

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Departamento de Farmacologia

Avaliação da atividade do tipo ansiolítica e antidepressiva do
óleo essencial de *Cananga odorata* por meio de procedimento sequencial
em camundongos.

Vinicius Luis Bertotti Ribeiro

Botucatu-SP

2012

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Departamento de Farmacologia

Avaliação da atividade do tipo ansiolítica e antidepressiva do
óleo essencial de *Cananga odorata* por meio de procedimento sequencial
em camundongos.

Vinicius Luis Bertotti Ribeiro

*Monografia apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Biociências da Unesp
como requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Ciências Biológicas.*

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

Coorientador: Dr. Celso A. R. de Almeida Costa

Botucatu-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ribeiro, Vinicius Luis Bertotti.

Avaliação da atividade do tipo ansiolítica e antidepressiva do óleo essencial de *Cananga odorata* por meio de procedimento sequencial em camundongos / Vinicius Luis Bertotti Ribeiro. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mirtes Costa

Coorientador: Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Capes: 21003009

1. Neuropsicofarmacologia. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Antidepressivos. 5. Camundongo – Estudos experimentais.

Palavras-chave: Ansiedade; Bateria de testes; *Cananga odorata*; Depressão; Neuropsicofarmacologia.

Dedicatória

A Deus que me dá forças para
vencer os obstáculos, à minha mãe Célia e ao
meu irmão Victor que sempre me
apoiam em todas as circunstâncias.

Agradecimentos

Agradeço a Deus que me ilumina e está sempre comigo guiando meus passos.

À minha mãe Célia Celeste e ao meu irmão Victor Augusto que me apoiam e me orientam em todos os momentos, sejam eles fáceis ou difíceis.

À todos os meus familiares, especialmente à minha tia Alice, que sempre me incentivaram.

À Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa, que compartilhou seu conhecimento, me orientando durante todo este tempo, sendo paciente com os meus deslizes, sempre solicita a elucidar todas as minhas dúvidas, permitindo-me consolidar os primeiros passos na pesquisa científica.

Ao Dr. Celso, que me ajudou nos experimentos, ensinando procedimentos da experimentação animal, proporcionando momentos de aprendizado, descontração e realização.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia que atenciosamente contribuíram para o meu desempenho.

Aos bons amigos da já antiga XLIII Turma de Biologia pelos momentos de reflexão e estudo, bem como os de entretenimento.

Muito obrigado.

Resumo

Os distúrbios do sistema nervoso central mais comuns relatados no mundo são a ansiedade e a depressão, com grande incidência de casos nos quais aparecem juntos. Os tratamentos utilizados na clínica além de não serem efetivos na totalidade dos casos podem, por vezes, apresentar diversos efeitos não desejados. Assim, na busca novas drogas mais efetivas e com menor incidência de efeitos adversos, a *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson aparece como uma alternativa. Esta espécie vegetal é utilizada na aromaterapia como na prevenção do estresse, ansiedade e depressão (BIRD, 2003). A busca de novas ferramentas terapêuticas depende do uso de animais de experimentação, e com as discussões na sociedade científica sobre o uso de animais, há uma maior preocupação em se desenvolver novas técnicas experimentais onde se possa aplicar os conceitos dos 3Rs objetivando a redução (*Replacement*) do número de animais, sua substituição (*Reduction*) e o refinamento (*Refinement*) das técnicas experimentais. Neste trabalho avaliou-se a atividade ansiolítica e antidepressiva do óleo essencial (OE) de *Cananga odorata*, em animais que foram sucessivamente submetidos a testes para avaliar a atividade motora, ansiolítica e antidepressiva. Camundongos machos foram tratados por via oral com OE nas doses de 0,1; 1, 10 e 100 mg/kg, e após 30 minutos foram submetidos ao teste do Campo Aberto, da Caixa Claro-Escuro e Suspensão pela Cauda, nesta ordem, com um intervalo de 30 minutos entre eles. Os resultados indicaram que a seqüência de testes é adequada para a avaliação destas atividades com economia de tempo, animais e drogas.

Sumário

1.	Introdução.....	8
2.	Objetivo.....	13
3.	Material e Métodos.....	14
3.1.	Óleo Essencial.....	14
3.2.	Animais.....	14
3.3.	Procedimentos gerais e grupos experimentais.....	15
3.4.	Procedimentos comportamentais.....	16
3.4.1.	Atividade Motora.....	16
3.4.2.	Atividade Ansiolítica.....	18
3.4.3.	Atividade Antidepressiva.....	19
3.5.	Análise estatística.....	21
4.	Resultados e Discussão.....	21
4.1.	Atividade motora.....	21
4.2.	Atividade ansiolítica.....	24
4.3.	Atividade antidepressiva.....	26
5.	Considerações Finais.....	28
6.	Conclusões.....	31
7.	Referências Bibliográficas.....	32
8.	Outras atividades desenvolvidas no período de desenvolvimento deste trabalho.....	37
9.	Anexos – Certificados do Comitê de Ética na Experimentação Animal.....	39

1. Introdução

Dentre os distúrbios do sistema nervoso central, a ansiedade e a depressão estão entre os mais frequentes (ANSSEAU *et al.*, 2005; KESSLER *et al.*, 2002, 2005; ALMEIDA FILHO *et al.*, 1992), e por interferir em diversos aspectos do comportamento humano levam à modificações deletérias na qualidade de vida dos acometidos.

