

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências – Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

**“Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos
essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* (Lam.)
Hook. f. & Thomson em camundongos, por via inalatória.”**

Filipe Galvão Ferreira

*Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia
do Instituto de Biociências de Botucatu como
requisito para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).*

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mirtes Costa

Botucatu
2010

Filipe Galvão Ferreira

**“Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos
óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata*
(Lam.) Hook. f. & Thomson em camundongos, por via
inalatória.”**

*Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia
do Instituto de Biociências de Botucatu como
requisito para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).*

Comissão Examinadora:

1º Titular/Presidente: Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa (UNESP/Botucatu)

2º Titular: Prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma Lima (UNESP/Botucatu)

3º Titular: Prof^a. Dr^a. Rosana de Alencar Ribeiro (UNIFESP/São Paulo)

1º Suplente: Prof^o. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira (UNESP/Botucatu)

2º Suplente: Prof^o. Dr. Roberto Frussa Filho (UNIFESP/São Paulo)

Auxílio Financeiro: **CAPES**
(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)



Dedicatória

Aos meus pais Júnior e Amélia, os quais são fundamentais em minha vida, sempre me

apoiando em todas minhas decisões. Eles sim são meus verdadeiros “Mestres”!

A minha irmã Camila a qual seguiu a mesma profissão e sempre me apoiou!

Aos meus avós Joel e Janete por terem corações que não cabem no peito!

Aos meus avós Eugênia por sua fé e ao “Pabipo” que cedo partiu!

Agradecimientos

*“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma.”
(John Ruskin)*

À Deus!

À minha família que SEMPRE me ajudou e torceram por mim! MUITÍSSIMO OBRIGADO!

À professora Dra. Mirtes Costa pelo voto de confiança e por todo aprendizado! Obrigado!

À todos meus amigos de Tatuí, Sorocaba, Botucatu e aos que estão espalhados por esse mundão sempre proporcionando momentos de descontração e alegria!

Aos grandes amigos que fiz no laboratório: Valéria, Dani, Carlos e Celso. Obrigado por contribuírem no meu aprendizado e por todos os momentos de muitas risadas, principalmente nas nossas viagens a congresso!

A todos do Depto. de Farmacologia: Professores, Funcionários, Estagiários, Pós-graduandos, que, de uma forma ou de outra, fizeram parte dessa caminhada.

Ao pessoal da “pelada” de terça-feira pelos momentos de lazer sendo minha única atividade física durante essa temporada!

A Dr^a Márcia Ortiz do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que gentilmente fez a análise dos componentes do óleo essencial.

A CAPES pelo incentivo científico e suporte financeiro.

A todos aqueles que não foram citados aqui que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho!

LISTA DE ABREVIações

- ADT – Antidepressivos tricíclicos
- AI – Aparato para inalação
- AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico
- BZD – Benzodiazepínicos
- CA – Campo aberto
- CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- DM – Depressão maior
- DSM – Manual de Diagnóstico e Estatística
- GABA – Ácido gama-aminobutírico
- IAC – Instituto Agrônomo de Campinas
- IMAO – Inibidor da enzima monoaminoxidase
- i.p. – via intraperitoneal
- ISO – *International Standard Organization*
- ISRN – Inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina
- ISRS - Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
- LCE – Labirinto em cruz elevado
- MAO – Monoaminoxidase
- NA – Noradrenalina
- OE – Óleo essencial
- SNC – Sistema nervoso central
- TSC – Teste de suspensão pela cauda
- WHO – *World Health Organization*
- 5-HT - Serotonina

Sumário

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de abreviações

Resumo

Abstract

Prólogo

| | |
|---|----|
| I.) Introdução | 01 |
| II.) Objetivo | 13 |
| III.) Material e Métodos | 14 |
| 3.1) Obtenção do óleo essencial..... | 14 |
| 3.2) Animais..... | 15 |
| 3.3) Procedimentos gerais..... | 15 |
| 3.4) Aparato de inalação..... | 16 |
| 3.5) Drogas e Tratamentos..... | 17 |
| 3.6) Avaliação da atividade ansiolítica..... | 17 |
| 3.7) Avaliação da atividade antidepressiva..... | 19 |
| 3.8) Avaliação da atividade motora..... | 20 |
| 3.9) Análise estatística..... | 21 |
| IV.) Resultados & Discussão | 22 |
| V.) Conclusão | 38 |
| VI.) Referências Bibliográficas | 39 |
| VII.) Anexos | |

Resumo

Resumo:

A ansiedade, um dos mais freqüentes distúrbios do sistema nervoso central, afeta uma em cada oito pessoas da população mundial, sendo que nem todos os pacientes respondem às drogas disponíveis que, ainda, podem induzir tolerância e/ou dependência. A depressão é caracterizada como um distúrbio do humor seriamente deprimido acompanhado de sintomas adicionais tais como sentimentos de desvalia, anedonia, podendo muitas vezes chegar ao suicídio. A terapêutica disponível para essas patologias apresentam diversos efeitos colaterais importantes e não são capazes de controlar os quadros em todos os pacientes, além da demora para o início de suas ações. Deste modo a avaliação de novos compostos pode ser útil no sentido de se encontrar novas alternativas de tratamento, mais eficazes e seguras. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e de *Cananga odorata* em dois modelos comportamentais validados, o labirinto em cruz elevado e o teste de suspensão pela cauda por via inalatória em camundongos. Os resultados dos testes farmacológicos mostraram que o óleo essencial de *Mentha piperita* aumentou significativamente o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, na concentração de 0,01% quando comparados com o grupo controle, indicando um efeito do tipo ansiolítico. O óleo essencial de *Cananga odorata* reduziu significativamente o parâmetro primário de tempo de imobilidade, no teste de suspensão pela cauda, nas concentrações de 0,1% e 1,0%, indicando um efeito do tipo antidepressivo. Além disso, observou-se também um aumento na latência para imobilidade reforçando o efeito do tipo antidepressivo. No teste do campo aberto, nenhuma diferença significativa foi observada em qualquer dos parâmetros registrados (freqüência da locomoção e número de *rearings*) dos grupos tratados com óleo essencial quando comparados com os valores controles. Tal resposta pode ser atribuída à ativação do sistema olfatório pelos componentes voláteis presentes nos óleos essenciais ou por absorção através de membranas biológicas.

Abstract

Abstract:

Anxiety is one of the most frequent central nervous system disorder affecting one every eight people in the world population. All the patients submitted to treatment do not always achieve a good response, and the drugs available for treatment can lead to tolerance and dependency. Depression is a chronic mental disorder clinically characterized by a pervasive low mood, loss of interest or pleasure in daily activities, low self-esteem, and a high suicidal tendency. The available drugs present important collateral effects and they are not capable to control the pictures in all the patients, also delay to beginning the action. This way, the efforts to find in new substances with potential therapeutic activity are justified. The present study aimed at assessing a possible anxiolytic and antidepressant effect in mice exposed to the inhalation of the essential oil of *Mentha piperita* and *Cananga odorata*, evaluated in experimental models of anxiety (elevated plus-maze) and depression (tail suspension test). The results showed that the essential oil of *Mentha piperita* 0,01% induced a significant increase in the time spent and number of visits in the open arms, when compared with the control group indicating the anxiolytic-like effect. The essential oil of *Cananga odorata* 0,1% e 1,0% reduced immobility time in the tail suspension test, indicating the antidepressant-like effect. Moreover, we observed that an increase the latency to immobility emphasizing the antidepressant-like effect. In the open-field test, we not observed any difference between the groups (frequency of locomotion and *rearing*). These effects can be attributed of the olfactory system activation for volatile components the essential oil or by absorption through biological membranes.

Prólogo

Prólogo:

Durante o curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Área de Farmacologia houve a possibilidade de participação em diferentes atividades extra-curriculares bem como em outras atividades de pesquisa desenvolvidas no laboratório. Estas atividades possibilitaram a divulgação de resultados em Congressos Nacionais e Internacionais.

*** Trabalhos apresentados na forma de painel em evento científico internacional:**

⇒ SANTOS, R.C.; FERREIRA, F. G.; RIBEIRO, C.A.S.; COSTA, M.; HIRUMALIMA, C.A. Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus* L. e seu composto majoritário (Eugenol) em camundongos. In: 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, Lisboa – Portugal, 2009, p. 123-123.

⇒ SANTOS, R.C.; RIBEIRO, C.A.S. ; FERREIRA, F. G. ; COSTA, M.; HIRUMALIMA, C.A. Efeito antinociceptivo do eucaliptol, composto majoritário de *Eucalyptus* sp. em camundongos. In: 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, Lisboa – Portugal, 2009, p. 122-122.

⇒ RIBEIRO, C.A.S. ; FERREIRA, F. G. ; COSTA, M. . Interferência de exposições múltiplas sobre os parâmetros comportamentais avaliados em modelos experimentais de ansiedade em camundongos. In: I IBRO/LARC Congress of Neurosciences, 2008, Búzios - RJ. I IBRO/LARC Congress of Neurosciences, 2008. p. 136-136.

⇒ COSTA, C.A.R.A. ; FERREIRA, F. G. ; COSTA, M. . Avaliação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em modelos de transtornos obsessivo compulsivo (TOC) e depressivo (TD).. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008. p. 142-142.

*** *Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos nacionais:***

⇒ FERREIRA, F. G. ; RIBEIRO, C.A.S. ; COSTA, M. . Exposição ao aparato utilizado para administração de drogas por via inalatória em camundongos: Interferência diferencial em comportamentos para avaliar ansiedade. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, Águas de Lindóia, 2009. p. 52-52.

⇒ RIBEIRO, C.A.S. ; FERREIRA, F. G. ; COSTA, M. . Comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro e campo aberto: Análise da interferência de exposições sucessivas. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, Águas de Lindóia. 2009. p. 52-52.

*** *Produção técnica:***

⇒ FERREIRA, F. G. ; SANTOS, R.C. ; RIBEIRO, C.A.S. . Potencial farmacológico de plantas: Sistema nervoso central e trato gastrintestinal. 2009. (Curso de curta duração ministrado).

*** *Livros publicados/organizados ou edições***

⇒ LEMKE, N. (Org.) ; FERREIRA, F. G. (Org.) ; SANTOS, R.C. (Org.) ; RIBEIRO, C.A.S. (Org.) ; FONSECA, P.R. (Org.) . Ensaio em Biociências. 1. ed. Botucatu: UNESP, 2009. v. 1. 111 p.

*** Capítulos de livros publicados**

- ⇒ FERREIRA, F. G. ; RIBEIRO, C.A.S. ; SANTOS, R.C. . Potencial farmacológico de plantas - Sistema nervoso central, trato gastrointestinal, analgesia e inflamação. Ensaios em biociências. 1 ed. : UNESP, 2009, v. 1, p. 98-109.

*** Organização de eventos científicos:**

- ⇒ Comissão de Apoio do VII Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2008.
- ⇒ Comissão Organizadora e Comissão Científica do VIII Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2009.

*** Participação em eventos científicos:**

- ⇒ 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia. 2009. Lisboa/Portugal.
- ⇒ XXIV Reunião anual da FeSBE. 2009. Águas de Lindóia/SP.
- ⇒ IX Encontro Paulista de Farmacêuticos. 2009. Sorocaba/SP.
- ⇒ VIII Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2009. Botucatu/SP.
- ⇒ I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin America, the Caribbean and Iberian Peninsula. 2008. Búzios/RJ.
- ⇒ XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology. 2008. São Paulo/SP.
- ⇒ VII Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2008. Botucatu/SP.
- ⇒ VIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu. 2008. Botucatu/SP.
- ⇒ Participação na Mesa Redonda “Trajetória dos Egressos do Programa de Iniciação Científica” 2008. Sorocaba/SP.
- ⇒ Trabalho científico em fase de conclusão intitulado “Anxiolytic and

antidepressant effects of *Mentha piperita* and *Cananga odorata* essential oil inhalation in mice” para submissão em periódico.

Introdução

I. Introdução:

Distúrbios do sistema nervoso central acometem milhões 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.

A ansiedade é um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho (CRYAN & HOLMES, 2005). É um fenômeno decorrente de longo processo evolutivo que permite o organismo reagir a situações que ameacem sua existência. Sob este aspecto é um fenômeno benéfico que reduz as ameaças potenciais e suas possíveis conseqüências, mas permanecer indefinidamente neste padrão comportamental pode trazer conseqüências indesejáveis como fadiga, deficiência do sistema imunológico e, inclusive, morte (GRAEFF & BRANDÃO, 1999).

A classificação dos transtornos ansiosos não é simples ou única embora ocorra uma tendência à unificação diagnóstica internacional, ainda não disponível (KESSLER, 2005). Uma das classificações mais bem aceitas é a proposta pelo Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, IV Revisão (DSM-IV), que classifica os transtornos de ansiedade em: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, agorafobia, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, fobias específicas e transtorno de estresse pós-traumático (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). Os transtornos ansiosos representam o grupo de desordens psiquiátricas mais prevalente, caracterizados por quadros clínicos em que os sintomas são primários, ou seja, não são derivados de outras

condições psiquiátricas (depressão, psicose, transtorno do desenvolvimento ou hipercinético, entre outros) (KESSLER, 2005).

Em um estudo multicêntrico, utilizando os critérios diagnósticos do DSM, ALMEIDA FILHO e colaboradores (1992; 1997) constataram alta prevalência na população brasileira (8% a 18%) como também alta prevalência de casos potencialmente necessitados de assistência (5% a 12%). Dentre os tipos de ansiedade, outro estudo brasileiro (ANDRADE et al., 2002) observou distribuição diferencial de prevalência para os tipos de ansiedade: transtorno de ansiedade generalizada (4,2%), transtorno de pânico (1,6%), agorafobia (2,1%), fobia simples (4,8%), fobia social (3,5%) e transtorno obsessivo-compulsivo (0,3%). No entanto, apesar da alta prevalência, menos de 30% dos indivíduos que sofrem de transtornos ansiosos procuram tratamento (LEPINE, 2002).

Dentre os tratamentos medicamentosos, os Benzodiazepínicos (BZDs) são drogas que possuem efeito ansiolítico com alta eficácia terapêutica e baixos riscos de intoxicação (SILVA, 1999), mas que podem levar ao uso abusivo, desenvolvimento de tolerância, de síndrome de abstinência e de dependência pelos usuários crônicos (OLIVER et al., 1998), o que reduz sua segurança de uso, em especial na vigência de fatores de risco (FRASER, 1998). Os BZDs ligam-se a sítios específicos associados aos receptores GABA_A, intensificando a neurotransmissão inibitória gabaérgica, o que resulta em efeitos adversos como sedação, relaxamento muscular e sonolência, além de apresentarem interações importantes com outros depressores do sistema nervoso central (OLIVER et al., 1998).

Também utilizados no tratamento de quadros ansiosos, as azapironas, como a Buspirona, têm atividade agonista parcial sobre os receptores 5-HT_{1A} e sua ação ansiolítica é devida tanto à atividade sobre receptores pré-sinápticos somatodendríticos, diminuindo a frequência de disparos do neurônio serotoninérgico

quanto à atividade sobre receptores pós-sinápticos, competindo com a serotonina e, conseqüentemente, reduzindo sua ação (GRAEFF, 1999). A atividade ansiolítica não é acompanhada de sedação, no entanto, a remissão dos sintomas começa a ser percebida apenas cerca de duas semanas após o início do tratamento, que deve ser feito três vezes ao dia, devido a sua curta meia-vida. Os efeitos adversos mais comumente associados ao uso da buspirona são náusea, vertigem, cefaléia e, ocasionalmente, nervosismo e excitação (ANDREATINI et al., 2001).

Outras classes de drogas como antidepressivos, betabloqueadores, antipsicóticos e extratos de espécies vegetais, têm sido utilizadas com sucesso em alguns casos, no entanto, dentre os portadores de transtorno de ansiedade generalizada estima-se que menos de 50% dos pacientes apresentem remissão total da sintomatologia com as ferramentas farmacológicas disponíveis, indicando a necessidade de continuidade da pesquisa pré-clínica e clínica neste campo (ANDREATINI et al., 2001).

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 (CRYAN & HOLMES, 2005; PILC & NOWAK, 2005).

Diversos estudos demonstram que sintomas de ansiedade são freqüentes em pacientes depressivos e, em geral, isso desencadeia um pior prognóstico (CLAYTON et al., 1991; ZIMMERMAN et al., 2000; KESSLER & GREENBERG, 2002). A ansiedade e depressão são consideradas, na clínica, desordens distintas devido aos diferentes tratamentos utilizados, usualmente os benzodiazepínicos e os antidepressivos tricíclicos. Entretanto, estudos clínicos têm demonstrado uma grande sobreposição entre esses dois estados (ANDREATINI & BACELLAR, 1999).

A depressão maior ou depressão unipolar é caracterizada por um humor seriamente deprimido (sentimentos profundos de infelicidade, deslocamento e desvalia) ou prazer reduzido nas atividades diárias, e é acompanhada por, pelo menos, quatro sintomas adicionais que incluem mudanças no apetite e no peso corporal, fadiga, agitação psicomotora, insônia ou hipersonia, falta de concentração, sentimentos de culpa, diminuição da libido e pensamentos suicidas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*), a prevalência de depressão maior é crescente, sendo estimados 120 milhões de casos (aproximadamente 5,8% dos homens e 9,5% das mulheres) com um episódio depressivo em um dado momento da vida (WHO, 2006). No ano de 2030 espera-se que a depressão maior seja o primeiro maior problema de saúde em termos de qualidade de vida e incapacitação da população mundial (WHO, 2004).

A fisiopatologia exata dos distúrbios depressivos é ainda pouco esclarecida. Na realidade, muito do que é conhecido hoje e as teorias prevalentes são baseadas no estudo dos mecanismos farmacológicos de ação de compostos com atividade antidepressiva conhecida.

A primeira substância antidepressiva foi identificada por acaso na década de 50, durante o estudo de medicamentos usados para o tratamento da tuberculose que pareciam melhorar o humor dos pacientes. Um derivado destes medicamentos, o inibidor da enzima monoaminoxidase (IMAO) iproniazida mostrou sua capacidade de reduzir os sintomas depressivos, constituindo, assim, a primeira farmacoterapia efetiva para este distúrbio (SNYDER, 1986). Logo depois uma segunda classe de substâncias, os antidepressivos tricíclicos (ADT), inicialmente usados como anti-histamínicos, foram usados na clínica para tratar transtornos depressivos. Estas substâncias, que não apresentam alguns dos mais sérios efeitos colaterais

associados à inibição da MAO, inibem a recaptção de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos das sinapses centrais, prolongando a possibilidade de interação destas monoaminas com seus receptores pós-sinápticos (SNYDER, 1986).

A descoberta dos alvos moleculares para a primeira geração de medicamentos antidepressivos levou ao desenvolvimento das drogas da segunda e da terceira geração, tais como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN).

Todos estes fármacos agem pelos mesmos mecanismos farmacológicos, chamados monoaminérgicos, que se caracterizam pela reversão do déficit funcional das monoaminas transmissoras em certos locais do cérebro. É este déficit que leva ao estado depressivo. Clinicamente, os novos compostos não são mais eficazes que os antigos, mas produzem menos efeitos adversos. Estes fármacos exercem seu efeito antidepressivo por aumentarem a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, por inibirem sua recaptção, agindo direta ou indiretamente nos sistemas transportadores pré-sinápticos, ou por inibirem a degradação dos mediadores. Muitos estudos pré-clínicos e clínicos claramente implicam os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos na ação antidepressiva (MANN, 1999; PAUWELS, 2000).

A teoria monoaminérgica da depressão (HENDLEY & SNIDER, 1968) ainda é a mais aceita para explicar a etiologia e a patogênese da depressão, atribuindo esta psicopatologia a um prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica e, mais recentemente, dopaminérgica (KAPUR & MANN, 1992). Este déficit monoaminérgico pode ser resultante de diversos mecanismos, não excludentes entre si: redução da síntese ou degradação precoce dos mediadores, expressão ou função alterada dos receptores destes mediadores, e prejuízo nos sistemas de

transdução de sinal ativados pelos receptores pós-sinápticos das monoaminas (URANI et al., 2005).

A teoria monoaminérgica da depressão pode explicar algumas características do transtorno e é a base dos tratamentos usados há mais de 50 anos, mas não explica por si só sua patogênese. A teoria monoaminérgica também não explica o grande número de pacientes que não respondem aos atuais agentes terapêuticos, nem a demora para o aparecimento da resposta clínica ao tratamento antidepressivo, já que um aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica ocorre em horas após o tratamento agudo, mas apenas o tratamento crônico melhora o humor. Estas observações sugerem que alterações na transmissão monoaminérgica representam somente o início de mudanças plásticas mais lentas, que poderiam subsidiar o início e a reversão dos episódios depressivos. As hipóteses mais recentes tentam implicar as vias de segundos-mensageiros, que poderiam representar o correlato molecular das mudanças plásticas que ocorrem na patogênese e na terapia antidepressiva (URANI et al., 2005).

Os fármacos antidepressivos produzem, em média, uma melhora dos sintomas depressivos em 60 a 70% dos pacientes, no prazo de um mês, enquanto a taxa de placebo é em torno de 30%. Esses fármacos, tais como, os ADT, IMAO, ISRS e ISRN, de um modo geral apresentam boa eficácia, entretanto apresentam importantes efeitos colaterais como insônia, efeitos anticolinérgicos, disfunção sexual, entre outros (SOUZA, 1999).

Além das abordagens farmacológicas clássicas para o tratamento de transtornos ansiosos e depressivos, práticas alternativas – como a aromaterapia – também contribuem para o tratamento desses transtornos. É uma prática reconhecida há mais de 4000 anos pelas suas propriedades de cura, incluindo a interferência no estado de humor (MOSS et al., 2006), e nos últimos anos aumentou

o interesse na avaliação do papel que os odores desempenham, na tentativa de explicar o alívio de vários sintomas tais como ansiedade, depressão e estresse por meio da inalação de um aroma (SPENCE et al., 2001).

A aromaterapia é definida como *o uso terapêutico de uma fragrância ou uma substância volátil para curar e para mitigar ou prevenir doenças, infecções e indisposições apenas por meio da inalação* e, freqüentemente utiliza óleos essenciais (óleos etéreos ou essências) como fonte destas substâncias voláteis. Segundo SIMÕES (1999), 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. Em geral são misturas complexas de substâncias lipofílicas, odoríferas e líquidas, com aparência oleosa à temperatura ambiente, com solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas (hidrolatos). Seus constituintes variam, mas os derivados terpenóides estão presentes com freqüência, sendo acoplados a funções orgânicas, como álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, entre outros. Esta variedade na composição química dos óleos essenciais pode resultar em efeitos farmacológicos diversos, e a aromaterapia clínica aborda esses efeitos visando restabelecer o equilíbrio orgânico (CARDOSO et al., 2000).

Linda B. Buck e Richard Axel, vencedores do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2004, foram responsáveis pela decodificação genética dos receptores de odores e a organização do sistema olfatório. Em sua síntese a respeito do assunto (BUCK, 2005) foi enfatizado que até a década de 90, o olfato era um dos sentidos mais desconhecidos e as pesquisas se concentravam principalmente na análise da audição e da visão. A descoberta permitiu a identificação de cerca de mil genes que se expressam como receptores olfativos, capazes de reconhecer e memorizar cerca de 10.000 substâncias aromáticas conhecidas. Assim, cada célula

olfativa é especializada em identificar um número determinado de odores, enviando o sinal ao cérebro através de impulsos elétricos.

Esses receptores estão posicionados nas células olfatórias, que ocupam uma pequena área na parte superior do epitélio nasal e detectam as moléculas de odor inaladas. As células olfatórias são neurônios que possuem em sua parte apical, os cílios olfatórios, nos quais estão as proteínas receptoras de odor que estimulam as células olfatórias. Quando um receptor de odor é ativado, um sinal elétrico é originado na célula olfatória e enviado ao cérebro através dos processos nervosos. Resumidamente, cada receptor de odor ativa uma proteína G que estimula a formação de AMPc (Monofosfato de Adenosina Cíclico). Este ativa canais iônicos que, ao se abrir, permitem a entrada de íons sódio, dando início a um potencial de ação que ativa a célula, enviando o sinal de odor para diversas áreas do cérebro, inclusive para o sistema límbico (BUCK, 2005).

Óleos essenciais – administrados por via inalatória – já se mostraram efetivos sobre a atividade do sistema nervoso central, trazendo benefícios terapêuticos a pacientes deprimidos (HOLMES, 1999; FUJIWARA et al., 2002; LEMON, 2004), ou ansiosos (MORRIS et al., 1995; LEMON, 2004), sendo capazes de reduzir a quantidade de sedativos ou analgésicos utilizados por pacientes idosos (BOWLES et al., 2005), assim como reduzir os efeitos da retirada de benzodiazepínicos utilizados por longos períodos por portadores de insônia primária (KOMORI et al., 2006).

Em uma abrangente revisão, INOUE (2003b) 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 (INOUE & ABE, 2006), um padrão de absorção semelhante ao que ocorre em seres humanos.

Em animais de experimentação, este tipo de exposição aos óleos essenciais já mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (INOUE, 2003a), e aumentou a competência imunológica de camundongos (FUJIWARA et al., 2002) submetidos a estresse. Também já foram registradas mudanças comportamentais resultantes da ação sobre o sistema nervoso central de roedores, como a interferência no tempo de sono induzido por derivado barbitúrico (KOMORI et al., 2006), o aumento do tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (ALMEIDA et al., 2004; LEITE, et. al., 2008), o aumento do tempo de permanência e o comportamento de exploração no compartimento claro da caixa claro/escuro (BRADLEY et al., 2007) e a diminuição da imobilidade na arena circular (SHAW et al., 2007) denotando atividade ansiolítica.

Numerosas plantas medicinais – fontes de óleos essenciais – são reconhecidas como ativas sobre o sistema nervoso central, e possuem potencial para interferir em processos crônicos como a ansiedade ou depressão, que não respondem bem aos tratamentos convencionais (PHILLIPSON, 2001; CARLINI, 2003).

Tem sido estimado que 43% da população que sofre com desordens de ansiedade usam alguma forma de terapia complementar (EISENBERG et al., 1998 *apud* ERNST, 2006) sendo os medicamentos de origem vegetal os tratamentos mais populares (ASTIN, 1998 *apud* ERNST, 2006).

Assim, a investigação de plantas tendo como base a informação popular sobre seu uso (etnofarmacologia), ainda permanece como uma fonte inestimável de novas moléculas, que podem servir como protótipo de substâncias úteis nos transtornos de ansiedade e depressão. Em um levantamento realizado por

FABRICANT & FARNSWORTH (2001) observa-se que de 122 compostos com estrutura química definida, obtidos de 94 espécies de plantas, 80% possuem uso idêntico ao relatado pelo uso popular para as espécies de onde foram isolados.

Com isso, no presente estudo foram avaliadas, em roedores, a atividade ansiolítica e antidepressiva de duas espécies vegetais que possuem citação popular relacionada com atividade sobre o sistema nervoso central. São elas a *Mentha piperita* L. (hortelã) e a *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson (ylang-ylang).

A hortelã é uma planta da família *Lamiaceae*, originária da Europa, e cultivada como planta medicinal em todo o Brasil (LORENZI & MATOS, 2002), cuja composição do óleo essencial obtido das folhas frescas apresenta mentol, mentona, limoneno, alfa-pineno, cariofileno, felandreno, azuleno, citral, citronelal, pulegona, além de flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides, betaína, tocoferol e taninos. Os compostos majoritários do óleo essencial são o mentol (entre 30 e 50%) e a mentona (entre 14 e 32%) (CARDOSO et al., 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

O uso medicinal popular da hortelã inclui diversas afecções do trato gastrointestinal, incluindo a expulsão de vermes, facilita a expectoração e tem atividade antiséptica (BORNHAUSEN, 1991; OLIVEIRA, 2002). As ações sobre o sistema nervoso central podem ser apreendidas pela indicação da hortelã “para acalmar”, “para ansiedade” e “para aliviar tremores” (MACEDO et al., 2007). Este estudo compara a literatura com a ocorrência do uso de plantas medicinais de um bairro do município de Marília – SP onde a hortelã é citada pelos respondentes como utilizada contra insônia. A ação depressora do sistema nervoso central já foi apontada como indício de toxicidade ou contra-indicação para o uso da hortelã (CONCEIÇÃO, 1987; MARTINS et al., 2000; FDA, 2005).

Na região da Mata Atlântica, o suco das folhas de hortelã é usado externamente como cicatrizante, enquanto o macerado das folhas em aguardente ou

em vinho branco também é empregado externamente como analgésico; a infusão das folhas é usada como sedativo e contra parasitas intestinais, diarreia, dor de barriga, bronquite e tosses; e as folhas frascas são usadas em crianças como estimulantes do apetite (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). Em Brasília é utilizada como anti-séptico, calmante, anti-reumático e contra insônia, problemas cutâneos, de estômago, vômitos e cólera (MATOS & DAS GRAÇAS, 1980).

Muitas espécies de Annonaceae são fragrantas devido à presença de óleos essenciais (LEBOEUF, et. al., 1982), e alguns têm importância comercial como o óleo de ylang-ylang. A *Cananga odorata* é uma espécie de origem asiática, também conhecida pelas expressões “Flor das Flores”, “Flor das Pétalas Douradas”, “Rainha das Flores” ou “Árvore do Perfume” cujo óleo essencial é usado em perfumaria, aromaterapia, indústria farmacêutica (cosméticos) e indústria de alimentos (CRAVEIRO, et. al., 1981).

Apesar de sua origem asiática, com o tempo, foi introduzido em outras regiões, podendo ser atualmente encontrado, em grandes quantidades, em países com climas tropicais úmidos, tais como as Filipinas, a Malásia, a Indonésia, as ilhas Comores, São Tomé e Príncipe e Madagascar (LEBOEUF, et. al., 1982), cuja composição do óleo essencial obtido das flores apresenta benzoato de metila, geraniol, eugenol, linalol, acetato de benzila, pineno, cariofileno, entre outros.

Na aromaterapia africana, o óleo essencial de ylang-ylang é muito utilizado, não para curar patologias propriamente ditas, mas sim, com o propósito de melhorar a qualidade de vida, atuando mais como um efeito preventivo contra o estresse, ansiedade e depressão, promovendo uma melhora no humor por seu odor doce e agradável. Também é utilizado em situações de separação conjugal (relacionando-se com a depressão), podendo ainda ser utilizado em situações de transtorno de estresse pós-traumático (BIRD, 2003).

Além disso, outros estudos enfocando técnicas terapêuticas complementares e práticas paliativas (HADFIELD, 2001; LOUIS & KOWALSKI, 2002; EDJE, 2003) enfatizam que o uso da *Cananga odorata* pode ser útil no tratamento para redução da ansiedade e da depressão, especialmente com a utilização da aromaterapia.

Modelos animais adequados têm sido considerados a espinha dorsal da pesquisa de novas drogas (RODGERS et al., 1997). Uma ampla investigação acerca da presença da atividade farmacológica em novas substâncias envolve a utilização de modelos experimentais que devem: a) reproduzir características comportamentais e patológicas; b) permitir investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem; e c) permitir avaliação confiável de agentes com atividade farmacológica, assim como identificar efeitos de drogas e toxinas (ANDREATINI et al., 2001).

Dentre os diferentes procedimentos experimentais para o estudo da ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado parece ser o modelo mais adequado para detecção de substâncias ativas no tratamento dos Transtornos de Ansiedade Generalizada, enquanto que para avaliação de atividade antidepressiva, o Teste de Suspensão pela Cauda, apresenta-se como um teste simples, sensível e muito utilizado para este tipo de avaliação.

Considerando que as espécies vegetais em estudo são utilizadas na aromaterapia, e que o reconhecimento e discriminação de odores pelos animais resulta em influências profundas em seus comportamentos (CARLETON et al., 2002), o presente trabalho enfoca a possibilidade da obtenção de resposta comportamental em modelos experimentais de ansiedade e depressão após administração por via inalatória, em roedores.

Objetivos

II. Objetivo:

Avaliar o efeito dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita*) e no óleo essencial de ylang-ylang (*Cananga odorata*) em modelos experimentais clássicos para detectar atividade ansiolítica e antidepressiva em roedores pré-expostos a ambiente com o ar enriquecido destes compostos voláteis.

Material e Métodos

III. Material e Métodos:

3.1) Obtenção dos óleos essenciais

A identificação precisa de espécies do gênero *Mentha* não é uma tarefa simples, já que por suas características peculiares, ocorre a formação de híbridos com muita facilidade. Por este motivo, e para evitar grandes variações na composição do óleo essencial, os procedimentos experimentais foram realizados com o óleo essencial de *Mentha piperita* (hortelã) na forma em que é comercializado e utilizado para uso clínico. Da mesma forma, realizou-se a compra do óleo essencial de ylang-ylang (*Cananga odorata*), pois assim como a hortelã, apresenta dificuldades no procedimento de extração de seu óleo essencial, caracterizado por seu baixo rendimento e perda de compostos voláteis pela utilização de solventes.

Cada partida adquirida no comércio especializado teve sua composição química caracterizada. 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), sob as seguintes condições: Injetor: 220 °C, Detector: 230 °C; 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 (C₉-C₂₄), aplicando-se a equação de VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) sob supervisão da Dra. Márcia Ortiz.

3.2) Animais

Foram utilizados camundongos da raça Swiss com aproximadamente 45 dias de idade, originados 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 ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e alimento até 2 horas antes do início dos experimentos.

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 01.

3.3) Procedimentos gerais

Os animais ficaram no Biotério no Departamento de Farmacologia por um período mínimo de uma semana antes de serem utilizados, e foram trazidos para o laboratório 2 horas antes do início dos experimentos, para habituação. As sessões experimentais foram realizadas sempre no mesmo período, para evitar variações devidas ao ciclo circadiano. Os testes comportamentais foram realizados numa sala isolada, com som atenuado e controle de temperatura e luminosidade, além da exaustão de ar, na qual nenhuma outra atividade foi realizada durante a realização dos experimentos.

Os animais foram divididos em grupos independentes e cada camundongo foi colocado individualmente na caixa de inalação. O tempo de exposição foi de 7 minutos para cada animal, os quais foram imediatamente submetidos aos procedimentos comportamentais descritos adiante.

3.4) Aparato de inalação

O aparato de inalação consiste numa caixa de acrílico (36 x 30 x 29cm) construída na universidade como descrito por ALMEIDA et al., 2004. As paredes anterior e posterior contém 4 furos de 2cm de diâmetro onde são colocados os algodões embebidos com as soluções de óleo essencial ou com salina (2mL em cada unidade). Para manter a homogeneidade na concentração de óleo essencial dentro da caixa, os algodões embebidos foram sempre renovados após a exposição de dois animais. 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.



Figura 1: Aparato de inalação.

3.5) Drogas e Tratamentos

As diferentes soluções foram preparadas momentos antes do procedimento experimental. Os óleos essenciais de hortelã e de ylang-ylang, foram solubilizados em água a 0,01%, 0,1% e 1,0% e 2 mL de cada solução foi adicionado a cada algodão acoplado na caixa de inalação. Os animais que formaram o grupo controle negativo foram submetidos à caixa de inalação sem a presença do OE e os algodões foram embebidos com 2mL de salina. Os animais que formaram o grupo controle positivo foram tratados, por via intraperitoneal, com drogas padrão em doses efetivas no respectivo procedimento, de modo a se avaliar as condições experimentais para análise da atividade ansiolítica e antidepressiva previamente padronizada. Assim, Diazepam (1mg/kg) foi utilizado como controle positivo no teste de ansiedade e Imipramina (30mg/kg), no teste de depressão. Tanto o Diazepam quanto a Imipramina foram solubilizados em salina 0,9% e os animais tratados com estas drogas foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais que os tratados com os OE.

Para evitar que os animais dos grupos controle positivo e negativo ficassem expostos ao OE, em cada sessão experimental estes foram submetidos aos procedimentos comportamentais antes dos animais pertencentes aos grupos tratados com OE.

3.6) Avaliação da atividade ansiolítica

Existem diferentes modelos para avaliar ansiedade generalizada, dentre eles o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa claro-escuro (CCE). Desta forma, a escolha foi baseada em resultados que avaliaram a interferência da pré-exposição

ao aparato de inalação nos comportamentos. No entanto, os parâmetros avaliados no LCE não são alterados pela pré-exposição, enquanto aqueles avaliados na CCE sofrem modificação. Estes resultados foram obtidos em grupos tratados com salina (10mL/kg i.p.) expostos ou não ao aparato de inalação e estão descritos no Anexo 2.

O modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) foi originalmente descrito para ratos (PELLOW et. al., 1985) e posteriormente validado para camundongos (LISTER, 1987) sendo adequado para mensuração de ansiedade de roedores e usado extensivamente na descoberta de novos agentes ansiolíticos (PELLOW & FILE, 1986; DAWSON & TRICKLEBANK, 1995).

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

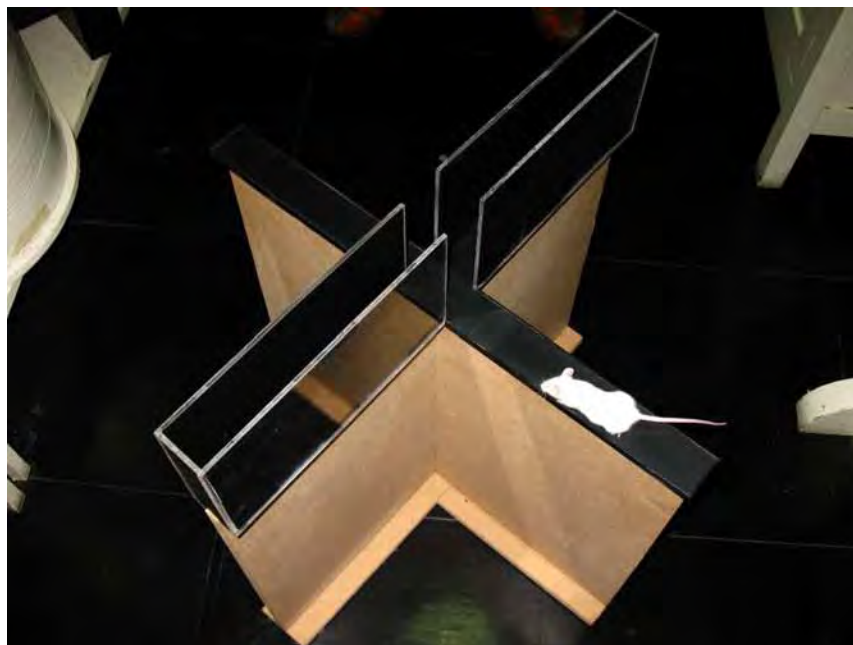


Figura 2: Labirinto em cruz elevado.

Os braços abertos são considerados aversivos a roedores devido à altura e ausência de proteção lateral. Segundo (ESPEJO, 1997) a entrada no braço aberto, não protegido, é o melhor parâmetro utilizado para avaliar ansiedade em camundongos expostos a este modelo, que parece refletir o transtorno da ansiedade generalizada (GRAEFF, 1999).

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. Posteriormente, o aparelho é limpo com pano embebido em álcool 10% para assepsia do local e colocação do próximo animal. São registrados os parâmetros tradicionais desse modelo: número de entradas, bem como o tempo de permanência nos braços abertos. Estes índices mostram grande sensibilidade para drogas ansiolíticas que agem no complexo receptor GABA_A/BZD (RODGERS & COLE, 1994), porém, drogas serotoninérgicas tem apresentado resultados contraditórios e até mesmo ausência de resultado (SETEM et. al., 1999).

3.7) Avaliação da atividade antidepressiva

O teste de suspensão pela cauda foi realizado conforme descrito por Stéru e colaboradores (1985). Este teste baseia-se na observação que camundongos quando suspensos pela cauda, sem possibilidade de fuga, adotam um comportamento característico no qual ocorre um período de alta atividade inicial, seguido de períodos de imobilidade, sendo esta imobilidade relacionada com o estado de desistência, semelhante à síndrome depressiva humana. Fármacos antidepressivos diminuem este tempo de imobilidade e muitas vezes aumenta a latência até a imobilidade ocorrer, constituindo este método um procedimento adequado de “screening” para novas drogas antidepressivas (STÉRU et al., 1985).

Os animais foram presos com uma fita adesiva pela cauda (aproximadamente 1cm da porção final da cauda) a 50cm da bancada (Figura 3). O animal permaneceu nesta condição durante 6 minutos, nos quais foram registrados o tempo até a primeira imobilidade (latência) e o tempo total em que o animal permaneceu imóvel (imobilidade).

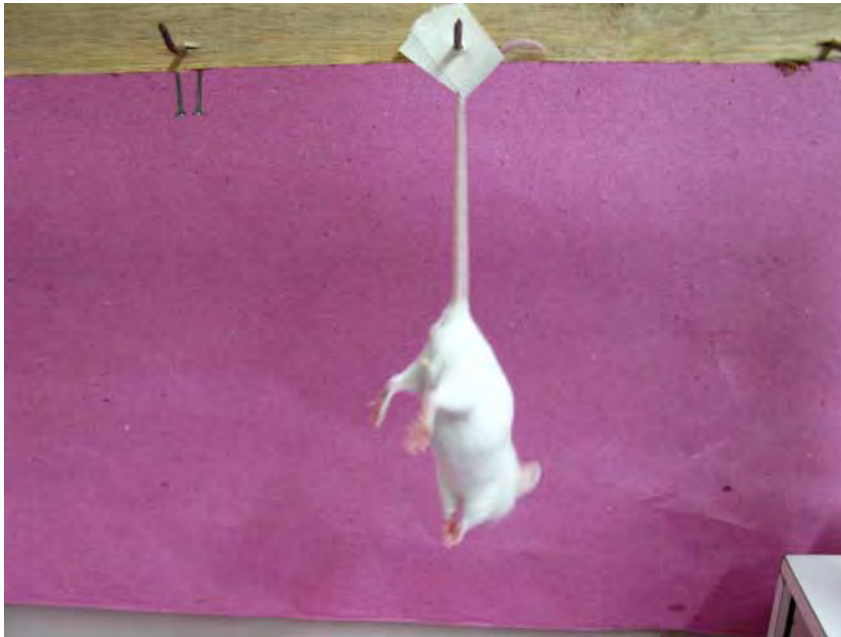


Figura 3: Teste de suspensão pela cauda.

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 um aumento na atividade locomotora, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto. Após uma revisão crítica (WALSH & CUMMINS, 1976) o teste consiste em uma arena circular construída em acrílico branco com 50 cm de diâmetro e paredes com 40 cm de altura (Figura 4). O piso da arena é dividido por três linhas concêntricas e linhas radiais em 19 segmentos de área semelhante.



Figura 4: Teste do campo aberto.

Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e permaneceram durante 5 minutos em movimentação livre, período durante o qual foram registrados o número de quadrantes percorridos, assim como o número de *rearings* (o animal se apoiando nas patas posteriores). Enquanto o número de quadrantes percorridos é um indicador de ambulação espontânea, o número de *rearings* é indicador de comportamento exploratório. A arena foi limpa com uma solução de etanol 10% entre os testes.

3.9) Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação comportamental estão apresentados como mediana e intervalo interquartil e foram comparados ao respectivo grupo controle negativo por meio de testes não paramétricos (Análise de variância de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney), considerando-se – em todos os casos – significantes as diferenças associadas a $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

IV. Resultados e Discussão

No presente estudo, investigou-se a atividade farmacológica dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Cananga odorata*, popularmente conhecidas como hortelã e ylang-ylang respectivamente, em dois modelos comportamentais validados, o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) por via inalatória em camundongos.

4.1) Análise fitoquímica

Para cada partida adquirida dos óleos essenciais de hortelã e ylang-ylang, realizaram-se técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas para caracterização e identificação de sua composição química. Os cromatogramas e a composição química dos óleos essenciais são apresentados na Figura 5 (hortelã) e Figura 6 (ylang-ylang).

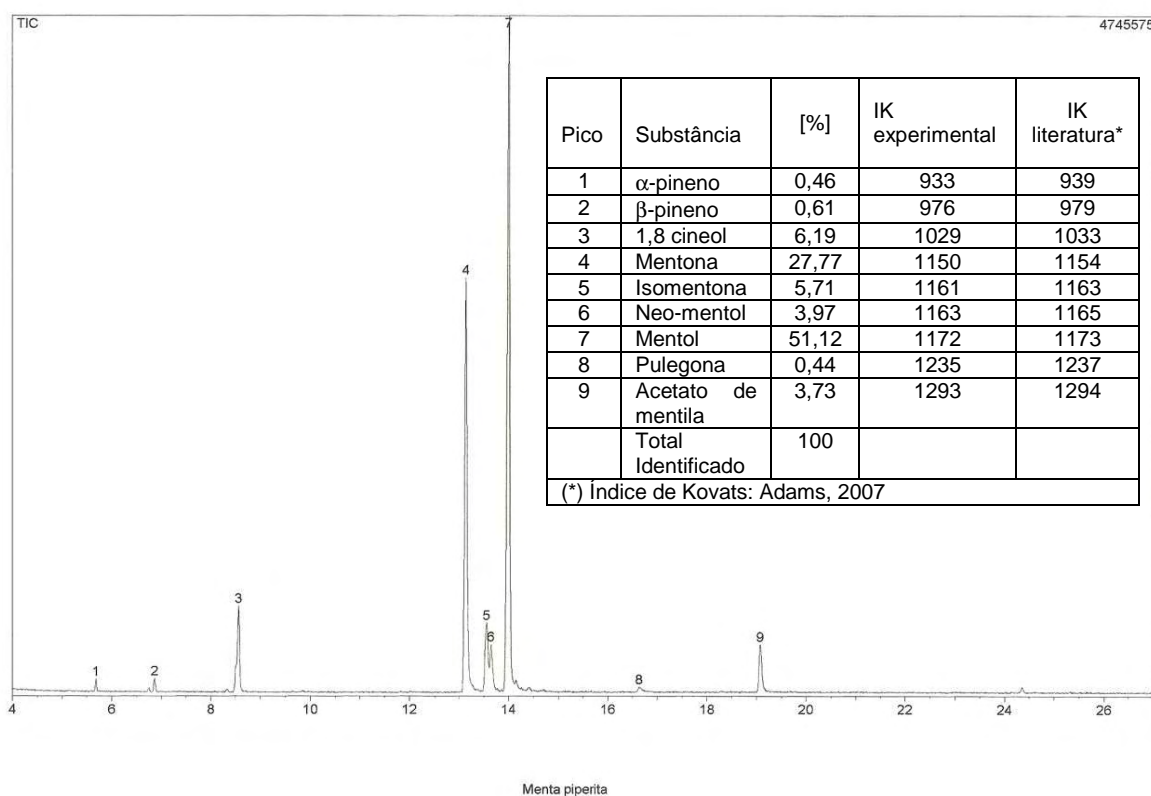


Figura 5: Cromatograma com os compostos químicos do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

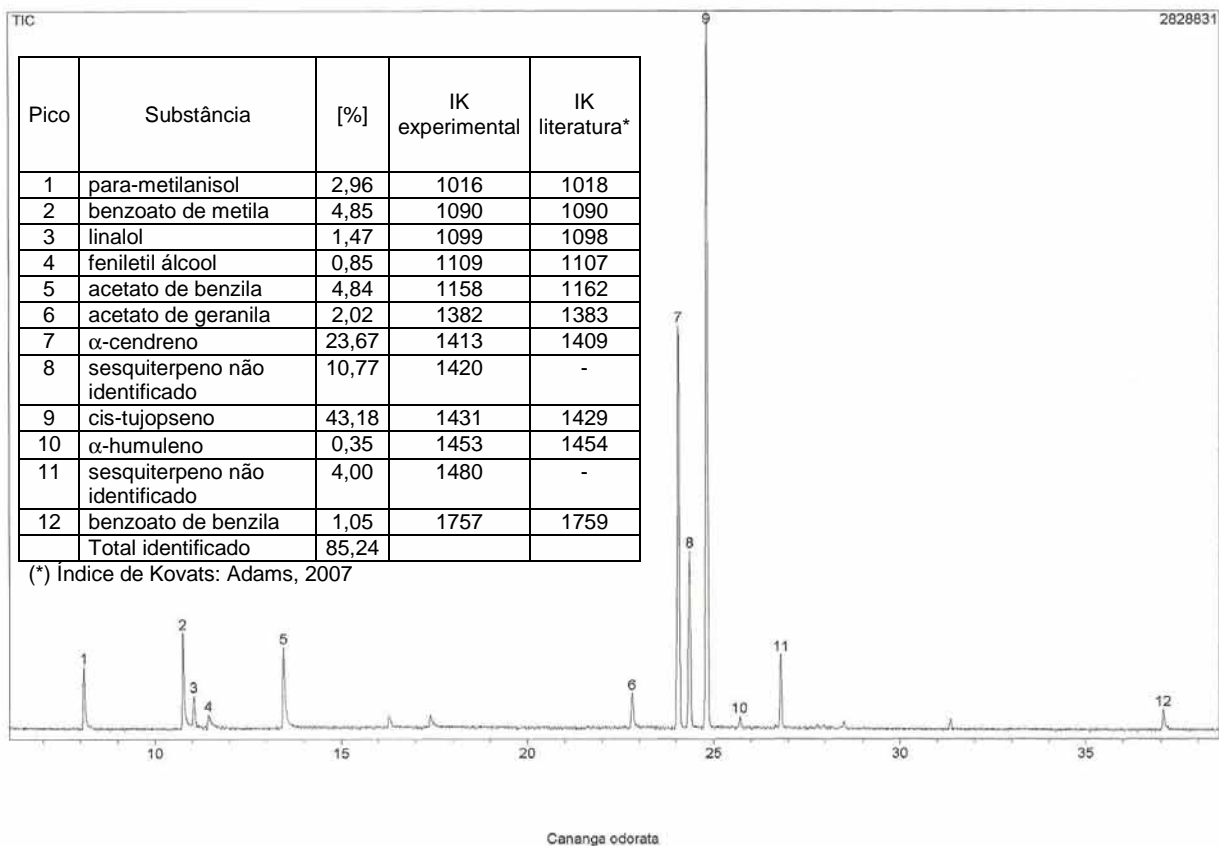


Figura 6: Cromatograma com os compostos químicos do óleo essencial de *Cananga odorata*.

Após a realização da análise cromatográfica e identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais, podemos observar que são óleos completamente distintos, não havendo qualquer composto em comum a ambos.

Um recente trabalho propõe uma revisão na literatura de terpenos com ações descritas sobre o sistema nervoso central entre o período de 1997-2007, presentes em diversas plantas psicoativas que exercem importantes efeitos sobre a consciência, as emoções e a cognição (PASSOS et al., 2009). Dentre os compostos descritos, o pineno (com atividade ansiolítica e antidepressiva), cineol e pulegona (pró-convulsivante) e o mentol (com atividade analgésica) estão presentes no óleo essencial de hortelã, enquanto que o linalol (com atividade anticonvulsivante, ansiolítica e antinociceptiva) está presente no óleo essencial de ylang-ylang. De um

modo geral, o uso de plantas contendo terpenos é bem conhecido na medicina popular, e muitos desses compostos demonstram potencial terapêutico.

4.2) Avaliação da atividade ansiolítica

Os parâmetros avaliados no LCE foram o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos, cujos resultados são apresentados a seguir.

Tempo de permanência nos braços abertos

O diazepam, um derivado benzodiazepínico, utilizado como controle positivo, administrado na dose de 1mg/kg (i.p.), aumentou o tempo de permanência nos braços abertos de maneira significativa quando comparado com o grupo controle (salina) tanto no experimento com o óleo essencial de hortelã quanto com o óleo essencial de ylang-ylang como mostrado na Figura 7.

Como pode ser observado ainda na Figura 7, o óleo essencial de hortelã, na concentração de 0,01% aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo de permanência nos braços abertos quando comparado com o grupo controle (salina), resultado compatível com uma atividade do tipo ansiolítica, diferentemente das outras concentrações (0,1% e 1,0%), as quais não apresentaram diferença significativa. Já o óleo essencial de ylang-ylang, não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas (0,01%; 0,1% e 1,0%).

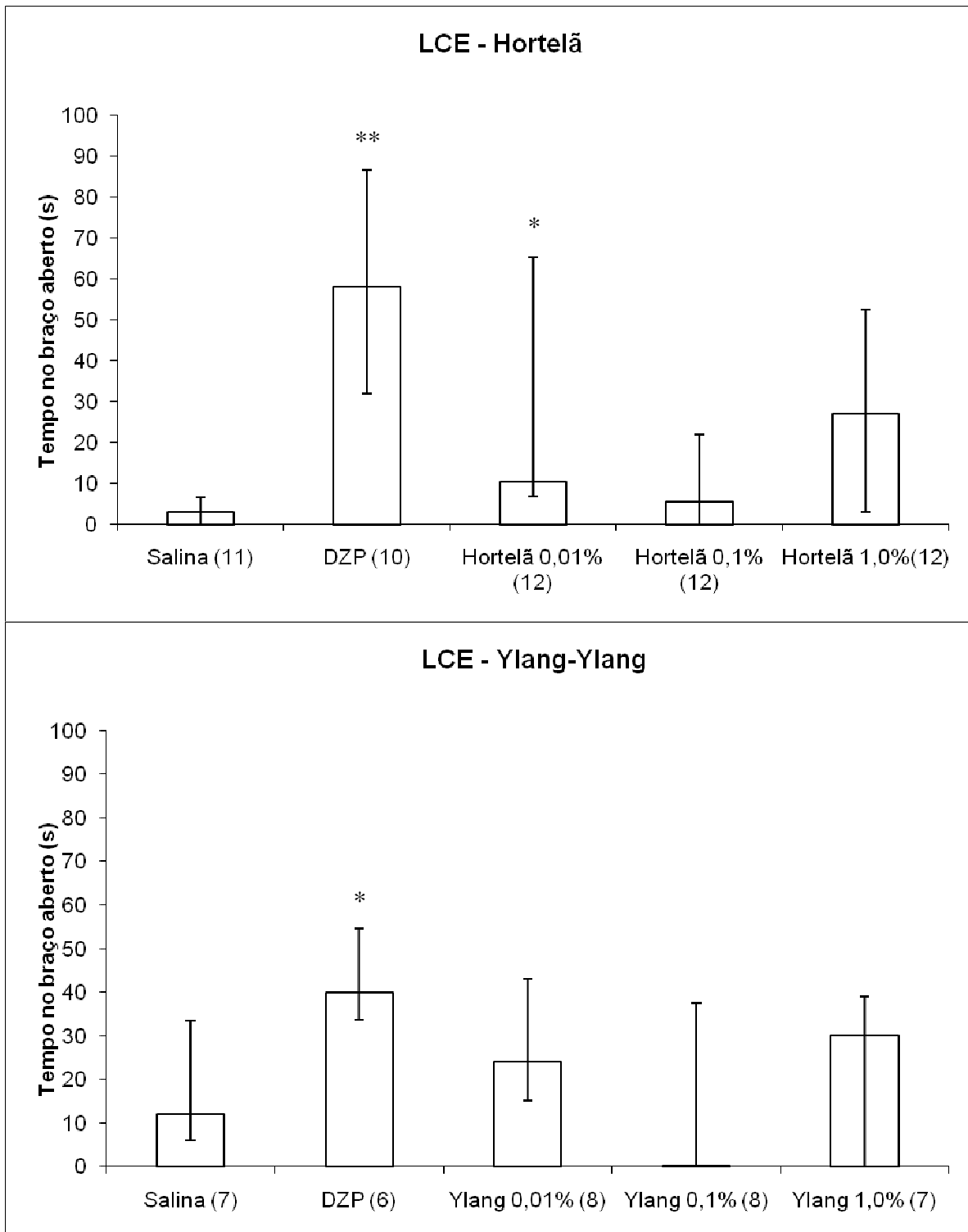


Figura 7: Mediana (Q1-Q3) do tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos do LCE de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

Número de entradas nos braços abertos

O Diazepam (1mg/kg i.p.) aumentou o número de entradas nos braços abertos de maneira significativa quando comparado com o grupo controle (salina) em ambos experimentos como ilustrado na Figura 8. Podemos observar também outro parâmetro reforçando a atividade do tipo ansiolítica com o óleo essencial de hortelã na concentração de 0,01% aumentando o número de entradas nos braços abertos de maneira significativa quando comparado com o grupo controle (salina). O óleo essencial de ylang-ylang manteve-se sem apresentar diferença significativa quando comparado com o grupo controle (Figura 8).

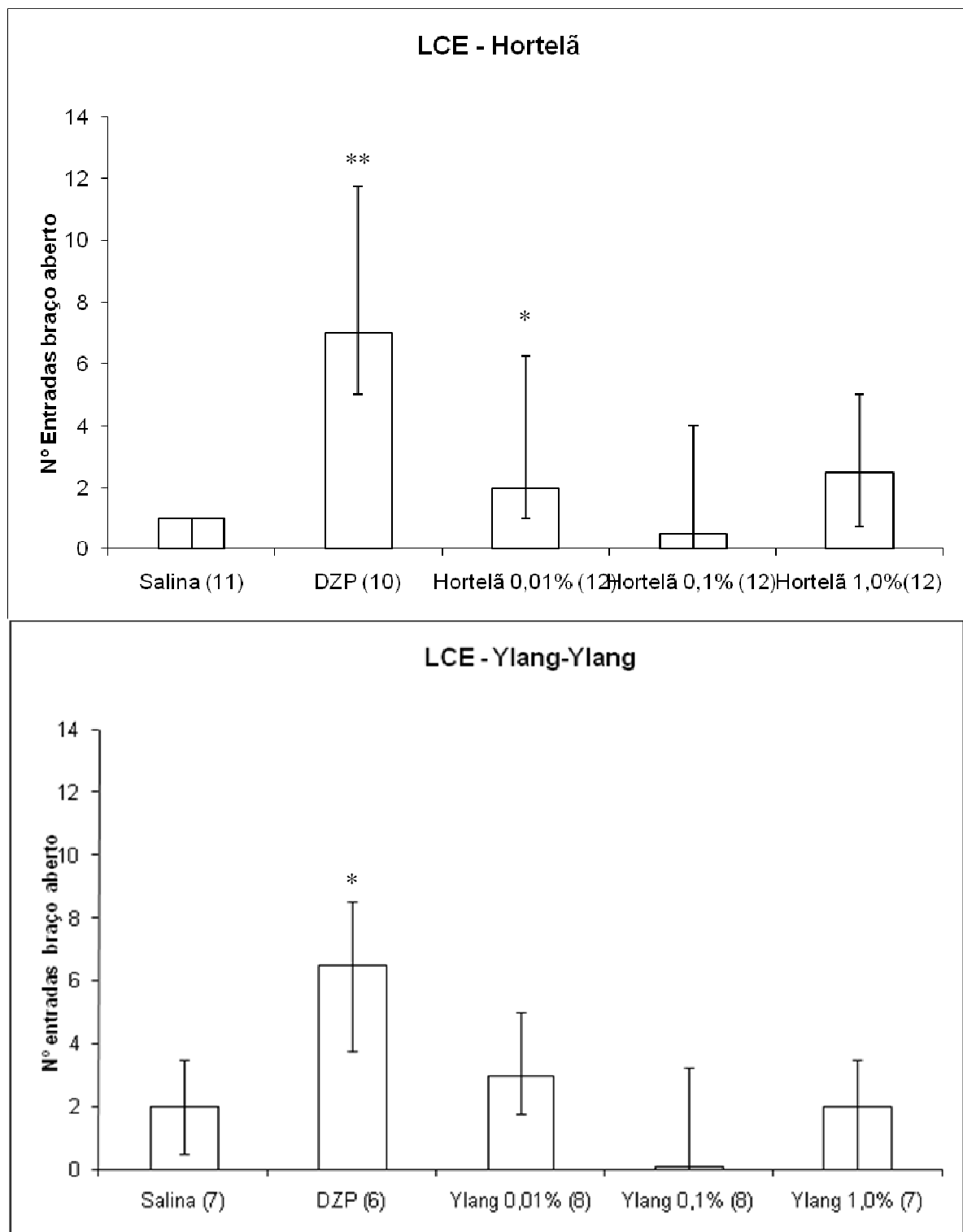


Figura 8: Mediana (Q1-Q3) do número de entradas nos braços abertos do LCE de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

No modelo do LCE os braços abertos são considerados aversivos a roedores devido à altura e ausência de proteção lateral, e esta ausência seria mais importante do que a altura no desencadeamento de comportamentos que refletem o estado ansioso (TREIT et al., 1981). Segundo ESPEJO (1997) a entrada no braço aberto é o parâmetro mais robusto utilizado para avaliar ansiedade em camundongos expostos a este modelo.

O óleo essencial de hortelã aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos na menor concentração testada 0,01%, enquanto que nas concentrações maiores não se observou o mesmo resultado. Esse tipo de curva é conhecido como hormese caracterizada pela estimulação em doses baixas e inibição em doses altas (CALABRESE & BALDWIN, 2002). Este é um tipo específico de dose-resposta não monotônica cuja ocorrência vem sendo documentada amplamente por vários modelos biológicos e para diversos tipos de exposição (COOK & CALABRESE, 2007).

Em uma abrangente revisão Calabrese (2008) identificou predominância de curva hormética dentre as drogas ansiolíticas, independente do modelo animal, das condições e modificações dos testes e da classe química de cada droga testada.

Os resultados obtidos com o óleo essencial de hortelã no LCE são um indicativo de efeito ansiolítico na concentração de 0,01%, sugerindo uma curva dose-resposta similar a curva dos demais agentes com comprovada atividade ansiolítica caracterizada pela resposta hormética (CALABRESE, 2008). Esse tipo de curva vem despertando interesse de pesquisadores, pois são cada vez mais comuns tendo implicações importantes no processo de descobrimento e desenvolvimento de novas drogas.

Outros óleos essenciais, quando inalados, já apresentaram efeito ansiolítico em camundongos expostos ao LCE (ALMEIDA et al., 2004; LEITE et al., 2008) e atualmente muitos estudos com esses compostos vem sendo desenvolvidos.

Odores familiares e agradáveis os quais são associados com momentos de felicidade podem ser úteis no tratamento de algumas patologias como a ansiedade e a depressão. Em um estudo realizado por BURNS & BLAMEY (1994) foram avaliados 10 óleos essenciais (dentre eles o óleo essencial de hortelã) em 585 mulheres com a prática da aromaterapia para redução dos níveis de ansiedade, os quais todos apresentaram resultados satisfatórios com a redução de estresse expressados pelas participantes desse estudo. Numa análise posterior, envolvendo 8058 mulheres que foram expostas aos óleos essenciais indicou que mais de 50% dessa população se beneficiou com um efeito relaxante (BURNS, 2000).

4.2.2 Avaliação da atividade antidepressiva

Os parâmetros avaliados no TSC foram o tempo de imobilidade e a latência para imobilidade, cujos resultados são apresentados a seguir.

Tempo de imobilidade

A imipramina, um antidepressivo tricíclico, utilizada como controle positivo, administrada na dose de 30mg/kg (i.p.) reduziu o tempo de imobilidade de maneira significativa em comparação com o grupo controle (salina), como mostrado na Figura 9.

O óleo essencial de hortelã não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas quando comparadas com o grupo controle (salina), entretanto, o óleo essencial de ylang-ylang, diminuiu de modo significativo o tempo de imobilidade nas concentrações de 0,1% e 1,0% quando comparadas com

o grupo controle (salina), resultado compatível com uma atividade do tipo antidepressiva (Figura 9).

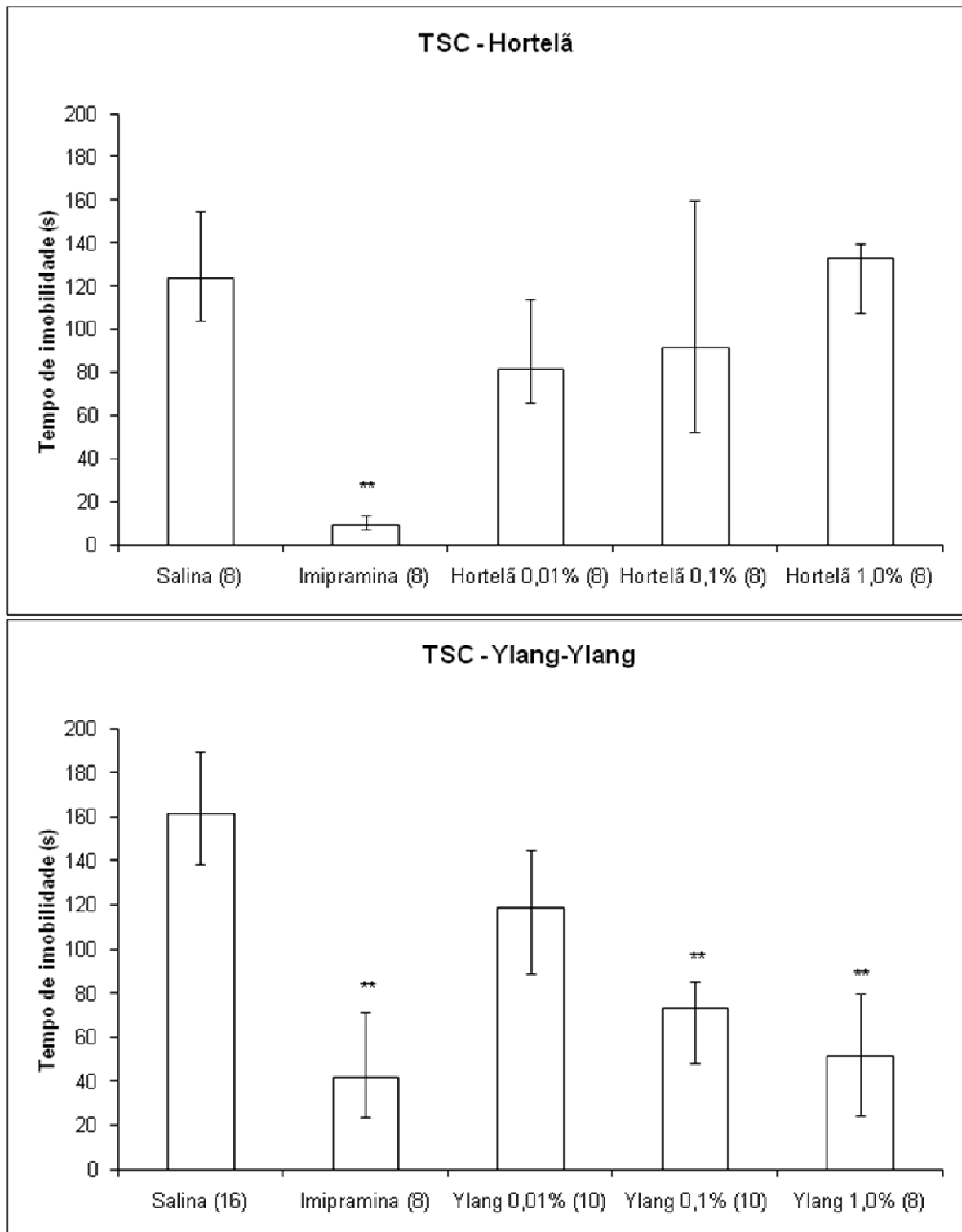


Figura 9: Mediana (Q1-Q3) do tempo (em segundos) de imobilidade no TSC de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. **p<0,01; em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

Latência para Imobilidade

Na dose de 30mg/kg (i.p.), a imipramina, como ilustrado na Figura 10, aumentou a latência para imobilidade de forma significativa em ambos os experimentos em comparação com o grupo controle (salina).

Enquanto não foram observadas alterações na latência para imobilidade nos animais expostos ao óleo essencial de hortelã, o óleo essencial de ylang-ylang aumentou de maneira significativa este parâmetro nas três concentrações quando comparado com o grupo controle (salina) reforçando a atividade do tipo antidepressiva (Figura10).

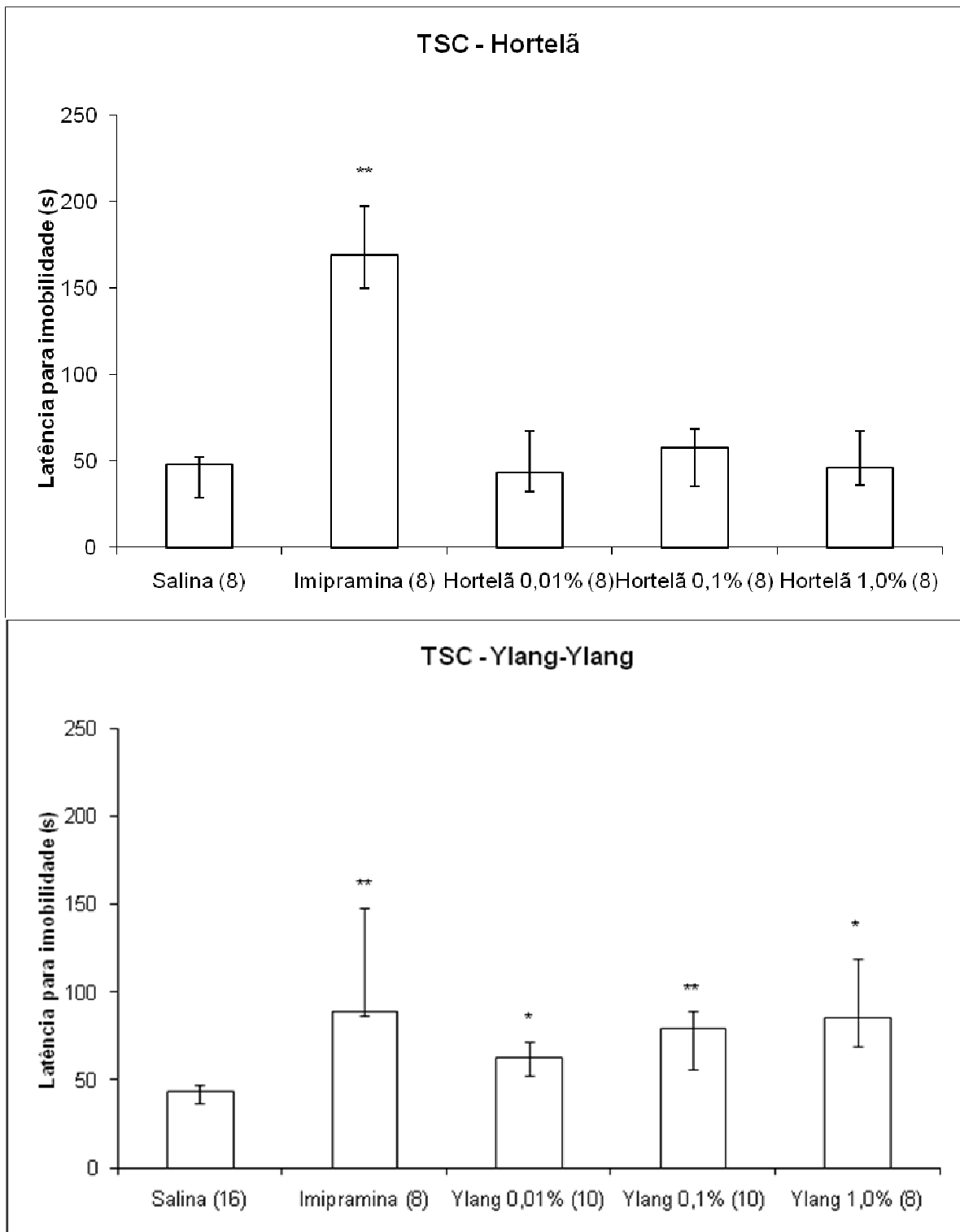


Figura 10: Mediana (Q1-Q3) da latência para imobilidade (em segundos) no TSC de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

Os modelos animais de depressão não refletem exatamente a sintomatologia da depressão em humanos, mas eles tem um alto valor na investigação de drogas

antidepressivas e ainda vários estudos mostraram que sua efetividade se correlaciona significativamente com o potencial clínico destas drogas (WILLNER, 1984).

O óleo essencial de ylang-ylang diminuiu o tempo de imobilidade nas maiores concentrações testadas (0,1% e 1,0%) e aumentou a latência para imobilidade nas três concentrações avaliadas. Drogas antidepressivas aumentam a latência para imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (STÉRU et al., 1985) reforçando a validade preditiva deste modelo experimental. Portanto, substâncias desconhecidas que induzem este tipo de alteração podem possuir atividade antidepressiva, já que é esta a resposta comportamental observada com drogas antidepressivas utilizadas na clínica.

Diferentemente do óleo essencial de hortelã, o qual apresentou resposta na menor concentração (curva hormética), o óleo essencial de ylang-ylang apresentou resposta nas maiores concentrações, seguindo uma curva dose-resposta padrão.

Na prática da aromaterapia, os óleos essenciais são selecionados de acordo com os sintomas de cada paciente. Em um estudo LOUIS & KOWALSKI (2002), utilizando 11 óleos essenciais (dentre eles o óleo essencial de *Cananga odorata*) através da inalação em pacientes hospitalizados, mostra uma diminuição dos níveis de ansiedade, depressão e dor nesses pacientes expostos aos óleos promovendo bem-estar e auxiliando na sua recuperação.

4.2.3 Avaliação da atividade motora

Frequência da locomoção

No teste do campo aberto a imipramina, óleo essencial de hortelã e óleo essencial de ylang-ylang não mostraram diferenças estatísticas na frequência da locomoção quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com diazepam (1mg/kg) mostraram um aumento significativo na frequência da locomoção (Figuras 11). Este não é um resultado inesperado e já foi observado anteriormente (LISTER, 1990; PRUT & BELZUNG 2003).

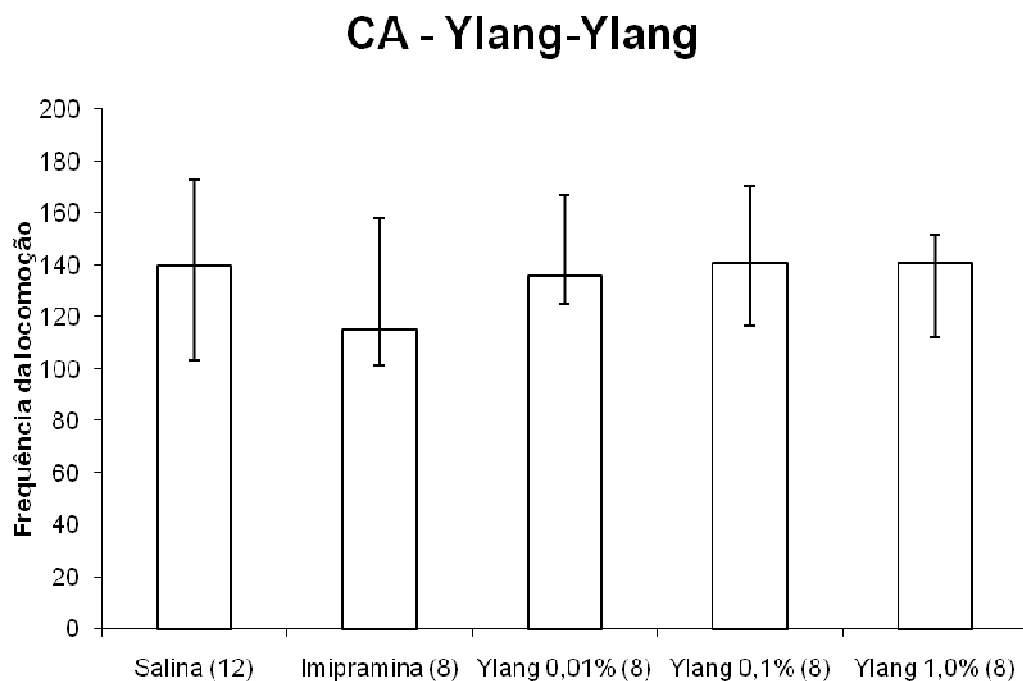
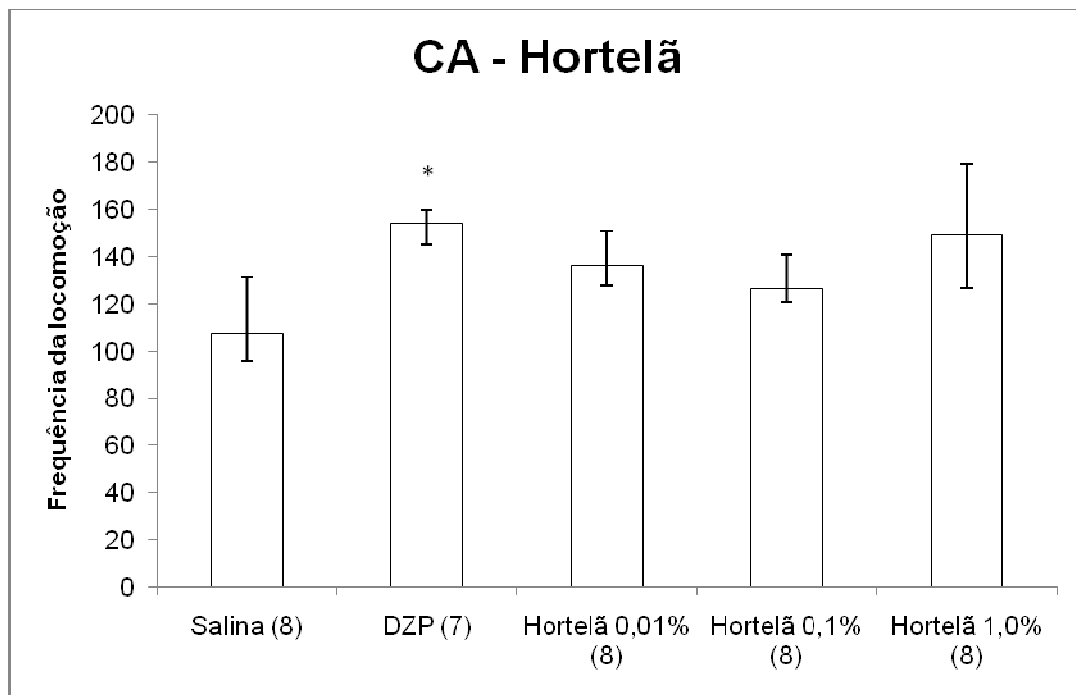


Figura 11: Mediana (Q1-Q3) da frequência da locomoção (número de quadrantes) no CA de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

Número de rearings

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no número de *rearings* em nenhuma das substâncias testadas em comparação com o grupo controle, como ilustrado na Figura 12.

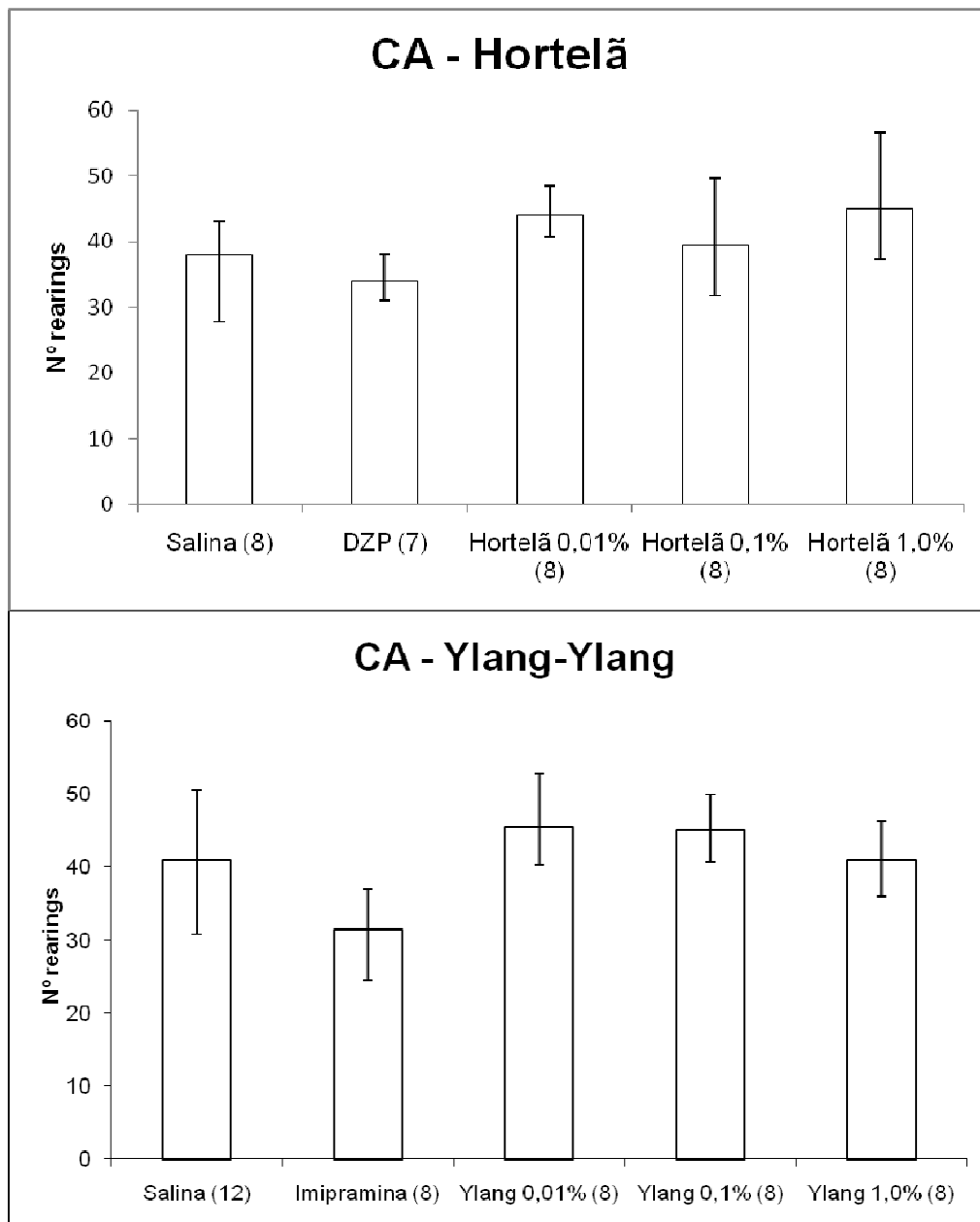


Figura 12: Mediana (Q1-Q3) do número de *rearings* no CA de animais expostos por 7 min. a inalação de OE de hortelã ou ylang-ylang nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1,0%. Entre parênteses está apresentado o número de animais em cada grupo. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

O Campo Aberto é um dos testes mais simples para avaliar alterações comportamentais e motoras, e é baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores (PRUT & BELZUNG, 2000; KLIETHERMES, 2005).

Neste teste, nenhuma diferença significativa foi observada em qualquer dos parâmetros registrados dos animais pertencentes aos grupos expostos aos óleos essenciais quando comparados com o grupo controle. Deste modo, elimina-se a possível interferência da locomoção ou motivação sobre a atividade do tipo ansiolítica no LCE (para OE de hortelã) e do tipo antidepressiva no TSC (para OE de ylang-ylang).

Ainda, com os resultados obtidos neste trabalho, é possível especular entre duas possibilidades para explicar a ação dos OE sobre comportamentos em modelos experimentais que são indicativos de ação sobre o sistema nervoso central. Na primeira, as respostas comportamentais, podem ser atribuídas à ativação do sistema olfatório pelos componentes voláteis presentes nos óleos essenciais, que atuam 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, o que pode determinar as próximas etapas do estudo da atividade biológica destes óleos essenciais.

Conclusão

V. Conclusões:

- O óleo essencial de *Mentha piperita* aumentou significativamente o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos no LCE após exposição ao óleo essencial na concentração de 0,01%, de acordo com o esperado para drogas com atividade ansiolítica;

- O óleo essencial de *Cananga odorata* reduziu significativamente o tempo de imobilidade, assim como aumentou a latência para imobilidade no TSC, confirmando sua atividade do tipo antidepressiva;

- No teste do CA, nenhuma diferença significativa dos óleos essenciais foi observada em qualquer dos parâmetros registrados, excluindo qualquer interferência de atividade locomotora ou motivacional no efeito observado;

- Tais respostas, podem ser atribuídas a duas possibilidades: ativação do sistema olfatório/área límbica, pelos componentes voláteis presentes nos óleos essenciais de comprovada ação central ou por absorção através de membranas biológicas.

Referências Bibliográficas

VI. Referências Bibliográficas:

- ADAMS, R. P.; **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy.** Allured, Carol Stream, Illinois, 2007. 804 p.
- ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J.F.; FERNANDES, J.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). **Revista ABP-APAL.** v.14, n.3, p.93-104, 1992.
- ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J.F.; FERNANDES, J.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity – Methodological features and prevalence estimates. **Br J Psychiatry,** v.171, p.524-9, 1997.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour.** v.77, p.361-364, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders. American Psychiatric Association; 349. Washington, DC, 2002.
- ANDRADE, L.; WALTERS, E.E.; GENTIL, V.; LAURENTI, R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. **Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol,** v.37, p.316-25, 2002.

- ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. S. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.32, n.9, p.1121-1126, 1999.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v.23, n.4, p.233-42, 2001.
- BIRD, S.R. African aromatherapy: past, present and future applications. **The International Journal of Aromatherapy**. v.13, n.4, p.185-195, 2003.
- BORNHAUSEN, R.L. **As ervas do sítio: história, magia, saúde, culinária e cosmética**. 3ª ed. São Paulo: M.A.S. 1991.
- BOWLES, E.J.; CHERAS, P.; STEVENS, J.; MYERS, S. A survey of aromatherapy practices in aged care facilities in northern NSW, Australia. **The international journal of aromatherapy**. v.15, p.42-50, 2005.
- BRADLEY, B.F.; STARKEY, N.J.; BROWN, S.L.; LEA, R.W. The effects of prolonged rose odor inhalation in two animal models of anxiety. **Physiol. Behav.** v.92, n.5, p.931-938, 2007.
- BUCK, L.B. Unraveling the sense of smell. **Angew Chem Int Ed Engl**. v.44, n.38, p.6128-6140, 2005.

- BURNS, A. Might olfactory dysfunction be a marker for early Alzheimer's disease? **Lancet**.v.355, p.84–85, 2000.
- BURNS, E.; BLAMEY, C. Soothing scents in childbirth. **Int J Aromather**. v.6, n.1, p.24–28, 1994.
- CALABRESE, E.J. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. **Critical Reviews in Toxicology**. v.38, p.489-542, 2008.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Defining hormesis. **Hum. Exp. Toxicol**. v.21, p.91-97, 2002.
- CARDOSO, M.G.; GAVILANES, M.L.; MARQUES, M.C.S.; SHAN, A.Y.K.V.; SANTOS, B.R.; OLIVEIRA, A.C.B.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, A.P.S. **Óleos Essenciais**. *Boletim Técnico - Série Extensão*, Lavras, v.8, n.58, p.1-42, 2000.
- CARLETON, A.; ROCHEFORT, C.; MORANTE-ORIA, J.; DESMAISONS, D. ; VICENT, J.D. ; GHEUSI, G. ; LLEDO, P.M. ; Making scents of olfactory neurogenesis. **J. Physiol**. v.96, p.115-122, 2002.
- CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochemistry and Behaviour**. v.75, p.501-512, 2003.
- CLAYTON, P. J.; GROVE, W. M.; CORYELL, W.; KELLER, M.; HIRSCHFELD, R.; FAWCETT, J. Follow-up and Family Study of Anxious Depression. **American Journal Psychiatry**. v. 148, p. 1512-1517, 1991.

CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais no ano 2000: dicionário de plantas medicinais**. 3ª ed. Brasília: Editerra; 1987.

COOK, R.; CALABRESE, E. J. The importance of hormesis to public health. **Ciênc. saúde coletiva**. v.12, n.4, p. 955-963, 2007.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. 1 ed., Fortaleza: Edições UFC, 1981.

CRYAN, J. F., HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 4, n.9, p. 775-790, 2005.

DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the Elevated Plus Maze in the Search for Novel Anxiolytic Agents. **Trends Pharmacol_Sci.**, v. 16, p. 33-36, 1995.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP. p. 417, 2002.

EDGE, J. A pilot study addressing the effect of aromatherapy massage on mood, anxiety and relaxation in adult mental health. **Complement Ther Nurs Midwifery**. v.9, p.90–97, 2003.

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

ESPEJO, E.F. Structure of the Mouse Behaviour on the Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 86, p. 105-112, 1997.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environ Health Perspect.**, v.109 (suppl 1), p.69-75, 2001.

FDA, United States Food and Drug Administration. Poisonous Plant Database [cited 2005 Out 24]. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html> - Acesso em: 09/12/2009.

FRASER, A.D. Use and abuse of the benzodiazepines. **Ther Drug Monit.** v.20, n.5, p.481-9, 1998.

FUJIWARA, R.; KOMORI, T.; YOKOYAMA, M.M. Psychoneuroimmunological benefits of aromatherapy. **The international journal of aromatherapy.** v.12, n.2, p.77-82, 2002.

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

GRAEFF, F.G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da Psicofarmacologia,** São Paulo: Atheneu, p.123-160, 1999.

- HADFIELD, N. The role of aromatherapy massage in reducing anxiety in patients with malignant brain tumours. **Int J Palliat Nurs.** v.7, p.279–285, 2001.
- HENDLEY, E.D.; SNIDER, S.H. Relationship between the action of monoamine oxidase inhibitors on the noradrenaline uptake system and their antidepressant efficacy. **Nature**, ed.220, v. 174,1968.
- HOLMES, P. Uplifting oil: the treatment of depression in clinical aromatherapy. **The international journal of aromatherapy.** v.9, n.3, p.102-104, 1999.
- INOUE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). **The international journal of aromatherapy.** v.13, n.2/3, p.95-107, 2003a.
- INOUE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2). **The international journal of aromatherapy.** v.13, n.4, p.173-184, 2003b.
- INOUE, S.; ABE, S. Predominant adsorption of sesquiterpene constituents of lavender, tea tree, lemongrass and thyme thymol oils on hairless mouse and human hairs in an aromatic bath. **The international journal of aromatherapy.** v.16, p.75-83, 2006.
- KAPUR, S.; MANN, J.J. Role of the dopaminergic system in depression. **Biological Psychiatry.** v.32, p.1-17, 1992.
- KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K.R.; WALTERS, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV

- disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**. v.62, n.6, p.593-602, 2005.
- KESSLER, R. C.; GREENBERG, P. E. The economic burden of anxiety and stress disorders. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**. v. 67, p. 982-992, 2002.
- KLIETHERMES, C. L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. v.28, p.837-850, 2005.
- KOMORI, T.; FUJIWARA, R.; TANIDA, M.; NOMURA, J. Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**. v.5, p.477-480, 1995.
- KOMORI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, M.; MOTOMURA, E.; SHIROYAMA, T.; OKAZAKI, Y. Application of fragrance in discontinuing the long-term use of hypnotic benzodiazepines. **The international journal of aromatherapy**. v.16, p.3-7, 2006.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.
- LEITE, M.P.; FASSIN-JR, J.; 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.

LEPINE, J.P. The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and societal costs. **J Clin Psychiatry**, 63 Suppl. v.14, p.4-8, 2002.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther.**v.46, n.3, p.321-340, 1990.

LISTER, R.G. The Use of a Plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum. p.512, 2002.

LOUIS, M.; KOWALSKI, S.D. Use of aromatherapy with hospice patients to decrease pain, anxiety, and depression and to promote an increased sense of well-being. **Am J Hosp Palliat Care**. v.19, p.381–386, 2002.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.1, p.123-128, 2007.

MANN, J.J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. **Neuropsychopharmacology** v.21, p.99-105, 1999.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E.; **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV; 2000.

MATOS, J.K.A.; DAS GRAÇAS, M.A. VI **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**.
Cie., Cult. (suppl.), p.96-103, 1980.

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, n.2, p.33-39, 1995.

MOSS, M.; HOWARTH, R.; WILKINSON, L.; WESNES, K. **The international journal of aromatherapy**. v.16, p.63-73, 2006.

OLIVEIRA, M.V.M. **O cravo bem temperado: usos, história e estórias das ervas aromáticas e outros condimentos**. Feira de Santana: UEFS. 2002.

OLIVER, H.; FITZ GERALD, M.J.; BABIAK, B. Benzodiazepines revisited. **J La State Med Soc**. v.150, n.10, p.483-5, 1998.

PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; RATES, S.M.K.; POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.19, p.140-149, 2009.

PAUWELS, P.J. Diverse signaling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. **Biochem. Pharmacol**. v.60, p.1743-1750, 2000.

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

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. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.24, p.525-529, 1986.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry.** v.56, p.237-243, 2001.

PILC, A., NOWAK, G. GABA-ergic hypotheses of anxiety and depression: Focus on GABA-B receptor. **Drugs of Today.** v. 41(11), p. 755, 2005.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology.** v.463, p.3-33, 2003.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p.289-304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J.; Hendrie, C.A. (EDS). **Ethology and Psychopharmacology.** Chichester: John Wiley and Sons, p. 9-44. 1994.

- 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. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.62, p. 515-521, 1999.
- SHAW, D.; ANNETT, J.M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J.C. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**. v.14, n.9, p.613-620, 2007.
- SILVA, J.A. **História dos Benzodiazepínicos**. In: BERNIK, M.A, editor. Benzodiazepínicos, quarto décadas de experiência. São Paulo (SP): Edusp; p.15-28, 1999.
- SIMÕES, C. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 3ªed. Florianópolis: UFSC/UFRGS, 1999.
- SNYDER, S. Drugs and the Brain. **Scientific American Books Inc.**, New York, 1986.
- SOUZA, F.G.M. Tratamento da depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr**. v.21, p.18-23, 1999.
- SPENCE, C.; MCGLONE, F.P.; KETTENMANN, B.; KOBAL, G. Attention to olfaction: a psychophysical investigation. **Experimental Brain Research**, Berlim, v.138, n.4, 2001. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/database>. Acesso em: 20 set. 2009.
- STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**. v. 85, p.367-370, 1985.

TREIT, D.; PINEL, J. P. J., FIBIGER, H. C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v.15, p.619-626, 1981.

URANI, A.; CHOURBAJI, S.; GASS, P. Mutant mouse models of depression: Candidate genes and current mouse lines. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.29, p.805-828, 2005.

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

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol. Bull.**, v.83, p.482-504, 1976.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**. v. 83, p. 1-16, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): Burden of disease: DALYs Disponível em : www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part4.pdf. Acesso em: 07/02/10.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): Mental Health “Depression” Disponível em: http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/,2006. Acesso em: 09/11/09.

ZIMMERMAN, M.; MC DERMUT, W.; MATTIA, J. I. Frequency of Anxiety Disorder in Psychiatric Outpatients with Major Depressive Disorder. **American Journal Psychiatry**. v. 157, p. 1337-1340, 2000.

Anexos

A exposição ao aparato para inalação (AI) pode interferir em comportamentos sensíveis a agentes estressores, parâmetros para o estudo de atividade ansiolítica. Assim, foi avaliada a interferência da exposição ao aparato para inalação (sem a difusão de qualquer substância volátil) nos comportamentos medidos no labirinto em cruz elevado (LCE) e na caixa claro-escuro (CCE) para registro dos seguintes parâmetros: LCE – entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados; número de *rearings*; CCE – tempo de permanência e número de *rearings* no compartimento claro e escuro e transições entre os compartimentos, os quais são apresentados a seguir.

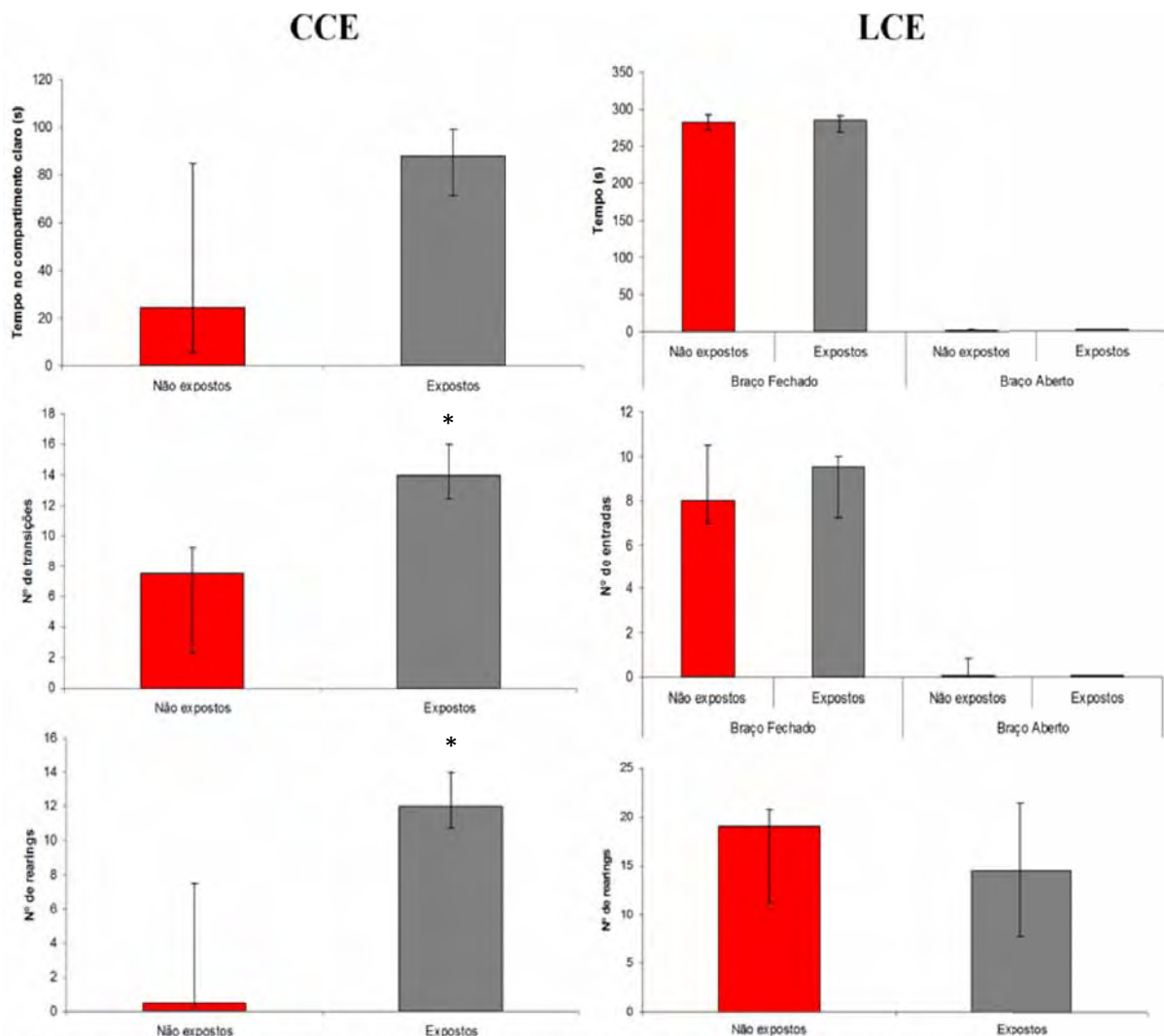


Figura 13: Comportamentos avaliados na caixa claro-escuro e no labirinto em cruz elevado em animais previamente expostos ou não ao aparato para inalação. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (n = 8-10 por grupo). *p<0.05; em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney).

A exposição ao AI interfere de modo diferencial na sensibilidade dos diferentes procedimentos para avaliação de atividade ansiolítica; o LCE parece ser mais robusto à interferência da exposição ao AI, resultando em comportamento similar entre os animais dos dois grupos. Assim, é preferível a avaliação da atividade ansiolítica em óleos essenciais por via inalatória no LCE à na CCE, apesar de ambos procedimentos serem equivalentes na análise de ansiedade generalizada.