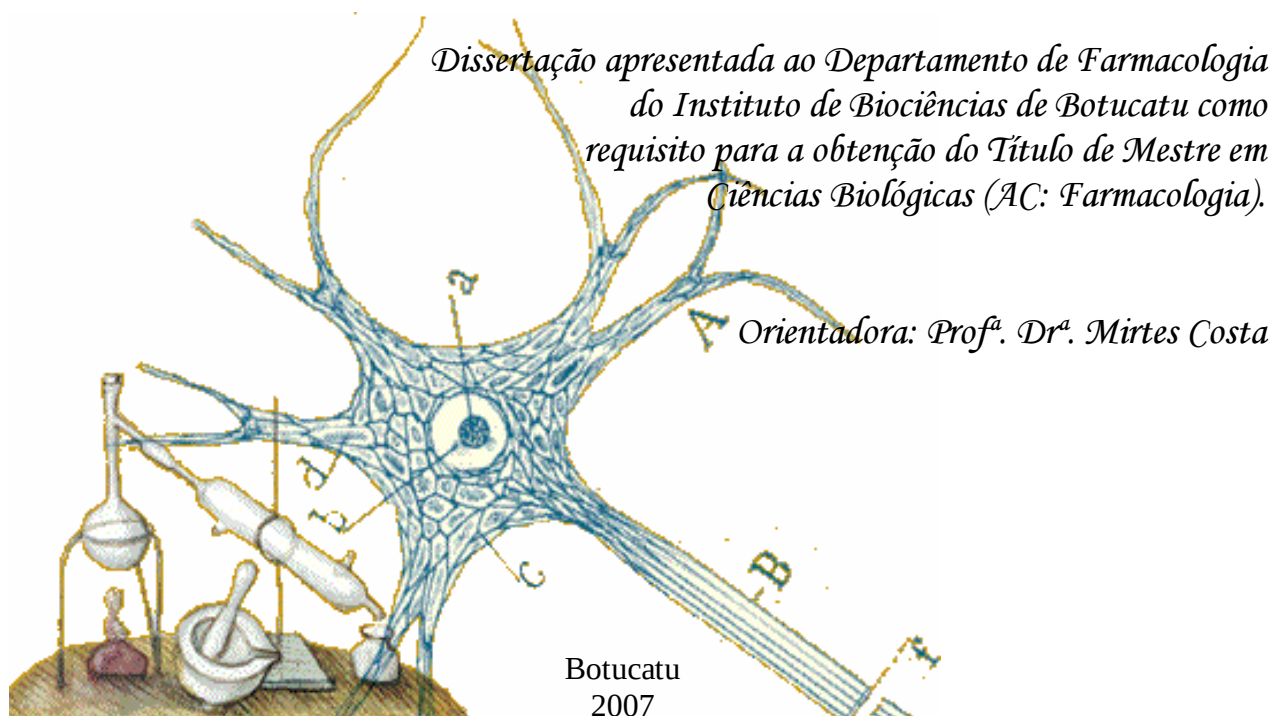


Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências – Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

**“Estudo da ação ansiolítica e sedativa de preparações
obtidas de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.”**

Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Costa, Celso Acácio Rodrigues de Almeida.

Estudo da ação ansiolítica e sedativa de preparações obtidas de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf / Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Mirtes Costa

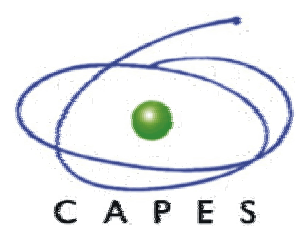
Assunto CAPES: 21003009

1. Neuropsicofarmacologia 2. Etnofarmacologia 3. Capim cidrão - Uso terapêutico

CDD 615.78

Palavras-chave: Ansiedade; Camundongo; Ciclo estral; *Cymbopogon citratus*; Modelos animais; Sono

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



Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

**“Estudo da ação ansiolítica e sedativa de preparações
obtidas de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.”**

*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^o. Dr^o. Roberto Andreatini (UFPR/Curitiba)

3º Titular: Prof^o. Dr^o. Oduvaldo Câmara Marques Pereira (UNESP/Botucatu)

1º Suplente: Prof^a. Dr^a. Silvia Mitiko Nishida (UNESP/Botucatu)

2º Suplente: Prof^o. Dr^o. Dejair Caitano do Nascimento (USC/Bauru)

Dedicatória



A minha mãe – e também avó! – porto seguro, fonte de amor incondicional!

A meu pai.... por seu coração “maior que o mundo”!

A meu avô, que muito cedo partiu!

Agradecimientos



“Nenhum indício melhor se pode ter a respeito de um homem do que a companhia que frequenta: o que tem companheiros decentes e honestos adquire, merecidamente, bom nome, porque é impossível que não tenha alguma semelhança com eles.” (Adam Parfrey)

À Deus!

Aos grandes amigos da minha República: “UNESPinTUDO®” – Mingo, Kurrompido, Raridade e Nervoso! - a moçada das antigas e aos agregados: Prumo, Babito, Godiness. KaSa-PrÓpRiA, Comédião, VôKH, Pon-Pon, Funga-X@#%, Érika Roldão, Dutra, Mameluca, Abana, Astro... – sem vocês Botucatu não seria a mesma!

Aos meus tios Marlene e Edvaldo... fonte de apoio e inspiração!!! Obrigado pela enorme ajuda e por todo o carinho. Vocês foram fundamentais...

As amigas que fiz no laboratório: Aline (Kani), Aline Nascimento, Melissa (Porteira) e Valéria.

Aos grandes parceiros de laboratório... André – Pinóculos e Eduardo – Nikito! Valeram as piadas, as risadas e a excepcional amizade e parceria!!!

A todos os alunos da Pós... que, cada um a seu jeito, fizeram parte dessa caminhada.

Em particular agradeço ao Léo! Figura ímpar! Sempre atencioso e disposto a ajudar! Obrigado pelos ensinamentos, pela força e pelas dicas.

À sessão de Pós-graduação nas figuras do Serginho, Luciene e Maria Helena.

Ao Prof. Dr. Roberto Andreatini da UFPR por aceitar, sem hesitar, ler e fazer parte da banca desta dissertação!

Ao Prof. Dr. Oduvaldo e aos alunos do seu laboratório (Cíntia, Fábio e Renata) que, no início dos trabalhos com as fêmeas, foram extremamente atenciosos! Muito obrigado!

À Profª Drª Silvia M. Nishida do Depto. de Fisiologia pela especial amizade, pela solicitude e por se dispor a ler minha dissertação!

Ao Prof. Dr. Dejair por aceitar ser um dos membros da banca.

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

A todos os Professores do Depto. de Farmacologia.

Aos Funcionários do Depto.: Cris, Paulão, Luis e Aninha.

Ao pessoal que “cuida” do Depto. de Farmacologia, aqui simplesmente representados pela figura da Janete! - Êhhhh! Janete!!!

Que me perdoem os que não foram citados aqui, - Tico e Teco já não são como antes! – que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta dissertação!

À CAPES pelo incentivo científico e suporte financeiro.

- Este trabalho leva um pouco de todos vocês!

*Em especial, agradeço a minha Profª e Orientadora Drª Mirtes Costa.
- Orientadora no sentido mais amplo da palavra! Muuuuito obrigado!
Estes anos foram essenciais para minha formação profissional e pessoal!*

“...a melhor homenagem que se pode fazer a um mestre é discutir-lhe a obra, e seguir-lhe as lições. Principalmente quando entre as lições inclui-se a de pensar pela própria cabeça e seguir seu próprio caminho e mais principalmente ainda quando mestres e discípulos sabem que nem sempre os percursos têm o mesmo ponto de chegada...

*...os generosos e sábios olhos de mestre ensinam hoje a seus ouvidos a paciência necessária para tolerar mais estas arengas de seus alunos. Pois paciência, sabedoria e tolerância – são as marcas maiores de quem verdadeiramente é Mestre!”
(Marisa Lajolo)*

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

“Durante anos consecutivos, nossos professores têm aprendido teorias científicas sobre a educação, achando que é assim que se formam professores. Existe, de fato, uma ciência da educação, como também existe uma ciência do piano. Mas a ciência da educação não faz um professor, da mesma forma como o conhecimento da ciência do piano não faz um pianista. Muitos professores maravilhosos nunca estudaram as disciplinas pedagógicas. Se os alunos refutam diante da comida e se, uma vez engolida, a comida provoca vômitos e diarreia, isso não quer dizer que os processos digestivos dos alunos estejam doentes. Quer dizer que o cozinheiro-professor desconhece os segredos do sabor. A educação é uma arte. O educador é um artista. Aconselho os professores a aprender seu ofício com as cozinheiras.”
(Rubem Alves)

Resumo



Resumo:

A ansiedade é uma das mais freqüentes desordens psiquiátricas cuja etiologia parece depender de uma interação entre predisposição e fatores ambientais. No Brasil, os transtornos ansiosos encontram-se entre os mais prevalentes diagnósticos psiquiátricos, sendo as mulheres afetadas cerca de duas vezes mais que os homens. A terapêutica disponível é baseada, principalmente, na manipulação dos sistemas de neurotransmissão gabaérgico, com a utilização de agonistas de receptores benzodiazepínicos. Estas drogas apresentam efeitos colaterais importantes e não são capazes de controlar os quadros ansiosos em cerca de 25% dos pacientes. Outras drogas mais recentemente introduzidas na terapêutica, como a buspirona, que atuam sobre o sistema serotoninérgico, apresentam latência de cerca de duas semanas para o início dos efeitos ansiolíticos, e falham no controle dos sintomas de ansiedade em uma parcela importante dos pacientes. Deste modo, justificam-se os esforços no sentido de se encontrar novas substâncias com potencial atividade ansiolítica. Neste contexto surgem as plantas medicinais. A espécie *Cymbopogon citratus* apresenta grande potencial, pois é utilizada na medicina popular como calmante, sedativa e ansiolítica. No entanto, apesar do intenso uso desta planta para fins medicinais, são praticamente inexistentes as pesquisas farmacológicas a respeito. Uma ampla investigação acerca da presença da atividade ansiolítica em novas substâncias envolve a utilização de modelos experimentais, dentre eles o procedimento da Caixa Claro/Escuro e o Teste de Esconder Esferas. Resultados sugestivos da presença de atividade ansiolítica foram obtidos em camundongos tratados com o óleo essencial (OE) de *C. citratus* no Labirinto em Cruz Elevado e na Caixa Claro/Escuro. No presente trabalho o OE demonstrou ser ativo no Teste de Esconder Esferas em animais machos tratados com a dose de 500 mg/Kg e em fêmeas na fase de estro na dose de 1000 mg/Kg. Nas doses de 1500 e 2000 mg/Kg do OE, 1200 e 1600 mg/Kg do composto majoritário Citral houve um aumento no tempo de duração do sono induzido por éter etílico. Tanto os camundongos machos quanto as fêmeas tratados com as diferentes preparações de *C. citratus* não apresentaram prejuízo sobre a Barra Giratória, indicando integridade do sistema locomotor. A análise conjunta dos dados sugere a presença de atividade ansiolítica e sedativa na espécie estudada, entretanto, estudos posteriores são essenciais para o melhor entendimento dos mecanismos de ação do OE.

Abstract



Abstract:

Anxiety is one of the most frequent psychiatric disorders which etiology seems to depend on an interaction between predisposition and environmental factors. In Brazil, anxiety disorders are among the most prevalent psychiatric diagnoses being the affected women about twice more than men. The available therapeutics are set mainly in the manipulation of the gabaergic systems neurotransmission with the benzodiazepine/GABA_A agonists receptor complex usage. These drugs present important collateral effects and they are not capable to control the anxiety disorders in about 25% of the patients. Other drugs more recently introduced in the therapeutics as the buspirone that acts on the serotonergic system present latency in about two weeks for the beginning of the anxiolytic-like effects and they fail in the control of the anxiety symptoms in an important portion of the patients. This way the efforts to find out in new substances with potential anxiolytic activity are justified. It is in this context that the medicinal plants appear which the *Cymbopogon citratus* species presents great potential, because it is used in the popular medicine as sedative and anxiolytic. However, despite the intense use of this plant for medicinal ends, there are nonexistent the pharmacological researches about it. A wide investigation concerning the anxiolytic activity presence in new substances involves the appropriate experimental models usage among then the Light/Dark Box Test and the Marble-burying Test. The suggestive results of anxiolytic activity presence were obtained in treated mice with the essential oil (EO) of *C. citratus* in the Elevated Plus-Maze and in Light/Dark Box Test. In the present work OE demonstrated to be active in the Marble-burying Test in treated male animals with the dose of 500 mg/Kg and in the females in the estrous phase in the dose of 1000 mg/Kg. There was an increase in the duration time of sleeping time induced by ethyl ether in 1500 and 2000 mg/Kg EO doses and 1200 and 1600 mg/Kg doses of the majority compound Citral. Both male and female mice treated with the different preparations of *C. citratus* didn't present Rota-Rod Test damage indicating integrity of the locomotor system. The data analysed group suggests the presence of anxiolytic activity and sedative in the studied specie, however posterior studies are essential for the best understanding of EO action mechanisms.

Sumário



SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Sumário

Prólogo

I.) Introdução	01
II.) Objetivo	11
III.) Material e Métodos	12
3.1) A Planta	12
3.2) Extração do Óleo Essencial	12
3.3) Preparo da Decocção	13
3.4) Análise Cromatográfica	14
3.5) Procedimentos Gerais	16
3.6) Animais	16
3.7) Determinação do Ciclo Estral	17
3.8) Avaliação da Atividade Ansiolítica	18
A.) Caixa Claro/Escuro (“Light/Dark Box Test”)	18
B.) Teste de Esconder Esferas (“Marble Burying Test”)	20
3.9) Avaliação da Atividade Sedativa	21
3.10) Avaliação da Atividade Geral	22
A.) Barra Giratória (“Rota-Rod”)	22
B.) Campo Aberto (“Open field”)	23
3.11) Análise Estatística	23
IV.) Resultados & Discussão	25
4.1) Rendimento do Óleo Essencial	26
4.2) Análise Cromatográfica	27
4.3) Composição do Óleo Essencial	29
4.4) Análise do Ciclo Estral	30
4.5) Avaliação da Atividade Ansiolítica	31
4.6) Avaliação da Atividade Sedativa	42
4.7) Avaliação da Atividade Geral	48
V.) Conclusão	58
VI.) Referências Bibliográficas	59
VII.) Anexos	67

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 e envio de artigo para publicação em periódico científico internacional.

*** Trabalho completo publicado em periódico científico:**

Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine, 2007 (in press)**. Miriam Marcela Blanco, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Anaflávia de Oliveira Freire, Jair Guilherme dos Santos Júnior, Mirtes Costa. (Anexo 01)

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

⇒ COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; GARGANO, André Costa; COSTA, Mirtes. Anxiolytic-like effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in experimental procedures in mice. In: **European Neuropsychopharmacology - The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**. v. 16, suplemento 4, pg. S475, França, 2006.

⇒ COSTA, Mirtes; COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; GARGANO, André Costa; LEDVINKA FILHO, Eduardo. Differential behavior in the marble-burying test does not predict behavioral differences in generalized anxiety disorder models. In: **European Neuropsychopharmacology - The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**. v. 16, suplemento 4, pg. S474, França, 2006.

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

⇒ COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; MARQUES, Márcia Ortyz Maio; COSTA, Mirtes. Atividade sedativa do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf e de seus compostos majoritários. In: XXI FESBE, 2006, Águas de Lindóia/SP. XXI Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2006. v. 1, p. 68.

⇒ GARGANO, André Costa; COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; GARCÍA-GONZÁLEZ, Mildred; COSTA, Mirtes. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico de *Annona muricata* (graviola, araticum) sobre o Sistema Nervoso Central. In: 8º ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA, 2005, Botucatu. 8º ERBM - Anais. 2005.

⇒ COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; PULTRINI, Aline de Moraes; GALINDO, Luciane de Almeida; COSTA, Mirtes. Efeito Ansiolítico do óleo essencial (OE) de *Citrus aurantium* L. no modelo da caixa claro-escuro. In: XX FESBE, 2005, Águas de Lindóia/SP. XX Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. 2005. v. 1, p. 170-170.

*** Trabalhos técnicos:**

⇒ COSTA, Celso Acácio Rodrigues de Almeida; STELZER, Murilo. 8º Encontro Regional de Biomedicina. 2005. Site desenvolvido para o 8º Encontro Regional de Biomedicina com a finalidade de divulgar e servir como meio de inscrição dos participantes do evento (<http://www.ibb.unesp.br/eventos/erbm/>).

⇒ PULTRINI, Aline de Moraes; GALINDO, Luciane de Almeida; COSTA, Mirtes. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. Finalidade: Ajuda na coleta e na análise dos dados do artigo publicado na revista **Life Sciences**. 2006. v. 78, p. 1720-1725.

*** Organização de eventos científicos:**

- ⇒ Comissão Organizadora do VI Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2007.
- ⇒ Comissão de Apoio do 9º Encontro Regional de Biomedicina. 2006.
- ⇒ Comissão Organizadora do 8º Encontro Regional de Biomedicina. 2005.
- ⇒ Comissão Organizadora do V Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas. 2005.

*** Participação em eventos científicos:**

- ⇒ I Encontro Nacional Sobre Ética na Experimentação Animal (ENSEEA). 2006. Botucatu/SP
- ⇒ XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 2006. Salvador/BA.
- ⇒ XXI Reunião anual da FeSBE. 2006. Águas de Lindóia/SP.
- ⇒ XX Reunião anual da FeSBE. 2005. Águas de Lindóia/SP.
- ⇒ II Fórum Internacional de Ética e Bem-estar Animal. 2005. Botucatu/SP.
- ⇒ Simpósio. Plantas Medicinais do Brasil: o Pesquisador Brasileiro Consegue Estudá-las?. 2005. São Paulo/SP.

Introdução



I. Introdução:

A ansiedade é um fenômeno que vem sendo relatado há milênios, porém só veio a ter importância na cultura ocidental a partir do século XIX (DRACU & LADER, 1997). A distinção entre ansiedade, medo e angústia, ainda hoje, não encontra consenso. Etimologicamente, os termos latinos correspondentes a angústia e a ansiedade derivam do verbo grego *agkhô*: eu aperto, eu estreito. Deste termo, surgem no latim os verbos *ango* e *anxio*, que significam respectivamente aperto, constrição física e tormento (PEREIRA, 2004).

Do ponto de vista fenomenológico, a ansiedade é representada por um desagradável estado de tensão, apreensão ou inquietude, com a presença de sintomas psicológicos, psicomotores e vegetativos (PAPROCKI, 1990). É qualidade emocional associada ao medo. Porém, enquanto este é fruto de ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (GRAEFF & GUIMARÃES, 2000).

No plano somático os indivíduos expressam sintomas como, por exemplo, aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da respiração e urgência de micção ou defecação – induzidas pela expectativa de perigo, dor ou necessidade de um esforço especial (BRANDÃO, 1999). Já no plano cognitivo, a ansiedade manifesta-se por pensamentos de que alguma coisa ruim vai acontecer, designados como preocupação. Esta pode ser tão intensa que interfere na capacidade de concentração e no desempenho de tarefas intelectuais (GRAEFF & GUIMARÃES, 2000).

A ansiedade é considerada normal ou patológica, conforme a relação entre os fatores desencadeantes e a intensidade das reações

emocionais, fisiológicas e comportamentais. Esta relação é conhecida como lei de *Yerkes-Dodson*, descrita pela primeira vez em 1908 por Robert M. Yerkes e John D. Dodson (Fig. 01), e é muito útil para ilustrar os aspectos adaptativos (na medida em que levam o indivíduo a evitar dano físico ao organismo ou prejuízos psicológicos) e mal-adaptativos (transtornos psiquiátricos) da ansiedade (GRAEFF & GUIMARÃES, 2000).

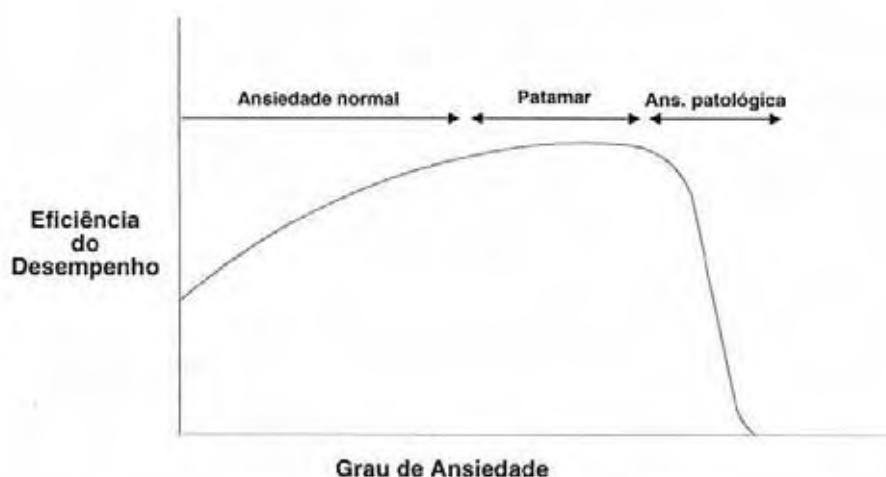


Figura 01. Curva de *Yerkes-Dodson*. Relação entre ansiedade e adaptação (Eficiência do Desempenho).

Fonte: Graeff & Brandão, 1993. p. 114.

Três sistemas de neurotransmissores estão implicados na base biológica da ansiedade: o complexo receptor de GABA-benzodiazepínico, o sistema *locus coeruleus*-noradrenalina e o serotoninérgico. Estes sistemas de neurotransmissores podem ser os mediadores da ansiedade “normal” e também da ansiedade patológica. Contudo, é bastante improvável que os transtornos de ansiedade sejam decorrentes de alterações em um único sistema de neurotransmissão, tendo em vista que diversos outros neurotransmissores participam da modulação dos comportamentos, além de interagirem entre si (GRAEFF & HETEM, 2004).

Como em outros distúrbios psiquiátricos, a etiologia da ansiedade patológica, parece depender de uma interação entre predisposição e fatores ambientais. A predisposição, além de ser determinada geneticamente pode também ser resultado de experiências marcantes que o indivíduo tenha sofrido (GRAEFF & BRANDÃO, 1993).

Estas desordens englobam, de acordo com critérios diagnósticos de classificação psiquiátrica do DSM-IV (Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria, 1994), os seguintes transtornos: ataques de pânico, agorafobia, transtorno de pânico sem agorafobia, transtorno de pânico com agorafobia, agorafobia sem história de transtorno de pânico, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, transtorno de ansiedade induzido por substância e transtorno de ansiedade sem outra especificação (FIGUEIREDO, 2004).

De acordo com os resultados da etapa inicial do *World Mental Health Survey* (Levantamento Mundial sobre Saúde Mental), um amplo estudo coordenado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) sobre prevalência e severidade dos transtornos mentais, parcelas variáveis de 2,4% a 18,2% da população dos 14 países já avaliados apresentam algum tipo de transtorno de ansiedade. O País com maior prevalência destas desordens são os EUA (18,2%) e entre os países latino-americanos já avaliados, a Colômbia tem a prevalência de 10% e o México 6,8%. O Brasil também integra este estudo, porém os dados ainda não estão prontos (WHO, 2004).

Também no Brasil, os transtornos ansiosos constituem o principal problema de saúde mental e encontram-se em primeiro lugar entre os mais prevalentes diagnósticos psiquiátricos. Um estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica de adultos demonstrou as seguintes estimativas de prevalência de distúrbios ansiosos: 12,1% para Brasília, 6,9% para São Paulo e 5,4% para Porto Alegre. Estes relatos estão associados a um elevado (5,5 a 12%) número de casos potencialmente necessitados de assistência (ALMEIDA FILHO *et al.*, 1992) sendo que, a maioria, são tratados por clínicos gerais, os quais são responsáveis por cerca de 60% das prescrições de benzodiazepínicos para o tratamento (BRAWMAN-MINTER & LYDIARD, 1997).

Desde a década de 60 do século passado os benzodiazepínicos têm sido extensivamente usados para tratar formas severas de ansiedade (JORDAN *et al.*, 1996; RICKELS & SCHWEIZER, 1997), contudo o tratamento farmacológico dos vários distúrbios de ansiedade está longe do ideal (OLIVIER, 2003). A ação ansiolítica destes compostos é devida à sua atividade sobre a porção basolateral da amígdala, onde a concentração de receptores benzodiazepínicos é máxima, assim como a redução do funcionamento do sistema septo-hipocampal, por diminuírem a atividade da aferência serotoninérgica e noradrenérgica (GRAEFF & HETEM, 2004).

Os benzodiazepínicos não são capazes de controlar os quadros ansiosos em cerca de 25% dos pacientes e possuem efeitos colaterais importantes, incluindo: sedação, relaxamento muscular, potencialização do efeito depressor do etanol, amnésia anterógrada, abuso e dependência (JORDAN *et al.*, 1996). Outras drogas, mais recentemente introduzidas na terapêutica como a buspirona e seus correlatos, que atuam sobre o sistema

serotonérgico, apresentam latência de cerca de duas semanas para o início dos efeitos ansiolíticos, e falham no controle dos sintomas de ansiedade em uma parcela importante dos pacientes.

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 (OLIVIER, 2003; CRYAN & HOLMES, 2005; PILC & NOWAK, 2005).

É neste contexto que surge a utilização das plantas medicinais. Os metabólitos secundários da grande diversidade de espécies vegetais representam uma rica fonte de novas moléculas que podem servir como protótipo de substâncias úteis nos transtornos de ansiedade.

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 naturais os tratamentos mais populares (ASTIN, 1998 *apud* ERNST, 2006).

A espécie *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf foi selecionada com base em dados etnofarmacológicos, que a indicam como detentora de ação sobre o Sistema Nervoso Central não pressupondo nenhum mecanismo de ação. Essa é uma estratégia eficiente para escolha de novas plantas para pesquisa, visto que seu uso tradicional pode ser considerado como uma pré-triagem quanto a sua utilidade terapêutica (ELISABETSKY & SOUZA, 2004) e possibilita o desenvolvimento de grupos de drogas inteiramente novos, com mecanismos de ação diferentes das drogas já disponíveis para os transtornos de ansiedade (ANDREATINI *et al.*, 2001).

O chá das folhas é largamente utilizado na medicina popular como antiespasmódico, sedativo, calmante, analgésico suave, carminativo, antipirético, emenagogo, diurético, sudorífico, hipotensor e anti-reumático (DI STASI *et al.*, 1989). Seguramente o emprego como sedativo do Sistema Nervoso ou calmante é o uso mais comum (CARLINI, 1985). No Brasil, de acordo com levantamento feito por Nogueira (1983), o *C. citratus* foi indicado como medicamento para os transtornos do Sistema Nervoso ou “males psiconeurológicos” por 201 entre 479 (41,96%) mulheres que freqüentaram centros de Saúde de São Paulo. Também há registro de uso caseiro para combater diversas afecções das vias respiratória e digestiva e também inflamação da bexiga. A planta foi incluída na lista da extinta Ceme (Central de Medicamentos) como espécie de estudo prioritário (AKISUE, 1996).

Esta espécie vegetal, a despeito da grande utilização empírica no controle de quadros ansiosos, foi objeto de poucos estudos controlados no sentido de se melhor caracterizar sua atividade ansiolítica e possíveis efeitos gerais sobre o sistema nervoso central.

Resultados sugestivos da presença de atividade ansiolítica no óleo essencial (OE) de *C. citratus* foram obtidos em camundongos no Labirinto em Cruz Elevado e na Caixa Claro/Escuro, dois procedimentos experimentais amplamente utilizados na investigação da atividade ansiolítica (BLANCO *et al.*, 2007). A análise conjunta destes dados sugere a presença de atividade ansiolítica na espécie estudada.

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 ansiolítica em novas substâncias envolve a utilização de modelos experimentais que devem:

a) reproduzir características comportamentais e patológicas da síndrome de ansiedade; b) permitir investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem; e c) permitir avaliação confiável de agentes ansiolíticos, assim como identificar efeitos ansiogênicos de drogas e toxinas (ANDREATINI *et al.*, 2001).

Dentre os diferentes procedimentos experimentais para o estudo da ansiedade, o da Caixa Claro/Escuro parece ser adequado para detecção de substâncias ativas no tratamento dos Transtornos de Ansiedade Generalizada – TAG (FILE, 1990), enquanto o Teste de Esconder Esferas parece ser mais sensível a substâncias utilizadas para o tratamento do Transtorno Obsessivo Compulsivo - TOC (NJUNG'E & HANDLEY, 1990).

O procedimento da Caixa Claro/Escuro tem a vantagem de ser rápido e fácil de usar, sem a necessidade de treinamento prévio dos animais e sem submetê-los a estímulos nocivos, como choques elétricos, privação de água ou alimentos, que geram estados motivacionais (dor, sede, fome) que podem interferir no comportamento do animal e assim obscurecer as análises de ansiedade (BOURIN & HASCOËT, 2003).

Um conflito natural ocorre quando os animais são expostos a um ambiente não familiar ou a um novo objeto. O conflito ocorre entre a tendência de explorar e a tendência inicial de evitar o desconhecido – neofobia. A atividade exploratória reflete o resultado combinado destas tendências na nova situação. Assim, na Caixa Claro/Escuro, as drogas ansiolíticas induzem um aumento nos comportamentos executados na parte clara. Um aumento na transição entre os ambientes claro e escuro, sem um aumento na locomoção espontânea, é considerado reflexo da atividade ansiolítica (BOURIN & HASCOËT, 2003).

Já o Teste de Esconder Esferas explora o comportamento de roedores de ocultar objetos. Drogas que apresentam atividade ansiolítica diminuem o número de objetos escondidos pelos animais (TREIT *et al.*, 1981).

As substâncias ativas nestes procedimentos experimentais também são distintas. Assim, na Caixa Claro/Escuro, os derivados benzodiazepínicos são capazes de aumentar o tempo de permanência no compartimento claro e no TEE, drogas antidepressivas são capazes de reduzir o número de esferas escondidas. Similarmente, estas são as drogas mais ativas nestas desordens na clínica, ou seja, os benzodiazepínicos são as drogas mais ativas no TAG e os antidepressivos – em especial os inibidores seletivos da recaptação de serotonina – as drogas mais ativas no TOC.

Desordens do humor parecem ser mais freqüentes em mulheres que em homens, além do que as fêmeas são diferentes dos machos frente a reações de estresse, comportamento emocional e susceptibilidade a drogas (PALANZA, 2001).

O TAG atinge as mulheres em proporção cerca de duas vezes maior do que os homens. Por outro lado, o TOC parece afetar cerca de 1,5 vezes mais mulheres do que homens. No entanto, a idade do início parece diferir entre ambos os gêneros, já que há dados que sugerem que meninos pré-púberes têm probabilidade três vezes maior de receber o diagnóstico de TOC do que meninas pré-púberes. Após a menarca, o índice de prevalência de mulheres com TOC aumenta, sugerindo um possível papel dos hormônios sexuais no desenvolvimento do transtorno (WEISSMAN, 1994; BRAWMAN-MINTER & LYDIARD, 1997; LIMA *et al.*, 2004).

Esta maior prevalência de quadros ansiosos em mulheres do que em homens é devida às flutuações naturais dos hormônios sexuais durante o ciclo ovariano, que exercem enorme influência no estado psicológico de fêmeas. O cérebro é o mais sensível órgão para hormônios esteróides, mediando seus efeitos psicotrópicos e inúmeros processos fisiológicos e particularmente processos psicobiológicos (GALEEVA *et al.*, 2003).

Também em roedores, as mudanças emocionais nas fêmeas são associadas com os hormônios esteroidais ovarianos. Os hormônios estrógeno e progesterona são bem conhecidos por ter uma associação com os níveis de ansiedade (CHIKAHISA *et al.*, 2007).

A progesterona, por exemplo, afeta o funcionamento do Sistema Nervoso Central através de duas diferentes vias fundamentais: a primeira, chamada de não-genômica, ativa os receptores GABA_A, por meio de seus metabólitos; a outra, chamada de genômica, ativa os receptores de progesterona (PR-A e PR-B) que desempenham papel fundamental para a expressão dos comportamentos sexuais de camundongos fêmeas. Por outro lado, o mecanismo não-genômico está associado ao efeito ansiolítico propriamente dito (CHIKAHISA *et al.*, 2007).

Flutuações do humor, depressão e ansiedade estão relacionados a baixos níveis de estradiol nas mulheres no período peri e pós-menopausa, sendo que a terapia de reposição hormonal apresenta excelentes efeitos nessas condições psicológicas. Desta forma, os hormônios esteroidais ovarianos estrógeno e progesterona apresentam fundamental importância na modulação dos níveis de ansiedade tanto em humanos, quanto em roedores (GALEEVA & TUOHIMAA, 2001; CHIKAHISA *et al.*, 2007).

Embora não haja dúvidas quanto a relação entre os hormônios esteroidais ovarianos e a modulação da ansiedade, a grande maioria das pesquisas básicas para os distúrbios ansiosos e drogas ansiolíticas têm seu foco em ratos ou camundongos machos (PALANZA, 2001), justificando a investigação da influência do ciclo ovariano sobre a atividade ansiolítica de preparações obtidas de *C. citratus*.

Assim, o objetivo deste trabalho envolveu o estudo de preparações de *C. citratus*, espécie utilizada popularmente como ansiolítica e sedativa, em procedimentos experimentais que avaliam diferentes aspectos dos transtornos de ansiedade, em animais machos e fêmeas.

Objetivos



II. Objetivos:

- Avaliar o perfil de atividade neurofarmacológica de preparações obtidas a partir de folhas frescas de *Cymbopogon citratus*, assim como dos compostos principais do óleo essencial: Geraniol, β -Mirceno e Citral. O perfil de atividade neurofarmacológica incluiu testes para atividade ansiolítica, sedativa e efeitos gerais.

- Avaliar a influência das diferentes fases do ciclo estral na resposta ansiolítica em camundongos.

Material e Métodos



III. Material e Métodos:

3.1) A planta

O *C. Citratus*, planta pertencente à família Poaceae é de origem Indiana e foi introduzida no Brasil na época da colônia. É conhecida popularmente como capim-limão, capim-cidreira, erva-cidreira, chá de estrada, capim-santo, capim-cidrô, capim-cidrão, capim-cheiroso. É uma erva perene e cespitosa que forma touceiras compactas e robustas (Fig. 02). Suas folhas são aromáticas (exalam forte odor de limão), amplexicaules linear-lanceoladas, alternas, dísticas, simples e ásperas nas duas faces (CORRÊA, 1984). A espécie é muito resistente às variações de solos e climas (AKISUE, 1996). O material vegetal foi obtido de exemplares cultivados no *campus* da UNESP de Botucatu e a exsicata depositada no herbário “Irina D. Gemtchujnicov” – BOTU, Depto. de Botânica, IBB, UNESP, sob o número 23031.



Figura 02. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf

3.2) Extração do Óleo Essencial

Imediatamente após a coleta, as folhas de *C. citratus* foram submetidas à extração do óleo essencial (OE) por hidrodestilação, com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger (Fig. 03). O material vegetal foi cortado em pedaços e colocado dentro de um balão volumétrico contendo água destilada. O recipiente e seu conteúdo foram aquecidos até ebulição da água, e o vapor resultante, ao passar por um condensador, retornou ao

estado líquido. Esse líquido foi coletado em um novo recipiente onde, por princípio de densidade, a água foi separada do OE. De cada lote de OE obtido foi feita a determinação do perfil fitoquímico para identificação dos principais compostos e comparação da composição.

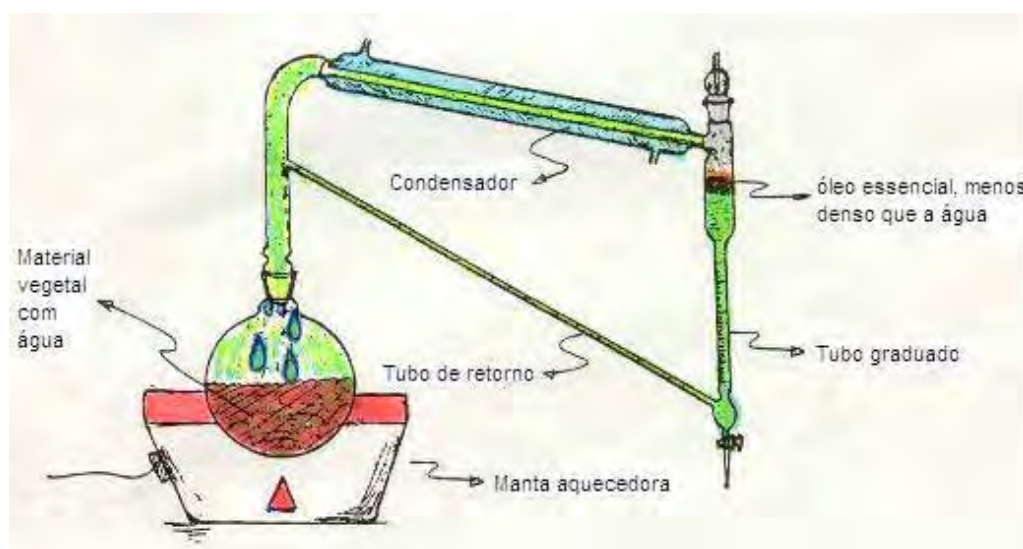


Figura 03. Desenho esquemático do aparelho do tipo Clevenger.

3.3) Preparo da Decocção

O decocto foi preparado em duas diferentes concentrações, a primeira a 20% (p/v) e a segunda a 40% (p/v). Utilizaram-se folhas frescas cortadas em pedaços e colocadas dentro de um béquer contendo 100 mL de água destilada. O recipiente e seu conteúdo foram fechados com folhas de papel alumínio sobrepostas e aquecidos até o início da fervura onde permaneceram, sob aquecimento, por mais três minutos.

3.4) Análise Cromatográfica

O perfil cromatográfico em camada delgada do OE e do decocto foram realizados segundo técnica descrita em Akisue (1996), utilizando-se placas com adsorvente Sílica Gel 60 em vidro, 10 X 20 cm, Sigma-Aldrich®. A fase móvel (eluente) foi selecionada utilizando-se vários solventes ordenados por polaridade (LOPES, 1990), sendo a mais adequada a mistura de Tolueno + Acetato de Etila (93:7).

A aplicação das amostras foi feita com o auxílio de tubos capilares, a partir de soluções a 1% (v/v) do OE e seus compostos principais em Diclorometano e a 500% (v/v) do decocto em Diclorometano, com o cuidado de se aplicar as amostras a uma distância adequada umas das outras assim como eqüidistantes da borda inferior da placa.

O desenvolvimento das placas foi feito de forma unidirecional ascendente, no interior de cubas previamente saturadas com o eluente.

Após a secagem das cromatoplas, a visualização das diferentes zonas de separação dos compostos foi feita utilizando-se como reveladores o Anisaldeído sulfúrico ou a Vanilina sulfúrica (solução I e logo em seguida a solução II).

- Anisaldeído sulfúrico:

0,5mL Anisaldeído

10mL Ácido acético glacial

85mL Etanol

5mL Ácido sulfúrico

- Vanilina sulfúrica:

Solução I: 1% de vanilina em etanol

Solução II: 10% de ácido sulfúrico em etanol.

As placas depois de prontas e aspergidas com os reveladores foram aquecidas em estufa a 100 °C durante cinco minutos e logo em seguida documentadas através de fotografia.

A cromatografia gasosa foi usada para análise da composição do OE. A técnica foi realizada pela Dr^a Márcia Ortiz do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), utilizando-se um Cromatógrafo à Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (Equipamento da marca Shimadzy, QP-5000).

O OE foi solubilizado em acetato de etila (2µL de óleo/1mL solvente) e injetado num volume de 1µL. 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 literatura (MCLAFFERTY & STAUFFER, 1989) e índice de retenção (ADAMS, 2001). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção da amostra com uma série homologa de n-alcanos (C₉H₂₀ - C₂₅H₅₂, Sigma – Aldrich, 99%) no seguinte programa de temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/min. (ADAMS, 2001), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963).

3.5) Procedimentos Gerais

As diferentes soluções foram preparadas momentos antes do procedimento experimental. O Diazepam (DZP) e a Imipramina (IM), controles positivos, foram solubilizados em salina a 0,9%. O OE de *C. citratus*, bem como seus compostos principais Geraniol, β -Mirceno e Citral, foram solubilizados em Tween 80® (polioxietileno-sorbitan monooleato) a 2%, o qual, isoladamente, serviu de controle negativo.

No tratamento com doses repetidas os animais foram tratados três vezes por semana durante três semanas consecutivas, perfazendo um total de nove tratamentos. Todas as doses utilizadas nos diferentes procedimentos experimentais estão explicitadas na sessão “Resultados & Discussão”.

No dia do teste os animais foram transportados do Biotério do Departamento de Farmacologia para o Laboratório de Comportamento, onde permaneceram por duas horas para adaptação. O Laboratório de Comportamento é uma sala isolada com controle de temperatura, luminosidade e exaustão de ar, onde nenhuma outra atividade é realizada durante os experimentos. Todos os experimentos foram realizados no período entre 12h e 18h, para evitar variações do ciclo circadiano, com exceção do Teste de Esconder Esferas que foi realizado entre 8h e 12h. Durante esse período os animais não tiveram acesso à água e alimento.

3.6) Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (Suíço) machos e fêmeas provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de

Botucatu, com cerca de 45 dias de idade os machos e 60 dias as fêmeas. Estes foram mantidos por no mínimo uma semana antes dos procedimentos experimentais no Biotério do Depto. de Farmacologia, reunidos em grupos de 15 animais por gaiola, em salas com temperatura (21 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12h) controlados, com água fresca e comida *ad libitum* até serem utilizados nos procedimentos experimentais.

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 02.

3.7) Determinação do Ciclo Estral

O ciclo estral em camundongos tipicamente dura de quatro a cinco dias e é dividido em quatro estágios distintos: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro (Fig. 04). O Proestro, determinado pela predominância de células epiteliais nucleadas grandes e redondas, é a fase com os níveis mais altos de estradiol; O Estro, fase na qual ocorre a ovulação, é caracterizado pela predominância de células não nucleadas, queratinizadas – esta é a fase em que a fêmea se encontra receptiva aos machos; O Metaestro se caracteriza pela mistura de células epiteliais nucleadas, muco, células queratinizadas e leucócitos; e o Diestro pela predominância de leucócitos e muco (COOPER *et al.*, 1993; TUFIK *et al.*, 2004).

Após cada sessão experimental foi determinado o estágio do ciclo estral de cada fêmea pela técnica de esfregaço vaginal. A coleta do material

para análise foi feita através de um tubo capilar de vidro com uma das extremidades envolta por algodão embebido em salina 0,9%. Este “cotonete” foi introduzido na vagina e imediatamente esfregado sobre uma lâmina de vidro para visualização a fresco dos tipos de células ao microscópio.

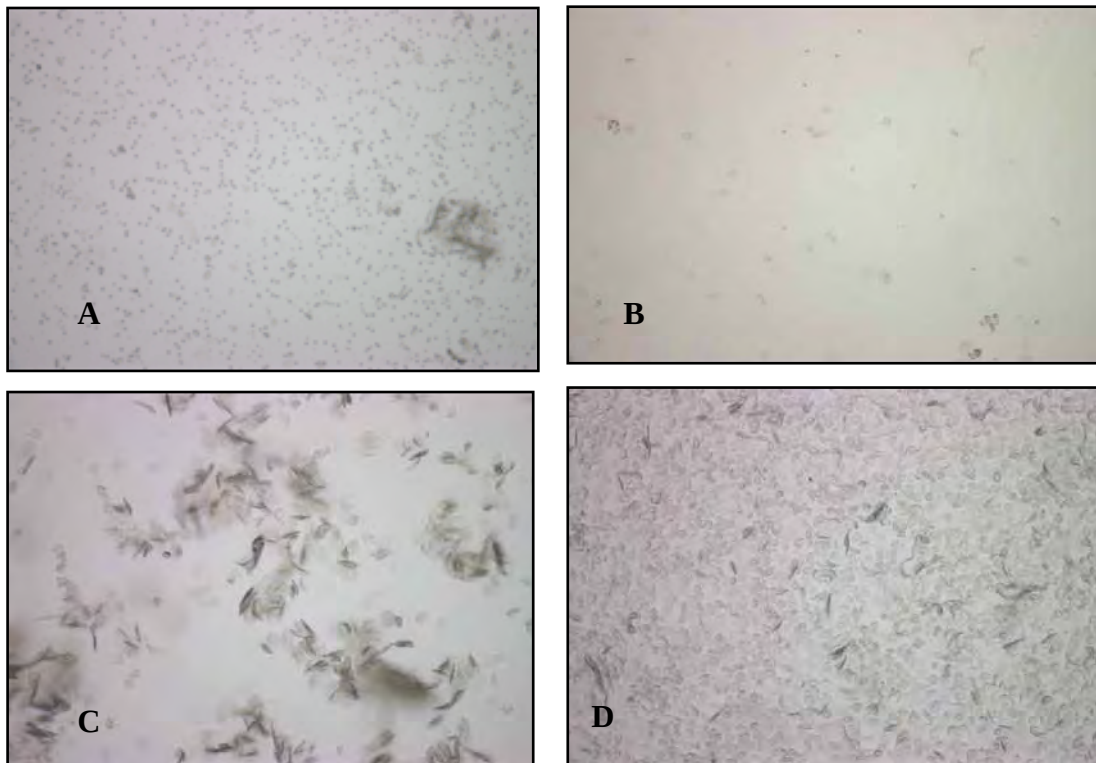


Figura 04. Fases do ciclo estral. A) Diestro; B) Metaestro; C) Estro; D) Proestro.
Fonte: *The Albert Einstein College of Medicine (Rose F. Kennedy Center)*.

3.8) Avaliação da atividade ansiolítica

a) Caixa Claro/Escuro (“Light/Dark Box Test”)

O aparelho, elaborado por Crawley e Goodwin em 1980, inclui uma arena construída de acrílico com dimensões exteriores de 46 x 27 x 30 cm (comprimento x base x altura) sendo 1/3 escura (revestido externamente de papel Contact® preto) e 2/3 clara (revestido externamente de papel

Contact® branco). Os dois compartimentos são separados por uma placa de acrílico (revestida de papel Contact® preto) de 27 x 30 cm (base x altura) com uma abertura de 7,5 x 7,5 cm localizada no centro da divisão, ao nível do chão (Fig. 05). O compartimento claro é iluminado diretamente por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20W, enquanto a parte escura é dotada de uma tampa preta com 16 x 28 cm.

Depois de 30 minutos da administração de uma das soluções cada camundongo foi colocado no centro da parte iluminada de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa. O animal foi intensivamente observado e durante cinco minutos após a sua primeira entrada no lado escuro, foram registrados os parâmetros comportamentais com o auxílio de uma câmera de vídeo instalada acima do compartimento claro, sendo a avaliação dos comportamentos feitas posteriormente. Depois deste período o animal foi retirado e o aparelho limpo com uma esponja embebida em água (CRAWLEY & GODDWIN, 1980; COSTALL *et al.*, 1989).

Durante o período de observação, os parâmetros comportamentais avaliados foram:

- a) tempo gasto no compartimento claro;
- b) número de levantamentos (“rearing”) realizados no compartimento claro e;
- c) número de transições entre os dois compartimentos.

A transição (entrada em um compartimento) é definida como a passagem das quatro patas do animal pela divisória (CRAWLEY & GODDWIN, 1980) e serve como medida da atividade locomotora (LEPICARD *et al.*, 2000). O levantamento é definido quando o animal se apóia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para

cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes da caixa (CRAWLEY *et al.*, 1984).

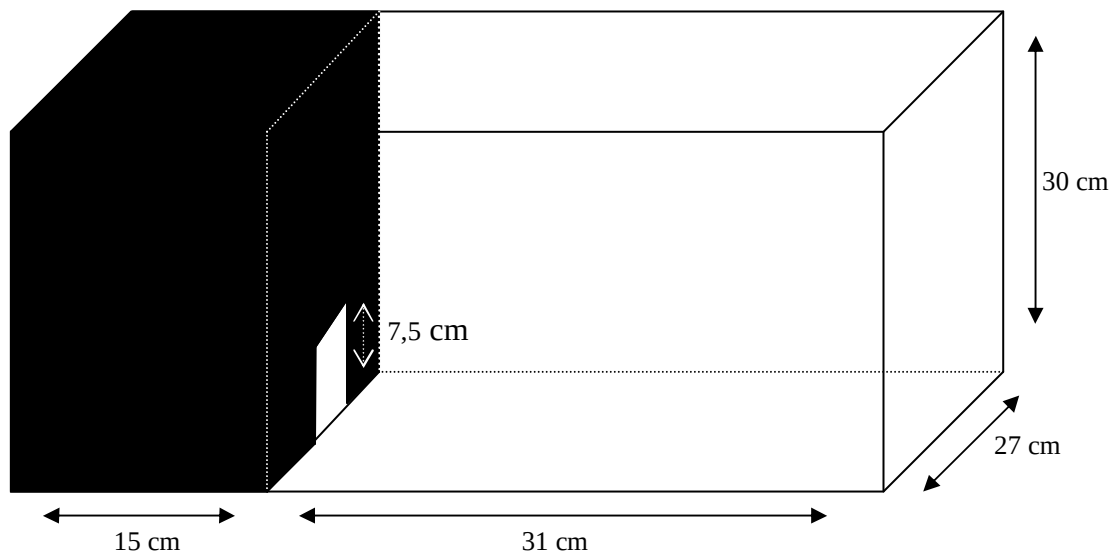


Figura 05. Caixa Claro/Escuro

b) Teste de Esconder Esferas (“Marble Burying Test”)

Este modelo explora o comportamento de roedores de ocultar objetos que representam ou são associados à estimulação aversiva. Drogas que apresentam atividade ansiolítica diminuem o número de objetos escondidos pelos animais (TREIT *et al.*, 1981).

Para o procedimento experimental foram utilizadas gaiolas de 27 x 16 x 13 cm, as quais foram forradas com uma camada de 5 cm de maravalha sobre a qual foram distribuídas ao acaso 25 esferas de vidro com 1,5cm de diâmetro (Fig. 06). Essas gaiolas foram cobertas com uma placa de acrílico transparente com pequenos furos para ventilação.

Considerando a grande variabilidade no número de esferas escondidas entre um animal e outro, foram submetidos ao procedimento experimental aqueles que esconderam durante três dias consecutivos pelo menos 13 das 25 esferas (BROEKKAMP *et al.*, 1986; NJUNG'E & HANDLEY, 1991).

Após 30 minutos do tratamento cada animal foi colocado em uma gaiola individual e ao término de mais 30 minutos, foi registrado o número de esferas de vidro escondidas pelos animais. Foram consideradas escondidas as esferas que foram completamente cobertas pela maravalha (PULTRINI *et al.*, 2006).

3.9) Avaliação da atividade sedativa

Considerando que uma das indicações populares de *C. citratus* é a atividade sedativa, esta foi avaliada no modelo de sono induzido por éter etílico. A atividade sedativa foi medida pela capacidade do tratamento em reduzir a latência e/ou aumentar o tempo de duração do sono, quando comparada com o veículo - grupo controle negativo.

Trinta minutos após o tratamento os animais foram induzidos ao sono pela inalação de éter etílico em câmara saturada (5ml, frasco hermético com capacidade para 3L – Fig. 07), onde permaneceram por 60 segundos após a perda do reflexo postural. O tempo decorrido até a perda deste reflexo foi registrado como latência para início do sono. Logo em seguida os animais foram colocados em caixas individuais para a avaliação do principal parâmetro: duração do sono (período entre a perda e a recuperação do reflexo postural).

3.10) Avaliação da atividade geral

Para melhor estabelecer o perfil de atividade das preparações sobre o comportamento e o sistema motor, os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos:

a) Barra Giratória (“Rota-Rod”)

Descrita por Dunham & Miya (1957) esta técnica permite detectar prejuízos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. O aparato consiste em uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e 50cm de comprimento que gira a uma velocidade constante de 5 r.p.m. (Fig. 08). A altura da barra em relação à base do aparelho é de 25 cm, e a divisão do eixo possibilita a avaliação concomitante de cinco animais.

Os animais foram selecionados 24 horas antes do procedimento experimental e somente foram utilizados aqueles que se mostraram hábeis em manter-se sobre a barra giratória. Cada animal foi submetido a, no máximo, três tentativas consecutivas para que demonstrasse capacidade de permanecer sobre a barra giratória durante um minuto. Desta forma, foram classificados como Aptos os animais que conseguiram ficar sobre a barra giratória e Não-Aptos aqueles que não conseguiram ficar sobre a barra giratória.

b) Campo Aberto (“Open Field”)

O aparelho consiste em uma arena circular com 50 cm de diâmetro dividido em campos de áreas semelhantes, circundada por parede de PVC com 37 cm de altura (Fig. 09). O equipamento foi colocado a 50 cm do solo e sobre ele foram instalados: Uma lâmpada fluorescente (fria) de 20W e uma câmera de vídeo para registro e posterior análise.

Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena, onde permaneceu durante cinco minutos para avaliação dos parâmetros que forneceram informações sobre a atividade motora e exploratória: locomoção/ambulação e levantar. A locomoção foi avaliada pelo número de vezes em que o animal invadiu com as quatro patas um dos campos do piso da arena; o comportamento de levantar foi avaliado pelo número de vezes que o animal se apoiou nas patas posteriores com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto (ARCHER, 1973).

3.11) Análise estatística

Os resultados foram comparados por análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de testes de contraste *a posteriori*, quando necessário. As proporções foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. Foram consideradas significantes as probabilidades associadas a $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle negativo.



Figura 06. Teste de Esconder Esferas.



Figura 07. Câmara para indução de sono.



Figura 08. Barra Giratória ('Rota-rod').



Figura 09. Campo Aberto ('Open Field').

Resultados & Discussão



IV. Resultados & Discussão

A seleção de espécies vegetais à partir de dados coletados na população, ou seja, a partir de dados etnofarmacológicos, é uma estratégia eficiente para escolha de novas plantas para pesquisa, visto que seu uso tradicional pode ser considerado como uma pré-triagem quanto a sua utilidade terapêutica (ELISABETSKY & SOUZA, 2004).

O *C. citratus* é uma das espécies mais usadas na medicina popular do Brasil, com diversos usos terapêuticos. No entanto, apesar do intenso uso da planta para fins medicinais são praticamente inexistentes as pesquisas farmacológicas a respeito, exceto o trabalho desenvolvido como parte das atividades da CEME (CARLINI, 1985).

Uma recente revisão feita por Ernst (2006) demonstra que poucas triagens rigorosas a respeito de produtos naturais ativos contra distúrbios ansiosos estão atualmente disponíveis. Excetuando-se a Kava (*Piper methysticum*) que foi repetidamente demonstrada como sendo tão efetiva quanto os benzodiazepínicos, nenhuma das outras plantas medicinais citadas no estudo, incluindo o *C. citratus*, foi associada a um efeito ansiolítico comparável as drogas padrão. Isto sugere que, atualmente, dentro do campo das plantas medicinais, não há alternativa bem-documentada para as terapias convencionais (ERNST, 2006).

O interesse por óleos essenciais tem registro histórico de pelo menos seis mil anos (CARVALHO, 2003) e vai desde finalidades medicinais até espirituais (GOTTLIEB & BORIN, 2003). Os óleos essenciais desempenham importante papel na proteção, reprodução e sobrevivência das espécies vegetais. Por causa de seu aroma e de suas características

condimentares, os óleos essenciais têm sido amplamente usados na indústria, desde compostos farmacêuticos e perfumes até áreas de produção alimentícia (GROSSO, 2003).

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos essenciais (óleos voláteis ou essências) como os produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água ou hidrodestilação. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e dotados de aroma forte. São solúveis em solventes orgânicos apolares e em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos (SPITZER, 2004).

4.1) Rendimento do óleo essencial (OE)

Para o desenvolvimento deste trabalho foram necessárias várias coletas de material vegetal para extração de quantidades suficientes de OE. A tabela 01 mostra o período das coletas, o número de extrações de cada período, a massa total de amostra vegetal fresca obtida, seus respectivos volumes de OE obtidos e o rendimento médio de cada uma dessas extrações.

Tabela 01. Dados da extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Período das coletas	Nº de extrações	Massa da amostra	Volume de OE extraído	Rendimento (v/p)
Mai-Jun/2005	5	2880 g	13,25 mL	0,46%
Março/2006	2	1148 g	6,70 mL	0,58%
Junho/2006	1	706 g	3,60 mL	0,51%
Setembro/2006	1	696 g	3,75 mL	0,54%

Os rendimentos acima obtidos estão de acordo com os citados na literatura. Czepak e Cruciol (2003) relatam uma média anual de 0,35% de rendimento de OE e Mostardeiro e colaboradores (2003) obtiveram um rendimento médio de 0,57% nos meses de fevereiro e março.

4.2) Análise Cromatográfica

A cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação (FALKENBERG *et al.*, 2004).

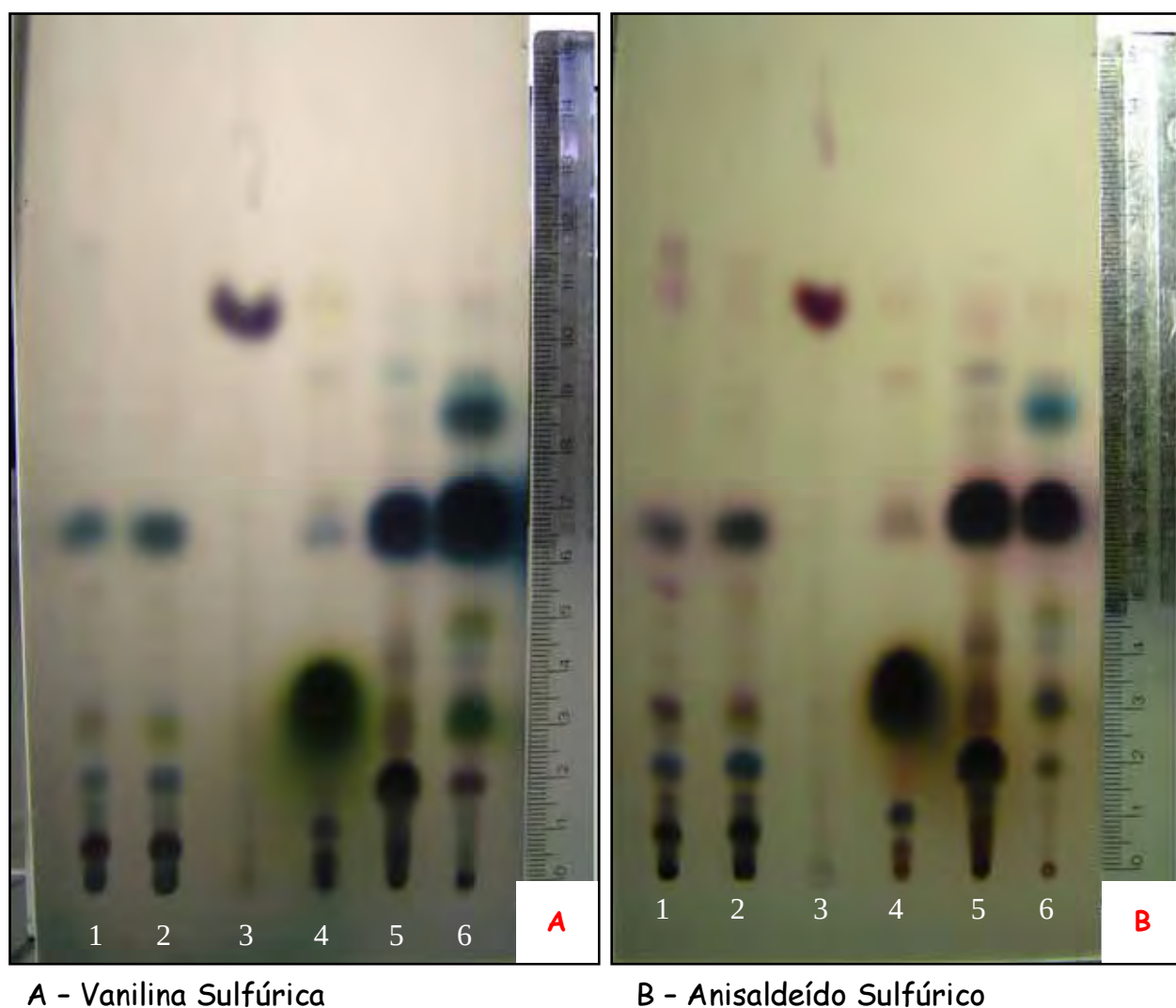
A análise da composição química do OE foi feita com a mistura das cinco extrações do período de maio-junho de 2005 e das duas extrações de abril de 2006, após a comparação por CCD que garantiu a homogeneidade da mistura do produto das diferentes extrações. Também foram feitas análises dos períodos de Junho e Setembro/2006.

A análise por CCD foi utilizada também para a comparação qualitativa dos principais compostos presentes no decocto e no OE. Nesta comparação foi utilizado o OE resultante da coleta de Setembro/2006.

Para a revelação das cromatoplasmas foram utilizados dois reveladores que apresentam diferentes especificidades. O anisaldeído sulfúrico é adequado para detecção de terpenóides, propilpropanóides, saponinas, pungentes e amargos, enquanto a vanilina sulfúrica detecta componentes de óleos essenciais, terpenóides e fenilpropanóides.

O perfil cromatográfico do decocto e do OE revelou manchas com padrões de migração qualitativamente semelhantes. Foi identificada a

presença dos três compostos principais (geraniol, β -mirceno e citral) tanto no decocto quanto no OE, como indicado na figura 10.



Preparações:

- 1 – Decocto 20%
- 2 – Decocto 40%
- 3 – β -Mirceno

- 4 – Geraniol
- 5 – Citral
- 6 – Óleo Essencial

Eluente:

Tolueno : Acetato de Etila (93:7)

Figura 10. Fotografia do perfil cromatográfico de preparações de *Cymbopogon citratus* e dos padrões β -Mirceno, Geraniol e Citral.

4.3) Composição do óleo essencial

A determinação quantitativa da composição do OE de *C. citratus* está de acordo com a descrição da literatura. A tabela 02 mostra os resultados da análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, na qual se observam que 96 % da composição do OE é formada por geraniol, β -mirceno, neral e geranial. A presença de geraniol, β -mirceno e citral como principais compostos em *C. citratus* já foi descrita por Luz e colaboradores (2001), que os identificou como principais constituintes do OE. O citral apresenta dois isômeros: o citral Z (também chamado neral) e o citral E (também chamado geranial).

Tabela 02. Composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Substância	Mai-Jun/05 [%]	Março/06 [%]	Junho/06 [%]	Set./06 [%]
6-metil-5-hepten-2-ona	0,63	0,74	0,81	0,55
β -mirceno	8,82	17,01	16,79	17,76
linalol	0,57	0,29	0,54	0,50
neral*	32,89	29,86	29,60	29,25
geraniol	1,36	1,17	1,81	1,67
geranial*	52,91	48,42	47,20	46,24
2-undecanona	0,81	0,28	0,32	0,56
Não identificado	2,01	2,23	2,93	3,47
TOTAL	100	100	100	100
* neral e geranial são os isômeros que formam o Citral.	85,8	78,28	76,8	75,49

4.4) Análise do Ciclo Estral

A duração e a regularidade do ciclo estral em camundongos é influenciada por uma série de fatores externos, tais como: número de animais em cada gaiola, presença, ausência ou introdução súbita de machos. De fato, num pré-teste com o objetivo de estimar a duração do ciclo sob nossas condições experimentais, o esfregaço vaginal foi coletado durante 6 – 10 dias consecutivos e resultou em uma média de duração do ciclo estral de cinco dias, com ciclos variando de três a dez dias. O método de se recolher o esfregaço vaginal em dias sucessivos parece acabar com a regularidade do ciclo estral (GUTTMAN *et al.*, 1975). Optamos, portanto, pela realização de uma única observação histológica, obtida imediatamente após o teste de comportamento.

Do total de fêmeas avaliadas, após os diferentes tratamentos e procedimentos, a distribuição nas quatro fases do ciclo estral se deu conforme a tabela 03.

Tabela 03. Distribuição das fêmeas nas fases do ciclo estral.

Fases do ciclo	Nº de fêmeas	%	Agrupadas em
Proestro	37	12,89	Estro
Estro	96	33,45	
Diestro	118	41,11	Não-estro
Metaestro	36	12,55	

A exemplo do seguido por Guttman e colaboradores (1975), optou-se por agrupar as fêmeas em duas fases: a) fase de Estro, composta por fêmeas em estro e proestro e b) fase Não-estro, composta por fêmeas em diestro e metaestro. Essa separação fez-se necessária, principalmente,

devido a grande dificuldade de se obter número semelhante de fêmeas na mesma fase do ciclo para compor cada grupo experimental.

4.5) Avaliação da Atividade Ansiolítica

Resultados sugestivos da presença de atividade ansiolítica foram obtidos em camundongos machos após tratamento agudo com 1000 mg/Kg (v.o.) do óleo essencial (OE) de *C. citratus*, os quais demonstraram aumento no tempo de permanência no compartimento claro (BLANCO *et al.*, 2007 – Anexo 01). Segundo Young e Johnson (1991) este é o parâmetro mais robusto para avaliação da atividade ansiolítica.

A maioria das investigações em procedimentos experimentais de ansiedade tem seu foco em animais machos. Os poucos estudos existentes incluindo fêmeas demonstram que ambos os gêneros respondem diferentemente e até mesmo em direções opostas (PALANZA, 2001).

O desempenho de fêmeas na Caixa Claro/Escuro é apresentado nas figuras 11 e 12, nas quais o painel A mostra os resultados de fêmeas em Estro (estro e proestro) e o painel B os resultados de fêmeas em Não-estro (diestro e metaestro).

Na figura 11 observa-se que apenas as fêmeas em Estro tratadas com a droga-padrão mostraram aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro. De acordo com Galeeva e Tuohimaa (2001), níveis máximos de ansiedade foram observados na fase de Diestro no Labirinto em Cruz Elevado, o que pode justificar a não observação de atividade do diazepam nas fêmeas na fase de Não-estro, tendo em vista que, na Caixa Claro/Escuro, as drogas ansiolíticas induzem um aumento no

tempo de permanência na parte clara. Nos demais parâmetros, menos relacionados com a atividade ansiolítica, não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle, tanto com fêmeas em Estro quanto em Não-estro (Fig. 12).

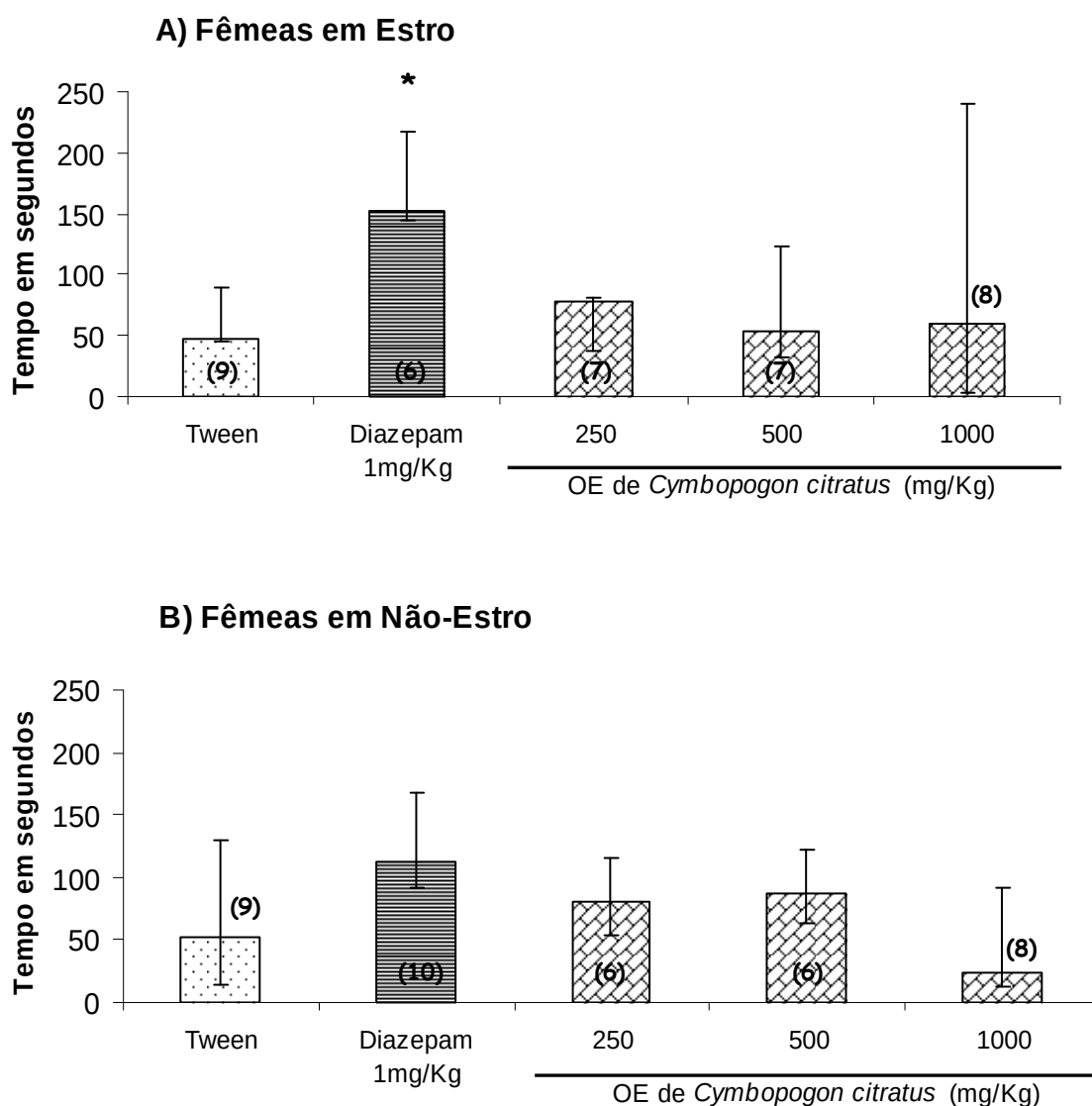


Figura 11. Tempo de permanência no compartimento claro (Mediana e intervalo interquartil) obtidos na curva dose-resposta do óleo essencial de *C. citratus* na Caixa Claro/Escuro em fêmeas (A - Estro e B - Não-estro) tratadas (via oral) 30 minutos antes de serem submetidas ao procedimento experimental.

* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

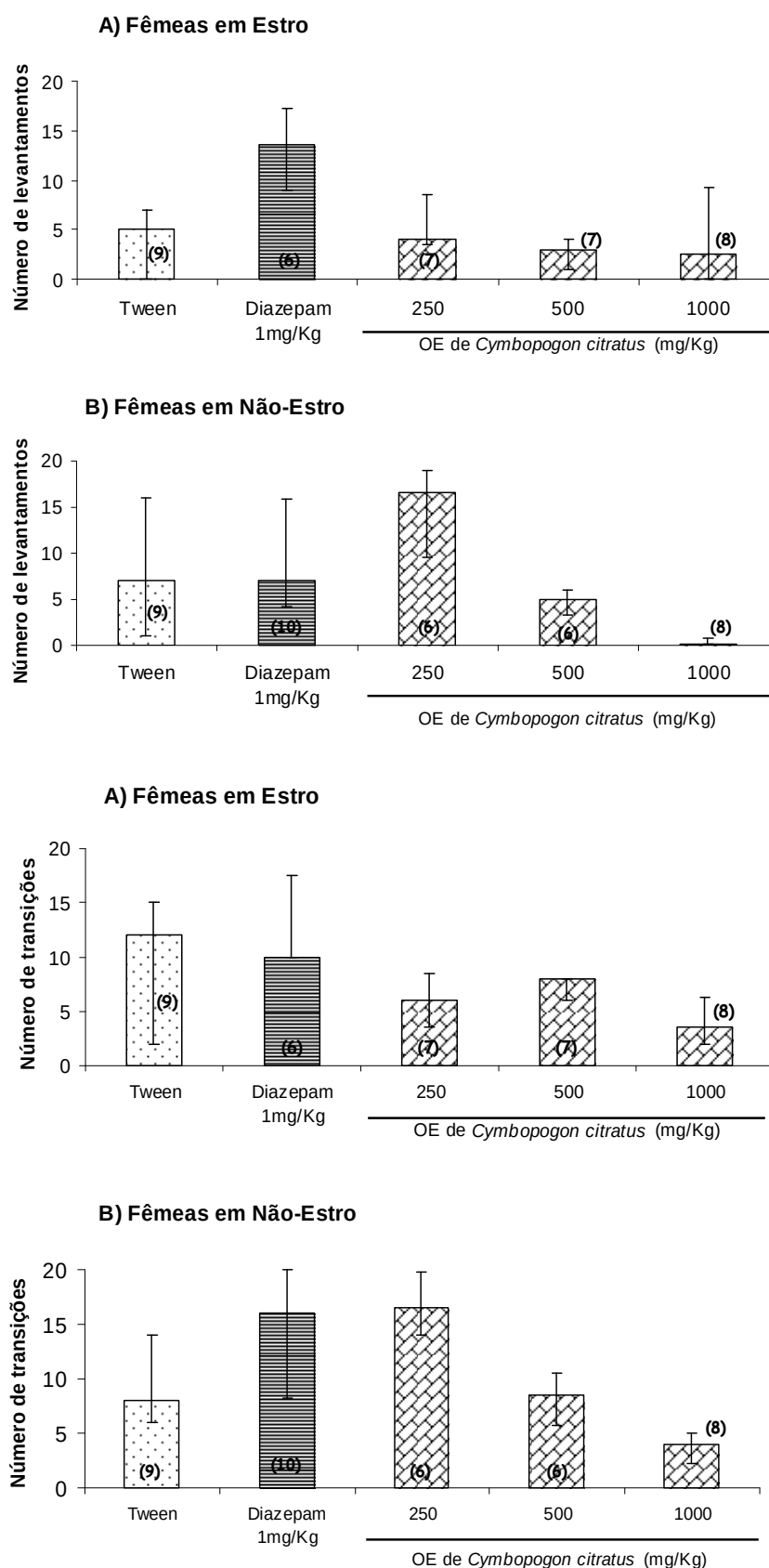


Figura 12. Número de levantamentos no compartimento claro e Número de transições entre os dois compartimentos (Mediana e intervalo interquartil) obtidos na curva dose-resposta do óleo essencial de *C. citratus* na Caixa Claro/Escuro em fêmeas (A - Estro e B - Não-estro) tratadas (via oral) 30 minutos antes de serem submetidas ao procedimento experimental.

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Em ratos, as fêmeas apresentam menos comportamentos ansiosos que os machos. Contudo, estudos mais refinados destes comportamentos durante o ciclo estral demonstraram que esta redução dos comportamentos ansiosos geralmente ocorre durante o estágio de proestro (CHIKAHISA *et al.*, 2007).

Usando o Labirinto em Cruz-Elevado, Frick e colaboradores (2000) observaram que fêmeas de camundongos gastam menos tempo que os machos nos braços abertos – indicando serem mais ansiosas – mas não há efeitos significativos nas diferentes fases do ciclo estral. Todavia, Galeeva e Tuohimaa (2001) acharam que a exploração nos braços abertos é reduzida nas fêmeas em diestro, fase em que os níveis de estrógeno encontram-se baixos e que, portanto, as fêmeas seriam mais ansiosas. Nossos resultados parecem estar de acordo com estes dados considerando que a droga-padrão diazepam somente apresentou efeito nas fêmeas na fase de Estro, ou seja, as fêmeas na fase de Não-estro parecem ser mais ansiosas que as fêmeas em Estro.

Tendo em vista que 96 % da composição do OE é formada por geraniol, β -mirceno e citral, foi estudada também a atividade destes compostos isolados. A escolha da dose dos compostos principais utilizados no tratamento agudo foi feita de acordo com a sua concentração no OE que apresentou efeito ansiolítico no procedimento experimental (1000 mg/Kg).

Assim, na Caixa Claro/Escuro, na qual o OE foi ativo na dose de 1000 mg/Kg, os compostos principais foram avaliados em doses equivalentes à média de sua concentração nas diferentes extrações do OE. Por exemplo, o geraniol estava presente na proporção média de 1,5% nas diferentes extrações (tabela 2), o que resultou em 15 mg/Kg de geraniol

administrado aos animais. O mesmo raciocínio foi utilizado para o cálculo das doses de β -mirceno e citral, resultando em 150 e 800 mg/Kg, respectivamente.

Os resultados expressos na figura 13 demonstram que não houve alteração de nenhum dos comportamentos avaliados na Caixa Claro/Escuro. Somente a droga controle positivo alterou de forma significativa o tempo de permanência dos animais no compartimento claro, o principal parâmetro relacionado à ansiedade.

Deste modo, o tratamento agudo com doses semelhantes dos compostos isolados não foi capaz de reproduzir os resultados obtidos com o OE (BLANCO *et al.*, 2007), indicando que cada um destes compostos não pode ser considerado, isoladamente, como responsável pela atividade ansiolítica.

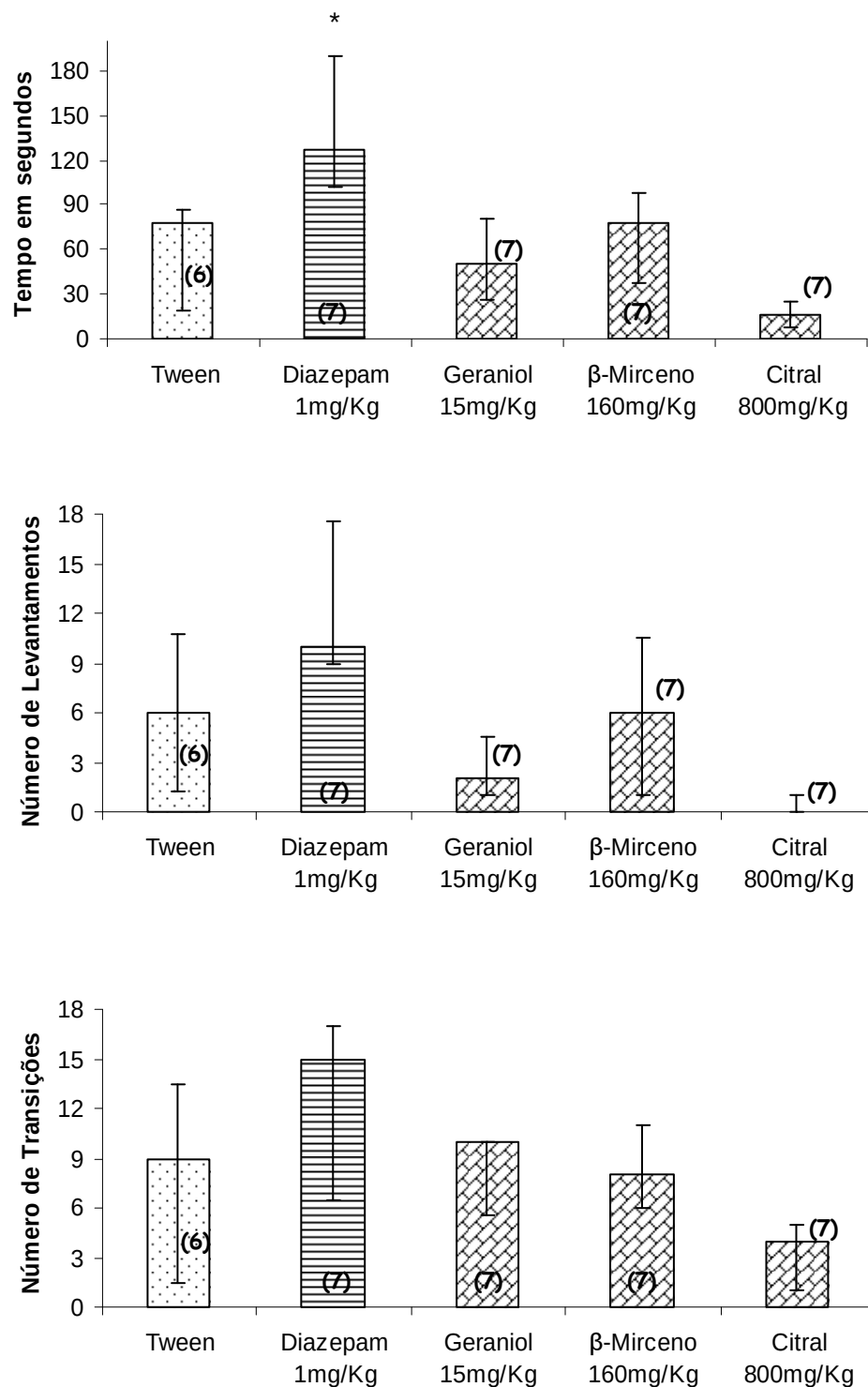


Figura 13. Tempo de permanência no compartimento claro, Número de levantamentos e Número de transições entre os dois compartimentos da Caixa Claro/Escuro em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Considerando que frequentemente o uso da espécie vegetal pela população é feito de modo repetido ao longo do tempo e não em dose única, foi feita a avaliação em um regime de tratamento repetido durante três semanas utilizando, em cada tratamento, doses equivalentes à metade da dose usada no tratamento agudo. Os resultados apresentados na figura 14 demonstram que não houve alteração significativa de nenhum dos comportamentos avaliados.

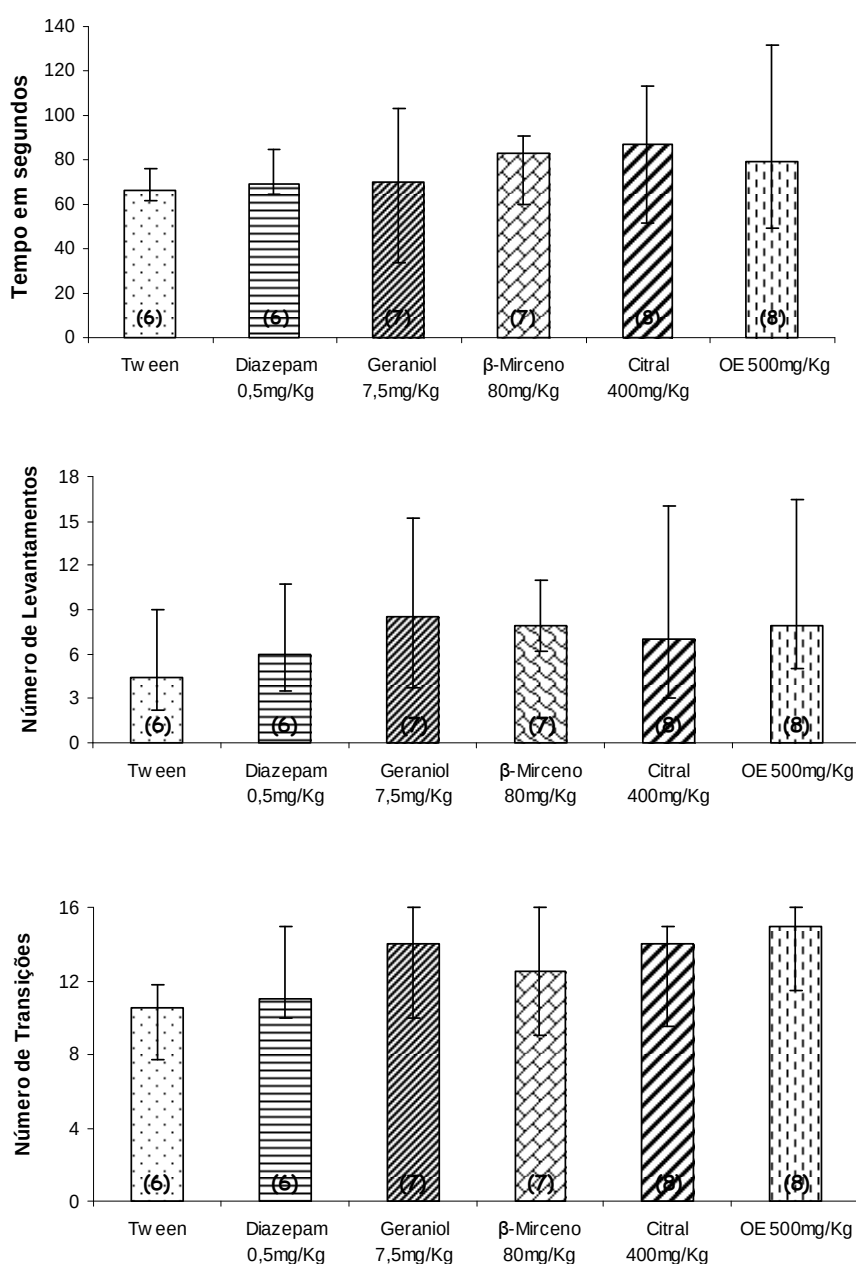


Figura 14. Tempo de permanência no compartimento claro, Número de levantamentos e Número de transições entre os dois compartimentos na Caixa Claro/Escuro em camundongos machos tratados repetidamente durante três semanas (via oral). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Diferentes interpretações podem ser levantadas para a falta de efeito tanto do controle positivo (diazepam) quanto do OE após tratamento repetido. Uma delas diz respeito ao desenvolvimento de tolerância, como já descrito por Flaishon e colaboradores (2003) que, após duas semanas de tratamento, não detectaram efeito ansiolítico da droga-padrão em camundongos.

Outra possível explicação está no ato da manipulação diária dos animais resultando em habituação as estas manipulações. Sob estas condições os animais poderiam estar menos ansiosos ao procedimento experimental, sentindo-se seguros no compartimento claro, o que serviria de justificativa para o mesmo padrão de comportamento dos animais tratados tanto com os controles quanto com o OE.

Outro procedimento experimental amplamente utilizado para detecção de atividade de substâncias ansiolíticas é o Teste de Esconder Esferas (TEE). Diferentemente da Caixa Claro/Escuro (CEE), relacionada com o Transtorno de Ansiedade Generalizada – TAG (ZANGROSSI Jr. & GRAEFF, 2004), o TEE está relacionado com o Transtorno Obsessivo-Compulsivo – TOC (NJUNG´E & HANDLEY, 1990).

Para o TEE animais machos foram tratados com veículo, imipramina (30 mg/Kg – i.p.) ou OE nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg (v.o.). A atividade ansiolítica neste modelo é determinada pela diminuição no número de esferas escondidas, comportamento observado nos grupos tratados com 500 mg/Kg de OE e com a droga padrão (Fig. 15). Uma tendência à redução no número de esferas escondidas também foi observada no grupo de animais tratados com 1000 mg/Kg, porém tal tendência não foi significativa devido a grande variabilidade dos resultados.

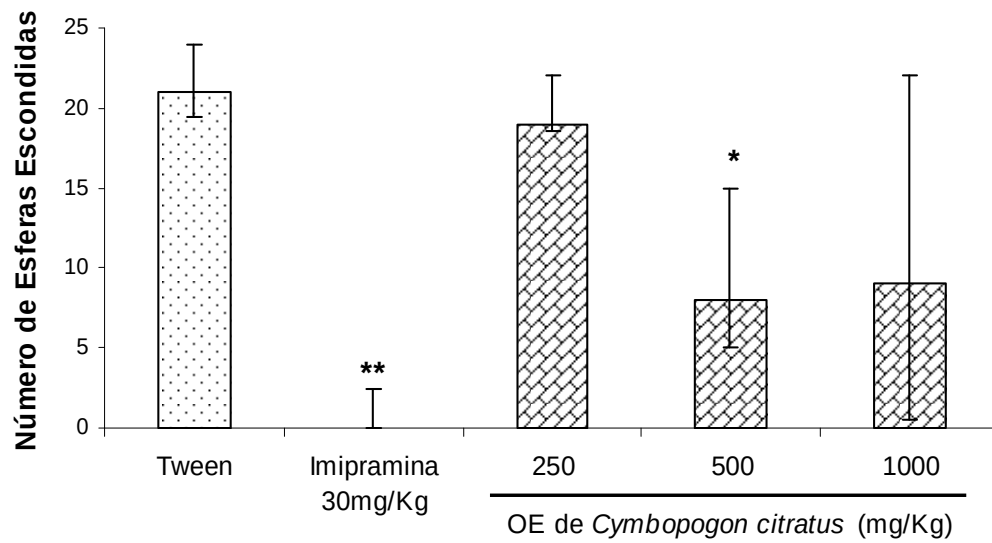


Figura 15. Número de esferas escondidas no Teste de Esconder Esferas, em machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil ($n = 7$ animais por grupo).

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Também foram realizados experimentos com fêmeas cujos resultados são apresentados na figura 16. Observa-se que nas fêmeas em Estro o OE foi ativo na maior dose utilizada, não havendo indicação de atividade na dose de 500 mg/Kg – dose que foi ativa em machos.

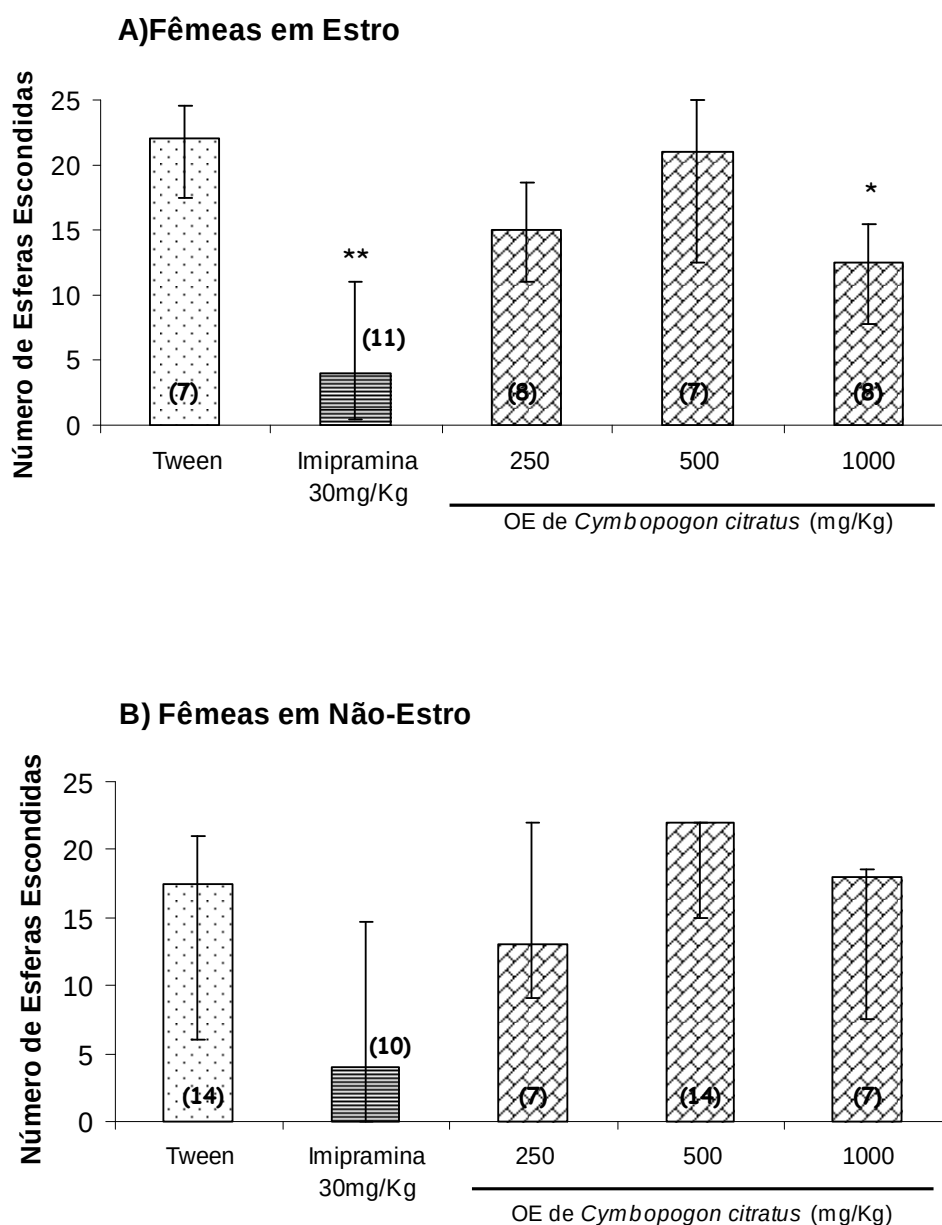


Figura 16. Número de esferas escondidas no Teste de Esconder Esferas, em fêmeas tratadas (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

A dose da droga padrão apresentou efeito mais pronunciado em machos (Fig. 15) do que em fêmeas (Fig. 16). Estes resultados parecem dar suporte às observações de Frick e colaboradores (2000), nas quais as fêmeas de camundongos apresentariam níveis de ansiedade mais elevados que os machos.

Embora possa ser observado diminuição no número de esferas escondidas no grupo de fêmeas em Não-estro tratadas com imipramina, esta redução não atingiu significância estatística. Esta observação dá subsídios às afirmações de Chikahisa e colaboradores (2007) para fêmeas de ratos e Galeeva e Tuohimaa (2001) para as fêmeas de camundongos segundo os quais as fêmeas na fase de Não-estro seriam as mais ansiosas.

Alguns achados suportam a utilização do procedimento do TEE como sendo relacionado ao TOC: as drogas utilizadas na terapêutica do TOC, como a clomipramina – um antidepressivo tricíclico amplamente utilizado na clínica - e inibidores da recaptação da serotonina, diminuem o número de esferas escondidas pelos animais, tanto em tratamento agudo como crônico (ICHIMARU *et al.*, 1995).

Outra evidência diz respeito à habituação. Os animais submetidos a tal procedimento experimental não apresentam comportamento de habituação quando expostos as esferas de vidro, ou seja, continuam a enterrá-las quando reexpostos em dias consecutivos. Tal comportamento de esconder está intimamente relacionado às compulsões (NJUNG'E & HANDLEY, 1990), diferentemente de modelos clássicos de TAG, como o Labirinto em Cruz Elevado e a Caixa Claro/Escuro, nos quais os animais expostos por uma segunda vez já demonstram comportamentos de

habituação, fenômeno conhecido como “*one-trial tolerance*” (LISTER, 1987; FILE, 1990; RODGERS & SHEPHERD, 1993).

Deste modo, parece que o OE atua em modelos que apresentam alto grau de homologia tanto para o TAG como para o TOC em animais machos e fêmeas.

4.6) Avaliação da atividade sedativa

Considerando que uma das indicações populares de *C. citratus* é a atividade sedativa, foi avaliada também, a capacidade das preparações em potencializar o sono induzido por éter etílico, em camundongos machos.

Em experimentos piloto com a droga padrão diazepam, observou-se uma diminuição da latência na dose de 3 e 5 mg/Kg e um aumento no tempo de sono em ambas as doses (Fig. 17), com resultados mais consistentes na dose de 5 mg/Kg. Não houve diferença significativa entre os controles negativos Tween e Salina optando-se, portanto, pelo uso do Tween nas outras sessões experimentais, nas quais se avaliou o efeito do OE e dos principais compostos, tendo em vista que ele foi o veículo de solubilização das preparações avaliadas neste procedimento experimental.

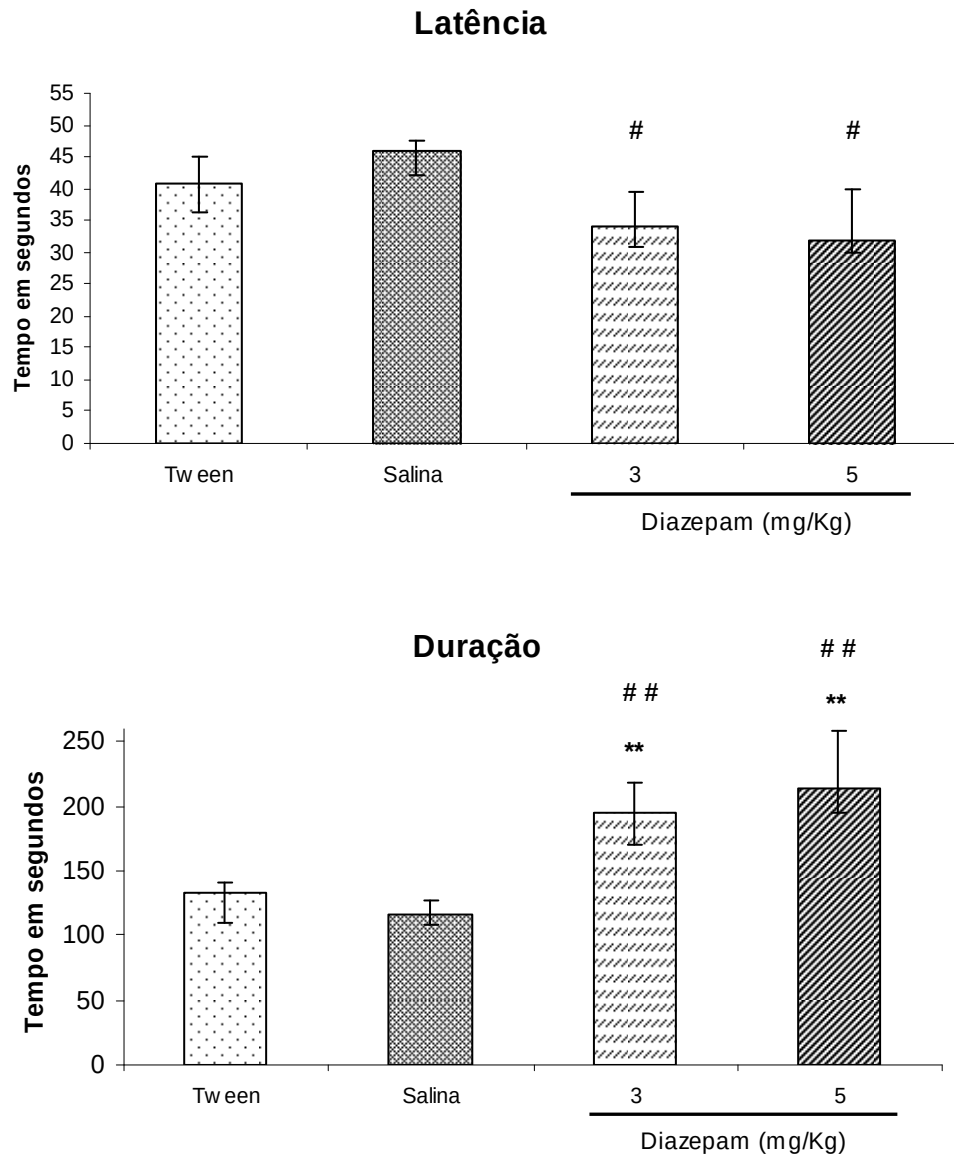


Figura 17. Latência e Duração do sono induzido por éter etílico, em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental ($n = 8$ animais por grupo). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil e comparados pelo Teste de Mann-Whitney.

** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle Tween.

$p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle Salina.

$p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle Salina.

Na figura 18 são apresentados os resultados obtidos com OE de 500 a 2000 mg/Kg. Houve um aumento de 44% e 334% no tempo de sono dos animais tratados com o OE nas doses de 1500 e 2000 mg/Kg, respectivamente, assim como redução na latência para início do sono nos animais tratados com 1000, 1500 e 2000 mg/Kg. A droga padrão diazepam aumentou a duração do sono (73,5%), porém não foi possível detectar diminuição na latência, provavelmente devido à grande variabilidade dos resultados.

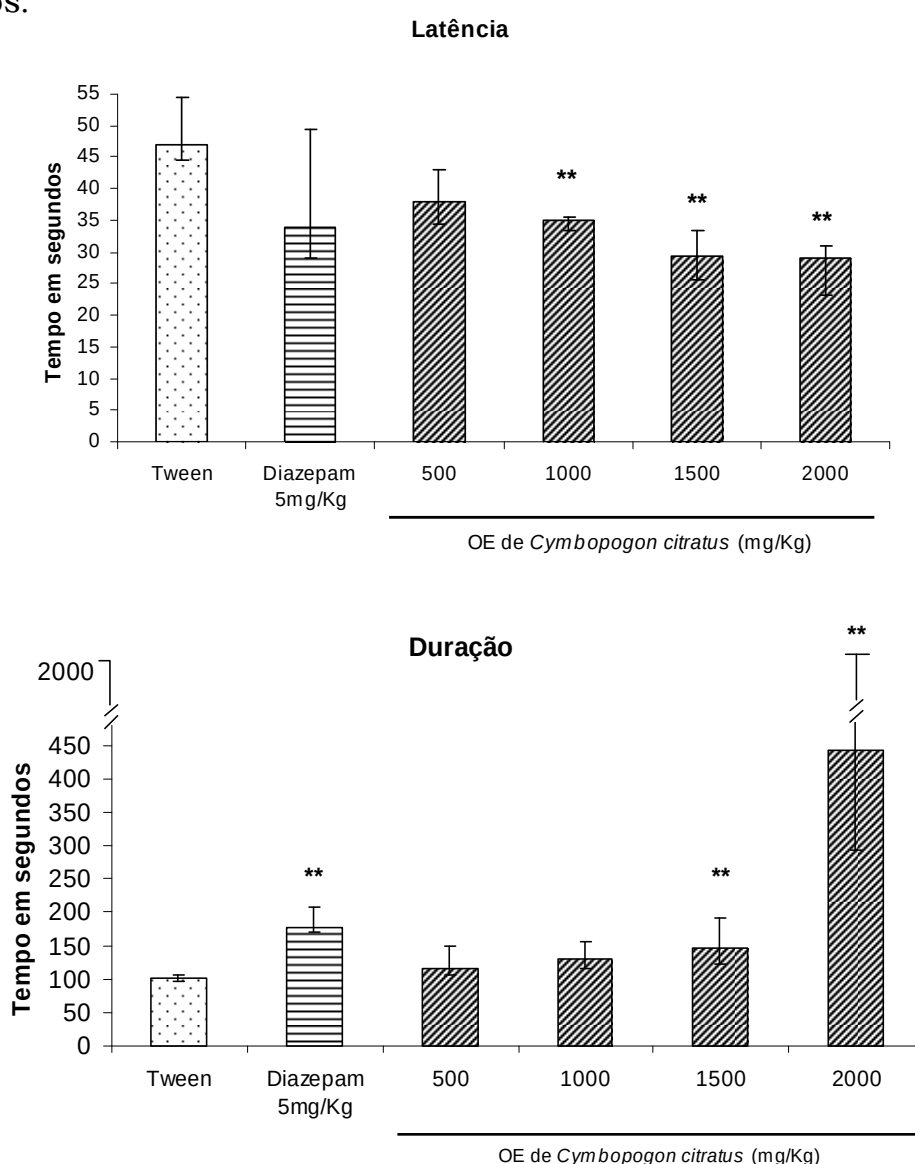


Figura 18. Latência e Duração do sono induzido por éter etílico, em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (n = 7 a 8 animais por grupo).

** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Para escolher as doses dos compostos isolados partiu-se da dose de OE ativa no modelo do sono induzido por éter etílico (2000 mg/Kg). Deste modo, foi feito o teste com 30 mg/Kg de geraniol, 300 mg/Kg de β -mirceno e 1600 mg/Kg de citral. A partir daí foram escolhidas duas outras doses equivalentes à metade e ao dobro desta dose inicial, exceto para o citral cuja maior dose atingiria 3200 mg/Kg, considerada uma quantidade muito alta de composto isolado.

Na figura 19 são apresentados os resultados obtidos com as doses dos compostos isolados. Os grupos controles dos diferentes procedimentos experimentais foram agrupados, para facilitar a visualização, após comparação estatística e constatação de que não diferiam entre si.

Foi verificada redução na latência para início do sono na dose de 800 mg/Kg de citral. Também se observa diminuição na latência e aumento na duração do sono no grupo tratado com citral na dose de 1200 mg/Kg. Na dose de 1600 mg/Kg o efeito do citral é observado na duração do sono. Assim, diferentemente do verificado para a atividade ansiolítica, parece ser o citral o responsável pela atividade sedativa. É justamente ao Citral, composto majoritário do OE, que é atribuída a atividade calmante (CRAVEIRO *et al.*, 1981, MATOS, 2000, SOUZA, 1991 *apud* LORENZI & MATOS, 2002).

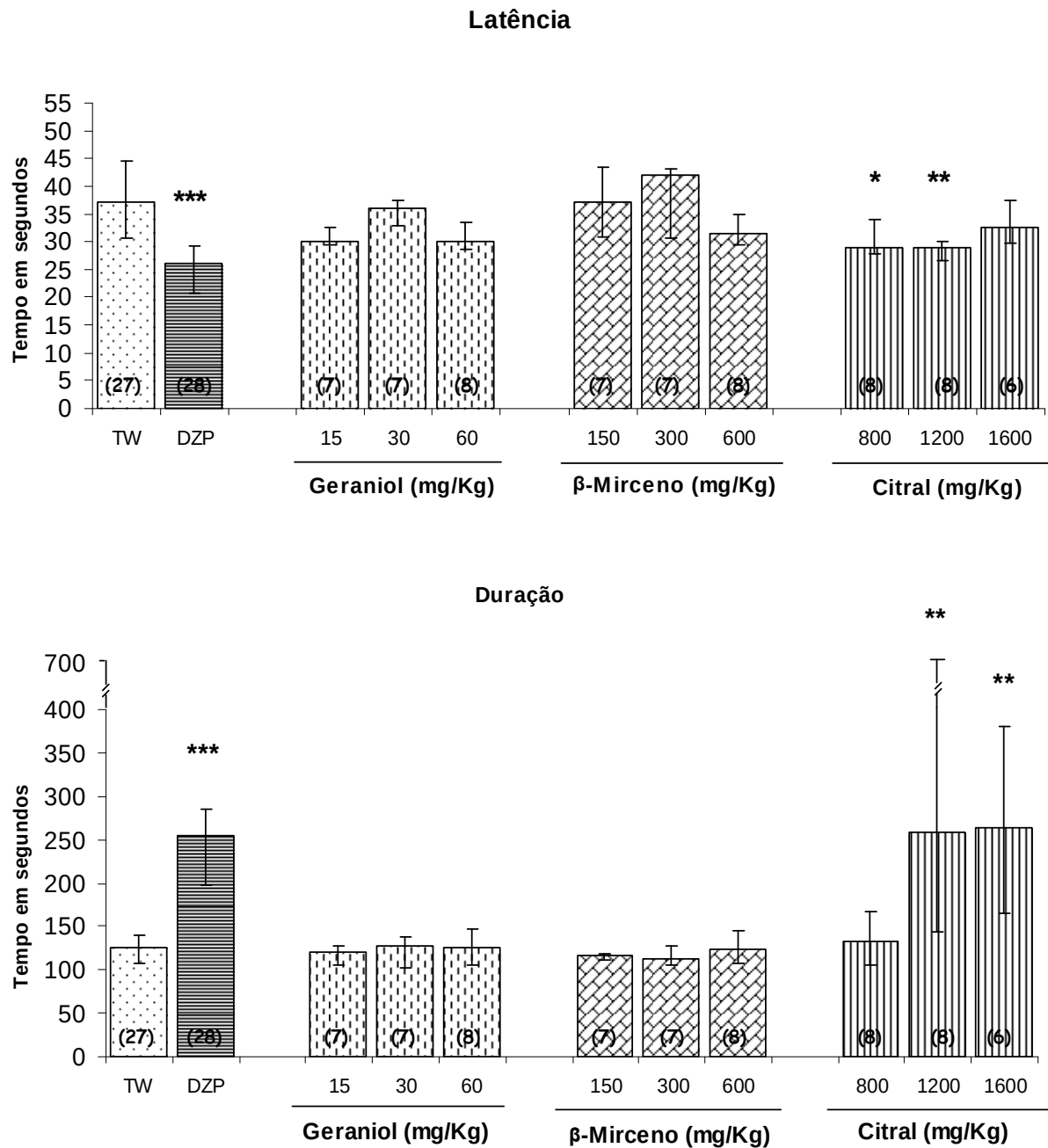


Figura 19. Latência e Duração do sono induzido por éter etílico, em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Considerando os resultados apresentados, foram realizados experimentos piloto com doses maiores de OE na tentativa de detectar indução de sono espontâneo ao invés de potencialização do sono induzido por droga padrão. Foram testadas doses de até 4000 mg/Kg e não se observou indução de sono, no entanto observou-se toxicidade aguda, tendo sido possível calcular a DL₅₀. A DL₅₀ é um valor estimado derivado da administração de um único tratamento de uma substância que provoca a morte de 50% dos animais tratados (BRITO, 1994).

A tabela 04 indica as doses de OE administradas, o número de animais tratados em cada grupo, a razão número de mortes pelo total de animais e a porcentagem de mortes. De acordo com estes dados pôde-se calcular, através do método da regressão linear ponderada, que a DL₅₀ do OE é de 3440 mg/Kg.

Tabela 04. Avaliação da DL₅₀ do OE de *C. citratus*.

Óleo Essencial (mg/Kg)	N	Mortes/Total	Mortes (%)
1000	8	0/8	0,0
2000	7	1/7	14,3
3000	8	3/8	37,5
4000	8	5/8	62,5

Substâncias que só promovem a morte de animais com doses muito elevadas podem ser consideradas de baixa toxicidade. As que possuem DL₅₀ entre 500 e 5000 mg/Kg podem ser consideradas levemente tóxicas. Aquelas com DL₅₀ acima de 5000 mg/Kg são consideradas atóxicas (HODGSON, 1997). Portanto, o OE de *C. citratus* pode ser considerado levemente tóxico.

4.7) Avaliação da atividade geral

Descrita por Dunham & Miya (1957) o teste da Barra Giratória indica a presença de prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade ou alterações motoras em animais que não são capazes de se manter durante 1 minuto sobre a barra em movimento, sendo permitido até três tentativas consecutivas.

Em machos tratados com até 1000 mg/Kg, dose que apresentou atividade no Labirinto em Cruz Elevado e na Caixa Claro/Escuro, não se observou qualquer prejuízo no desempenho sobre a Barra Giratória (BLANCO *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos com as fêmeas em Estro (Painel A) e Não-estro (Painel B) são apresentados na figura 20, na qual os animais são classificados como Aptos (aqueles que conseguiram se manter sobre a barra durante um minuto) ou Não-Aptos (aqueles que não conseguiram se manter por um minuto sobre a Barra Giratória).

No procedimento da Caixa Claro/Escuro, o grupo de animais fêmeas em Estro tratados com OE na dose de 1000 mg/Kg mostrou uma tendência ao aumento no tempo de permanência no compartimento claro (Fig. 11) e na redução no número de transições entre os dois compartimentos (Fig. 12). Este padrão de comportamento poderia indicar possível comprometimento motor dos animais, resultado esse que não foi corroborado pelo teste da Barra Giratória.

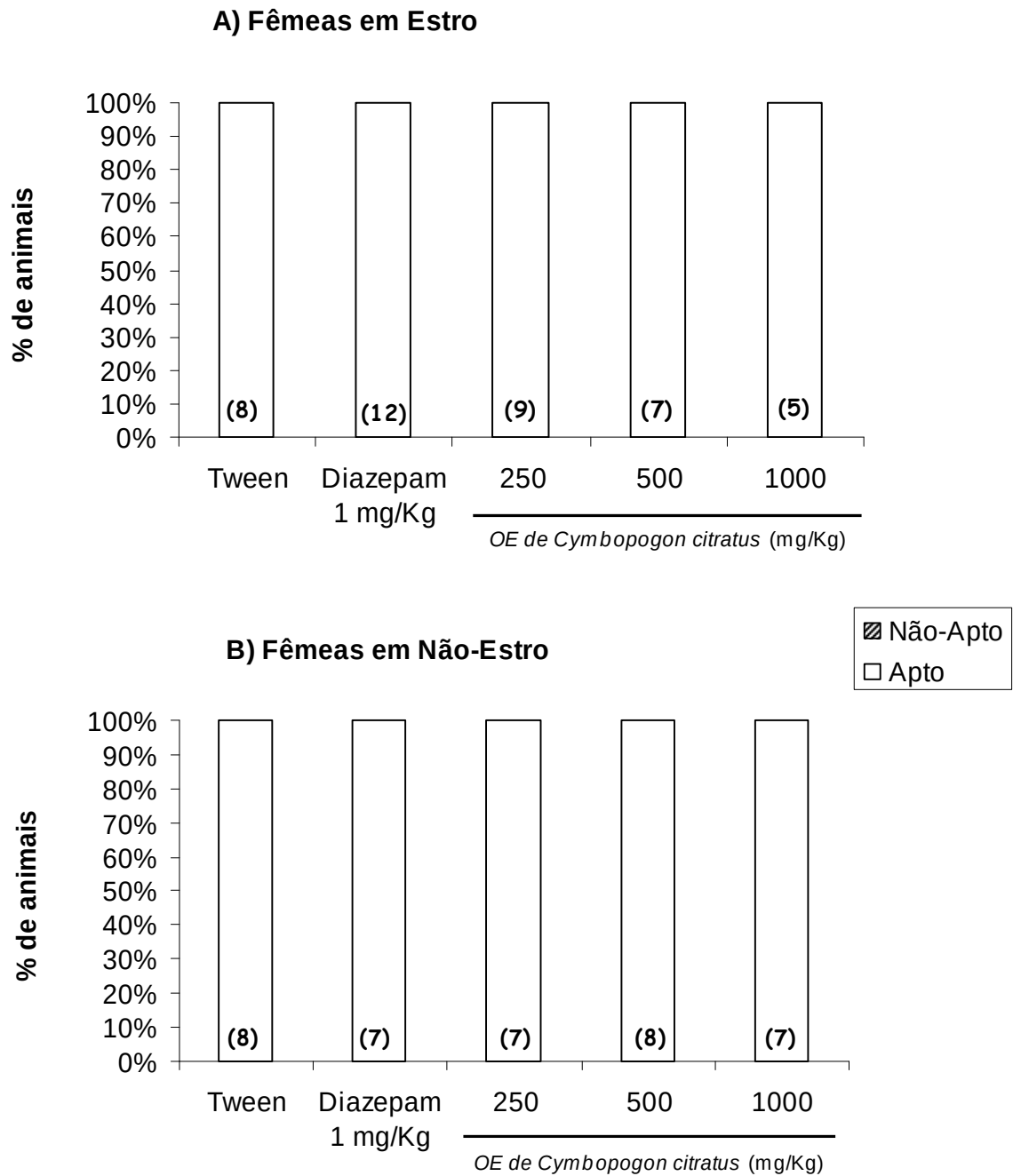


Figura 20. Desempenho das fêmeas no Teste da Barra Giratória após 30 minutos dos tratamentos. Dados apresentados em porcentagem de animais classificados como Aptos ou Não-Aptos na Barra Giratória (5 r.p.m.). Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Também não se observou efeito deletério sobre o desempenho de animais machos tratados de forma aguda com os principais compostos (Fig. 21) ou após tratamento com doses repetidas com o OE ou com os compostos isolados (Fig. 22). Somente um animal dos grupos controle, tratados repetidamente, não conseguiu ficar sobre a Barra Giratória.

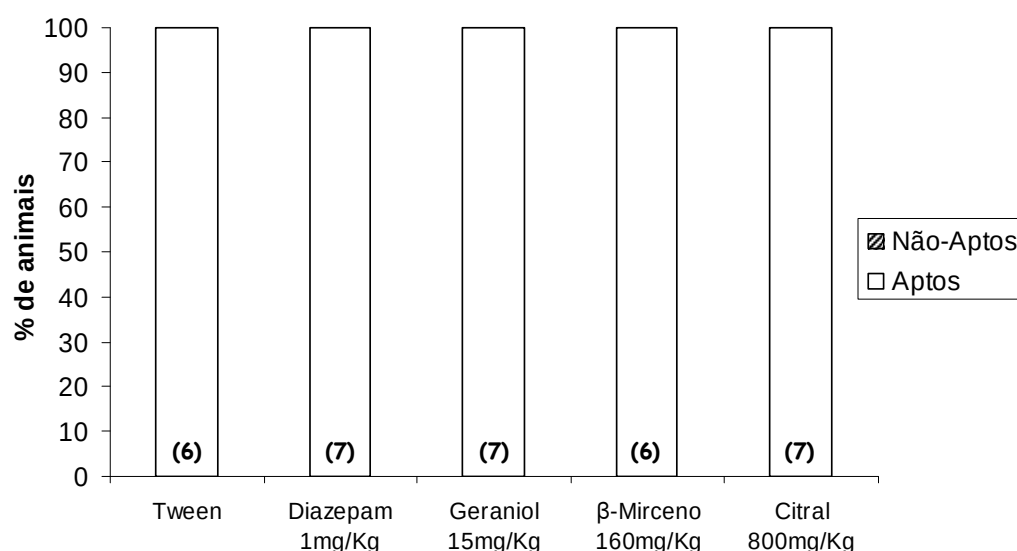


Figura 21. Desempenho dos machos no Teste da Barra Giratória após 30 minutos dos tratamentos. Dados apresentados em porcentagem de animais classificados como Aptos ou Não-Aptos na Barra Giratória (5 r.p.m.). Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

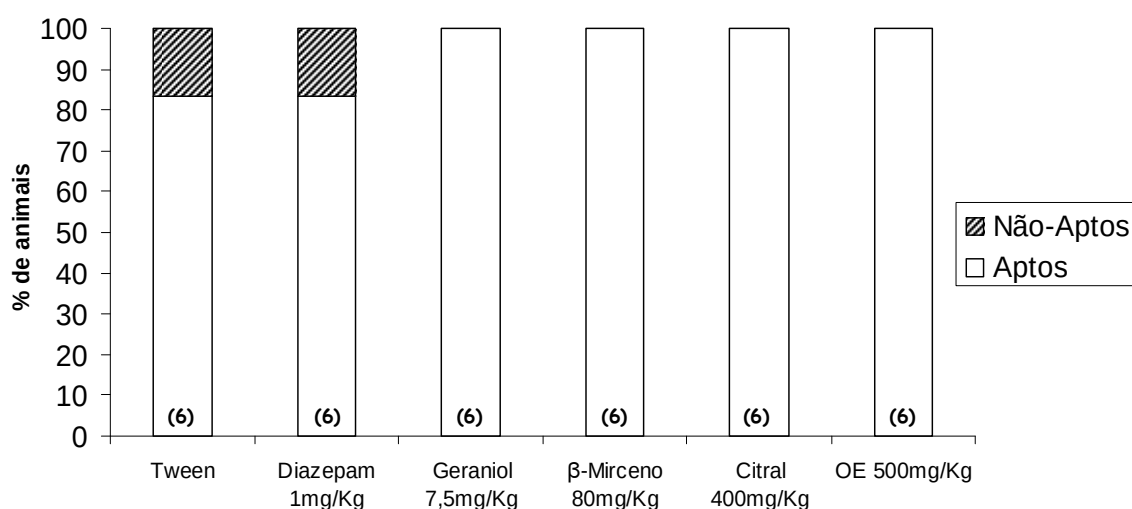


Figura 22. Desempenho dos machos tratados repetidamente no Teste da Barra Giratória. Dados apresentados em porcentagem de animais classificados como Aptos ou Não-Aptos na Barra Giratória (5 r.p.m.). Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Outro procedimento experimental amplamente utilizado não somente para medir comportamentos ansiosos, mas também sedação e atividade motora é o Campo Aberto. É um teste baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores (PRUT & BELZUNG, 2003; KLIETHERMES, 2005). O procedimento consiste em submeter o animal a um ambiente novo (desconhecido) do qual não pode escapar (WALSH & CUMMINS, 1976), e avaliar os comportamentos eliciados.

A atividade motora dos animais foi avaliada pelo número de quadrantes cruzados e pelo comportamento de levantar (WALSH & CUMMINS, 1976, PRUT & BELZUNG, 2003).

Os animais machos tratados com OE nas doses de 500 e 1000 mg/Kg apresentaram uma diminuição no número de quadrantes cruzados e uma tendência à redução do número de levantamentos (Fig. 23). Todavia, a interferência sobre o sistema motor não é corroborada pelo teste da Barra Giratória, onde os animais não apresentaram comprometimento motor algum (BLANCO *et al.*, 2007).

Um aumento da locomoção espontânea pode ser considerado como efeito estimulante enquanto uma diminuição conjunta tanto da atividade vertical quanto da locomoção estão relacionados a sedação ou a prostração (PRUT & BELZUNG, 2003).

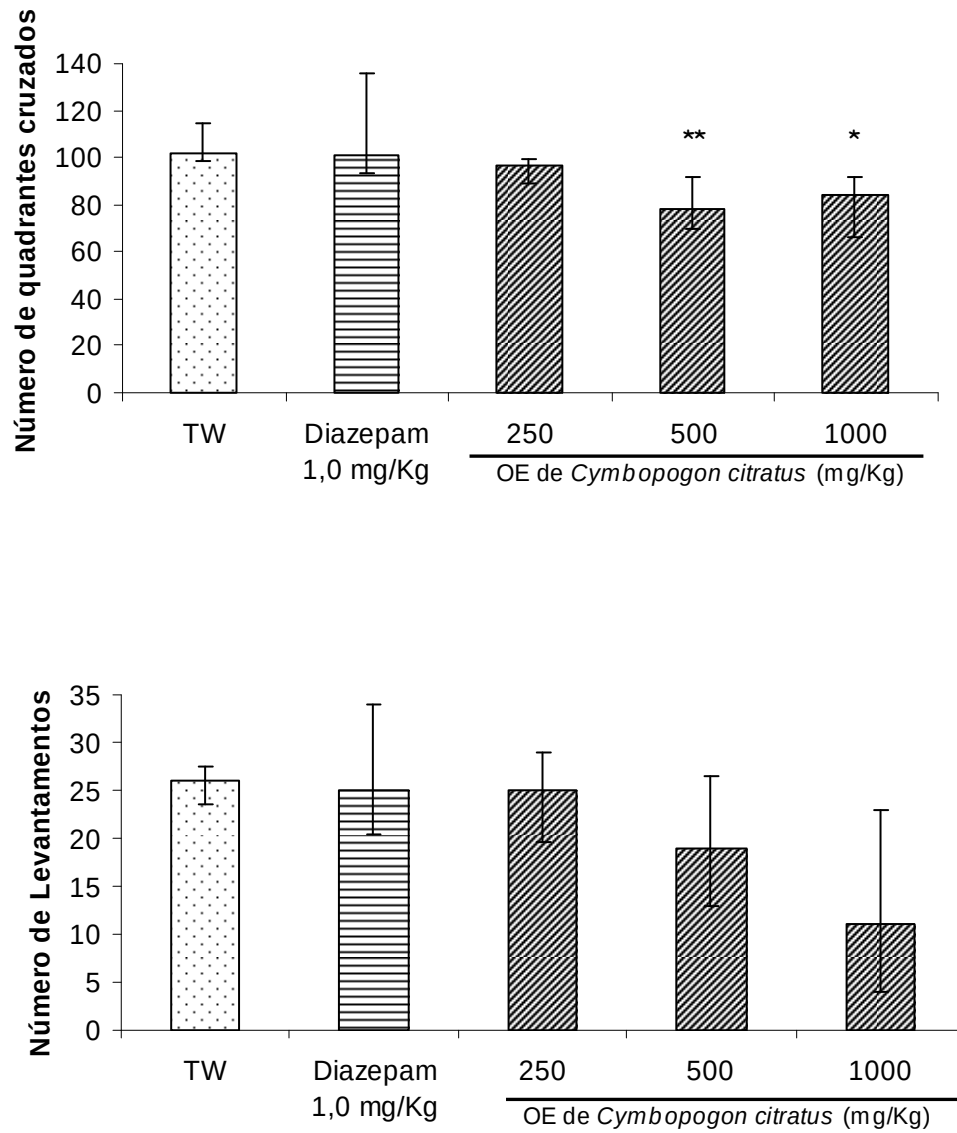


Figura 23. Número de quadrantes cruzados e Número de levantamentos realizados no Campo Aberto, em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil. (N = 7 animais por grupo)
 * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).
 Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

As fêmeas, nas diferentes fases do ciclo (Fig. 24) tratadas com 250, 500 ou 1000 mg/Kg de OE também não apresentaram diferenças significativas no número de quadrantes cruzados no Campo Aberto. Pode-se notar um aumento significativo no número de quadrantes cruzados nas fêmeas em Estro tratadas com a droga-padrão diazepam. Em uma análise mais aprofundada do procedimento tal ocorrência estaria relacionada ao fato do diazepam ser a droga ansiolítica de referência no procedimento experimental. Tal fato reforça ainda mais a idéia de que fêmeas na fase de Não-estro são mais ansiosas que as fêmeas em Estro.

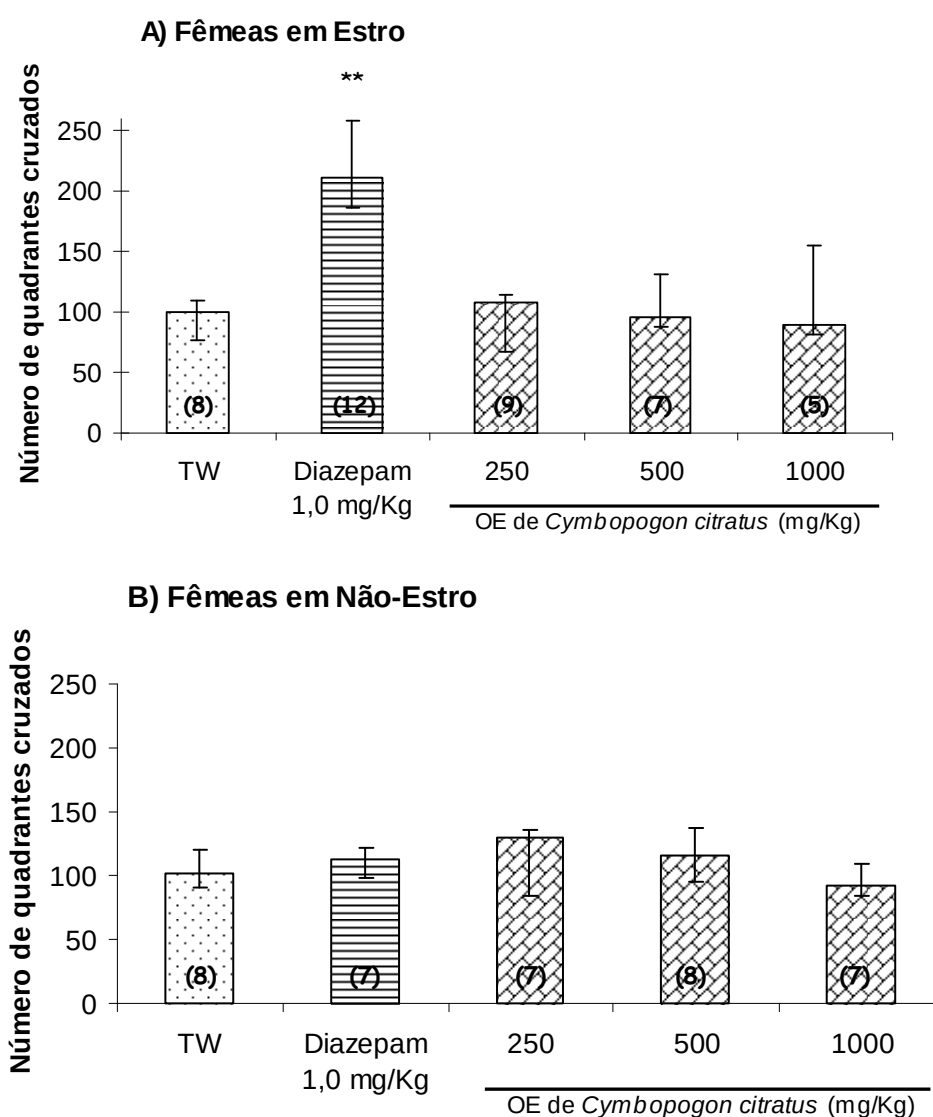


Figura 24. Número de quadrantes cruzados no Campo Aberto, em fêmeas tratadas (via oral) 30 minutos antes de serem submetidas ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Na figura 25 (Painel B) observa-se uma redução significativa no número de levantamentos realizados pelas fêmeas em Não-estro tratadas com diazepam ou com óleo essencial nas doses de 250 ou 1000 mg/Kg. Tal redução não está relacionada com a atividade motora já que não foram observados prejuízos na Barra Giratória (Fig. 20) ou no número de quadrantes cruzados no Campo Aberto (Fig. 24).

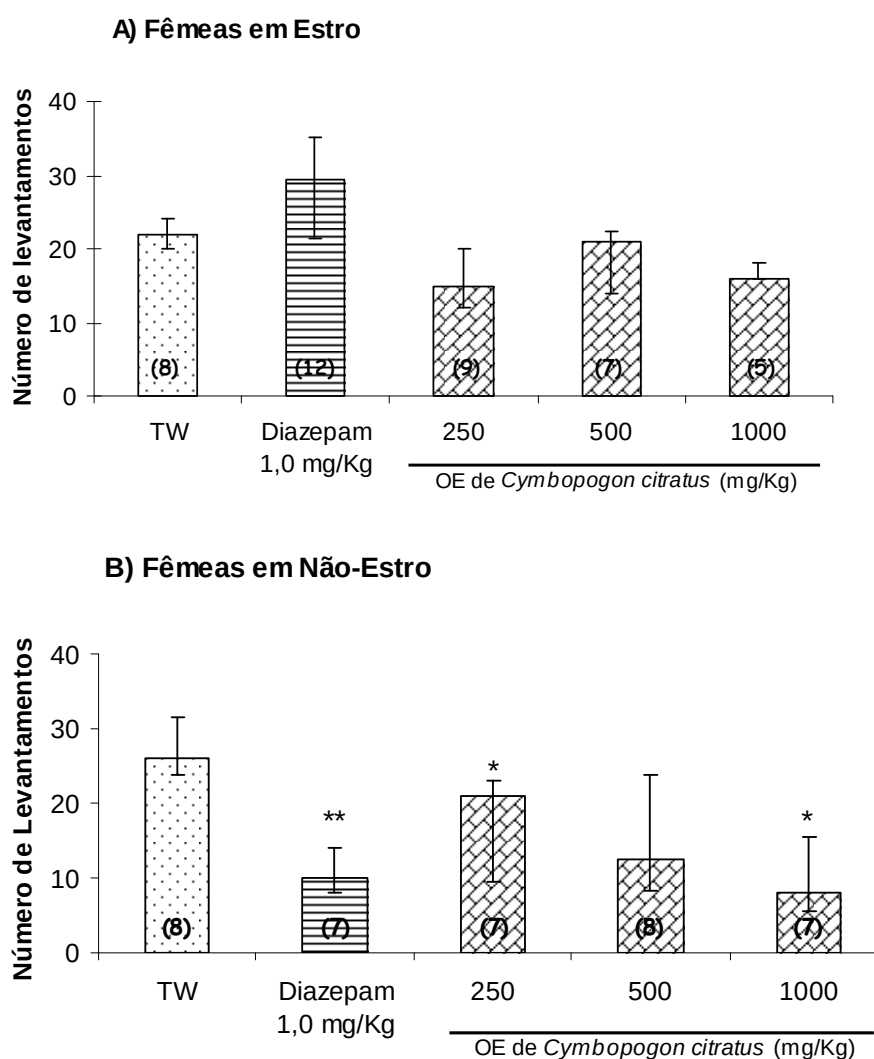


Figura 25. Número de Levantamentos no Campo Aberto, em fêmeas tratadas (via oral) 30 minutos antes de serem submetidas ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Finalizando o trabalho, tendo sido preparada a decocção de *C. citratus* para a comparação qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada da composição tanto do decocto como do OE, pareceu-nos interessante avaliar a atividade biológica deste tipo de preparação. Duas diferentes concentrações do decocto (20% e 40%) foram estudadas no procedimento da Caixa Claro/Escuro e da Barra Giratória.

A quantidade de planta utilizada na preparação da decocção foi superior àquela normalmente usada pela população, levando-se em consideração que tradicionalmente se utiliza o chá da espécie vegetal com aproximadamente cinco folhas da planta para uma xícara de chá (algo entre 140 e 150 ml), o que corresponde a uma concentração menor que 5%.

O tratamento com a decocção não modificou o desempenho dos animais sobre a barra giratória (Fig. 26) e, para nossa surpresa, também não apresentou efeito ansiolítico na Caixa Claro/Escuro como demonstrado na figura 27. A ausência de efeito neste tipo de preparação, tanto em roedores quanto em seres humanos, foi observada anteriormente na série de trabalhos realizados por Carlini e colaboradores (CARLINI *et al.*, 1986; LEITE *et al.*, 1986; SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1986).

Possíveis explicações para a não observação de efeito no decocto podem ser aqui levantadas. A primeira possibilidade está relacionada com a concentração dos compostos que fazem parte do OE e estão presentes na decocção. Como demonstrado na Cromatografia em Camada Delgada (Fig. 10) os principais compostos do OE estão presentes no decocto nitidamente em menores concentrações, porém não se pode afirmar a quantidade de cada um deles no decocto, tendo em vista que não foram feitas avaliações quantitativas nesse tipo de preparação. Portanto, as concentrações destes

compostos podem não ser suficientes para sofrer absorção necessária para levar a uma atividade biológica.

A segunda explicação está relacionada ao esquema de tratamento utilizado pela população. Tais preparações são utilizadas rotineiramente pelos indivíduos o que equivaleria, em termos práticos, a uma espécie de tratamento repetido. No presente trabalho os animais receberam a decocção de forma aguda, por isso ainda são necessários estudos com tais preparações em esquemas de tratamento prolongado.

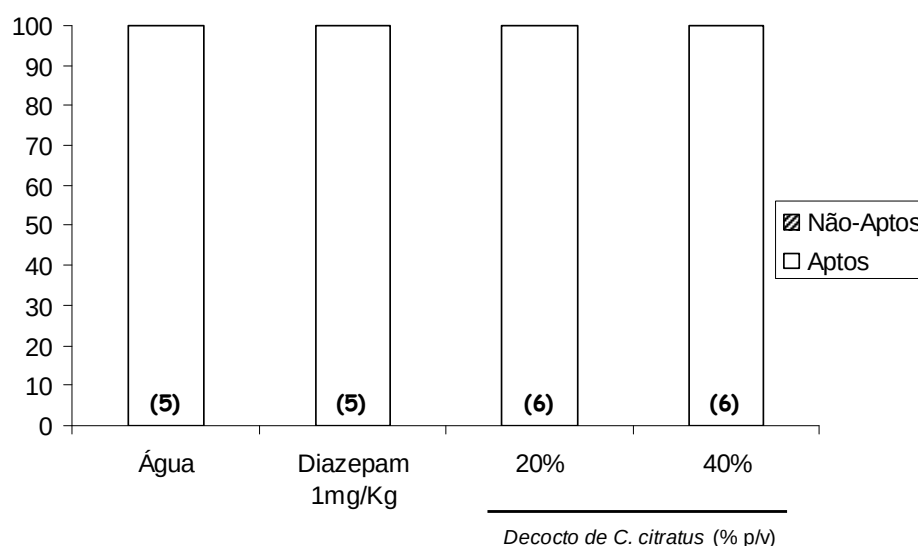


Figura 26. Desempenho dos animais machos no Teste da Barra giratória após 30 minutos dos tratamentos. Dados apresentados em porcentagem acumulada de animais classificados como Aptos ou Não-Aptos na Barra Giratória (5 r.p.m.). Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Assim, o presente trabalho contribui para aumentar o rol de informações a respeito da espécie vegetal estudada. Contudo, faz-se necessário estudos mais aprofundados para estimativa de parâmetros farmacocinéticos, do mecanismo de ação do OE de *Cymbopogon citratus* e da toxicidade da planta quando administrada cronicamente.

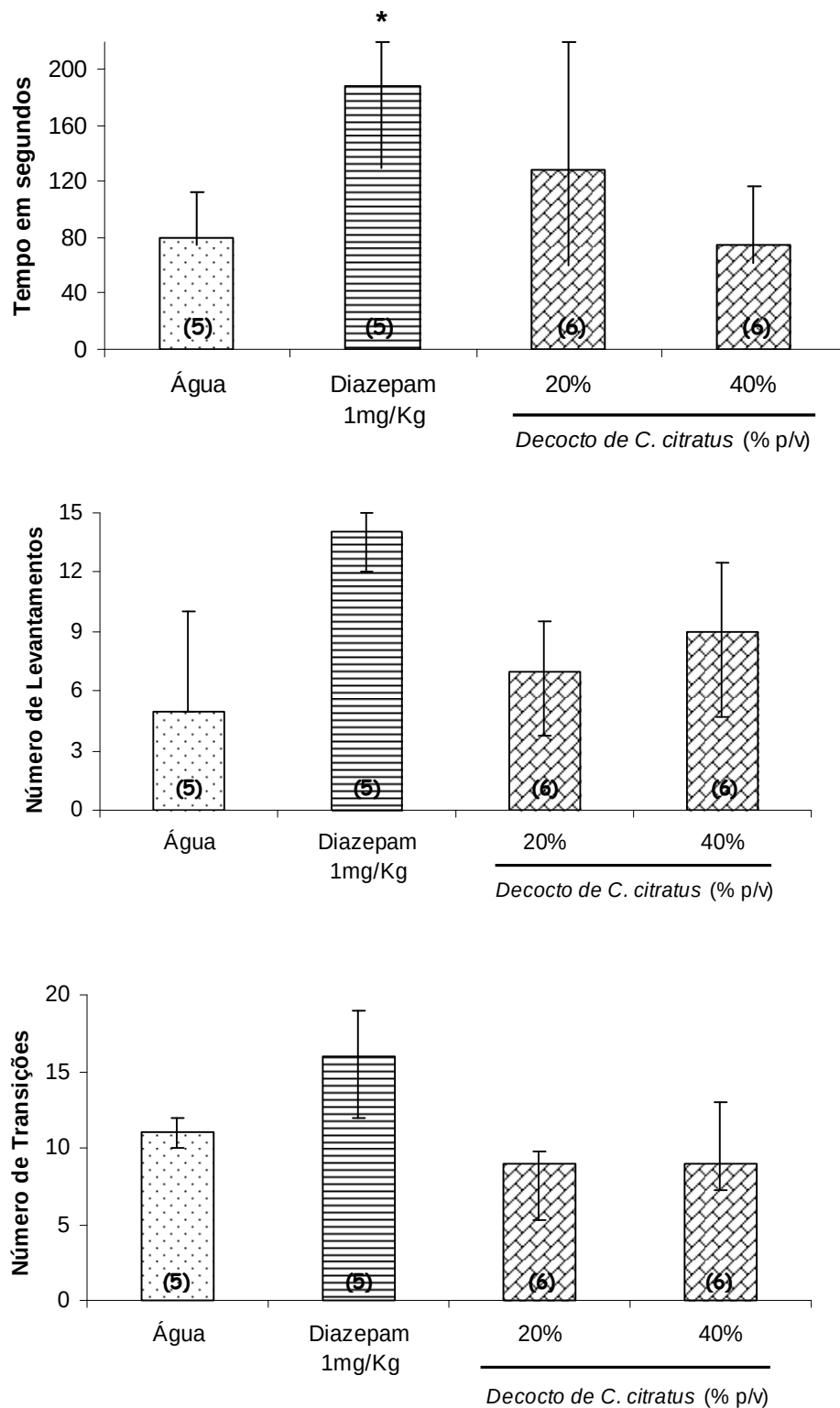


Figura 27. Tempo de permanência no compartimento claro, Número de levantamentos e Número de transições entre os dois compartimentos da Caixa Claro/Escuro em camundongos machos tratados (via oral) 30 minutos antes de serem submetidos ao procedimento experimental. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

* $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

Os algarismos entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo.

Conclusão



V. Conclusão:

- As fêmeas em Não-estro parecem ser mais ansiosas que as fêmeas em Estro;
- Os tratamentos agudo e com doses repetidas dos compostos isolados do OE de *Cymbopogon citratus* não produziram efeito ansiolítico na Caixa Claro/Escuro;
- O OE demonstrou ser ativo em animais machos na dose de 500 mg/Kg no Teste de Esconder Esferas;
- Em fêmeas na fase de Estro o OE apresentou efeito ansiolítico na dose de 1000 mg/Kg no Teste de Esconder Esferas;
- Houve um aumento na duração do sono nos animais machos tratados com 1500 ou 2000 mg/Kg do OE;
- O composto majoritário citral aumentou a duração do sono nos animais machos tratados com 1200 ou 1600 mg/Kg;
- Não houve comprometimento do sistema motor tanto dos animais machos quanto das fêmeas tratados com as diferentes preparações.

Referências Bibliográficas



VI. Referências Bibliográficas:

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publ. Corp**, Carol Stream, 2001.
- AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; SILVA, J. R.; ANDALUZ, M. I. Padronização da droga e do extrato fluido de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **LECTA – USF**. v. 14, p. 109-119, 1996.
- ALMEIDA, FILHO N.; MARI, J. J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J. F.; FERNANDES, J. G.; ANDREOLI, S. B.; *et al.* Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). **Rev. ABP-APAL**. v. 14, p. 93-104, 1992.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 23, p. 233-242, 2001.
- ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.** v.21, p. 205-35, 1973.
- BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS-JR, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**. (2007) Article in Press, DOI: 10.1016/j.phymed.2007.04.007.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharmacol.** v. 463, p. 55-65, 2003.
- BRANDÃO, M. L. Sistema nervoso central. In:_. GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5.ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999. p. 35-58.
- BRAWMAN-MINTZER, O.; LYDIARD, R. B. Biological basis of generalized anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry**. v. 51, p. 16-25, 1997.
- BRITO, A. S. Manual de ensaios toxicológicos “*in vivo*”. **Ciências Médicas**. Campinas: UNICAMP, p. 15-22, 1994.

- BROEKKAMP, C.L.; RIJK, H.W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K.L. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 223-229, 1986.
- CARLINI, E. A. Considerações gerais sobre o uso do Capim-cidrão (*Cymbopogon citratus* D. C. Stapf) em medicina popular. In:_. Farmacologia pré-clínica, clínica e toxicologia do Capim-cidrão (*Cymbopogon citratus*). **Publicação CEME** (Brasília). p. 9-12, 1985.
- CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** 17(1), 37-64, 1986
- CARVALHO, J. E. Atividade farmacológica e toxicológica de óleos essenciais. **II Simpósio Brasileiro de óleos essenciais: Diagnóstico & Perspectivas**. Documentos IAC; nº. 74, v. 01, p. 13, 2003.
- CHIKAHISA, S.; SANO, A; KITAOKA, K.; MIYAMOTO, K.; SEI, H. Anxiolytic effect of music depends on ovarian steroid in female mice. **Behav. Brain Res.** (2007) Article in Press, DOI: 10.1016/j.bbr.2007.01.010.
- COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH J. G. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In:_. HEINDEL, J. J.; CHAPIN R. E. **Female Reproductive Toxicology**. v.3B, p.45-46, 1993.
- COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white box: validation as a model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 32, p. 777-785, 1989.
- CORREIA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 5, p. 152.
- CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 13, p. 167-170, 1980.

- CRAWLEY, J. N.; SKOLNICK, P.; PAUL, S. M. Absence of intrinsic antagonist actions of benzodiazepine antagonist on a exploratory model of anxiety in the mouse. **Neuropharmacology**. v. 5, p. 531-537, 1984.
- CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 4(9), p. 775-790, 2005.
- CZEPAK, M. P.; CRUCIOL, C. A. C. Produtividade e composição de óleo essencial de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em diferentes arranjos espaciais. **II Simpósio Brasileiro de óleos essenciais: Diagnóstico & Perspectivas**. Documentos IAC; nº. 74, v. 01, p. 113, 2003.
- DI STASI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: UNESP. p. 194, 1989.
- DRACTU L.; LADER M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. *J. Bras. Psiqu.* v. 42, p. 19-32, 1993. In:_. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Rio de Janeiro: ECN, 1997. p. 03-12.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** v. 46, p. 208-209, 1957.
- ERNST, E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**. v. 13, p. 205-208, 2006.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In:_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 107-122.
- FALKENBERG, M.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In:_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 229-245.
- FIGUEIREDO, M. S. L. Classificação. In:_. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 29-51.

- FILE, S. E. New strategies in the search for anxiolytics. **Drug Design and Delivery**. v. 5, p. 195-201, 1990.
- FLAISHON, R.; WEINBROUM, A. A.; VEENMAN, L.; LESCHINER, S.; RUDICK, V.; GAVISH, M. Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam. **Anest. Analg.** v. 97, p. 1046-1052, 2003.
- FRICK, K. M.; BURLINGAME, L. A.; ARTERS, J. A.; BERGER-SWEENEY, J. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. **Neuroscience**. v.95, p.293-307, 2000.
- GALEEVA, A.; TUOHIMA, A. P. Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. **Behavioural Brain Research**. v.119, p.41-47, 2001.
- GALEEVA, A.; TUOHIMA, A. P.; SHALYAPINA V. G. The role of sex steroids in forming anxiety states in female mice. **Neurosci Behav Physiol**. v.33, p.415-420, 2003.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Diversidade da flora odorífera brasileira. **II Simpósio Brasileiro de óleos essenciais: Diagnóstico & Perspectivas**. Documentos IAC; nº. 74, v. 01, p. 01, 2003.
- GROSSO, C. R. F. Aplicação de óleos essenciais em alimentos. **II Simpósio Brasileiro de óleos essenciais: Diagnóstico & Perspectivas**. Documentos IAC; nº. 74, v.01, p. 13., 2003.
- GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Ansiedade**. In:_. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos, 1993. p. 109-144.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Medicamentos Ansiolíticos. In:_. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 123-160.
- GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. Neurobiologia. In:_. **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 107-132.
- GUTTMAN, R.; LIEBLICH, I.; GROSS, R. Behavioral Correlates of Estrous Cycle Stages in Laboratory Mice. **Behav. Biol.** v. 13, p. 127-132, 1975.

- HODGSON, E. Toxicity testing and risk assessment. In:_. **Textbook of modern toxicology**. Applenton & Lange, Connecticut, 1997, pp. 285-337.
- ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT_{1A} Receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. **Jap. J. Pharmacol.** v. 68, p. 65-70, 1995.
- JORDAN, A. D.; KORDIK C. P.; REITZ A. B.; SNFILLIPO P. J. Novel anxiolytics agents – 1994 to present. **Expert. Opin. Ther. Pat.** v. 6, p. 1047-1060, 1996.
- KLIETHERMES, C. L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neuroscience and biobehavioral reviews.** v.28, p.837-850, 2005.
- LEPICARD, E. M.; JOUBERT, C.; HAGNEAU, I.; PEREZ-DIAZ, F.; CHAPOUTHIER, G. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 67, p. 739-748, 2000.
- LEITE, J.R.; SEABRA, M.L.V.; MALUF, E.; ASSOLANT, K.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S. *et al.* Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **J. Ethnopharmacol.** 17(1), 75-83, 1986.
- LIMA, M. S.; TEIXEIRA, V. A.; ANDRÉA, A. C. V.; MAGALHÃES, P. V. S. Epidemiologia. In:_. **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 171-187.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology.** v. 92, p. 180-185, 1987.
- LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In.: Introdução a métodos cromatográficos, COOLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (coordenadores) Campinas: Editora da Unicamp, 1990, p. 45-58.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p. 158-159.

- LUZ A. I.; ZOHGBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. (s.d.)a. The essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf occurring in the Amazon region In:_. **Plantas aromáticas na Amazônia... e seus óleos essenciais**. p. 76-77, 2001.
- McLafferty, F. W.; Stauffer, D. The wiley / NBS registry of mass spectral data. **John Wiley Sons**, New York, 1989.
- MOSTARDEIRO, M. A.; DREWS, S.; MONTAGNER, D.; PASINATO, R.; MOSTARDEIRO, C. P.; VIAU, L. V. M. Análise dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (Gramineae). **II Simpósio Brasileiro de óleos essenciais: Diagnóstico & Perspectivas**. Documentos IAC; nº. 74, v. 01, p. 47, 2003.
- NOGUEIRA, M. J. C. **Fitoterapia popular e enfermagem comunitária**. São Paulo, 1983. Tese (Livre docência em Enfermagem) - Departamento de Enfermagem Médico-cirúrgica, Universidade de São Paulo.
- NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 38, p.63-67, 1991.
- OLIVIER, B. Preface. **Eur. J. Pharmacol.** v. 463, p. 1-2, 2003.
- PAPROCKI, J. O emprego de ansiolíticos benzodiazepínicos pelo clínico geral e por especialistas não psiquiatras. **Arq. Bras. Med.** v. 64(1), p. 1-64, 1990.
- PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuros. Behav. Reviews.** v. 25, p. 219-233, 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.
- PEREIRA, M. E. C. O Conceito de Ansiedade. In:_. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 3-28.
- 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.

- PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sci.** v. 78(15), p. 1720-1725, 2006.
- RICKELS, K.; SCHWEIZER, E. The clinical presentation of generalized anxiety in primary-care: practical concepts of classification and management. **J. Clin. Psychiatry.** v. 58, p. 4-9, 1997.
- RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology.** v. 113, p. 237-242, 1993.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 30, p. 289-304, 1997.
- SOUZA-FORMIGONI, M.L.; LODDER, H.M.; GIANOTTI-FILHO, O.; FERREIRA, T.M.; CARLINI, E.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) II. Effects of daily two months administration in male and female rats and in offspring exposed “in utero”. **J. Ethnopharmacol.** 17(1), 65-74, 1986.
- SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In:_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 467-496.
- STAHL, S. M. Ansiolíticos e Hipnótico-Sedativos. **Psicofarmacologia – Bases Neurocientíficas e Aplicações Clínicas.** São Paulo: MEDSI, 1998. p. 189-243.
- THE WHO WORLD MENTAL HEALTH SURVEY CONSORTIUM. Prevalence, Severity, and Unmet need for treatment of mental disorders in the world health organization world mental health surveys. **JAMA,** v. 291, p. 2581-2590, 2004.
- 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.

- TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004. p.167.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography, **J. Chromatography**, v. 11, 463-467, 1963.
- WEISSMAN M.M.; BLAND R.C.; CANINO G.J.; GREENWALD S.; HWU H.G.; LEE C.K.; NEWMAN, S. C.; OAKLEY-BROWNE, M. A.; RUBIO-STIPEC, M. The cross national epidemiology of obsessive compulsive disorder. The Cross National Collaborative Group. **J Clin Psychiatry**. v. 55 (Suppl:5-10), 1994.
- YERKES, R. M.; DODSON, J. D. The Relation of Strength of Stimulus to Rapidity of Habit-Formation. **Journal of Comparative Neurology and Psychology**. v. 18, p. 459-482, 1908.
- YOUNG, R.; JOHNSON, D. N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing Anxiolytic agents. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 40, p. 739-743, 1991.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol. Bull.**, v.83, p.482-504, 1976.
- ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F. G. Modelos animais. In:_. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 55-74.

Aneæos



Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice.

M. M. BLANCO^{a,b#}, C.A.R.A. COSTA^{a#}, A.O. FREIRE^b, J.G. SANTOS-JR^b; M. COSTA^{a*}

^a Department of Pharmacology, Institute of Biosciences, UNESP – São Paulo State University, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu, São Paulo, Brazil

^b current address: Department of Physiology, Federal University of São Paulo.

Both authors contributed equally to the work.

* Corresponding author. Tel.: +55 14 3811 6253; fax: +55 14 3815 3744.

E-mail address: mcosta@ibb.unesp.br (Mirtes Costa)

Abstract

Tea obtained from leaves of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf is used for its anxiolytic, hypnotic and anticonvulsant properties in Brazilian folk medicine. Essential oil (EO) from fresh leaves was obtained by hydrodistillation and orally administered to Swiss male mice 30 minutes before experimental procedures. EO at 0.5 or 1.0 g/kg was evaluated for sedative/hypnotic activity through pentobarbital sleeping time, anxiolytic activity by elevated plus maze and light/dark box procedures and anticonvulsant activity through seizures induced by pentylenetetrazole and maximal electroshock. EO was effective in increasing the sleeping time, the percentage of entries and time spent in the open arms of the elevated plus maze as well as the time spent in the light compartment of light/dark box. In addition, EO delayed clonic seizures induced by pentylenetetrazole and blocked tonic extensions induced by maximal electroshock, indicating the elevation of the seizure threshold and/or blockage of seizures spread. These effects were observed in the absence of motor impairment evaluated on the rotarod and open field test. Our results are in accord with the ethnopharmacological use of *Cymbopogon citratus*, and after complementary toxicological studies it can support investigations assessing their use as anxiolytic, sedative or anticonvulsive agent.

Keywords: Anxiolytic; Sedative; Anticonvulsant; *Cymbopogon citratus*; Essential oil, Lemongrass.

Introduction

Numerous herbal medicines are recognized as active in the central nervous system (CNS), and they have at least a hypothetical potential to affect chronic conditions such as anxiety, depression, headaches or epilepsy, that do not respond well to conventional treatments (Phillipson, 2001; Carlini, 2003;). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf – Poaceae, an herb known worldwide as lemongrass (local name: capim-cidrao) is widely used in tropical countries as a source of ethnomedicines (Di Stasi et al., 1989; Duke, 1989; Tortoriello and Romero, 1992). In spite of the strong popular indication and a short communication about its action published many years ago (Seth et al., 1976), there are few controlled experimental studies on their CNS activity, with some discrepant results. As pointed out by Viana et al. (2000a), negative results obtained in rodents (Carlini et al., 1986; Souza-Formigoni et al., 1986) and in human beings (Leite et al., 1986) could be due to different chemotypes of lemongrass evaluated, since there are at least two varieties: East Indian (roughly equal amounts of myrcene and citral) and the West Indian type (little myrcene but high amount of citral). The aim of the present study was to investigate the presence of CNS activity of the essential oil with high citral content, obtained from fresh leaves of *C. citratus*, using different experimental models to access anxiolytic, sedative and anticonvulsant activities in mice.

Materials and Methods

Plant material and essential oil (EO) extraction: Leaves were collected from the garden of medicinal plants (Lageado Farm, UNESP, Botucatu, SP, Brazil) and a voucher specimen (# 23031) has been deposited in the Irina D. Gemtchujnirov – BOTU herbarium. EO was obtained by hydrodistillation of fresh leaves (yield: 0.45% w/v) and stored, protected against light and heat, until behavioral assays. EO was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry according to these experimental conditions: injection of 1 µl of a solution made with 5 µl of EO suspended in 1 ml of ethyl acetate; silica capillary column: DB-5 (30m × 0.25mm × 0.25µm), electron impact: 70 eV, carrier gas: helium at 1.7 ml/min, injector temperature: 240 °C, detector temperature: 230 °C, temperature program: 50 °C (5 min) - 250 °C, 5 °C/min. The identification of the components was made through comparison of substance mass spectrum with the database of the GC/MS (NIST 62.lib), literature and retention index (Adams, 1995; McLafferty and Stauffer, 1989).

Animals: Adult male Swiss mice (35-45g) from the colony at the UNESP were maintained under controlled environmental conditions of temperature (21±2°C) and light (12/12 light/dark cycle) with food and water *ad libitum* until 2 h before experimental procedures. Experimental protocols were designed according to the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation

(COBEA) and were approved by the Bioscience Institute – Ethics Committee for Animal Research (CEEa).

Treatments: Immediately before use, EO was suspended in a vehicle (polyoxyethylenesorbitan monooleate - Tween 80® - 12% v/v in saline, Synth, Brazil) to achieve the proper dosage. The control group received vehicle (TW) at the same volume as the treated groups. Chlordiazepoxide (CDZ - 10 mg/kg, Psicosedin®, Farmasa, Brazil), valproic acid (ACV – 400 mg/kg; Depakene®, Abbott, Brazil) or diazepam (DZP – 1.0 mg/kg; Valium®, Roche, Brazil) was used as the standard drug. All treatments were made at 10 ml/kg orally by gavage, except the animals that received DZP, which was administered intraperitoneally.

Neurobehavioral evaluation: Neurobehavioral effects were evaluated according classical procedures, previously described in details (Carvalho-Freitas and Costa, 2002; Pultrini et al., 2006). Shortly, acute toxicity and effects on gross behavior were evaluated in groups of five animals treated with EO at 0.25, 0.5, 1.0, 3.0 or 5.0 g/kg, and observed 30 min, 1h, 3h and 5h after treatment and intermittently for 15 days during which their bodyweights were taken. Complementary evaluation of the exploratory activity and motor system integrity was made after 30min, 2h and 24h in mice treatment with EO or TW, through three minutes of observation in the open field procedure followed by evaluation on rota-rod apparatus, where the total time performed was registered on a stopwatch. Mice were previously selected in order to avoid a bias due to bad performance on rota-rod not related to treatments. Specific procedures were made in independent groups of mice treated with 0.5 or 1.0 g/kg of EO thirty minutes before induction of event. Hypnosis was induced by sodium pentobarbital (40 mg/kg, ip) and the latency and the duration of the sleep was individually recorded. Anxiolytic activity was evaluated for 5 min in the elevated plus maze and in the light/dark box. Convulsive episodes were induced by pentylenetetrazole (PTZ, 85 mg/kg, sc) or by maximal electroshock (MES - 50mA, 60Hz, 0.15s, corneal).

Statistical analysis: Quantitative data were submitted to Kruskal-Wallis non-parametric variance analysis, followed by the Mann-Whitney test, when appropriate. Proportions were compared by Fisher's exact test. Contrasts were made between treated and TW (vehicle) group and differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

The chromatogram obtained by gas chromatography coupled with mass spectrometry is presented in Fig. 1.

The analyses indicated the monoterpene citral, a mixture of the stereoisomers geranial (40.8% - peak 14) and neral (36.3% - peak 12), and beta-myrcene (13.2% - peak 2) as the main compounds in the EO.

insert
figure 1

Acute toxicity: Mice treated with different doses of EO presented some depressant effects such as reduction in general activity, righting and auricular reflexes, placing reactions, equilibrium, touch responses and

strength grasping. These inhibitory effects, mainly related to disturbances of the motor system and coordination, were classified as *discrete* until 1.0g/kg dosage and *moderate* to *serious* at higher doses. Treatment with EO did not present signs of toxicant effects which could be detected by alteration in body weight measured for 15 days (data not shown). One death was registered in the group treated with 5.0g/kg and 3 deaths in the group treated with 3.0g/kg, which would indicate the classification of *slightly toxicant* according to Hodgson (1997).

Open field and rota rod tests: There were no differences between the EO and TW groups for parameters observed in the open field: ambulation; rearing; freezing and grooming, or in the rota rod test when evaluated 30 min, 2h and 24h after treatments. Data obtained 30 min after treatments are presented in Table 1, and the same pattern of results was observed after 2h and 24h (data not shown).

insert
table 1

Assessment of Anxiolytic activity: Results are presented in Fig. 2. In the elevated plus maze the treatment with EO or DZP was effective in increasing the frequency of open-arm entries, expressed as percentage of total arm entries. Treatment with 1.0g/kg or DZP resulted in increase of time spent in the open arms in relation to total time spent inside arms (open + enclosed), as well as in decrease of time spent on the central platform. The total arm entries were not affected by any treatment compared to the TW group. In the light/dark box test, differences among groups were observed in time spent in the light compartment and in number of shuttle crossings. The time spent in the illuminated compartment was significantly enhanced due to treatment with 1.0 g/kg of EO or DZP. There was no observed effect after treatment with EO in transitions between white and black compartments.

insert
figure 2

Assessment of anticonvulsant activity: Occurrences of convulsive episodes after PTZ- and MES-induced seizures are presented in Table 2. In the MES test, 90% of vehicle-treated mice developed typical seizure patterns: the tonic flexion of the limbs occurred immediately after the shock, progressing to tonic extension of hind limbs followed by stupor and recovery. Mice treated with EO were protected against seizure episodes, reducing the occurrence to 40% in mice treated with 0.5 g/kg and to 20% in the group treated with 1.0 g/kg. In the PTZ test, treatment with EO was not able to reduce the occurrence of convulsive episodes. Due to its usual variability, the latency to the first convulsive episode had a weak significance if the occurrence of convulsion was not prevented. However, a difference in latency to clonic episode was observed after treatment with 1.0 g/kg of EO in PTZ-test, in which the latency in seconds was significantly improved from [median (Q1-Q3)] 221 (124-245) in the TW group to 422 (248-823).

insert
table 2

Pentobarbital sleeping time: Induction of sleep occurred in 100% of animals in the group treated with CDZ (total n=11) and in 80% of animals in the TW group (total n=10). EO treated groups presented sleep occurrence of 73% (0.5g/kg – total n=11) and 78% (1.0g/kg – total n=9). There were no significant differences between groups related to sleeping occurrence. Treatment with EO was effective in decreasing the latency to sleep induction after treatment with 0.5 or 1.0 g/kg, as well as after CDZ treatment. Sleep duration was significantly increased after treatments with 0.5 or 1.0 g/kg of EO or CDZ (Table 2). It was observed the occurrence of a deep depression of the CNS in four mice treated with 1.0 g/kg, persistent until 4 hours after barbiturate treatment. In this way, data from these animals were not considered on sleeping time.

Discussion and Conclusions

C. citratus is popularly used in Brazil mainly due to its central nervous system action, with few controlled studies about this type of activity. The present study provided some data on the effects of the essential oil from fresh leaves on the mouse central nervous system, providing information about motor performance, sedative-hypnotic, anxiolytic and anticonvulsant activities.

The rota-rod and open field tests were used to assess the locomotor and exploratory activity and similar performance observed in mice treated with EO in relation to the control group suggests absence of impaired motor coordination, equilibrium or exploratory behavior due to treatment with EO. Absence of effect on motor activity was also observed in elevated plus maze, where treated mice performed similarly to the control mice in relation to total arm entries, a mixed measure that reflects changes in motor activity more than in anxiety (Lister, 1990; File, 2001). In this way, we can accept absence of deleterious effect on coordination and motor activity due to EO treatment at evaluated doses. Decrease in sleeping latency and increase in sleeping time induced by pentobarbital, as observed after treatment with EO, are conventional measures related to a sedative/hypnotic property. Nevertheless, it is a non-specific test, since compounds that decrease the rate of hepatic biotransformation of barbiturates can show the same behavioral effects as central nervous system depressant drugs (Fujimoto et al., 1960). The two main compounds in EO, citral (Nakamura et al., 2003) and myrcene (de-Oliveira, 1997) were recognized as enzyme inducers, suggesting central depressant activity instead nonspecific action upon barbiturate metabolism. This activity was emphasized by the occurrence of deep depression, with respiratory failure, in animals treated with association of 1.0 g/kg of EO and pentobarbital. No similar effect was observed in mice evaluated daily for 15 days or during evaluation of anxiolytic and anticonvulsant activities, which were treated with the same dose of EO alone.

Results obtained on the elevated plus maze after treatment with EO reveal anxiolytic activity, since increases in open-

arm parameters are the most representative indices of anxiolytic activity (Lister, 1990). Time spent on the central platform appears to be related to decision making and/or risk assessment, and the total arm entries is a contaminated measure reflecting changes in anxiety or in general activity (File, 2001). Anxiolytic-like activity was also observed in the light/dark box. In this test, the number of transitions between the light and dark compartments as well as the time spent in the light side are recognized as anxiety indices, despite the transition parameter being highly dependent on locomotor activity (Bourin and Hascoët, 2003). Mice treated with EO at 1.0 g/kg performed the test by increasing the time spent in the light compartment, without changes in the numbers of shuttle crossings, confirming activity upon the main anxiolytic parameter.

The anticonvulsant property was evaluated by experimental procedures widely used to investigate antiepileptic drugs, with high predictive value for detection of clinically effective drugs (White, 1997). EO was able to modify the progress of convulsive episodes induced by both PTZ and MES. The PTZ test identifies drugs with efficacy against non-convulsive absence or myoclonic seizures, acting due to increase of the seizure threshold while the MES test identifies agents active against generalized tonic-clonic seizures due to blocking of seizure spread (Loscher and Schmidt, 1988). Our results suggest that EO from *C. citratus* has the potential to alter the course of convulsive episodes, interfering in seizure threshold and/or blocking seizure propagation. Since isolated citral or myrcene was not able to protect mice against convulsive episodes (Viana et al., 2000b), or to show anxiolytic activity (Vale, 2002), the results obtained with EO are probably due to synergistic action of more than one compound or on account of compounds present in small amounts. Considerations about synergistic action could also be supposed in relation to antinociceptive activity of essential oil from *C. citratus*, acting by central and peripheral mechanisms (Viana et al., 2000a).

The behavioral results obtained with EO from fresh leaves of *Cymbopogon citratus* are in accord with the ethnopharmacological use of this plant, suggesting a sedative/hypnotic, anxiolytic and anticonvulsant activity. This results profile reinforces the biological and cultural value of traditional studies as sources for new drugs for treatment of central disturbances. Meanwhile, it should be pointed out that the effective dose of EO is inconsistent with the amount of fresh leaves used to make a cup of tea, usually 2-10 g. Considering only the extraction yield (0.45%), roughly 200 g of fresh leaves/kg was required for EO doses of 1.0 g/kg. This straightforward reasoning deserves some considerations. Firstly, due to several factors - including the interspecies differences in plasma clearance of drugs, which principally reflects hepatic and renal peculiarities - there is not a definitive rule for extrapolation of doses among species. Another point to consider is the difference in dosage regimen, typically in repeated or chronic intake when the population uses the tea, as opposed to acute treatment employed experimentally. Moreover, compounds extracted from

leaves by warm water – as in tea preparation – could be different or present in unequal proportions in the essential oil; and differences in composition and/or concentration of compounds could interfere with absorption and distribution processes. In this way, the same compound could be present in a soluble form, easily absorbable from the tea, and in a less soluble form in the essential oil. These considerations could be assessable in the continuity of this study in order to improve the knowledge of its pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy and safety in long-term use.

Acknowledgements. We are grateful to Dr. M.O.M.Marques from IAC (Instituto Agronômico de Campinas) for the CG-MS analysis of essential oil. This work was supported by fellowships from CAPES and FAPESP.

References

- Adams, R.P., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream.
- Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. Eur. J. Pharmacol. 463, 55-65.
- Carlini, E.A., Contar, J.D.P., Silva-Filho, A.R., da Silveira-Filho, N.G., Frochtengarten, M.L., Bueno, O.F., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. J. Ethnopharmacol. 17(1), 37-64.
- Carlini, E.A., 2003. Plants and the central nervous system. Pharmacol. Biochem. Behav. 3, 501-512.
- Carvalho-Freitas, M.I.R., Costa, M., 2002. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. Biol. Pharm. Bull. 25(12), 1629-1633.
- De-Oliveira, A.C.A.X., Ribeiro-Pinto, L.F., Otto, S.S., Gonçalves, A., Paumgarten, F.J.R., 1997. Induction of liver monooxygenases by beta-myrcene. Toxicology 124, 135-140.
- Di Stasi, L.C., Santos, E.M.G., Hiruma, C.A., 1989. Plantas medicinais na Amazônia, UNESP, São Paulo, p.194.
- Duke, J.A., 1989. Handbook of Medical Herbs, seventh ed. (reprint) CPR Press, Florida.
- File, S.E., 2001 Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Behav. Brain. Res. 125, 151-157.
- Fujimoto, J.M., Pearce, K.B., Plaa, G.L., 1960. Barbiturate metabolism as affected by certain agents acting on the liver. J. Pharmacol. Exp. Ther. 129, 139-143.
- Hodgson, E. 1997. Toxicity testing and risk assessment. In: Hodgson E, Levi PE (Ed.), Textbook of modern toxicology. Applenton & Lange, Connecticut, pp. 285-337.
- Leite, J.R., Seabra, M.L.V., Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S. et al., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. J.

- Ethnopharmacol. 17(1), 75-83.
- Lister, R.G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology Pharmac. Ther.* 46, 321-340.
- Loscher, W., Schmidt, D., 1988. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.* 3, 145-181.
- McLafferty, F.W., Stauffer, D., 1989. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, vol. 1-2. John Wiley & Sons, New York.
- Nakamura, Y., Miyamoto, M., Murakami, A., Ohigashi, H., Osawa, T., Uchida, K., 2003. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 593-600.
- Phillipson, J.D., 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56, 237-243.
- Pultrini, A.M., Galindo, L.A., Costa, M., 2006. Effect of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.* 78, 1720-1725.
- Seth, G., Kokate, C.K., Varma, K.C., 1976. Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf. on central nervous system. *Indian. J. Exp. Biol.* 14, 370-371.
- Souza-Formigoni, M.L., Lodder, H.M., Gianotti-Filho, O., Ferreira, T.M., Carlini, E.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) II. Effects of daily two months administration in male and female rats and in offspring exposed "in utero". *J. Ethnopharmacol.* 17(1), 65-74.
- Tortoriello, J., Romero, O., 1992. Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Arch. Med. Res.* 23, 111-116.
- Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos Jr., J.G., Viana, G.S.B., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* 9, 709-714.
- Viana, G.S.B., Vale, T.G., Pinho, R.S.N., Matos, F.J.A., 2000a. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 70, 323-327.
- Viana, G.S.B., Vale, T.G., Silva, C.M.M., Matos, F.J.A., 2000b. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Biol. Pharm. Bull.* 23(11), 1314-1317.
- White, H.S., 1997. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. *Epilepsia* 38 (Suppl 1), S9-17.

Figures captions

Figure 1 – Chromatogram obtained by gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Peaks: 2 – beta-myrcene; 12 – neral; 14 – geranial.

Figure 2 – Effect of essential oil on elevated plus maze and on the light/dark box tests.

Upper panel: percentage of entries in open arms; percentage of time spent in open arms; percentage of time spent in central platform and total arm entries on elevated plus maze. Bottom panel: time (s) spent in the light compartment (left scale) and number of transitions between compartments (right scale) on the light/dark box. Results are expressed as median and interquartile range ($Q_1 - Q_3$). EO: essential oil of *C. citratus*; TW: control group (oral route); DZP: diazepam (1.0 mg/kg, ip). The number of animals in each group is in parentheses. * $p < 0.05$, compared with TW group (Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test).

Figure 1

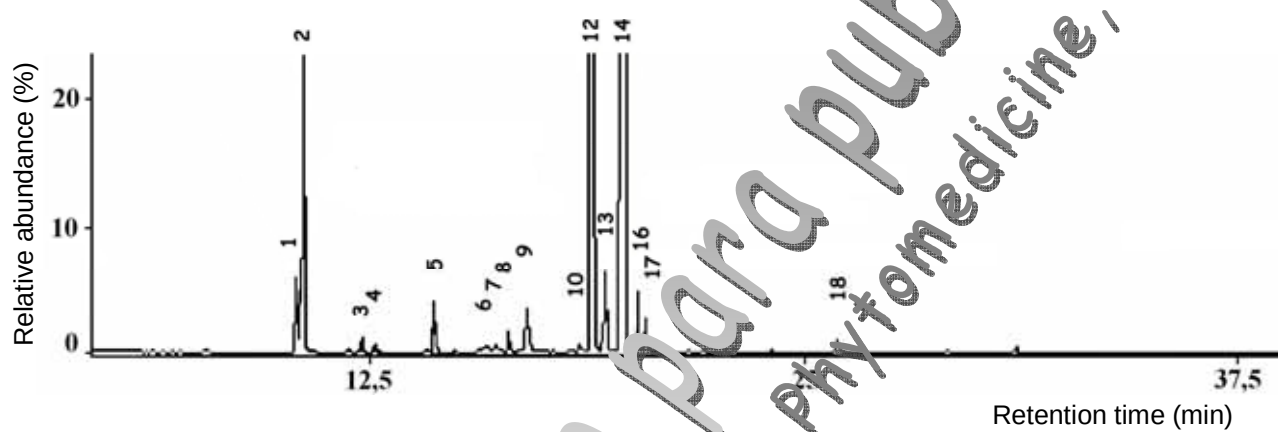


Figure 2

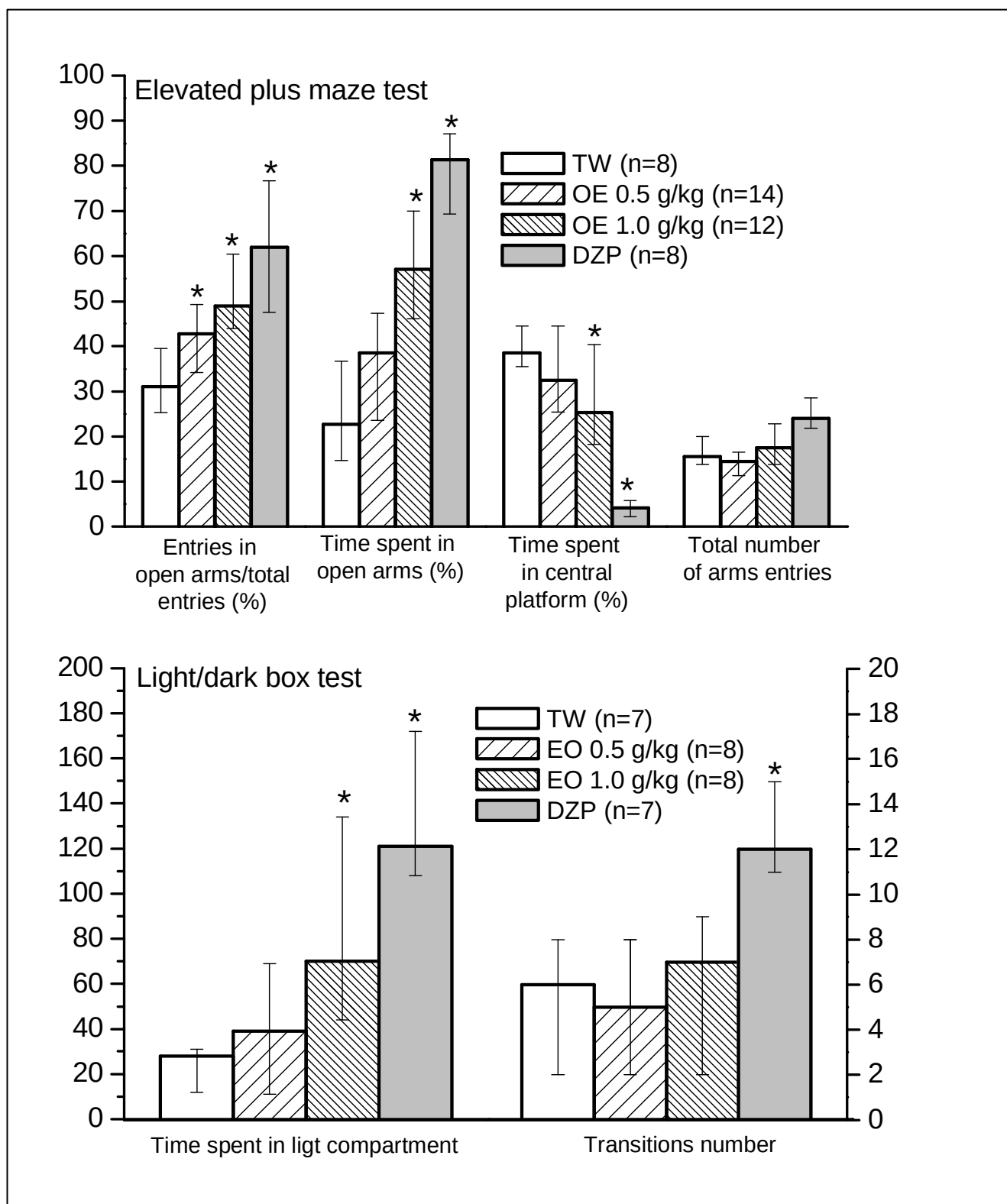


Table 1

Effects of essential oil on open field and rota-rod tests performed 30 min after oral treatment.

Treatment (n)	Parameters in open field				Total time (s) on rota-rod
	Ambulation	Rearing	Grooming (s)	Freezing (s)	
TW (5)	94 (90-110)	24 (23-25)	12 (8-38)	4 (1-11)	160 (111-180)
EO 0.5 g/kg (5)	80 (66-87)	20 (16-20)	3 (1-33)	7 (3-7)	180 (124-180)
EO 1.0 g/kg (5)	85 (80-103)	15 (12-18)	7 (6-12)	8 (2-11)	160 (160-180)

Data are expressed as median and interquartile range (Q₁–Q₃). EO: essential oil of *C. citratus*; TW: control group. Treatments were applied orally. Comparisons were made between treated and TW groups with Kruskal-Wallis Test ($p > 0.05$ in all cases).

Table 2

Effects of essential oil on anticonvulsive (pentylenetetrazole - PTZ and maximal electroshock -MES induced seizures) and sodium pentobarbital sleeping time.

Treatment	PTZ test				MES test			Sleeping time		
	n	Clonic (%)	Tonic (%)	Death (%)	n	Tonic (%)	Death (%)	n	Latency (min)	Duration (min)
TW	19	100	80	80	10	90	10	8	3.6 (3.3-4.7)	28 (25-40)
EO 0.5 g/kg	10	90	80	90	10	40 *	10	8	2.9 (2.4-3.2) #	121 (114-141) #
EO 1.0 g/kg	10	90	60	60	10	20 *	0	7	2.0 (1.8-2.5) #	139 (127-188) #
Standard drug	20	0 *	0 *	0 *	10	0*	0	11	3.0 (2.6-3.4) #	98 (57-131) #

Data are expressed as percentage [PTZ and MES tests] or median and interquartile range (Q₁–Q₃) [sleeping time]. EO: essential oil of *C. citratus*; TW: control group. Standard drug for PTZ test and sleeping time:

CDZ; for MES test: ACV. $p < 0.05$ when compared with TW group: * Fisher's exact test; # Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test.



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 011/06-CEEA, sobre “*Modelos experimentais de sedação/hipnose 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



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 GANEO DE MELLO
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA