UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* L. ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS

Thaís Canto Cury

Monografia apresentada ao Departamento de Farmacologia
do Instituto de Biociências de Botucatu para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* L. ADMINISTRADO POR VIA INALATÓRIA EM CAMUNDONGOS

Thaís Canto Cury
Orientadora: Profª. Drª. Mirtes Costa
Co-orientador: Ms. Celso A. R. A. Costa

Monografia apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cury, Thaís Canto.
Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do óleo essencial da *Citrus aurantium* L. administrado por via inalatória em camundongos / Thaís Canto Cury. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010
Orientador: Mirtes Costa
Capes: 21003009

1. Essências e óleos essenciais. 2. Aromaterapia. 3. Ansiedade.
4. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Ansiedade; Aromaterapia; Camundongos; *Citrus aurantium*; Depressão; Óleo essencial.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus que sempre me ajudou nas horas difíceis e nas minhas conquistas.
- Agradeço à minha família que sempre torce por mim e é fundamental em minha vida. Mãe e pai, pelo amor, incentivo constante e apoio em todas as etapas da minha vida. Lívia, por sua alegria e companheirismo. Alysson, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, cumplicidade e amor. Mesmo longe, sempre presentes!
- Também agradeço a minha turma XLIV de Ciências Biomédicas, por fazer parte da minha história na graduação.
- Agradeço em especial minha amiga Melina, por ser uma companheira para todas as horas. Obrigada pelas longas conversas, risadas e amizade, que me ajudaram muito em todos os anos em Botucatu!
- Ao grupo PET-CBB, por me ajudar a crescer profissionalmente, me mostrar novos caminhos na graduação e pelo bom trabalho em grupo.
- A todos do Departamento de Farmacologia pelo auxílio no dia-a-dia.
- Agradeço aos colegas de laboratório. Primeiramente, agradeço ao Celso: obrigada por estar sempre disposto a me ajudar, conversar e me acompanhar em todos os experimentos e dias de estágio, contribuindo muito para o meu aprendizado. Também agradeço à Bruna, por compartilhar as idéias e me ajudar em decisões futuras; ao Leandro, pela boa vontade em ajudar e ao Vinicius, pela ajuda na realização dos primeiros experimentos.
- Agradeço à Profª Mirtes pela oportunidade, orientação e acolhimento em seu laboratório.

RESUMO

A investigação de plantas medicinais é indispensável na busca de novas substâncias com potencial atividade ansiolítica e antidepressiva, visto que a ansiedade e depressão estão entre os distúrbios do sistema nervoso central (SNC) mais relevantes dentre os problemas de saúde mundial. Tais plantas são fontes de óleos essenciais (OE) que frequentemente são utilizados na aromaterapia, pois fornecem substâncias voláteis capazes de curar e prevenir doenças por meio da inalação. Esta prática já se mostrou efetiva sobre o SNC, trazendo benefícios terapêuticos a pacientes que não respondiam bem aos tratamentos convencionais. Uma espécie vegetal cujo OE possui atividade sobre o SNC é o *Citrus aurantium* L. (laranja amarga), espécie do gênero que mostrou atividade ansiolítica quando utilizado na aromatização de ambiente na sala de espera de um consultório dentário. Aqui avaliamos o potencial efeito ansiolítico e antidepressivo do OE de *Citrus aurantium* L por via inalatória em camundongos, por meio da resposta comportamental em modelos experimentais de ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado, e de depressão, o Teste do Nado Forçado. Com esta avaliação, o OE não foi efetivo por via inalatória em nenhuma das concentrações testadas (0,5%, 1,0% e 2,5%), tanto para ansiedade quanto para depressão. No entanto, este resultado não exclui a possibilidade de obtenção de tais efeitos se alterada a concentração de OE.

Palavras-chave: ansiedade; aromaterapia; camundongo; *Citrus aurantium*; depressão; óleo essencial.

SUMÁRIO

1. Introdução 6

2. Objetivo 8

3. Material e Métodos 9

3.1. Obtenção e caracterização fitoquímica do óleo essencial 9
3.2. Animais 9
3.3. Procedimentos gerais 10
3.4. Aparato de inalação 10
3.5. Drogas e tratamentos 11
3.6. Avaliação da atividade ansiolítica 12
3.7. Avaliação da atividade antidepressiva 14
3.8. Avaliação da atividade motora 15
3.9. Análise Estatística 16

4. Resultados e Discussão 17

4.1. Análise fitoquímica 17
4.2. Avaliação da atividade ansiolítica 18
4.3. Avaliação da atividade antidepressiva 23
4.4. Avaliação da atividade motora 25
4.5. Avaliação geral 26

5. Conclusões 28

6. Referências Bibliográficas 29

1. INTRODUÇÃO

Distúrbios do sistema nervoso central (SNC) acometem milhares de pessoas no mundo e podem afetar diferentes aspectos do comportamento, como o pensamento, as emoções, a memória, as sensações, a linguagem e o movimento, interferindo na qualidade de vida sob o ponto de vista biológico, psicológico e/ou social (Cryan e Holmes, 2005).

Dentre estes distúrbios, a ansiedade representa um substancial problema de saúde pública no mundo, uma vez que causa um grande sofrimento pessoal e resulta em redução da expectativa de vida. O quadro de ansiedade caracteriza-se por estado emocional transitório que envolve conflitos psicológicos e sentimentos desagradáveis de tensão e angústia, além de desconforto derivado de antecipação do perigo ou de algo desconhecido (Cryan e Holmes, 2005). Quando permanente, a ansiedade pode trazer consequências indesejáveis, com considerável prejuízo funcional, como fadiga, deficiência do sistema imunológico e, inclusive, morte (Graeff e Brandão, 1999). Com isso, para seu tratamento existem diversas drogas e, dentro da abordagem farmacológica, os benzodiazepínicos são drogas que possuem efeito ansiolítico com alta eficácia terapêutica e baixos riscos de intoxicação. No entanto, podem levar ao uso abusivo, desenvolvimento de tolerância, síndrome de abstinência e dependência pelos usuários crônicos (Silva, 1999).

Outro distúrbio relevante é a depressão. A projeção para o ano de 2030 é que a depressão maior esteja em primeiro lugar dentre os problemas de saúde em termos de qualidade de vida e incapacitação da população mundial (World Health Organization, 2004). Caracterizada pela depressão do humor (sentimento de infelicidade, de fracasso e anedonia), redução de interesse ou prazer, a depressão pode vir acompanhada de outros sintomas, como mudança no apetite e no peso corporal, fadiga, agitação psicomotora, insônia e pensamentos suicidas (American Psychiatric Association, 2002). Os fármacos antidepressivos produzem, em média, uma melhora dos sintomas em 60 a 70% dos pacientes, no prazo de um mês (Souza, 1999). Dentre os mais utilizados, encontram-se a Imipramina (um antidepressivo tricíclico) e a Fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) que, de um modo geral, exibem boa eficácia, mas apresentam importantes efeitos colaterais como insônia, efeitos colinérgicos, disfunção sexual, dentre outros (Souza, 1999).

Tanto a ansiedade como a depressão são doenças psiquiátricas multifacetadas dramáticas e debilitantes, muitas vezes havendo co-ocorrência (Kalueff et al., 2007).

Nas ultimas décadas houve um intenso estudo de uma variedade de mecanismos neurobiológicos subjacentes a ansiedade e depressão, o que sugere que estas doenças

compartilhem determinantes genéticos comuns, mesmo com diferentes causas ambientais (Kendler et al., 1987).

Por estes motivos, considerando que o índice de comorbidade entre os quadros de ansiedade e depressão está em torno de 60 a 70 % (Kalueff et al., 2007), com indícios de que estes quadros possuam origens genéticas comuns (Kendler et al., 1987), é possível supor que uma mesma substância possa exercer atividade terapêutica em ambos os quadros.

Assim, os múltiplos efeitos adversos das drogas disponíveis e sua eficácia limitada em uma considerável proporção de pacientes justificam os esforços no sentido de encontrar novas substâncias com potencial atividade ansiolítica e antidepressiva.

É com esse objetivo que a investigação de plantas medicinais se apresenta como uma fonte promissora para a obtenção de novas moléculas com potencial atividade farmacológica (Calixto, 2000). Tais plantas são fontes de óleos essenciais, que já se mostraram efetivos sobre a atividade do sistema nervoso central, trazendo benefícios terapêuticos a pacientes deprimidos (Holmes e Rodgers, 1999) ou ansiosos (Morris et al., 1995; Lemon, 2004), que não respondem bem aos tratamentos convencionais (Carlini, 2003).

Para o sucesso de novas substâncias à base de plantas também se faz oportuno o desenvolvimento de terapias alternativas. Desta forma, entra em questão a incontestável popularidade da aromaterapia e o entusiasmo de profissionais da saúde quanto ao seu uso, o que têm incentivado seu aprimoramento e seu consequente êxito em diversos cenários da saúde (Cooke e Ernst, 2000).

A aromaterapia é definida como o uso terapêutico de uma fragrância ou uma substância volátil para curar e prevenir doenças, infecções e indisposições por meio de sua inalação. Frequentemente, ela utiliza óleos essenciais como fonte destas substâncias. Os óleos essenciais (OE) são definidos pela ISO (*International Standard Organization*) como compostos orgânicos obtidos de partes de plantas por destilação por arraste de vapor d'água. Há uma grande variedade na composição química dos OE que pode resultar em efeitos farmacológicos diversos.

Estudos clínicos sugerem que a exposição da inalação a vários tipos de OE é efetiva na redução do estresse psicológico, estado de ansiedade, assim como níveis de cortisol em pacientes hipertensivos (Hwang, 2006). Um destes estudos foi realizado com homens e mulheres expostos a gotas de óleo essencial de *Citrus sinensis* dispersas na ante-sala de um consultório odontológico. Esta exposição provocou efeito relaxante nos pacientes, especificamente nos casos das mulheres, que apresentaram menor nível de ansiedade, melhora no humor e maior estado de tranquilidade (Lehner et al., 2000).

Observa-se, então, uma forte relação entre a percepção de odores e a resposta no comportamento emocional, que foi sugerida pela conexão neuroanatômica (córtex órbito-frontal, amígdala, córtex piriforme e córtex do cíngulo anterior e insular) entre o olfato e as emoções (Pollatos et al., 2007).

Com isso, aqui investigamos a potencial atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongos expostos à inalação do OE de uma espécie vegetal que possui citação popular relacionada com a atividade sobre o SNC: *Citrus aurantium* L.

O *Citrus aurantium* L. (família Rutaceae), popularmente conhecido como laranja-amarga ou laranja-azeda (Santos et al., 1988) é uma planta originária do sudeste da Ásia, Índia e China (Grieve, 1994), cujas partes mais utilizadas com fins medicinais pela população são a casca dos frutos, flores e folhas. Em relação aos seus efeitos sobre o SNC, a espécie é popularmente empregada para curar ou aliviar insônia, tratar nervosismo, ansiedade e histeria, e as flores são utilizadas com fins sedativos (Santos et al., 1988; Lehrner et al., 2000).

Estudos anteriores já sugerem a ação central do óleo essencial de *C. aurantium*, potencialmente útil no tratamento da ansiedade (Carvalho-Freitas e Costa, 2002; Pultrini et al., 2006). No entanto, estas atividades foram detectadas após administração por via oral, diferentemente do presente estudo, que propõe a avaliação via inalatória do OE.

2. OBJETIVO

Investigar a potencial atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongos expostos à inalação do óleo essencial de *Citrus aurantium* L, por meio da resposta comportamental em modelos experimentais clássicos de ansiedade e depressão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e caracterização fitoquímica do óleo essencial

A parte vegetal utilizada foi a casca dos frutos. A coleta deste material foi realizada em um só pomar localizado no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, que contém 7 exemplares adultos da espécie selecionada.

Imediatamente após a coleta, as cascas dos frutos de *Citrus aurantium* L. foram submetidas à extração do OE por hidrodestilação, com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger. O material vegetal foi misturado com água destilada dentro de um balão volumétrico e posto sobre uma manta aquecedora. Assim que o conteúdo entrou em ebulição, o vapor resultante passou por um recipiente resfriado para condensar em líquido novamente, desembocando em um compartimento onde a água foi separada do óleo essencial por princípio de densidade.

Em seguida, a separação, quantificação e identificação das substâncias foram realizadas em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV). Dotado de coluna capilar: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

- Condições de análises:

Injetor: 220 ºC, Detector: 230 ºC; gás de arraste: hélio, vazão: 1,0 mL/min.; split: 1/20. Programa de temperatura: 60 °C-240 °C, 3 °C/min.

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (Adams, 2007). Os índices de retenção das substâncias foram obtidos pela co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C_9-C_{24}), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz, 1963.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com aproximadamente 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições controladas de luz (fase claro/escuro de 12 horas) e temperatura (21ºC ± 2ºC), com livre acesso à água e alimento.

Todos os animais foram acondicionados e tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo todos os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu (Anexo 1).

3.3. Procedimentos gerais

Os animais ficaram no Biotério do Departamento de Farmacologia por um período mínimo de uma semana antes de serem utilizados, e foram levados para o laboratório 2 horas antes de serem submetidos aos procedimentos experimentais, para habituação.

Os testes foram realizados sempre em um mesmo período, para evitar variações devidas ao ciclo circadiano. Além disso, foram feitos em uma sala isolada com som atenuado, exaustão de ar e controle de temperatura e luminosidade, na qual nenhuma outra atividade foi executada concomitantemente à realização dos experimentos.

3.4. Aparato de inalação

O procedimento experimental, padronizado para nossas condições experimentais (Ferreira, 2010) teve como base o descrito por Almeida e colaboradores (2004). O aparato consiste numa caixa de acrílico (36 x 30 x 29 cm) cujas paredes anterior e posterior contêm 4 furos de 2cm de diâmetro onde foram colocados os algodões embebidos com as soluções do óleo essencial ou com salina (2mL em cada unidade). A tampa removível da caixa é constituída por uma placa com 30 pequenos furos de 0,4cm de diâmetro para ventilação, como ilustrado na Figura 1.

Os camundongos foram colocados individualmente na caixa de inalação e o tempo de exposição foi de 7 minutos para cada animal, os quais foram posteriormente submetidos aos modelos comportamentais descritos adiante.

Para manter a homogeneidade na concentração do OE dentro da caixa, os algodões embebidos foram sempre renovados após exposição de dois animais. Além disso, a cada procedimento experimental, o aparato foi limpo com papel toalha embebido em água.

Figura 1. Aparato de inalação.

3.5. Drogas e Tratamentos

O óleo essencial de *Citrus aurantium* L. foi solubilizado em água nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,5%. Para o tratamento dos animais, a cada chumaço de algodão acoplado à caixa de inalação foram adicionados 2mL da solução em teste. Imediatamente após a retirada do aparato de inalação o camundongo foi submetido a um dos procedimentos experimentais descritos posteriormente.

Os animais que formaram os grupos controles (positivo e negativo) foram submetidos à caixa de inalação sem a presença do OE, tendo seus algodões embebidos apenas com 2mL de salina.

- Controle positivo: os animais que formaram o grupo controle positivo foram tratados com drogas-padrão em doses efetivas no respectivo procedimento, de modo a avaliar as condições experimentais para análise das atividades ansiolítica e antidepressiva previamente padronizadas. Assim, Diazepam (1mg/kg) foi utilizado como controle positivo no teste de ansiedade e Imipramina (30mg/kg), no teste de depressão. Ambas foram dissolvidas em solução fisiológica (Salina a 0,9%) e administradas por via intraperitoneal no volume final de 10 ml/kg.
- Controle negativo: o grupo controle negativo poderia ser formado de duas maneiras: os camundongos pertencentes a este grupo poderiam ser tratados com salina ou poderiam ficar isento de qualquer tratamento. Assim, aqui foi verificada a existência de diferença entre estes dois grupos com relação ao comportamento dos animais e, a partir desta resposta, foi escolhido o melhor controle negativo.

Foram tomadas medidas preventivas para que nenhum dos animais pertencente aos grupos controles (positivo ou negativo) fosse exposto ao odor do OE, para que assim não

houvesse interferência em seus resultados. Desta forma, as caixas de inalação permaneceram em uma capela dotada de um exaustor para controlar a disseminação do odor do OE.

3.6. Avaliação da atividade ansiolítica

O modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) é adequado para mensuração de ansiedade em roedores e usado extensivamente na descoberta de novos agentes ansiolíticos (Pellow e File, 1986). Foi originalmente descrito para ratos (Pellow et al., 1985) e posteriormente validado para camundongos (Lister, 1987).

O aparato do LCE (Figura 2) consiste numa plataforma com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados, todos medindo 30cm de comprimento por 5cm de largura. As paredes dos braços fechados têm 25cm de altura. A altura do labirinto em relação ao solo é de 50cm.

O protocolo experimental consiste em colocar o animal no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo-lhe permitido explorar livremente o aparelho por 5 minutos, durante os quais, os animais são filmados. Posteriormente, o aparelho é limpo com papel toalha e água para colocação do próximo animal.

Foram registrados os parâmetros tradicionais deste modelo: freqüência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. A aversão aos braços abertos é interpretada como sendo gerada pelo "medo da novidade" (que induziria aversão e curiosidade) e também pela elevação do braço aberto. Já o número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) é considerado como índice de atividade locomotora (Rodgers, 1992; Rodgers et al., 1995).

Alguns autores propuseram que a sensibilidade, confiabilidade e validade etológica de um teste melhorariam se a atenção do pesquisador fosse voltada para o que os animais fazem de fato no labirinto e não apenas para os itens primários (Rodgers et al., 1992). Assim, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo (Rodgers et al., 1995):

- Rearing (levantar) - comportamento exploratório no qual os camundongos apóiam-se nos membros posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, adquirindo posição vertical, mantendo as patas anteriores movimentando-se no ar ou encostadas contra a parede do braço (Espejo, 1997);
- Stretched attend postures (espreitas) - postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição;

- Grooming (autolimpeza) - limpeza de qualquer parte da superfície do corpo com a língua, dentes e / ou patas dianteiras.
- Head dippings (mergulhos de cabeça) - comportamento exploratório, no qual o animal examina a lateral do labirinto (braço aberto) em direção ao chão, sugerindo movimento vertical (Setem, 1999).

No LCE para camundongos, mergulho de cabeça e espreitas parecem preencher os requisitos de uma avaliação de risco (*risk assessment*), um comportamento que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentado por indivíduos ansiosos (Blanchard et al., 2001). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos. Desta forma, os animais mais ansiosos se aproximarão vagarosamente da saída da plataforma central, exibindo alta freqüência de espreitas e de mergulho de cabeça (Rodgers, 1992).

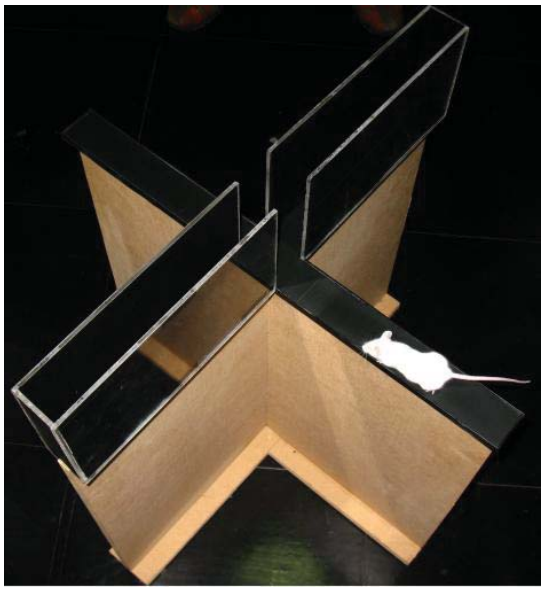


Figura 2. Labirinto em Cruz Elevado

3.7. Avaliação da atividade antidepressiva

O Teste do Nado Forçado é o modelo farmacológico "*in vivo*" mais utilizado para avaliação da atividade antidepressiva, cuja imobilidade reflete o estado de baixo humor relacionado com a impossibilidade de escape durante a situação experimental (Porsolt et al., 1977).

O protocolo foi realizado em um recipiente cilíndrico com 21 cm de altura e 20,5 cm de diâmetro, com uma coluna d´água de 13 cm, à temperatura de 23 ºC (± 1 ºC). A

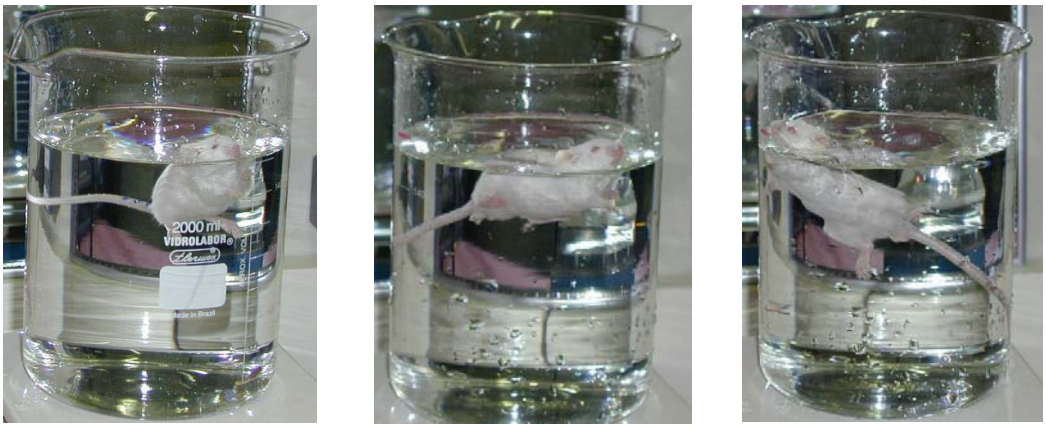
O comportamento avaliado se baseia na resposta de "desamparo aprendido" (Geyer e Markou, 2000) na qual o animal é submetido a um estresse incontrolável representado pela natação em um ambiente confinado. Os animais inicialmente nadam e tentam encontrar uma saída e, não obtendo êxito, assumem uma postura imóvel que ocorre cada vez mais precocemente com a repetição do procedimento. Assim, 24 horas antes do teste, é realizada uma a sessão treino, que representa o período de estresse incontrolável e inescapável. Esta sessão treino tem duração de 15 minutos e determina a ocorrência mais precoce de imobilidade na sessão de teste.

A sessão teste teve a duração de 6 minutos, durante os quais tem seu comportamento registrado pelo computador, em forma de vídeos. Para a posterior leitura destes vídeos, um programa distribuído livre e gratuitamente chamado *EthoLog* foi utilizado para a visualização e observação do comportamento (Ottoni, 2000). Esta ferramenta auxiliou a leitura dos comportamentos, que foram classificados e analisados detalhadamente pelo experimentador.

Os comportamentos executados foram classificados em: natação, escalada ou imobilidade (figura 3) e foram analisados somente nos 4 últimos minutos de gravação, uma vez que durante os 2 primeiros minutos observa-se pouca imobilidade dos camundongos, dificultando a avaliação do real efeito dos tratamentos (Porsolt et al., 1977).

O comportamento de natação é caracterizado por movimentos, usualmente horizontais, através do recipiente; o comportamento de escalada é caracterizado por movimentos ascendentes das patas dianteiras, geralmente, ao longo das paredes do recipiente; a imobilidade é definida quando nenhuma atividade adicional é realizada, com os animais executando movimentos mínimos para manter suas cabeças acima da água (Cryan et al., 2002).

Ao término do período de natação os animais foram retirados cuidadosamente do recipiente, secos com um papel toalha e colocados de volta nas suas respectivas caixas.



a) Imobilidade b) Natação c) Escalada

Figura 3. Comportamentos executados no Teste do Nado Forçado.

3.8. Avaliação da atividade motora

Com a finalidade de excluir a possibilidade de que um eventual efeito ansiolítico e/ou antidepressivo nos modelos descritos anteriormente seja devido a uma alteração na atividade locomotora, os camundongos foram submetidos a outro procedimento denominado Rota-Rod.

Descrita por Duham e Miya (1957), esta técnica pode detectar prejuízos neurológicos mínimos e consiste na avaliação da capacidade do animal em manter-se sobre uma barra giratória, a uma velocidade fixa. Prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade são indicados pela inabilidade do animal em se manter sobre a barra em 1 minuto. Cada animal foi submetido a três tentativas consecutivas para que demonstrem capacidade de permanecer sobre a barra.

Este aparato está mostrado na figura 4 e consiste em uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento que gira a uma velocidade de 5 r.p.m. Esta barra é dividida em 5 seções iguais para possibilitar a avaliação individual de 5 animais ao mesmo tempo. A altura da barra em relação à base do aparelho é de 25cm. Os animais foram selecionados 24 horas antes do teste, e apenas foram submetidos ao Rota-Rod aqueles animais que, em condições normais (sem nenhum tratamento) mostraram-se hábeis em manter-se em equilíbrio sobre a barra giratória.

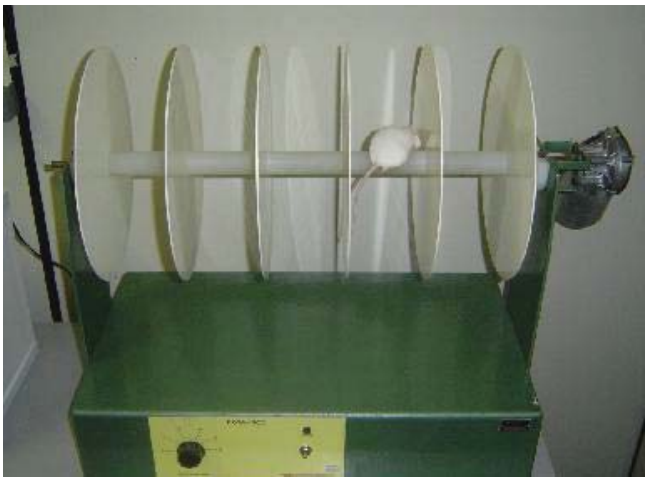


Figura 4. Rota-Rod

3.9. Análise estatística

Dados quantitativos foram comparados por análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Mann-Whitney, quando necessário. Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação comportamental foram apresentados como mediana e intervalo interquartis (Q1 e Q3), sendo comparados com grupo veículo (controle negativo), considerando as diferenças como significantes quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise fitoquímica

A análise dos principais componentes do óleo essencial (OE) foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A tabela 1 mostra os resultados da composição química do OE, cujo cromatograma está reproduzido na figura 5, na qual se observa que 98,66% é formado por limoneno.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *Citrus aurantium*

Pico	Substância	[%]	IK experimental	IK literatura*
1	β- pineno	0,41	977	976
2	mirceno	0,53	991	990
3	limoneno	98,66	1037	1029
4	ni	0,41	1100	-
	Total identificado	**99,59**		

(*) Índice de Kovats: Adams, 2007; ni = não identificada

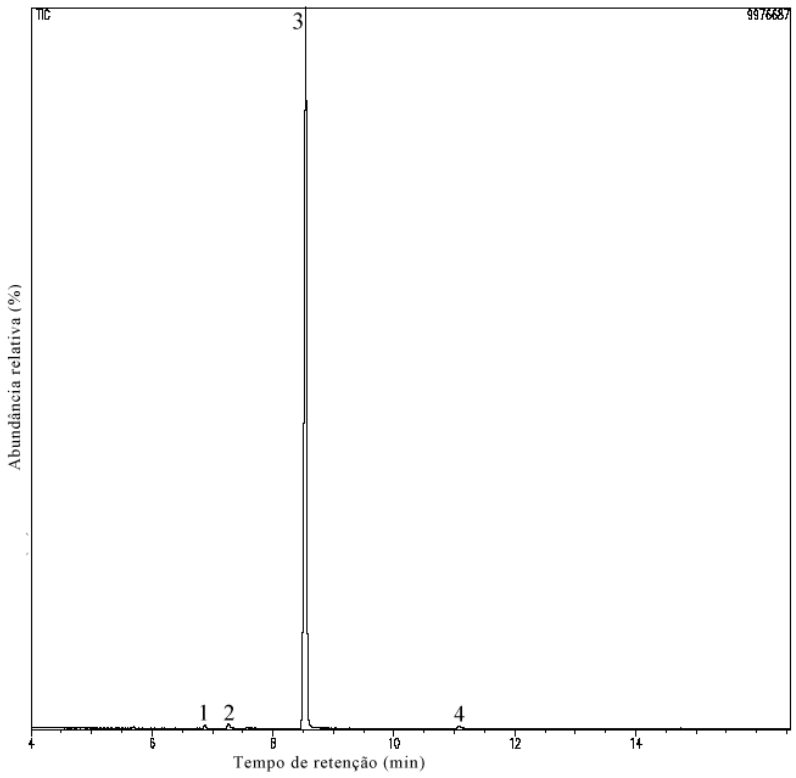


Figura 5. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

4.2. Avaliação da atividade ansiolítica

Utilizando o modelo do Labirinto em Cruz Elevado, os dois principais parâmetros medidos na avaliação da atividade ansiolítica foram: o tempo gasto nos Braços Abertos (BA) e a freqüência de entradas nos Braços Abertos.

a) Escolha do Controle Negativo: Salina ou Ausência de tratamento

Para a escolha do controle negativo, verificamos e comparamos duas opções: camundongos tratados apenas com salina e camundongos isentos de qualquer tratamento.

Conforme apresentado na figura 6 e 7, os controles negativos (Salina e Ausência de tratamento) não obtiveram diferença significante entre eles quanto aos parâmetros analisados.

Normalmente, a administração de salina por via intraperitoneal é utilizada como controle negativo, pois os camundongos são submetidos ao mesmo procedimento dos camundongos que compõem o grupo controle positivo: ambos sofrem manipulação experimental e o desconforto de receberem um tratamento por via intraperitoneal. No entanto, os animais que integram o grupo teste (inalação de óleo essencial) não recebem nenhum tipo de administração intraperitoneal, apenas sendo colocado diretamente na caixa de inalação.

Assim, para uma comparação mais efetiva entre o grupo teste e o controle negativo, determinamos o grupo com ausência de tratamento como o melhor controle negativo usado na investigação da atividade ansiolítica por via inalatória, por isentar o animal da manipulação e exposição ao tratamento e permitir que o camundongo tenha um comportamento mais natural frente ao novo ambiente no LCE.

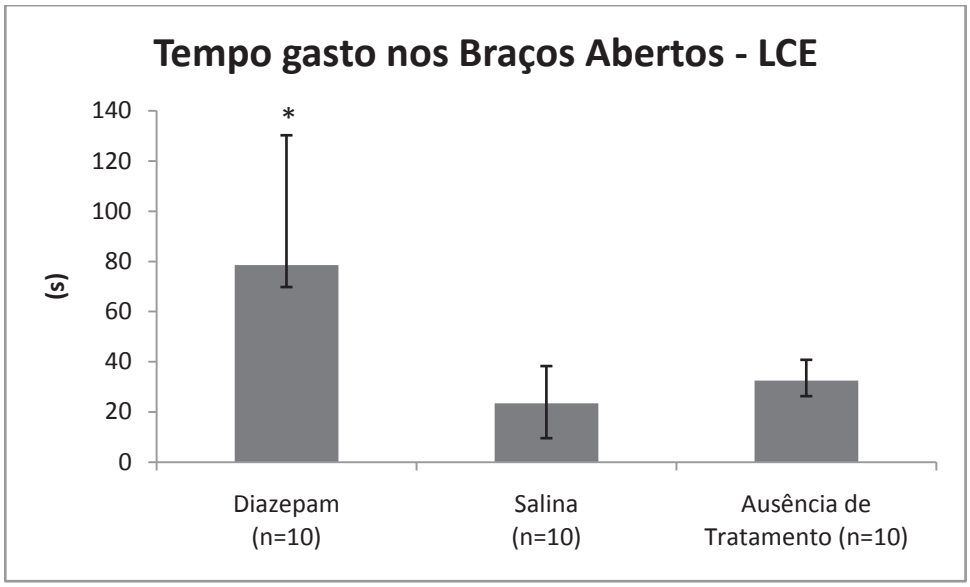


Figura 6. Mediana (Q1-Q3) do Tempo Gasto nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), útil na escolha do grupo controle negativo (salina ou ausência de tratamento).
n = número de animais por grupo
*p≤0,05 em relação aos grupos controles negativos (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann Whitney).

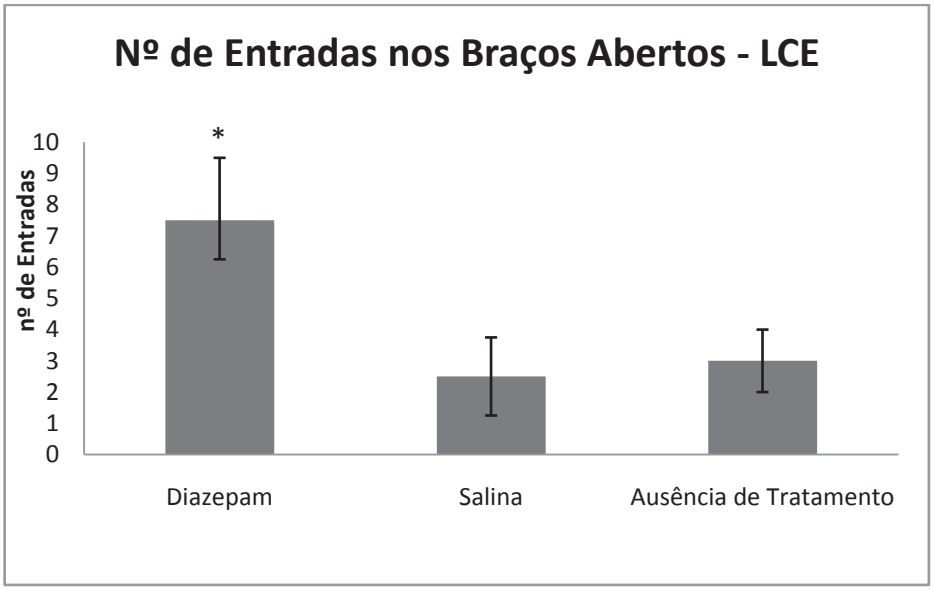


Figura 7. Mediana (Q 1-Q3) do Número de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) útil na escolha do grupo controle negativo (salina ou ausência de tratamento).
n = número de animais por grupo
*p<0,05 em relação aos grupos controles negativos (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann Whitney).

b) Avaliação do efeito ansiolítico do Óleo Essencial

Na análise do modelo do LCE, o DZP na dose de 1mg/kg (controle positivo) foi efetivo no aumento do tempo gasto nos Braços Abertos, e no aumento do número de entradas nos BA. A efetividade do controle positivo valida o procedimento experimental e descarta a possibilidade de erros na execução do procedimento. Já o OE (em todas as concentrações) não aumentou nenhum dos parâmetros clássicos, não obtendo diferença significativa em relação ao controle negativo. (Figuras 8 e 9).

Deste modo, é possível afirmar que o tratamento com OE nas concentrações testadas não modificou os parâmetros avaliados para ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado. E então, concluímos que o OE de *Citrus aurantium* L. nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,5% não possui efeito ansiolítico por via inalatória.

Com relação ao uso do LCE como modelo experimental, não há dúvida de que ele seja referência no estudo da atividade ansiolítica. O LCE é adequado para mensuração de ansiedade em roedores e usado extensivamente na descoberta de novos agentes ansiolíticos (Pellow e File, 1986). Este é um modelo baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, e os roedores tendem a evitar locais desprotegidos e elevados (Graeff e Guimarães, 2000), aqui representados pelos braços abertos. Drogas que na clínica são ativas no tratamento dos transtornos de ansiedade generalizada, em especial os derivados benzodiazepínicos, aumentam a interação dos animais com estes ambientes aversivos, enquanto o oposto ocorre em animais tratados com drogas ansiogênicas como, por exemplo, a cafeína. (Lister, 1987).

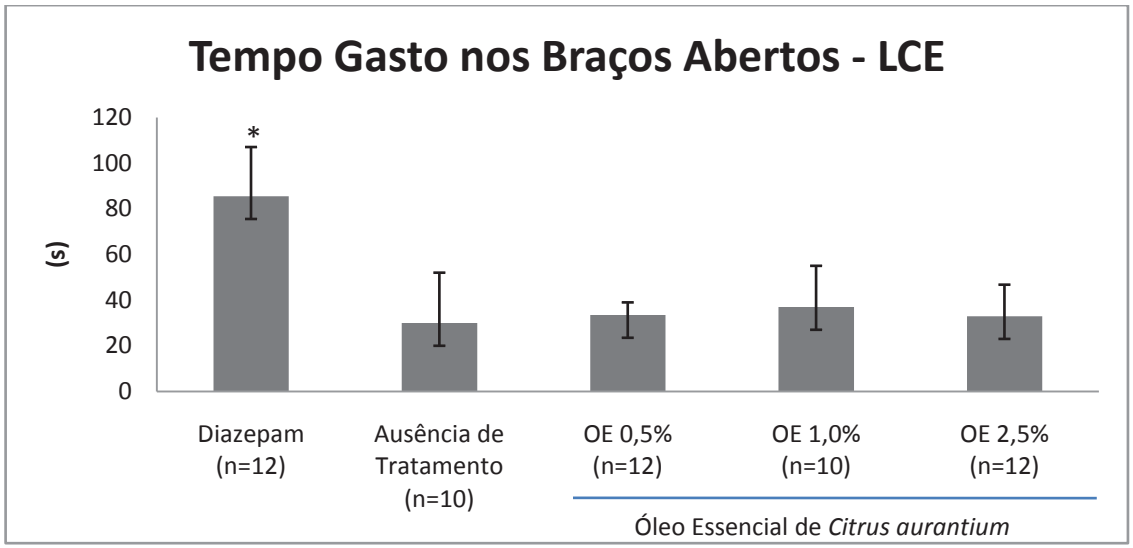


Figura 8. Mediana (Q 1-Q3) do Tempo Gasto nos Braços Abertos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para a Avaliação da Atividade Ansiolítica do Óleo Essencial (OE) de *Citrus aurantium L.* por via inalatória em camundongos.

n = número de animais por grupo

*p<0,05 em relação ao grupo controle negativo (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann Whitney).

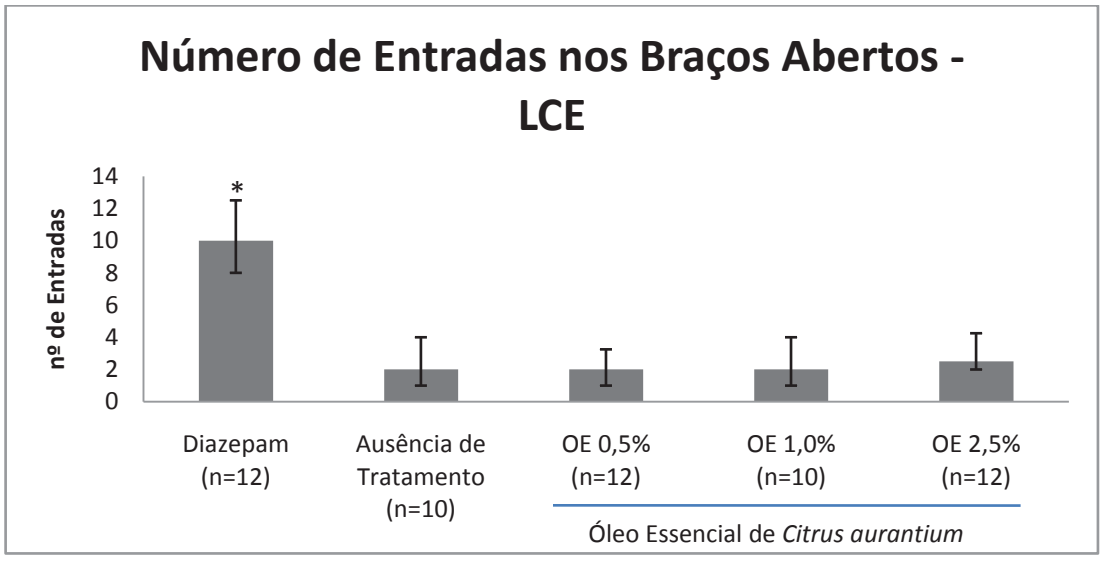


Figura 9. Mediana (Q 1-Q3) do Número de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para a Avaliação da Atividade Ansiolítica do Óleo Essencial (OE) de *Citrus aurantium L.* por via inalatória em camundongos.

n = nº de animais por grupo

* p<0,05 em relação ao grupo controle negativo (Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann Whitney).

Pelo fato de os resultados obtidos a partir dos dois parâmetros clássicos para o LCE não apresentarem respostas indicativas de efeito ansiolítico, a análise dos fatores etológicos deixou de ser significativa e relevante. Seus resultados apenas ressaltaram os resultados dos parâmetros clássicos, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos Fatores Etológicos na Avaliação de Ansiedade no LCE

	Fatores etológicos			
Tratamentos	Rearing	Mergulho de cabeça	Espreitas	Grooming
DZP	15,5 [11-20]	2 [2-4] *	2 [2-5] *	3,5 [0-23]
Ausência de Trat.	11 [10-15]	5 [4-5]	7,5 [6-9]	16 [8-20]
OE 0,5%	14 [9-19]	7 [5-11]	7 [3-7]	1 [0-7]
OE 1,0%	15 [11-22]	5 [2-8]	9 [8 -13]	66 [13-72]
OE 2,5%	19 [14-21]	4,5 [3-7]	8 [7- 8]	0 [0-6]

Mediana e Intervalos Interquartis [Q1 – Q3]
* $p<0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann Whitney).

Nesta tabela, são analisados os comportamentos que representam a avaliação de risco, em que o camundongo antecipa um perigo potencial. Assim, o mergulho de cabeça e as espreitas foram realizados com maior freqüência tanto no controle negativo (ausência de tratamento) quanto na inalação de óleo essencial (em todas as concentrações), o que somente ressalta a hipervigilância apresentada por indivíduos ansiosos. O grupo tratado com Diazepam obteve significativa redução destes dois comportamentos, sendo um resultado esperado e promovido por sua ação ansiolítica.

Os outros dois parâmetros medidos pela análise etológica foram rearing e grooming.

O comportamento de grooming foi avaliado pelo tempo em que o animal gasta para realizar sua autolimpeza. Alguns estudos relatam não haver correlação entre o comportamento de grooming e a ansiedade. Existem indícios de que os Benzodiazepínicos (como o Diazepam) provoquem redução deste comportamento, por reduzirem a resposta aos estímulos ansiogênicos (Spruijt et al., 1992). No entanto, por existir uma alta variabilidade nos resultados aqui encontrados, não é possível fazer inferências sobre a influência deste comportamento.

Já o rearing (levantar), que indica um comportamento exploratório, não obteve diferença significativa entre os grupos. A execução deste comportamento é importante para avaliar a integridade do sistema motor, relacionado com atividade exploratória (Espejo, 1997; Rodgers et al., 1997). Positivamente, o tratamento com OE não promoveu qualquer alteração

neste parâmetro. Essa medida é frequentemente utilizada em outros modelos comportamentais, como a Caixa Claro-Escuro (Crawley e Goodwin, 1980) em que os resultados deste comportamento são fundamentais para a avaliação do efeito ansiolítico.

A seleção de parâmetros para a pesquisa comportamental é um tópico importante de discussão. Enquanto alguns autores são a favor da adição de fatores etológicos, outros preferem ter como referências somente alguns "bons" indíces. Uma lamentável tendência observada atualmente em artigos publicados é que seus dados comportamentais são limitados a apenas algumas medidas, algumas vezes adicionando outros tipos de dados referentes a biologia molecular (Kendler et al., 1987). No entanto, é fundamental entender que a análise de multiplos parâmetros do comportamento (como a análise de fatores etológicos) pode muito bem ser tão importante quanto o estudo de marcadores genéticos ou neuroquímicos da ansiedade e depressão.

4.3. Avaliação da atividade antidepressiva

Utilizando o modelo do Teste do Nado Forçado, o principal parâmetro medido na avaliação da atividade ansiolítica foi o tempo de Imobilidade.

a) Escolha do Controle Negativo: Salina ou Ausência de Tratamento

A escolha do controle negativo se baseou nas mesmas condições apresentadas na avaliação da atividade ansiolítica.

Conforme mostrado na figura 10, os controles negativos não apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao tempo de imobilidade. Deste modo, também validamos a ausência de tratamento como o melhor controle negativo usado na investigação da atividade antidepressiva por via inalatória, assim como já determinado para a avaliação da atividade ansiolítica no LCE e já esclarecida suas vantagens.

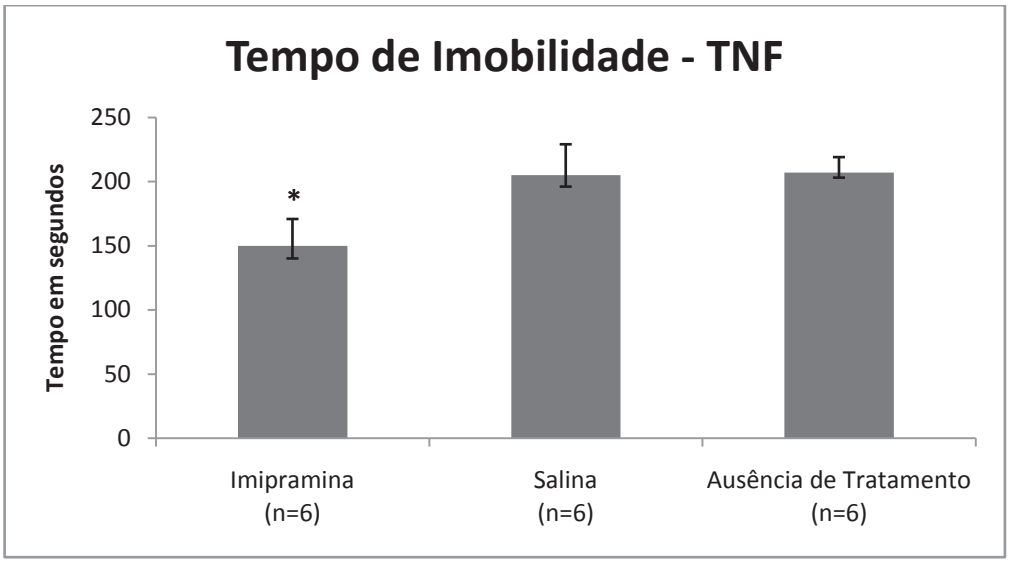


Figura 10. Mediana (Q 1-Q3) do Tempo de Imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF), útil na escolha do grupo controle negativo (salina ou ausência de tratamento).

n = número de animais por grupo

* p<0,05 em relação aos grupos controles negativos (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann Whitney).

b) Avaliação do efeito antidepressivo do Óleo Essencial

Observando a figura 11, a Imipramina na dose de 30mg/kg foi efetiva na redução do tempo de imobilidade, o que indica a presença da atividade compatível com a redução do desespero comportamental, parâmetro experimental associado à atividade antidepressiva. No entanto, observou-se que não houve diferença significativa do tempo de imobilidade entre as concentrações de OE e o controle negativo.

Os resultados encontrados para o OE de *Citrus aurantium* permitem afirmar que não existe efeito antidepressivo por via inalatória em camundongos submetidos a essas três concentrações de OE: 0,5%, 1,0% e 2,5%.

Com relação a confiabilidade do modelo experimental escolhido, o TNF é o modelo farmacológico "in vivo" mais utilizado para avaliar sinais de depressão, além de ter grande sensibilidade para todas as classes de antidepressivos, independentemente do mecanismo de ação (Petit-Demouliere et al., 2005).

Os outros comportamentos que poderiam ser analisados seriam a natação e a escalada, úteis na distinção das classes de drogas e determinantes na inferência do mecanismo de ação envolvido. Entretanto, seria interessante analisá-los caso houvesse redução do tempo de imobilidade para as concentrações do OE. Como o efeito antidepressivo não ocorreu, tornou-se desnecessária esta avaliação.

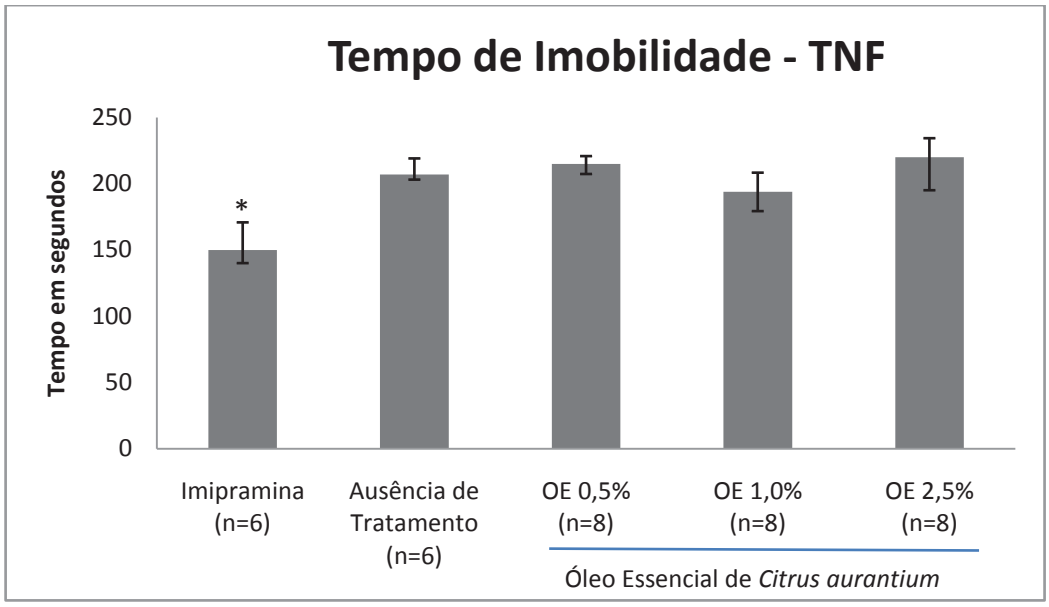


Figura 11. Mediana (Q 1-Q3) do Tempo de Imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF) para a Avaliação da Atividade Antidepressiva do Óleo Essencial (OE) de *Citrus aurantium* por via inalatória em camundongos.

n = número de animais por grupo

*p<0,05 em relação aos grupo controle negativo (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Mann Whitney).

4.4. Avaliação da atividade motora

A integridade do sistema motor foi avaliada com a utilização do Rota-Rod (Teste da Barra Giratória). Todos os animais foram submetidos ao teste, tanto no modelo para ansiedade quanto no modelo para depressão.

O resultado foi satisfatório quanto à integridade motora, uma vez que todos os camundongos foram capazes de se manter durante 1 minuto sobre a barra em movimento (5 r.p.m.), tanto os pertencentes aos grupos controles (Diazepam ou Imipramina ou Ausentes de Tratamento) quanto os animais pertencentes aos grupos que inalaram o OE.

Estes resultados são indispensáveis para confirmar as conclusões apresentadas anteriormente. A ausência de prejuízo na atividade locomotora nos camundongos submetidos aos testes garante que o efeito observado nos modelos não seja devido a nenhum comprometimento motor que impossibilite o desempenho e a execução dos comportamentos dos animais.

4.5. Avaliação geral

Excluídas as possibilidades de interferência nos resultados, é importante avaliar as atividades e implicações gerais de todo o experimento, que envolvem todos os modelos de forma indistinta.

Assim, é interessante analisar especialmente o uso do OE de *Citrus aurantium* no estudo da ansiedade e da depressão de um modo geral. Estudos anteriores mostraram que o OE de *Citrus aurantium* administrado por via oral tem atividade em modelos experimentais que reproduzem os principais transtornos de ansiedade. (Pultrini, 2006). Em um destes estudos, o OE de *Citrus aurantium* L. foi capaz de aumentar o tempo de permanência dos animais sobre os BA no LCE, perfil comportamental que indica um potencial efeito ansiolítico (Carvalho-Freitas e Costa, 2002). Além do LCE, outros modelos experimentais como a Caixa Claro-Escuro e o Teste de Esconder Esferas foram efetivos para demonstrar potenciais efeitos associados ao transtorno de ansiedade generalizada e ao transtorno obsessivo compulsivo, respectivamente. (Carvalho-Freitas e Costa, 2002). No entanto, vale destacar que os estudos foram realizados a partir da administração do OE via oral e o efeito foi encontrado com a administração de doses elevadas (1g/kg), ao contrário do que aqui propusemos, com a inalação de baixas concentrações de OE.

Com esta garantia sobre a utilização do *Citrus aurantium*, entra em questão o seu uso por via inalatória. Para isso, é relevante avaliar a potencialidade do uso de óleos essenciais provindos de plantas medicinais utilizados especificamente por via inalatória para o estudo da ansiedade e depressão. Neste caso, seu uso é fundamentado e validado por meio da resposta positiva obtida em estudos anteriores, em que óleos essenciais inalados por camundongos já apresentaram efeito ansiolítico quando expostos ao LCE (Almeida et al., 2004; Leite et al., 2008) e também efeito antidepressivo quando expostos ao TNF (Komori et al., 1995).

Portanto, com a ausência de alterações na atividade geral e habilidade exploratória dos camundongos somada à efetividade da inalação de óleos essenciais, aqui sustentamos a inexistência de efeito ansiolítico e antidepressivo do OE de *Citrus aurantium* L. nas concentrações avaliadas por via inalatória.

Mesmo assim, é importante destacar a possibilidade de obtenção de efeito se alterarmos as concentrações do óleo essencial. Um estudo realizado com ratos encontrou efeito ansiolítico do OE de *Citrus aurantium* L. na concentração de 2,5% (Leite et al., 2008). No entanto, no estudo com camundongos esta concentração não foi efetiva. Isso ocorre por existir uma dificuldade em estimar a correspondência da concentração de OE (assim como de

drogas, no geral) para diferentes espécies. Desta maneira, as concentrações aqui avaliadas podem ter sido inferiores à concentração efetiva para camundongos.

Além disso, em uma abrangente revisão, Inouye (2003) agrupa evidências experimentais de que óleos essenciais e compostos puros presentes em fragrâncias podem ser detectados na pele, pulmões, sangue e cérebro de camundongos, após exposição a um ambiente com o ar enriquecido destes compostos voláteis, resultado da absorção por meio da função pulmonar (inalação) ou percutânea, neste caso provavelmente por ligação à queratina (Inoye e Abe, 2006), um padrão de absorção semelhante ao que ocorre em seres humanos.

Isso nos faz especular duas possibilidades para explicar a ação dos OE sobre comportamentos em modelos experimentas que indicam ação sobre o SNC. Na primeira, as respostas comportamentais podem ser atribuídas à ativação do sistema olfatório pelos componentes voláteis presentes nos óleos essenciais, que atuariam em receptores localizados na cavidade nasal. Como resposta a esta ativação, tais receptores passariam a emitir sinais – via bulbo olfatório – para diferentes áreas do cérebro. A segunda possibilidade envolveria a passagem dos compostos presentes nos óleos essenciais através das membranas biológicas até atingirem a corrente circulatória, distribuindo-se desta forma para os demais órgãos até chegar ao sistema nervoso central. Nossos resultados não permitem a distinção entre estas duas possibilidades, mas esta informação seria relevante na escolha das concentrações utilizadas, uma vez que esta pode variar de acordo com o mecanismo envolvido na inalação do OE (ativação do sistema olfatório ou absorção através de membranas biológicas).

Portanto, não se pode generalizar e inferir que não existe efeito ansiolítico e antidepressivo do OE de *Citrus aurantium* por via inalatória, mas somente que não há efeito nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,5%. Deste modo, para uma avaliação mais completa, seriam necessários estudos mais refinados sobre a atividade biológica deste óleo essencial, possivelmente incluindo estudos de farmacocinética e neuroquímica.

5. CONCLUSÕES

- O Óleo Essencial de *Citrus aurantium* L. nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,5% não possui efeito ansiolítico por via inalatória.

- O Óleo Essencial de *Citrus aurantium* L. nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,5% não possui efeito antidepressivo por via inalatória.

- Não há comprometimento motor quando os camundongos são submetidos à inalação das três concentrações do OE de *Citrus aurantium* L.

- Camundongos isentos de tratamento podem ser escolhidos para compor o grupo controle negativo, em substituição da administração da salina, quando a via de administração da droga teste for inalatória.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P.; Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured, Carol Stream, Illinois, p.804, 2007.

ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *PharmacologyBiochemistry and Behaviour* v.77, p.361-364, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders. *American Psychiatric Association*, 349, 2002.

BLANCHARD, C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD R.J. Mouse defensive behaviours: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience andBiobehavioral Reviews* v.25, p.205-218, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v.33, p.179-189, 2000.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. *Phamacology Biochemistry and Behavior* v.75, p.501-512, 2003.

CARVALHO-FREITAS M.I.R.; COSTA M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin v. 25, p.*1629-1633, 2002.

COOKE, B.; ERNST, E. Aromatherapy: a systematic review. *British Journal of General Practice* v.50, p.493-496, 2000.

CRAWLEY J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* v. 13, 167–170, 1980.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery* v.4(9), p.775-790, 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences* v.23(5), p. 238-245, 2002.

DUNHAM, N.M.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association* v.46, p.208-209, 1957.

ESPEJO, E.F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze teste of anxiety. *Behavioural Brain Research* v.86, p.105-112, 1997.

FERREIRA, F. G. Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* Hook. f. & Thomson em camundongos, por via inalatória. L. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Farmacologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal Models of Psychiatric Disorders. *Psychopharmacology:The Fourth Generation of Progress*, 2000.

GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. *Neurobiologia das Doenças Mentais.* São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

GRIEVE, M. *A modern herbal.* London: Tiger Books International, p.601, 1994.

GUMNICK, J.K.; NEMEROFF, C.B. Problems with currently available antidepressants. *Journal of Clinical Psychiatry v.61, p.*5-15, 2000.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated-plusmaze.*Neuroscience & Biobehavioral Reviews* v.23, p.971-980, 1999.

HWANG, J.H. The effects of the inhalation method using essential oils on blood pressure and stress responses of clients with essential hypertension. *Taehan Kanho Hakhoe Chi v.* 36, p.1123-1134, 2006.

KALUEFF, A. V.; WHEATON M.; MURPH D. L. What´s wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research* v.179, p.1-18, 2007.

KENDLER K. S.; HEATH A. C.; MARTIN N. G.; EAVES L. J. Symptoms of anxiety and symptoms of depression: same genes, different environments? *Arch Gen Psychiatry* v.7, p.445-451, 1987.

KOMORI T.; FUJIWARA R.; TANIDA M.; NOMURA J. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* v.5: p.477-480, 1995.

LEHRNER, J.; ECKERSBERGER, C.; WALLA, P.; POTSCH, G.; DEECKE, L. Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients. *Psysiology and Behavior* v.71, p.83-86, 2000.

LEITE, M.; FASSIN, J.Jr.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of Citrus aurantium L. inhalation in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy v.*18, p.661-666; 2008.

LEMON, K. An assessment of treating depression and anxiety with aromatherapy. *The international journal of aromatherapy* v.14, p.63-69, 2004.

LISTER, R.G. The use of a Pluz-Maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* v.92, p.180-185, 1987.

MALIZIA, A.L. Receptor binding and drug modulation in anxiety. *European Neuropsycopharmacology v.*12, p.567-74, 2002

MORRIS, N.; BIRTWISTLE, S.; TOMS, M. Anxiety reduction by aromatherapy: anxiolytic effects of inhalation of geranium and rosemary. *The international journal of aromatherapy* v.7(2), p.33-39, 1995.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* v. 32(3), p.446-449, 2000.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated-plus maze; a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* v.24, p.525-529, 1986.

PELLOW, S.; CHOPPIN, P.; FILE S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. *Journal of. Neurosciences Methods* v.14, p.149-167, 1985.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology.* v. 177, p. 245-255, 2005.

POLLATOS, O.; ALBRECHT, J.; KOPIETZ, R.; LINN, J.; SCHOEPF, V.; KLEEMANN, A.M.; SCHREDER, T.; SCHANDRY, R.; WIESMANN, M. educed olfactory sensitivity in subjects with depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders* v.102, p.101-108, 2007.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* v.266, p.730-732, 1977.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences* v.78, p.1720-1725, 2006.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v.30, p.289-304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; COBAIN, M.R.; DALY, P.; DORAN, P.J.; EELLS, J.R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP1. *Behavioural Pharmacology* v.3, p.621-634, 1992.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior v.*52, p.297–303, 1995.

RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* v.106, p.102-110, 1992.

SANTOS, C.A.; TORRES, K.R.; LEONART R. *Plantas medicinais.* 2ed. São Paulo. Ícone, 1988. p.155.

SETEM, J.; PINHEIRO, A.P.; MOTTA, V.A.; MORATO, S.; CRUZ, A.P.M. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and. Behavior* v.62, p.515-521, 1999.

SILVA, J.A. *História dos Benzodiazepínicos*. In: BERNIK, M.A., editor. Benzodiazepínicos, quatro décadas de experiência. São Paulo (SP): Edusp, p.15-28, 1999.

SOUZA, F.G.M. Tratamento da depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria* v.21, p.18-23, 1999.

SPRUIJT, B. B.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and Neurobiology of Grooming Behavior. *Physiological Reviews* v. 72, p.825-851, 1992.

STOPPE JUNIOR, A. Aspectos clínicos da depressão em idosos. *Psiquiatria Clínica* v.21(4), p.121-128, 1994.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatograpy, *Journal of Chromatography A* v. 11, p. 463-471, 1963.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): Mental Health "Depression" Acesso em: 06/07/2010. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/

ANEXO 1

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP **fone** (014) 38116013 **fax** (01438113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009/06-CEEA, sobre *"Modelos experimentais em ansiedade em roedores"*, sob a responsabilidade de **MIRTES COSTA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela ***COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*** (CEEA), em reunião de 06/04/06.

Botucatu, 07 de abril de 2006.

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS GANEO DE MELLO
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária – CEEA

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **155-CEEA**, sobre "Modelos experimentais de depressão em roedores", sob a responsabilidade de **Mirtes Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *"Ad referendum"* da ***COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*** (CEEA), nesta data.

Botucatu, 19 de janeiro de 2010.

Profª Drª PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA

Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br