A ansiedade pode ser caracterizada como sendo uma sensação de medo e apreensão, causada por desconforto e tensão frente a uma situação de perigo, representada por algo estranho ou novo (CRYAN & HOLMES, 2005). É uma reação natural, resultante do processo evolutivo que permite ao indivíduo reagir frente a uma situação nova que possa representar algum risco ou ameaça e, deste modo, aumenta a chance de proteção frente a estímulos ameaçadores. A partir do momento que esta resposta comportamental se torna frequente ou permanente o indivíduo passa a ter o desempenho cognitivo afetado, apresentando respostas exageradas para as situações cotidianas o que desencadeia sintomas físicos como fadiga, falta de ânimo, transtornos dos sistemas gastrintestinal e cardiovascular, deficiência do sistema imune (GRAEFF & BRANDÃO, 1999). De acordo com o DMS-IV - Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, em sua IV Revisão, os quadros ansiosos podem ser classificados em diversas manifestações de acordo com as características da resposta comportamental. Um estudo multicêntrico no

Brasil apresenta um alto índice de prevalência de transtornos ansiosos (8 a 18%) em relação a outros transtornos do sistema nervoso central (ALMEIDA FILHO, 1992). Esta prevalência é, ainda, distinta entre os diferentes tipos de transtornos ansiosos: fobias, que incluem agorafobia, fobia social e fobia simples (8,4%), transtorno da ansiedade generalizada (4,2%), transtorno do pânico (1,6%), e transtorno obsessivo compulsivo (0,3%) (ANDRADE *et al.*, 2002).

Por outro lado, a depressão pode ser caracterizada por sintomas como infelicidade, sensação de pesar, miséria e desespero, além de causar mudanças no apetite e no peso, fadiga, insônia ou hipersonia, agitação psicomotora, diminuição da libido, sentimentos de culpa e falta de concentração (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002; NESTLER *et al.*, 2002). Ainda, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION), estima que 120 milhões de pessoas apresentem um episódio depressivo em algum momento da vida. Além de estimar que até o ano de 2030 a depressão venha a ser o maior problema de saúde em termos de incapacitação e qualidade de vida (WHO, 2004).

Apesar de serem tratadas como doenças distintas, a ansiedade e a depressão frequentemente se apresentam associadas. A estimativa de um estudo retrospectivo com 17 publicações envolvendo pacientes com ansiedade e depressão indica que cerca de 50% dos casos esses distúrbios

apareceram juntos (WETZLER & KATZ, 1989; ANSSEAU *et al*, 2005), levando a inferência de que essas doenças seriam relacionadas (KALUEFF *et al.*, 2007; LAMERS *et al*, 2011).

Os tratamentos comumente usados para estas doenças trazem, por muitas vezes, inconvenientes. Embora os diferentes tipos de quadros ansiosos possuam ferramentas terapêuticas específicas, os benzodiazepínicos constituem a primeira opção para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada. É uma classe de drogas que apresenta baixos níveis de intoxicação (SILVA, 1999), mas podem desenvolver o uso abusivo, síndrome de abstinência e dependência e desenvolvimento de tolerância pelos usuários crônicos (OLIVER *et al*, 1998), causando uma redução da segurança do seu uso clínico. Quanto ao tratamento da depressão, são usados fármacos que agem nos sistemas monoaminérgicos, que atuam aumentando a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica dos neurônios, ou por inibirem sua recaptação ou por algum tipo de ação nos sistemas transportadores pré-sinápticos, mas podem apresentar alguns efeitos colaterais como disfunção sexual, insônia e efeitos anticolinérgicos (SOUZA, 1999).

Assim há um empenho na busca de novos produtos que possam apresentar atividade ansiolítica e/ou antidepressiva com menor incidência de efeitos colaterais. Sabendo-se que muitas espécies vegetais apresentam algum tipo de ação sobre o sistema nervoso central, busca-se neste estudo

avaliar a atividade do óleo essencial (OE) da *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson.

A *Cananga odorata*, conhecida popularmente como Ylang-ylang, pertence à família Annonaceae, caracterizada por apresentar muitas espécies fragrantas devido à presença de óleos essenciais (LEBOEUF *et al*, 1982), com algumas de importância comercial como esta. Trata-se de uma espécie de origem asiática, a qual pode apresentar diversos nomes como “Flor das Flores”, “Flor das Pétalas Douradas”, “Rainha das Flores” ou ainda “Árvore do Perfume”, cujo óleo é muito usado na perfumaria, indústrias farmacêuticas de cosméticos e na indústria alimentícia (CRAVEIRO *et al*, 1981). Na aromaterapia o OE desta espécie é utilizado com o propósito de melhorar a qualidade de vida por possuir um efeito preventivo contra o estresse, ansiedade e depressão (BIRD, 2003). Em trabalhos anteriores realizados no laboratório, o OE de *Cananga odorata* apresentou atividade antidepressiva após administração por via inalatória (FERREIRA, 2010).

Para testar a atividade de óleos essenciais no sistema nervoso central, são utilizados testes comportamentais com camundongos, geralmente com o uso de grande número de animais para se obter resultados válidos e confiáveis. O que se tem discutido ultimamente é a necessidade de se avaliar novos produtos em diferentes testes, mas deve-se procurar reduzir ao máximo o número de animais utilizados sem que se

reduzam as quantidades de informações sobre o produto testado, buscando-se extrair o máximo de informações de cada animal. Há também a necessidade de reduzir a quantidade de substância a ser testada, pois, por vezes é de baixa eficiência de extração, ou raramente encontrada ou ainda apresenta custo elevado.

Devido à já comentada comorbidade existente entre a ansiedade e a depressão, e a possibilidade de redução da quantidade do produto utilizado, assim como redução do número de animais de experimentação, busca-se utilizar uma sequencia de testes na qual seja possível obter simultaneamente dados sobre a atividade em modelos experimentais adequados para avaliar ansiedade e depressão. Este procedimento visa elevar a quantidade de informações obtidas sem que haja perda na confiabilidade dos resultados e fazendo uso de uma menor quantidade de produto.

