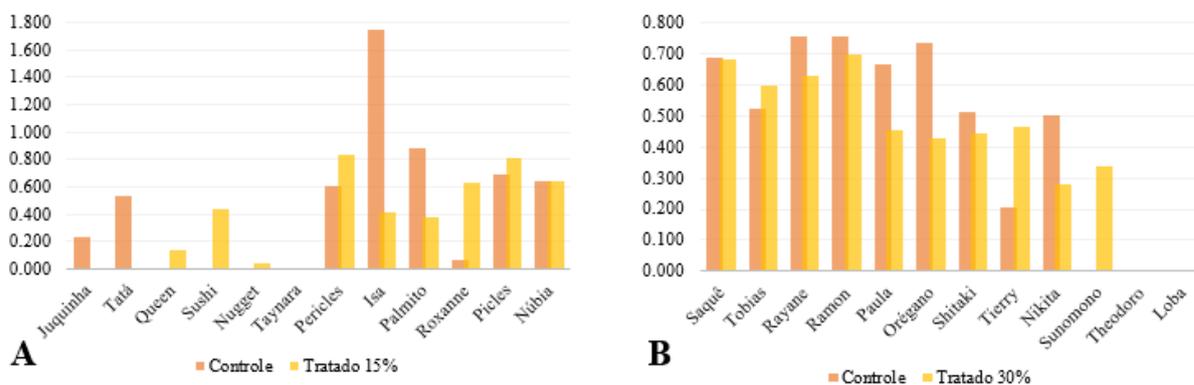


Figura 30: Resultado dos valores de cortisol salivar por animal. A = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 15% e B = Grupo controle e tratado com formulação na concentração de 30%.

Em relação à média dos valores de concentração de cortisol salivar de cada grupo (Tabela 8), foi possível observar que, no grupo tratado com 15%, essa média foi menor no grupo tratado em relação ao grupo controle, evidenciando o maior estresse desses animais quando não usaram a formulação a base de óleo essencial de lavanda. Entretanto, no grupo com 30%, não houve diferença notável entre controles e tratados.

As medidas biológicas do estresse incluem hormônios do estresse (por exemplo, cortisol) encontrados em níveis proporcionais à gravidade do estresse. Estudos anteriores em cães mediram o estresse por meio dos níveis de cortisol na saliva, urina e cabelo, e outras medidas fisiológicas, incluindo frequência cardíaca, temperatura retal, pressão arterial, pulsação e temperatura máxima da superfície ocular (Beerda *et al.*, 1996, 1998, 2000; Bennett; Hayssen, 2010).

O uso do cortisol salivar como medida de estresse fisiológico precisa ser considerado e coletado com cuidado, sob condições experimentais rigorosas, devido à variabilidade individual e ambiental inerente às amostras de cortisol salivar (Cobb *et al.*, 2016). Isso dificulta a comparação entre pesquisas que utilizam medidas de estresse fisiológico sob condições variadas. Devido à essa limitação, este experimento foi realizado com rigorosidade em todo o processo de coleta de saliva, armazenando as amostras sob a refrigeração indicada no manual do kit de análise das mesmas tanto logo após a coleta quanto no congelamento e descongelamento para o processamento de leitura dos níveis de cortisol.

Além disso, inferir níveis de estresse apenas a partir de respostas fisiológicas é difícil, pois a excitação biológica por si só não é sinônimo de estado emocional negativo. Como tal, as medidas comportamentais também são comumente utilizadas em investigações de estresse (Beerda *et al.*, 1998, 2000; Hekman *et al.*, 2012; Mariti *et al.*, 2015).

As medidas de estresse usadas para investigar a experiência em um contexto veterinário incluem: cortisol salivar, frequência cardíaca, temperatura retal, temperatura máxima da superfície ocular, frequência respiratória e pressão arterial, bem como sinais comportamentais, como resposta a humanos abordagem ou interação e disposição para entrar na sala de espera ou consultório (Petra *et al.*, 2019).

Poutaraud *et al.*, em 2018, realizaram um experimento com a aplicação em forma de roll-on de 2mL de óleo de lavanda em uma concentração de 10% nos focinhos de cavalos e os resultados mostraram que os indicadores de estresse, como frequência cardíaca, posturas de alerta e defecações, além do cortisol salivar são menores nos cavalos tratados. Neste estudo, também foi coletado o sangue dos animais e a farmacocinética do linalol no plasma apresentou um pico 20 minutos após a aplicação do óleo essencial de lavanda.

A Figura 31 diz respeito à análise estatística multivariada, a qual trabalha com todas as variáveis ao mesmo tempo e nos fornece três informações: a relação de variável com variável (setas), variáveis que apontam para o mesmo lado são positivamente correlacionadas entre si, mesmo sem significância, quando estão apontando para lados opostos a correlação é negativa,

ou seja, uma cresce para o lado e outra para o outro; dos animais (pontos), quando os pontos estão próximos entre si significa que tiveram similaridade entre si; variáveis com animais (ponto com seta), quanto mais próximo o ponto da cabeça da seta ou ultrapassando-a, maior são os valores daquele animal naquela variável.

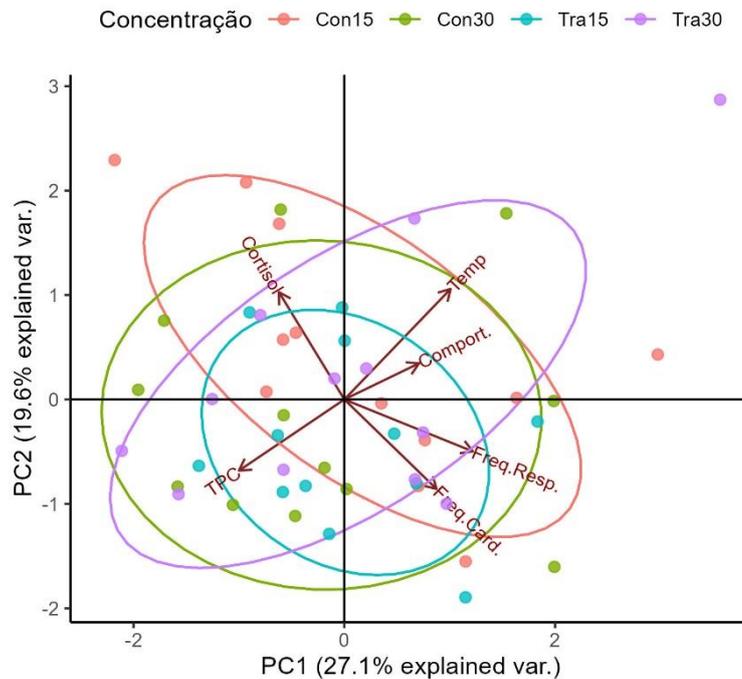


Figura 31: Gráfico representativo da Análise de Componentes Principais (análise multivariada), utilizando os dados de todos os animais e de todas as variáveis numéricas juntos.

Observando, então, a associação entre as variáveis (setas), identificou-se a formação de grupos: as variáveis temperatura e escore de comportamento, localizadas no quadrante superior à direita, estando positivamente correlacionadas entre si, mas negativamente associadas à variável Tempo de preenchimento capilar (TPC), ou seja, quanto maiores são os valores de temperatura e escore comportamental, menores são os valores de TPC dos animais. O grupo, formado pela dupla de variáveis frequência respiratória e frequência cardíacas, positivamente correlacionadas entre si, se encontra negativamente correlacionada à Concentração de cortisol salivar, ou seja, quanto mais crescem os valores de FC e FR, diminuem os valores de cortisol salivar. Em relação às amostras dos animais em cada grupo e cada concentração (pontos), não foi observado uma separação muito clara nem entre grupos e nem entre as concentrações, mas é notável uma tendência dos grupos controles terem maiores valores em cada parâmetro. Cada correlação de Spearman gerou um valor de P, mas apenas a correlação positiva entre FC e FR foi marginalmente significativa ($P = 0,067$).

4.3.4 Eventos Adversos

A administração tópica do óleo essencial em doses variando de 15 a 60 mg/kg não induziu alterações notáveis no padrão de comportamento dos cães, portanto, a administração foi desprovida de toxicidade evidente. Além disso, os parâmetros bioquímicos séricos observados, ou seja, creatinina, ureia, ALT e AST, não foram afetados. Da mesma forma, as avaliações dos glóbulos vermelhos e brancos não revelaram qualquer sinal notável de toxicidade hematológica induzida por *L. angustifolia*.

Embora testes adicionais, como análise de toxicidade reprodutiva e avaliação citotóxica e mutagênica, devam ser realizados, os presentes resultados mostram que a formulação a base de óleo essencial de lavanda é provavelmente segura para uso agudo *in vivo*.

Assim, os resultados obtidos nesta etapa certamente serão úteis em futuros estudos clínicos, onde serão realizados testes específicos para estabelecer o perfil seguro deste óleo essencial para uso clínico.

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir, com os resultados obtidos, que:

Através do questionário online, a maioria dos cães é considerado como filho(a) em relação ao vínculo com o responsável/grupo familiar; 59,5% dos participantes responderam que os seus cães apresentaram comportamentos desfavoráveis ao bem-estar animal na sala de espera do consultório veterinário, 55,9% no chão do consultório, 73,6% na mesa de procedimentos e 59,5% quando manipulados por médicos veterinários; 39% e 41% dos respondentes disseram se sentir um pouco apreensivos e ansiosos, respectivamente, com o comportamento dos seus cães em contexto de consulta veterinária, mas apesar disso, 83% não reduziram a frequência com que levam seus cães ao consultório por motivos comportamentais e 72% não preferem o atendimento à domicílio; o motivo para ter 59% dos participantes reduzindo a frequência de visitação ao consultório veterinário é financeiro;

A formulação de solução não aquosa para aplicação tópica a base de óleo essencial de *L. angustifolia* apresentou as características físico-químicas e estabilidade adequadas, além de ter consistência adequada para a aplicação através de seringa nas orelhas dos cães e não ter apresentado eventos adversos esperados, sendo viável para o uso;

No processo de seleção dos animais, todos os cães do biotério pré-selecionados apresentaram 4 comportamentos específicos: “Ficar em pé na grade do canil”, “Ficar andando pelo canil”, Ficar sentado na área de solário do canil” e “ Ficar deitado na área de solário do canil” A maioria dos cães machos apresentaram comportamentos favoráveis ao bem-estar animal, enquanto a maioria das fêmeas desfavoráveis; Os grupos experimentais conforme os escores comportamentais dos cães não tiveram diferença significativa entre si, portanto, a variável de discrepância comportamental entre os grupos foi descartada;

Os cães submetidos ao tratamento com formulação a base de óleo essencial de *L. angustifolia* nas concentrações de 15 e 30% não apresentaram diferença significativa em relação ao controle em relação aos parâmetros de Frequência Cardíaca, Frequência Respiratória e níveis de cortisol salivar após 20 minutos da aplicação tópica das formulações.

Ambas as formulações (15 e 30% de óleo essencial de *L. angustifolia*) apresentaram eficácia na redução de comportamentos desfavoráveis ao bem-estar de cães, após 20 minutos de sua aplicação tópica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato de os cachorros que se apresentaram à consulta com comportamento de medo manterem esse comportamento, pode indicar que problemas em consultas futuras podem ser detectados numa fase precoce do seu desenvolvimento, afinal, pode ser percebido o comportamento e realizado interferência para evitar sua repetição desde a primeira manifestação e a percepção e intervenção do médico veterinário é crucial para que esse objetivo seja atingido.

Com os resultados do questionário online, é possível observar que cães jovens, ou seja, que ainda não tiveram uma quantidade considerável de visitas realizadas ao consultório veterinário são menos propensos a apresentarem comportamentos de medo e ansiedade neste contexto, afinal, ainda não tiveram eventos traumáticos suficientes para formar tais experiências negativas. Sendo assim, pode ser considerada a faixa etária para melhor realizar intervenção e prevenir que se tornem cães com comportamentos indesejados para seu próprio bem-estar nas idas ao veterinário.

A maioria dos cães que apresentaram comportamentos de insegurança no contexto veterinário eram fêmeas, porém não se obteve a informação quanto a fertilidade dos cães para que fosse possível fazer alegações e hipóteses acerca da influência hormonal no comportamento dos animais.

Todos os cães que apresentaram insegurança em todo o contexto de consulta veterinária (sala de espera, chão do consultório, mesa de procedimentos e na manipulação pelo médico veterinário) não realizavam passeios para fora do lar familiar. Tal fato pode ser justificado pelo não conhecimento, por parte dos animais, de outras áreas, outros sons, cheiros e barulhos, fazendo com que tivessem insegurança maior quanto ao desconhecido. Essa permanência apenas dentro do ambiente familiar pode ser justificada pelo vínculo cada vez maior do ser humano com o cão, trazendo o animal cada vez mais para perto de si e falhando no oferecimento da possibilidade dele manifestar o comportamento de sua espécie, que seria farejar, correr, latir e socializar com outros da mesma espécie. Tal hipótese, ao mesmo tempo, levanta o questionamento de que quanto maior o vínculo humano-cão maior a preocupação em cuidar da saúde física e mental do cão por parte humana, mas acaba sendo no formato de relacionamento entre seres humanos e não de acordo com a espécie canina.

Com o resultado deste experimento, é possível lançar mão de uma terapia natural para aumentar o grau de bem-estar de cães que têm sua saúde mental afetada negativamente quando

vão ao consultório veterinário para realizar exames clínicos e ter sua saúde física verificada. Assim, reduzindo as chances de diagnóstico impreciso devido às dificuldades de realizar exame clínico em animais sob estresse, com seus parâmetros vitais alterados, bem como as chances de um tratamento malsucedido devido às dificuldades na administração de medicações. É de se esperar que, com o uso da formulação, menos cães sejam abandonados ou eutanasiados por motivos comportamentais.

O experimento pôde demonstrar como as manifestações comportamentais de insegurança nos cães pode não estar acompanhada de mudanças nos parâmetros vitais como frequência cardíaca, respiratória e até mesmo o hormônio considerado do estresse, o cortisol. Entretanto, tal falta de sincronismo não deve invalidar os comportamentos de medo e ansiedade dos animais com a justificativa de não ter comprovação fisiológica. As manifestações comportamentais já devem ser consideradas como comprovação fisiológica de insegurança nos cães.

A comprovação, por meio do questionário online e do ensaio clínico, de que cães manifestam comportamento característico de medo e ansiedade em contexto de consulta veterinária deve fomentar iniciativas de modificações tanto estruturais quanto metodológicas dos serviços veterinários. Para que seja possível reduzir cada vez mais tal estatística e, conforme jurado pelos médicos veterinários, agir em prol do bem-estar animal.

A identificação dos componentes biologicamente ativos do óleo essencial de lavanda e a determinação de seus mecanismos de ação, isoladamente e em combinação, ajudará a esclarecer muitas das inconsistências atualmente encontradas na pesquisa e pode levar à identificação de soluções terapêuticas novas e compostos mais eficazes. Por isso, mais pesquisas são necessárias para determinar a verdadeira bioatividade do óleo de lavanda e seus constituintes, assim como os seus níveis de toxicidade em suas diferentes vias de administração.

Este trabalho pôde estabelecer que, o uso tópico de uma formulação com 15% e 30% de óleo essencial de *Lavandula angustifolia* na face interna das orelhas de cães da raça beagle, é seguro e não apresenta eventos adversos. Podendo assim embasar mais pesquisas quanto a outros níveis de concentração e outros locais de aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAHA, American Animal Hospital Association. Reversing the decline in veterinary care utilization: progress made, challenges remain. 2014. Acessado em 10 de Dezembro de 2023. https://cdn.ymaws.com/www.movma.org/resource/resmgr/Docs/VetCareUsageStudy_WhitePaper.pdf
- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. Disponível em: www.abntcatalogo.com.br. Acessada em março 2022.
- ACIKGOZ, B.; DALKIRAN, B.; DAYI, A. An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice. **Behavioural Processes**, v. 200, 104670, ISSN 0376-6357. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2022.104670>.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 26, de 13 de maio de 2014; Brasília, 2014a.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 69, de 8 de dezembro de 2014; Brasília, 2014b
- AKHONDZADESH, S., KASHANI, L., FOTOUHI, A., JARVANDI, S., MOBASERI, M., MOIN, M., *et al.* Comparison of Lavandula angustifolia Mill. tincture and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized trial. **Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** 27, 123–127. 2003. doi: 10.1016/S0278-5846(02)00342-1
- ANDREI, P.; COMUNE, A. P. Aromatherapy and its applications. Centro Universitário São Camilo, São Paulo. Vol 11. 2005.
- ARAHORI, M. *et al.* Owners' view of their pets' emotions, intellect, and mutual relationship: Cats and dogs compared. **Behavioural processes**, v. 141, p. 316-321, 2017.
- ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; LOPES, O.; LIMA, M.; PEREIRA, M.; TINOCO, T.; MORAIS, J. C.; MARTINS, M. R. Pharmacological and Toxicological Studies of Essential Oil of Lavandula stoechas subsp. Luisieri. Nova York: **Planta Med.** 2016.
- ASKEW, H. R. Behandlung von Verhaltensproblemen bei Hund und Katze: ein Leitfaden für die tierärztliche Praxis. **Paul Parey Verlag**, Berlin. 1997.
- Assessment report on Lavandula angustifolia Mill., aetheroleum and Lavandula angustifolia Mill, flos. Committee on Herbal Medicinal Products. European Medicines agency. 2011.
- BEERDA, B. *et al.* Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 52, n. 3-4, p. 307-319, 1997.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B.; JANSSEN, N.; MOL, J. The use of saliva cortisol, urinary cortisol and catecholamine measurements for noninvasive assessment of stress responses in dogs. **Hormones and Behaviour**, 30, pp. 272-279. 1996.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B.; VAN HOOFF, J. A.; DE VRIES, H. W.; & MOL, J. A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, 58(3-4), 365-381. 1998.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B.; VAN HOOFF, J. A.; DE VRIES, H. W.; & MOL, J. A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. **Anim. Welf.**, 9, pp. 49-62. 2000.

BENNETT, A.; HAYSEN, V. Medindo o cortisol no cabelo e na saliva de cães: cor da pelagem e diferenças de pigmento. **Endocrinologia dos Animais Domésticos**, v. 39, n. 3, pág. 171-180, 2010.

BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.

BODNARIU, A. Indicators of stress and stress assessment in dogs. **Lucr Stiint Med Vet**, v. 41, p. 20-26, 2008.

BOERE, V.; SCALON, M. C.; WIEDEMANN, G. G. Os Cães De Mulheres São Menos Estressados E Mais Saudáveis Do Que Os Cães De Homens? Uma Investigação Na Sala De Espera Do Hospital Veterinário. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 264-269, 2011.

BOYD, C. *et al.* Mortality resulting from undesirable behaviours in dogs aged under three years attending primary-care veterinary practices in England. **Animal Welfare**, v. 27, n. 3, p. 251-262, 2018.

BRADLEY, B. F. *et al.* Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 517-525, 2007.

BRADLEY, B. F. *et al.* Effects of orally administered lavender essential oil on responses to anxiety-provoking film clips. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 24, n. 4, p. 319-330, 2009.

BRADSHAW, J.; ROONEY, N.; SERPELL, J. Dog social behavior and communication. The domestic dog: Its evolution, behavior and interactions with people, p. 133-159, 2017.

BRASIL. Lei Nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências.** Brasília, DF: Diário Oficial da União, 1990.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 42 de 16 de dezembro de 2010. **Estabelece critérios e procedimentos para a fabricação, fracionamento, importação e comercialização dos produtos isentos de registro, e dá outras providências.** Brasília, DF, nº.42, 16 dezembro 2010.

BUCHBAUER, G.; BASER, K. H. C. **Effects of essential oils in the central nervous system.** Handbook of Essential Oils, p. 287-320, 2020.

BULLER, K.; BALLANTYNE, K. C. Living with and loving a pet with behavioral problems: Pet owners' experiences. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 37, p. 41-47, 2020.

BURDICK, N. C. *et al.* Interactions between temperament, stress, and immune function in cattle. **International Journal of Zoology**, v. 2011, 2011.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 212, p. 29-35, 2018.

CASALS, G.; HANZU, F. A. Cortisol measurements in Cushing's syndrome: immunoassay or mass spectrometry?. **Annals of laboratory medicine**, v. 40, n. 4, p. 285-296, 2020.

CASE, L. P. **Canine and feline behavior and training: A complete guide to understanding our two best friends**. Livros CiNii, Parque Clifton, Nova York. ISBN 9781428310537. 2010.

CASSELS, M. T. *et al.* One of the family? Measuring young adolescents' relationships with pets and siblings. **Journal of Applied Developmental Psychology**, v. 49, p. 12-20, 2017.

CATANZARO, T. E. Promocion del vinculo humano-animal en la practica veterinaria: fundamentos para la jerarquización profesional, Buenos Aires: Inter.-Médica, 2002.

CAVANAGH, H. M. A.; WILKINSON, J. M. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy research**, v. 16, n. 4, p. 301-308, 2002.

CHA, Jung-Hee; LEE, Sun-Hee; YOO, Yang-Sook. Effects of aromatherapy on changes in the autonomic nervous system, aortic pulse wave velocity and aortic augmentation index in patients with essential hypertension. **Journal of Korean Academy of Nursing**, v. 40, n. 5, p. 705-713, 2010.

CHIOCA, L. R. *et al.* Anxiolytic-like effect of lavender and orange essential oil: participation of nitric oxide but not GABA-A benzodiazepine complex. **European Neuropsychopharmacology**, n. 21, p. S538, 2011.

CHIOCA, L. R. *et al.* Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 147, Issue 2, Pages 412-418, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.028>. 2013.

CHUNG, T.; PARK, C.; KWON, Y.; YEON, S. Prevalence of canine behavior problems related to dog-human relationship in South Korea—A pilot study. **J. Vet. Behav.** 11, 26–30. 2011.

CLINE, M. *et al.* Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male Sprague-Dawley rat. **AANA journal**, v. 76, n. 1, 2008.

COBB, M. L. *et al.* A systematic review and meta-analysis of salivary cortisol measurement in domestic canines. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 31-42, 2016.

COHEN, S. P. Can pets function as family members?. **Western Journal of Nursing Research**, v. 24, n. 6, p. 621-638, 2002.

COMAC, Comissão de Animais de Companhia. **Anuário Comac 2022** - Síntese de Indicadores. 2022.

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

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Fitoterapia na actualidade: Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 21-25, 2003.

DA SILVA, E. R. da *et al.* Report on the Malungo expedition to the Erepecuru river, Oriximiná, Brazil. Part I: is there a difference between black and white breu?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 647-656. 2016.

DANTZER, R.; MORMÈDE, P. Stress in farm animals: a need for reevaluation. **Journal of animal science**, v. 57, n. 1, p. 6-18, 1983.

DE ASSIS, L. C. de. Transporte e sala de espera alteram o comportamento de cães e gatos durante a consulta veterinária. **Boletim APAMVET**, v. 9, n. 1, p. 13-15, 2018.

DIAS, P. C. M. S. **Utilização de produtos naturais em aromaterapia**. 2013. Tese de Doutorado. Instituto Politecnico de Braganca (Portugal). Disponível em: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9203/1/Dias_Paula.pdf. Acesso em: 14/04/2024.

DÖRING, D. *et al.* Fear-related behaviour of dogs in veterinary practice. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 38-43, 2009.

FARACO, C. B.; LANTZMAN, M. Relação entre humanos e animais de companhia. In:___ Faraco, C. B.; Soares, G. M. **Fundamentos do comportamento canino e felino**. 1ª. São Paulo. Ed. Medvet, p. 1 –12, 2013.

FARACO, C. B. **Bem-estar dos cães e gatos e medicina comportamental** / Organização de Ceres Berger Faraco. – São Paulo: APAMVET, 352 p. 2021. Disponível em: <http://www.publicacoes.apamvet.com.br/PDFs/Publicacoes/7.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2024.

FARAGÓ, T. *et al.* Dogs' expectation about signalers' body size by virtue of their growls. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15175, 2010a.

FARAGÓ, T. *et al.* ‘The bone is mine’: affective and referential aspects of dog growls. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 4, p. 917-925, 2010b.

FATURI, C. B. *et al.* Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605-609, 2010.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 21CFR182.20 - Code of Federal Regulations Title 2. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=182.20>. Acesso em 31 de Janeiro de 2024.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 3^a. ed. – São Paulo: Roca. 2014.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FOLDEMO, A. *et al.* Qualidade de vida e sobrecarga em pais de pacientes ambulatoriais com esquizofrenia. **Psiquiatria Social e Epidemiologia Psiquiátrica**, v. 40, p. 133-138, 2005.

GAZZANO, A. *et al.* The prevention of undesirable behaviors in dogs: effectiveness of veterinary behaviorists' advice given to puppy owners. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 3, n. 3, p. 125-133, 2008.

GENOVESE, A. G.; MCLEAN, M. K.; KHAN, S. A. Adverse reactions from essential oil-containing natural flea products exempted from Environmental Protection Agency regulations in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n. 4, p. 470-475, 2012.

GOES, T. C. *et al.* Effect of sweet orange aroma on experimental anxiety in humans. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 8, p. 798-804, 2012.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of animal science**, v. 75, n. 1, p. 249-257, 1997.

GUIMARÃES, I. M. **Comportamento do cão no acto de consulta médico-veterinária profilática**. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal). 2013

GUIMARÃES, L. S. P.; HIRAKATA, V. N. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. **Revista HCPA**. Porto Alegre. Vol. 32, n. 4, p. 503-511. 2012.

HANDELMAN, B. **Canine behavior: A photo illustrated handbook**. Dogwise Publishing, 2012.

HEFFNER, H. E. The symbiotic nature of animal research. **Perspectives in biology and medicine**, v. 43, n. 1, p. 128-139, 1999.

HEIDENBERGER, E.; UNSHELM, J. Changes in the behavior of dogs after castration. **Tierarztl. Prax.** 18, 69–75. 1990.

HEKMAN, J. P.; KARAS, A. Z.; DRESCHER, N. A. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 141, n. 3-4, p. 149-157, 2012.

HEKMAN, J. P.; KARAS, A. Z.; SHARP, C. R. Psychogenic stress in hospitalized dogs: cross species comparisons, implications for health care, and the challenges of evaluation. **Animals**, v. 4, p. 331-347, 2014.

HIBY, E. F.; ROONEY, N. J.; BRADSHAW, J. W. S. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 3, p. 385-391, 2006.

HOEFMAN, R. *et al.* Caring for a child with autism spectrum disorder and parents' quality of life: application of the CarerQol. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, v. 44, p. 1933-1945, 2014.

HOPKINS, S.G.; SCHUBERT, T.A.; HART, B.L. Castration of adult male dogs: Effects on roaming, aggression, urine marking, and mounting. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 168, 1108–1110. 1976.

HOROWITZ, S. Aromatherapy: current and emerging applications. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 17, n. 1, p. 26-31, 2011.

HORVÁTH, Zsuzsánna *et al.* Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. **Hormones and behavior**, v. 52, n. 5, p. 621-630, 2007.

HRITCU, L.; CIOANCA, O.; HANCIANU, M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. **Phytotherapy**, v. 19, n. 6, p. 529-534, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Brasileiro de 2019. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

ISO, International Organization for Standardization. ISO 9235:2021. Aromatic natural raw materials - Vocabulary. International Organization for Standardization: Genebra, 2021.

ISO, International Organization for Standardization.; ISO 3515/2002. Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.); International Organization for Standardization: Genebra, 2002

KASPER, S. *et al.* Silexan, an orally administered *Lavandula* oil preparation, is effective in the treatment of 'subsyndromal' anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. **International clinical psychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 277-287, 2010.

KASPER, S. *et al.* Lavender oil preparation Silexan is effective in generalized anxiety disorder—a randomized, double-blind comparison to placebo and paroxetine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 859-869, 2014.

KASPER, S. *et al.* Efficacy of orally administered Silexan in patients with anxiety-related restlessness and disturbed sleep—A randomized, placebo-controlled trial. **European neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 11, p. 1960-1967, 2015.

KASPER, S. *et al.* Silexan in anxiety disorders: Clinical data and pharmacological background. **The world journal of biological psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 412-420, 2018.

KHOSHNEGAH, J.; AZIZZADEH, M.; GHARAIE, A. M.. Risk factors for the development of behavior problems in a population of Iranian domestic dogs: Results of a pilot survey. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 131, n. 3-4, p. 123-130, 2011.

KOMIYA, M. *et al.* Evaluation of the effect of topical application of lavender oil on autonomic nerve activity in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 70, n. 6, p. 764-769, 2009.

KÖNIG, C. Prinzipien der klassischen Konditionierung und ihre Bedeutung in der täglichen Praxis. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 89, n. 1, p. 21-26, 2002.

KOULIVAND, P. H. *et al.* Lavender and the nervous system. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

KUHNE, F. Castration of dogs from the standpoint of behaviour therapy. **Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere**, 40, 140–145. 2012.

LANDSBERG, G. M.; HUNTHAUSEN, W. L.; ACKERMAN, L. J. Handbook of behavior problems of the dog and cat. 2003.

LAWLESS, J. **Home aromatherapy**. Hong Kong: Readers Digest Book, 1995

LEMON, K. An assessment of treating depression and anxiety with aromatherapy. **International Journal Of Aromatherapy**, v. 14, n. 2, p. 63-69, 2004.

LETIZIA, C. S. *et al.* Fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 943-964, 2003.

LIEBERMANN, D.A. **Learning: Behavior and Cognition**. Wadsworth Thomson Learning, Belmont, USA. 2000.

LINCK, V. de M. *et al.* Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 679-683, 2010.

LINDSAY, S.R. **Handbook of applied dog behaviour and training Adaption and Learning**, vol. 1. Iowa State Press, Ames, USA. 2000.

LINDSAY, S. R. **Handbook of applied dog behavior and training, etiology and assessment of behavior problems**. John Wiley & Sons, 2001.

LONDON, K.B. **Piloerection: What does it mean when a dog does this?** The Bark, [blog] April 4. 2012.

LUESCHER, A. U. Diagnosis and management of compulsive disorders in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 2, p. 253-267, 2003.

LUND, J. D.; AGGER, J. F.; VESTERGAARD, K. S. Reported behaviour problems in pet dogs in Denmark: age distribution and influence of breed and gender. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 28, n. 1, p. 33-48, 1996.

MACHADO, M. P. *et al.* Propagação in vitro e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, p. 283-289, 2013.

MARITI, C. *et al.* The assessment of dog welfare in the waiting room of a veterinary clinic. **Animal Welfare**, v. 24, n. 3, p. 299-305, 2015.

MARITI, C. *et al.* Guardians' perceptions of cats' welfare and behavior regarding visiting veterinary clinics. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 19, n. 4, p. 375-384, 2016.

MCEWEN, B. S. *et al.* The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 79-133, 1997.

MELO, M. I. V.; STRADIOTO, M. A.; GOMES, G. R. S.; SANTANA, A. M.; POZZATO, L. DOS S.; WOLBERT, I.; COSTA, P. X. N.; VASCONCELLOS, A. DA S. Factors associated with behavioral changes in pet dogs during the Covid-19 pandemic in Brazil. **Journal of Veterinary Behavior**, ISSN 1558-7878. 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2024.03.001>.

MILLS, D. S.; DUBE, M. B.; ZULCH, H. **Estresse e Feromoterapia no Comportamento Clínico de Pequenos Animais**; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, EUA, 2012.

MUELLER, M. K. *et al.* Assessment of canine health and preventative care outcomes of a community medicine program. **Preventive veterinary medicine**, v. 157, p. 44-49, 2018.

O'FARRELL, V. **Manual of Canine Behaviour**. In: British Small Animal Association (Eds.), KCO Worthing. 1987.

OVERALL, K. **Manual of Clinical Behavioral Medicine for Dogs and Cats-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2013.

PEREIRA, I. *et al.* Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

POUTARAUD, A. *et al.* Lavender essential oil decreases stress response of horses. **Environmental chemistry letters**, v. 16, p. 539-544, 2018.

POZZATTO, D. S. *et al.* Técnicas para redução de estresse no atendimento clínico de cães e gatos durante consulta veterinária. **Pubvet**, v. 16, p. 133, 2022.

PRASHAR, A.; LOCKE, I. C.; EVANS, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. **Cell proliferation**, v. 37, n. 3, p. 221-229, 2004.

PUURUNEN, J.; HAKANEN, E.; SALONEN, M.K.; MIKKOLA, S.; SULKAMA, S.; ARAUJO, C.; LOHI, H. Inadequate socialisation, inactivity, and urban living environment are associated with social fearfulness in pet dogs. **Scientific reports**. 10, 3527. 2020.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2019.

RICHARDSON, M. *et al.* Parents' grief in the context of adult child mental illness: A qualitative review. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 14, p. 28-43, 2011.

ROCHA, C. F. P. G. **Avaliação comportamental e endócrina do nível de estresse de cães participantes de Intervenções Assistidas por Animais**. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Psicologia, São Paulo, Instituto de psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/47/47132/tde-10082015-115539/en.php>. Acesso em: 02 jan. 2024.

ROMERO, L. M.; BUTLER, L. K. **Endocrinology of Stress**. International Journal of Comparative Psychology: Copyright by the International Society for Comparative Psychology, U. S. A, 2007.

ROSSI, A. **Como os EUA estão incorporando bem-estar e comportamento na clínica veterinária**. Boletim APAMVET. n.1; v.7; p.11-14. 2016.

SALMAN, M. D. *et al.* Human and animal factors related to relinquishment of dogs and cats in 12 selected animal shelters in the United States. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 1, n. 3, p. 207-226, 1998.

SAVALLI, C.; ALBUQUERQUE, N.; VASCONCELLOS, A. S.; RAMOS, D. DE MELLO, F. T.; SERPELL, J. A. Characteristics associated with behavior problems in Brazilian dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, Volume 234, 2021, 105213, ISSN 0168-1591. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105213>.

SCHILDER, M. B. H.; VAN DER BORG, J. A. M. Training dogs with help of the shock collar: short and long term behavioural effects. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 85, n. 3-4, p. 319-334, 2004.

SCHUWALD, A. M. *et al.* Lavender oil-potent anxiolytic properties via modulating voltage dependent calcium channels. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e59998, 2013.

SEGEN, J. C. **Dictionary of Alternative Medicine**. Stamford, Ct: Appleton and Lange, 1998.

SHEN, J. *et al.* Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. **Neuroscience letters**, v. 383, n. 1-2, p. 188-193, 2005.

SHEPPARD, G.; MILLS, D. S. Evaluation of dog-appeasing pheromone as a potential treatment for dogs fearful of fireworks. **Veterinary Record**, v. 152, n. 14, p. 432-436, 2003.

SILVA, V. A. dos S.; DE TOLEDO, V. B.; BRUCH, K. L. **Perfil do consumidor de óleos essenciais no Brasil**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronegócios do Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 128 f. P. 53-69. 2023.

SINDAN, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. **Número de cães e gatos no Brasil deve chegar a mais de 100 milhões em 10 anos**. c2021. Disponível em:

<<https://sindan.org.br/release/numero-de-caes-e-gatos-no-brasil-deve-chegar-a-mais-de-100-milhoes-em-10-anos/>>. Acesso em: 30 de Novembro de 2023.

SOARES, G. M.; SOUZA-DANTAS, L. M.; D'ALMEIDA, J. M. Epidemiologia de problemas comportamentais em cães no Brasil: inquérito entre médicos veterinários de pequenos animais. **Ciência Rural**, Santa Maria. n.4; v,40; p. 873-879. 2010.

SOARES, S. **Mercado de óleos essenciais cresce com isolamento social**. AGE MKT. PUCSP. 2021. Disponível em: <https://agmt.pucsp.br/noticias/mercado-de-oleos-essenciais-cresce-com-isolamento-social> . Acesso em: 03 de dezembro de 2023.

SOUTO-MAIOR, F. N. *et al.* Efeitos ansiolíticos do óxido de linalol inalado em modelos experimentais de ansiedade em ratos. **Farmacologia Bioquímica e Comportamento**, v. 100, n. 2, pág. 259-263, 2011.

STANFORD, T.L. Behavior of dogs entering a veterinary clinic. **Applied Animal Ethol.**, 7: 271-279. 1981

STULL, C. L. **Stress and Dairy Calves**. Davis: University of California, Davis. 1997.

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

TAYLOR, A.M.; REBY, D.; MCCOMB, K. Context-related variation in the vocal growling behaviour of the domestic dog (*Canis familiaris*). **Ethology**, 115, 905–915. 2009.

TSANG, H. W.H.; Ho, Y.C. T. "A review of the anxiolytic effects of aromatherapy in rodents." **Reviews in the Neurosciences** 21.2: 141-152.

TYNES, V.V. Tynes. Help! My dog licks everything. **Vet. Med.**, 103, pp. 198-211. 2010.

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

VÄISÄNEN, M. A. M.; VALROS, A. E.; HAKOJA, E.; RAEKALLIO, M. R.; VAINIO, O. M. Pre-operative stress in dogs-a preliminary investigation of behaviour and heart rate variability in healthy hospitalized dogs. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, 32(3), p. 158-167. 2005.

VASCONCELLOS, A. S. **O bem-estar do animal coterapeuta**. In: CHELINI, M. O. M.; OTTA, E. *Terapia Assistida por Animais*. Barueri, SP: Manole, cap. 7, p. 149-175. 2016.

VOLK, J.O.; FELSTED, K.E.; THOMAS, J.G.; SIREN, C.W. Executive summary of the Bayer veterinary care usage report. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 238(10):1275–1282. 2011. doi:10.2460/javma.238.10.1275.

WENG, H. Y.; KASS, P. H.; HART, L. A.; CHOMEL, B. B., Risk factors for unsuccessful dog ownership: An epidemiologic study in Taiwan. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 82-85, 2006.

WOELK, H., AND SCHLAEFKE, S. A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. **Phytomedicine** 17, 94–99. 2010. doi: 10.1016/j.phymed.2009.10.006

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

YAMADA, R.; KUZE-ARATA, S.; KIYOKAWA, Y.; TAKEUCHI, Y. Prevalência de 25 problemas comportamentais caninos e fatores relevantes de cada comportamento no Japão. **Journal of veterinary medical Science**, 81: 1090–1096. 2019. doi: 10.1292/jvms.18-0705.

YEON, S.C. The vocal communication of canines. **Journal of Veterinary Behavior**. 2, 141–144. 2007.