Em trabalho anterior realizado no laboratório, foi estabelecida uma sequencia de procedimentos que reduziu o número de animais e de quantidade de amostra no estudo da potencial atividade sobre o sistema nervoso central em preparações de origem vegetal (RIBEIRO, 2010).

Portanto, no presente trabalho, propôs-se a utilização desta sequencia de procedimentos experimentais visando à investigação mais ampla do perfil de atividade presente no OE de *C. odorata*, administrado por via oral.

2. Objetivo

Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Cananga odorata* em camundongos através de sequencia de testes adequados para detecção de atividade do tipo ansiolítica e antidepressiva.

3. Material e métodos

3.1. Óleo essencial (OE)

Para a realização dos experimentos foi utilizado OE comprado na forma como é disponibilizado para o uso clínico. O fornecedor foi Florananda Ind. e Com. de Cosméticos e Produtos Naturais Ltda ME.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss provindos do Biotério Central da UNESP- Campus de Botucatu, com idade em torno de 45 dias. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia por no mínimo 14 dias antes dos experimentos, para habituação sob condições controladas de temperatura em torno de 21 °C (± 2 °C) e luminosidade com fase claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à alimento e água. No dia do experimento o acesso ao alimento e água foi interrompido duas horas antes do início dos procedimentos. Os animais foram acondicionados e tratados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)

sendo aprovados todos os protocolos experimentais pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu (Anexos).

3.3. *Procedimentos gerais e grupos experimentais*

Os experimentos ocorreram no período da tarde, visando a não interferência do ciclo circadiano sobre o comportamento dos animais. Para reduzir a interferência de um novo ambiente nos resultados dos procedimentos experimentais, no dia do experimento os animais foram habituados ao ambiente dos testes por um período de 2 horas antes do início dos procedimentos, sob temperatura e luminosidade controladas, exaustão de ar e com som atenuado, onde não foi realizada nenhuma outra atividade durante a realização dos experimentos.

Os camundongos foram divididos em grupos e foram tratados por via oral com o óleo essencial (OE) de *Cananga odorata* nas doses de 0,1; 1; 10 e 100 mg/kg (OE0,1 , OE1, OE10 e OE100, respectivamente). Os animais foram submetidos à sequência de procedimentos comportamentais para avaliação da atividade motora pelo Teste do Campo Aberto, da atividade do tipo ansiolítica pelo Teste da Caixa Claro-Escuro e da atividade do tipo antidepressiva pelo Teste da Suspensão pela Cauda,

na respectiva ordem, com 30 minutos de intervalo entre cada teste, sendo a sequência de teste iniciada 30 minutos após o tratamento dos animais.

O OE foi solubilizado em Tween 80® (polioxietileno-sorbitan monooleato) a 0,01% e este agente de solubilização foi utilizado (10 mL/kg) como controle negativo dos experimentos. Grupos controle-positivo foram tratados por via intraperitoneal com as drogas padrão ativas nos procedimentos experimentais. Um dos grupos recebeu Diazepam (DZP) na dose de 2 mg/kg e o outro recebeu Imipramina (IM) na dose de 30 mg/kg. Deste modo, cada sessão experimental foi composta por 7 grupos experimentais, assim denominados: TW (controle negativo); DZP (controle positivo para a atividade ansiolítica); IM (controle positivo para a atividade antidepressiva); OE 0,1, OE 1, OE 10 e OE 100 indicando as diferentes doses (mg/kg) de cada grupo tratado com o óleo essencial de *Cananga odorata*.

3.4. Procedimentos comportamentais

3.4.1. Atividade motora

Para a avaliação da atividade motora foi realizado o teste do Campo-Aberto (WALSH & CUMMINS, 1976), utilizando-se como parâmetro a atividade exploratória do animal representada pelo número de transições entre os quadrantes durante os 5 minutos que o animal

permaneceu no aparato. O equipamento é composto por uma arena circular feita de material acrílico de cor branca, com 50 centímetros de diâmetro, e com paredes de 40 centímetros de altura. O piso da arena circular é dividido por 2 linhas concêntricas e linhas radiais, dividindo a arena em 19 segmentos, com áreas semelhantes (Figura 1).



Figura 1: Aparato do Campo Aberto.

O animal foi colocado no centro após 30 minutos do tratamento e seu comportamento foi analisado por 5 minutos, onde teve movimentação espontânea durante todo o tempo. O número de transições entre os quadrantes demonstra a ambulação espontânea e o número de Rearings (que consiste no movimento no qual permanece apoiado somente nas patas posteriores) que indica o comportamento exploratório do animal. A arena foi limpa com papel toalha umedecida com água após a retirada de cada um dos animais.

3.4.2. Atividade ansiolítica

A atividade do tipo ansiolítica foi avaliada por meio do teste da Caixa Claro-Escuro (CRAWLEY, 1981), no qual se avalia a execução de comportamentos exploratórios eliciados frente à exposição a um ambiente desconhecido e aversivo. Estes fatores são reconhecidos como inibidores dos comportamentos exploratórios intrínsecos ao animal, oferecendo uma situação de conflito entre a exploração de um local novo e evitar o compartimento claro. Sendo assim, considera-se que o animal tratado com uma substância ansiolítica tende a executar mais este tipo de comportamento do que o controle.

O aparato da Caixa Claro-Escuro é composto por uma caixa de 46 centímetros de comprimento, 27 centímetros de largura e 30 centímetros de altura, que é dividida em dois compartimentos, sendo um iluminado por lâmpada fluorescente de 20 Watts, com 2/3 da área do compartimento menor, que não recebe luz. Os compartimentos são separados por uma divisória com abertura de 7,5 centímetros (Figura 2).



Figura 2: Aparato da Caixa Claro-Escuro.

O camundongo foi colocado no centro do compartimento claro, com a frente voltada para a abertura do compartimento escuro, 30 minutos após ter sido avaliado no teste de atividade motora (Teste do Campo Aberto) e 1 hora após o tratamento. Foram analisados os 5 minutos que o animal permaneceu no aparato, iniciando a contagem a partir da primeira entrada no compartimento escuro. O aparato foi limpo com papel toalha umedecido em água após a retirada de cada animal.

3.4.3. Atividade antidepressiva

A atividade do tipo antidepressiva foi avaliada pelo Teste de Suspensão pela Cauda (STERU *et al.*, 1985), modelo que avalia o comportamento em situações de estresse e a inibição do comportamento

natural para combater esta situação. O teste consiste em manter o animal suspenso pela cauda durante 5 minutos, preso a um suporte de madeira a 50 centímetros de altura, para registro da latência para o primeiro episódio de imobilidade (ausência de movimentos na tentativa de fuga) e o tempo total de imobilidade (Figura 3).

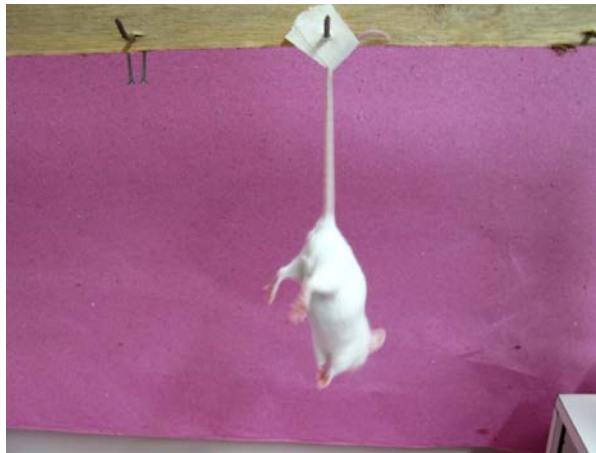


Figura 3: Aparato da Suspensão pela Cauda.

Durante esse teste o animal não tem possibilidade de fuga, adotando um comportamento típico, iniciado por um período inicial de alta atividade seguido de períodos com atividade reduzida e imobilidade, sendo relacionado com um estado de desistência. Drogas ativas no tratamento clínico da depressão diminuem a imobilidade nesta situação experimental. Os animais foram submetidos ao Teste de Suspensão pela Cauda 30 minutos após o Teste da Caixa Claro-Escuro e 1 hora e 30 minutos após o tratamento.

3.5. *Análise estatística*

Os resultados obtidos nos experimentos de avaliação comportamental foram apresentados como mediana e intervalo interquartis e foram comparados com o grupo controle negativo por meio de análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida do teste de Mann-Whitney, quando necessário. Foram consideradas significantes as diferenças associadas a $p \leq 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. *Atividade motora*

No teste de Campo aberto foram avaliados o número de transições entre os quadrantes percorridos e o número de *rearings* (Figura 4).

Nos procedimentos para avaliar a atividade do tipo ansiolítica ou antidepressiva, se a substância em teste interfere com a atividade motora esta interferência pode ser interpretada como uma resposta positiva ao teste específico (WALSH & CUMMINS, 1976). Assim, alterações motoras podem ser interpretadas como atividade do tipo ansiolítica

(alteração do número de transições entre os compartimentos da caixa claro-escuro, no tempo de permanência em um dos compartimentos ou no número de rearings) ou atividade do tipo antidepressiva (alteração na latência ou no tempo de imobilidade).

Em nossos experimentos, não foram observadas diferenças significantes na comparação entre os grupos tratados com OE e o grupo controle negativo em ambos os parâmetros analisados (número de transições e número de *rearing*). Deste modo, assegura-se a integridade do sistema motor e, portanto, eventuais alterações nos comportamentos avaliados nos outros procedimentos podem ser considerados específicos.

O grupo controle positivo DZP apresentou um aumento significativo no número de transições quando comparado com o grupo controle negativo TW. Este aumento pode ser interpretado de acordo com o efeito esperado dos benzodiazepínicos. Ou seja, os animais sob efeito do DZP - uma droga ansiolítica - estão menos susceptíveis aos estímulos estressores (ambiente desconhecido, iluminação intensa) e, desde modo, exercem com mais vigor a atividade exploratória.

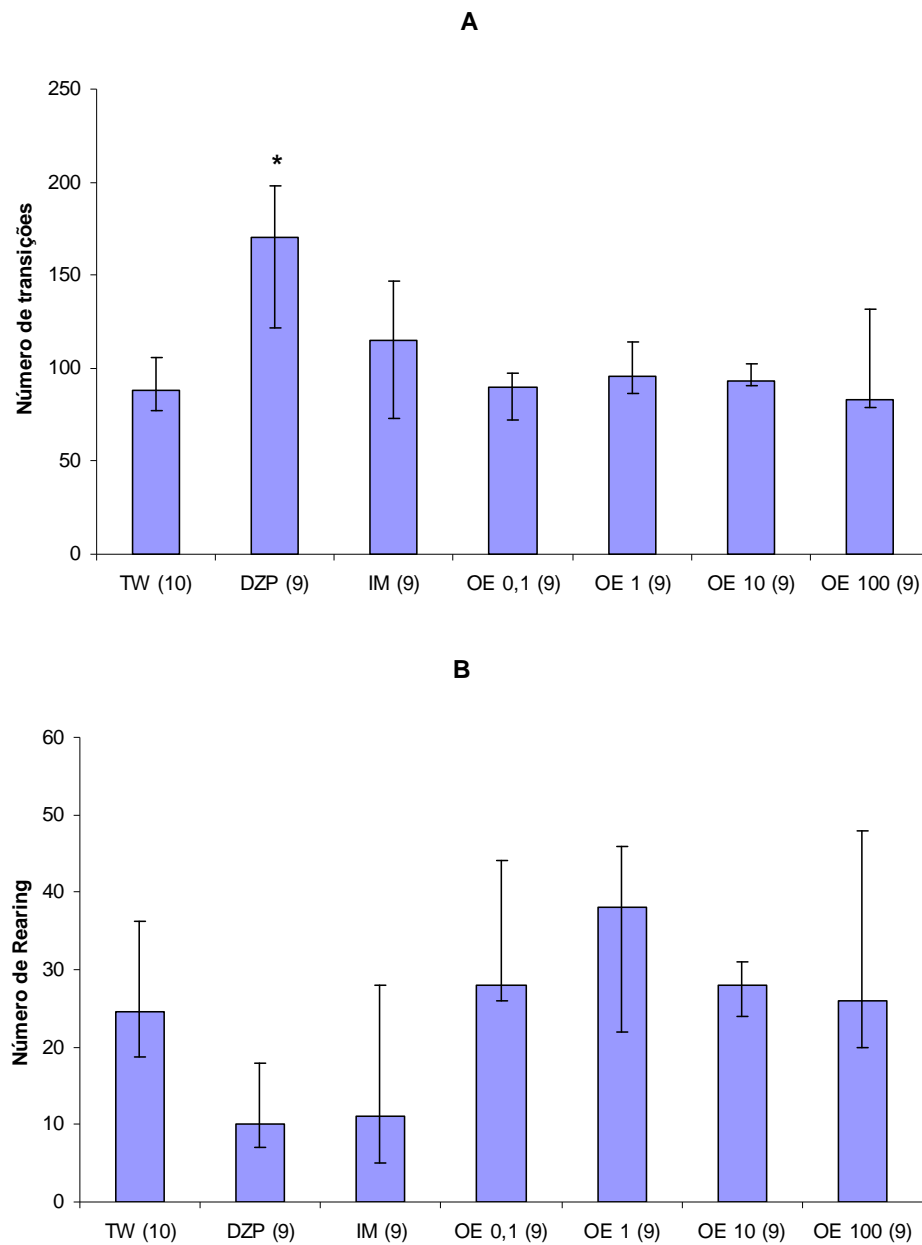


Figura 4: Resultados obtidos no Teste do Campo Aberto, em camundongos machos tratados 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartis. Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Em A, número de transições observadas. Em B, número de Rearings observados.

TW= tween; DZP= diazepam; IM= imipramina; OE= óleo essencial de *C. odorata* mg/kg.

* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

4.2. Atividade ansiolítica

Para a avaliação da atividade ansiolítica foi adotado o Teste da Caixa Claro-Escuro, onde foi analisado o tempo em que o animal permaneceu no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos (Figura 5).

Os animais tratados com as diferentes doses de OE não mostraram qualquer alteração no principal parâmetro do teste – tempo de permanência no compartimento claro – quando comparado com o grupo TW. No número de transições pode-se observar um ligeiro aumento nos grupos tratados com OE 1 e OE 100, sem significância estatística, provavelmente devido a grande variabilidade observada nos resultados.

O grupo tratado com o ansiolítico padrão DZP apresentou aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro. O aumento no número de transições entre os compartimentos não apresentou significância estatística, provavelmente devido à variabilidade dos dados.

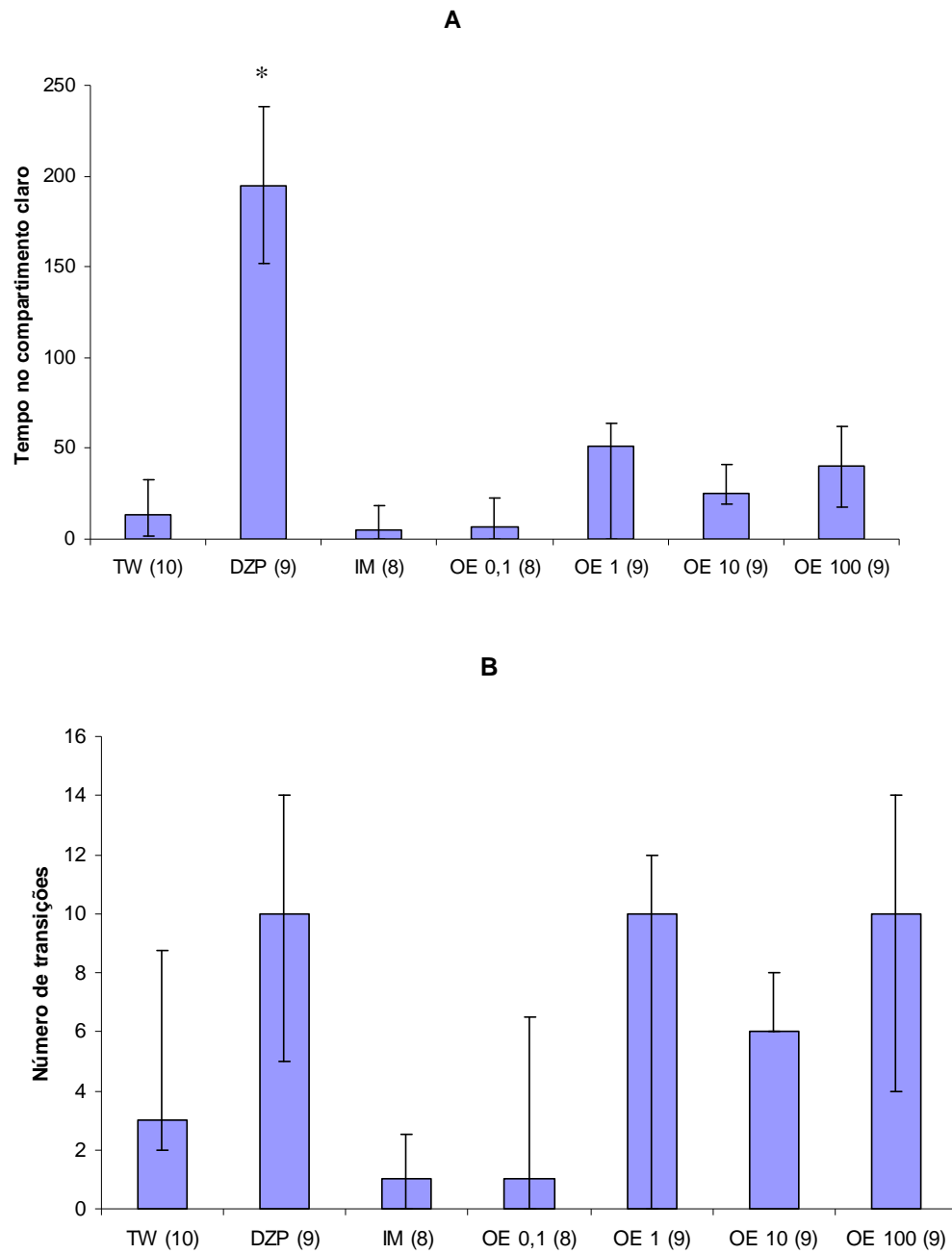


Figura 5: Resultados obtidos no Teste da Caixa Claro-Escuro, em camundongos machos tratados (via oral) 1 hora antes de serem submetidos ao procedimento experimental e 30 minutos após o Teste do Campo Aberto. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Em A, tempo no compartimento claro. Em B, número de transições entre os compartimentos.

TW= tween; DZP= diazepam; IM= imipramina; OE= óleo essencial de *C. odorata* mg/kg.

* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

4.3. *Atividade antidepressiva*

No Teste de Suspensão pela Cauda foram avaliados o tempo de latência para o primeiro comportamento de imobilidade e o tempo total de imobilidade (Figura 6).

Sabe-se que drogas antidepressivas aumentam a latência e reduzem o tempo total de imobilidade (STERU *et al.*, 1985). Em procedimentos anteriores o OE mostrou este perfil de resultado, após tratamento por via inalatória (FERREIRA, 2010). Neste conjunto de experimentos, o tratamento com OE mostrou uma tendência ao mesmo perfil, no entanto, sem significância estatística.

O grupo tratado com a droga padrão IM, apresentou aumento significativo na latência para o primeiro comportamento de imobilidade, e redução (sem significância estatística) para o tempo total de imobilidade. Alguns aspectos podem contribuir para este resultado, entre eles a variabilidade dos dados e o fato do composto utilizado estar fora de seu período de validade.

A aquisição de uma nova partida da droga padrão só poderia ser concretizada após o período destinado para a realização dos experimentos. Sendo assim, optou-se pelo uso do composto, mesmo fora das condições ideais, para possibilitar o treinamento na técnica comportamental em questão.

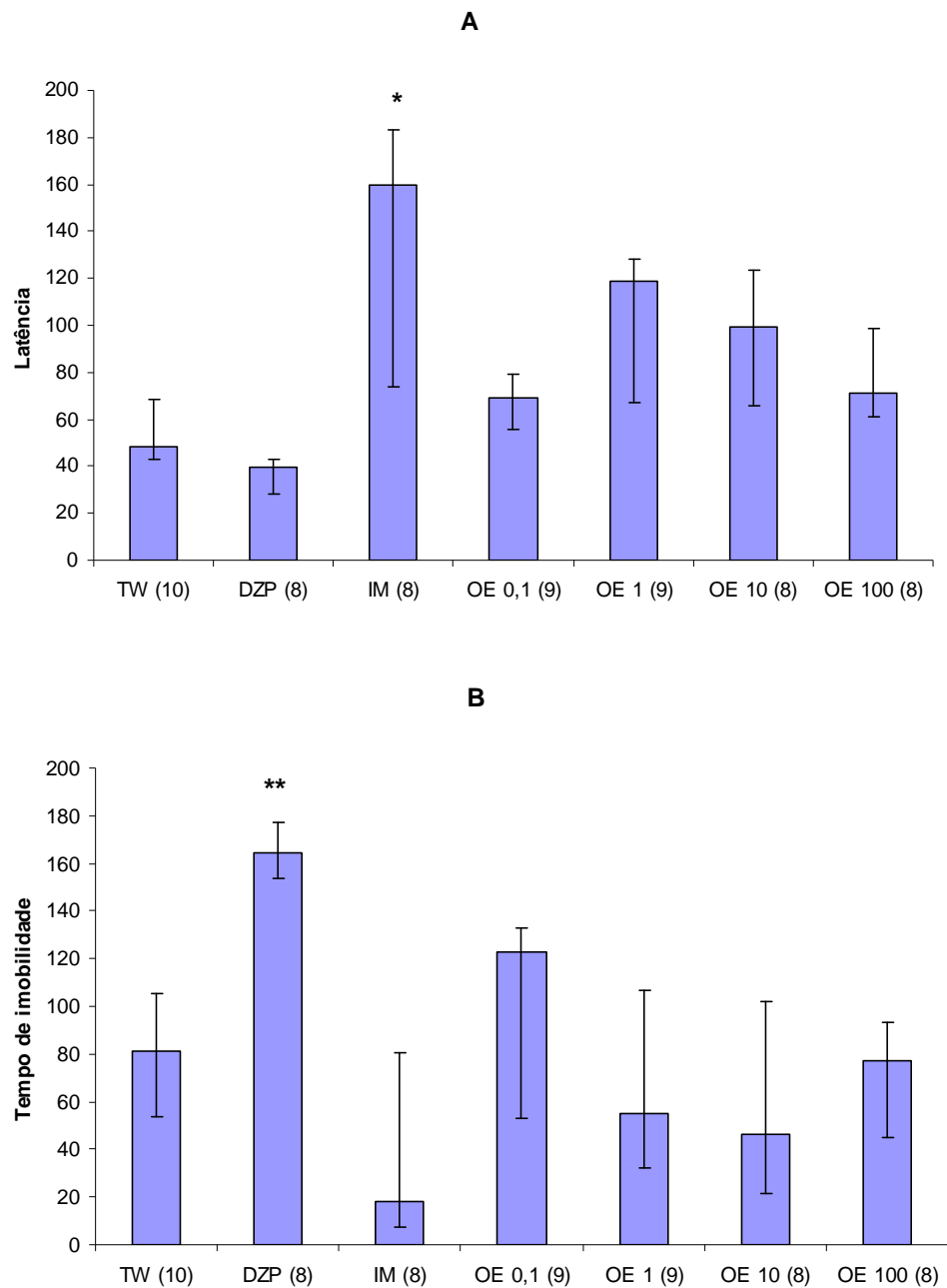


Figura 6: Resultados obtidos no Teste da Suspensão Pela Cauda, em camundongos machos tratados (via oral) 1 hora e 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental e 30 minutos após o Teste da Caixa Claro-Escuro. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais por grupo. Em A, latência observada. Em B, tempo total de imobilidade observado.

TW= tween; DZP= diazepam; IM= imipramina; OE= óleo essencial de *C. odorata* mg/kg.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney).

O resultado obtido com a curva dose-efeito do OE apresenta, ainda, uma particularidade que é comum aos antidepressivos, que é a gradativa redução do efeito em doses acima do nível ideal. Nesta situação a curva dose-efeito assume a forma de um “U”. Este padrão foi observado nos dois parâmetros apresentados na Figura 6, e também pode ser visualizado na Figura 7, que ilustra o fenômeno em compêndios de Farmacologia.

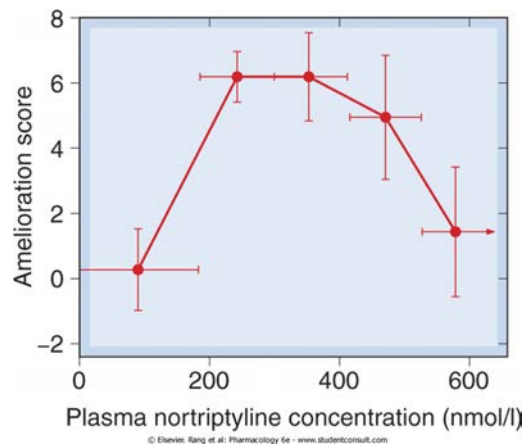


Figura 7: Ilustração da curva em U obtida quando se avalia a melhora no índice comportamental relacionado com depressão. Observa-se que a partir da concentração ideal ocorre diminuição do desempenho. Fonte: Hang & Dale Farmacologia, Fig. 39.5; cap. 39, p. 565, 6ª Edição; Elsevier, 2007.

5. Considerações finais

A utilização desta sequencia de experimentos possibilitou a redução da quantidade de OE utilizado, assim como do tempo de experimentação. Caso os experimentos fossem feitos de forma usual,

isoladamente, seria necessária uma quantidade 3 vezes maior de OE, das drogas-padrão e de animais de experimentação. Durante a seqüência de testes adotada, foram usados 64 animais. Em um experimento hipotético, estimando-se grupos de 9 animais, seriam necessários 63 animais por teste, resultando no uso de 189 animais. Assim, foi possível extrair o máximo de informação do número reduzido de animais.

Já em 1959 os cientistas Russel e Birch propuseram 3 conceitos éticos na experimentação animal, com as iniciais em inglês, *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*, conhecido como '3Rs', preceito que é atingido com a proposta da bateria de testes já descrita e utilizada no presente trabalho. Estes conceitos éticos englobam: *Replacement* ou substituição, visa possibilidade de troca dos métodos tradicionais com animais por outras técnicas de estudo, com menor número de animais, desenvolvimento de modelos cujos resultados possam ser extrapolados para os humanos de forma mais eficiente, aperfeiçoar a qualidade técnica dos experimentos e obter o maior número possível de informações relevantes em um pequeno número de animais. *Reduction* ou redução, diz para utilizar novas metodologias a partir do avanço técnico e científico, desenvolvendo métodos mais eficientes de experimentação; e *Refinement*, que nos diz para desenvolver métodos alternativos á experimentação animal (BALLS, M., 1994; FLECKNELL, P.A. 1994, FESTING, M.F.W. 1994, CAZARIN, K. C. C., *et al*, 2004).

Mais recentemente, a Lei nº11.794/08, chamada Lei Arouca, estabelece em seu Artigo 6º, nos parágrafos 1º e 2º, que caso sejam possíveis vários tipos de experimentos, devem ser selecionados os que exigirem menor número de animais, causarem menos dor, sofrimento ou danos permanentes e oferecerem maiores probabilidades de se obter resultados satisfatórios e que o número de animais utilizados e o tempo de duração de um experimento devem ser os mínimos indispensáveis para produzir o resultado conclusivo.

Assim, é de grande relevância o uso de baterias sequenciais em testes animais, para adequação aos preceitos éticos e à legislação.

6. Conclusões

- A análise dos resultados mostra que a sequência de testes é promissora para a avaliação de atividade de drogas com ação sobre o sistema nervoso central.

- Foi possível otimizar o procedimento experimental, reduzindo significativamente o número de animais, o tempo gasto com os experimentos e a quantidade de drogas utilizadas.

- Não foi observada atividade ansiolítica ou antidepressiva no óleo essencial de *Cananga odorata* por via oral, nos procedimentos experimentais utilizados. Do mesmo modo, o OE não apresentou sinais de comprometimento motor nos animais.

7. Referências bibliográficas

- 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.
- AMERICAN PSYCHIATRY 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 Epidemiol*, v.37, p.316-325,
2002.
- ANSSEAU, M.; FISCHLER, B.; DIERICK, M.; MIGNON, A.;
LEYMAN, S. Prevalence and Impact of Generalized Anxiety Disorder
and Major Depression in Primary Care in Belgium and Luxemburg: the
GADIS Study. *European Psychiatry*, v.20, p.229-235, 2005.
- BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research,
education and testing. *Lab. Animals*, v. 28, p. 193-211, 1994.

- BIRD, S.R. African aromatherapy: past, present and future applications. *The International Journal of Aromatherapy*, V.13, n.4, 185-195, 2003.
- CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.3, p.289-299, 2004.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Óleos essenciais do nordeste. 1 ed., Fortaleza: Edições UFC, 1981.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacology Specificity of a Simple Model for the Behavioural Actions of Benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.15, p.696-699, 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, p775-790, 2005.
- FERREIRA, F.G. 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. 2010. Tese (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

FESTING, M.F.W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab. Animals*, v. 28, p. 212-221, 1994.

FLECKNELL, P.A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Lab. Animals*, v. 28, p. 222-231, 1994.

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

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. *Behav. Brain Res.*, v.179 p.1-18, 2007.

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

LAMERS, F.; OPPEN, P.V.; COMIJS, H.C.; SMIT, J.H.; SPINHOVEN, P.; VAN BALKOM, A.J.L.M.; NOLEN, W.A.; ZITMAN, F.G.; BEEKMAN, A.T.F.; PENNINX, B.W.J.H. Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: the

- Netherlands study of depression and anxiety (NESDA). *J. Clin. Psychiatry*, v.72, n.3, p.341-348, 2011.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKERJEE, B.; MUKERJEE, R. The phytochemistry of the Anonaceae. *Phytochemistry*, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.
- McWILLIAMS, L.A.; GOODWIN, R.D. & COX, B.J. Depression and Anxiety Associated with Three Pain Conditions: Results From a Nationally Representative Sample. *Pain*, v.111, p.77-83, 2004.
- NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, M. Neurobiology of depression. *Neuron.*, v.34, p.13-25, 2002.
- OLIVER, H.; FITZ GERALD, M.J.; BABIAK, B. Benzodiazepines revisited. *J La State Med Soc.* V.150, n.10, p.483-5, 1998.
- RIBEIRO, C.A.S. Bateria seqüencial de procedimentos para avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongo. 2010. Tese (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.
- SACCHETTI, G.; Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v.91, p. 621–632, 2004.

SILVA, J.A. História dos benzodiazepínicos. In: BERNIK, M.A. editor.

Benzodiazepínicos, quarto décadas de experiência. São Paulo (SP):

Edusp; p.15-28, 1999.

SOUZA, F.G.M. Tratamento da Depressão. *Ver. Bras. Psiquiatr.* V.21,

p.18-23, 1999.

STERU, 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.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A.; The Open Field Test: a Critical

Review. *Psychological Bulletin*, v.23, p.482-504, 1976.

WETZLER S. & KATZ, M.M. Problems with the Differentiation of

Anxiety and Depression. *J Psychiatres*, v.23, p.1-12, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Global Burden of Disease:

2004 Update. A Response to the Need for Comprehensive, Consistent

and Comparable Information on Disease and Injuries at Global and

Regional Level. 2004

8. Outras atividades desenvolvidas no período de desenvolvimento deste trabalho

- Artigos Científicos – Trabalho técnico

Auxílio na coleta dos dados e análise técnica, reconhecido pelos autores em “Acknowledgment” no artigo submetido a publicação: *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment, 2012, BMC – Complementary and Alternative Medicine.

- Estágios

Estágio de observação de Técnicas em Toxicologia Analítica – Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) – Instituto de Biociências – Unesp Botucatu – 30 horas.

- Formação complementar

- Mini-curso ‘Produção Industrial de Medicamentos Fitoterápicos, da Bancada à Indústria’ – 1º Congresso de Biociências – Instituto de Biociências – Unesp Botucatu – 8 horas.
- Evento científico: 1º Congresso de Biociências – Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu.

- Disciplinas cursadas – optativas

Tópicos em Saúde Pública (4 créditos)

Processos Biotecnológicos (8 créditos)

Técnicas em Engenharia Genética (4 créditos)

Ecologia de Microrganismos (4 créditos)

Microbiologia Industrial (4 créditos)

Tecnologia das Fermentações (2 créditos)

- Organização de evento

- 1º Congresso de Biociências – Instituto de Biociências –
Unesp – Câmpus de Botucatu – 2012.

9. Anexos



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 (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 008/06-CEEA, sobre “*Modelos experimentais para avaliação de atividade geral 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 GANEIO DE MELLO
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA



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 (014)38113744

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

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.



Prof^a Dr^a **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA