

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

*“Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do
óleo essencial das cascas de frutos de espécies
do gênero Citrus”*

Orientadora: Profª. Drª. Mirtes Costa

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).

André Costa Gargano

Botucatu – SP
2007



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

Gargano, André Costa.

Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas de frutos de espécies do gênero *Citrus* / André Costa Gargano. – Botucatu : [s.n.], 2007.

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

Orientadora: Mirtes Costa

Assunto CAPES: 21000000

1. Neuropsicofarmacologia 2. Plantas medicinais

CDD 581.634

Palavras-chave: Ansiedade; *Citrus sp*; Óleo essencial; Sono induzido por éter

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

*“Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do
óleo essencial das cascas de frutos de espécies
do gênero Citrus”*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).

Comissão Examinadora:

1º Titular/Presidente: Prof^ª Dr^a Mirtes Costa
2º Titular: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento
3º Titular: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
1º Suplente: Prof^ª Dr. Luiz Cláudio Di Stasi
2º Suplente: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

André Costa Gargano

Botucatu – SP
2007



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente a minha família sem exceção. Minha mãe, pela luta constante sem nunca fraquejar a todas as barreiras impostas nesta vida. A meu pai, por ser acima de tudo um batalhador e possuir uma honestidade sem tamanho a qual me orgulho. A meu irmão pelo companheirismo sem igual.

Vocês sempre foram a base de tudo

Dedico também este trabalho ao meu falecido avô, a qual me deixou imensas saudades, mas acima de tudo maravilhosas lembranças. Com certeza você estará sempre entre nós.



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer especialmente a minha orientadora Profª Drª Mirtes Costa por todos os ensinamentos e orientações durante esses anos, nos quais com certeza foi de grande importância para minha formação;

Aos membros da banca por aceitarem o convite e com certeza contribuírem com o melhor desenvolvimento deste trabalho com idéias e opiniões;

Aos amigos de república, Marco e Yuri e demais moradores que hoje estão distantes, mas sempre presentes durante a faculdade, pelos sete anos de convivência e todos os momentos vivenciados e apoio nas horas difíceis;

As demais Repúblicas e amigos (as), principalmente Kabaré e Vira-Lata, na qual mostraram amizade sempre presente. Obrigado pela hospedagem;

Aos parceiros de laboratório, Eduardo e Celso, pela ajuda nos experimentos e companheirismo. Obrigado também a nova geração, seja bem vinda no laboratório Valéria;

Agradeço aos demais amigos dos laboratórios vizinhos, Walter, Leo, Hélio, Fábio, Cynthia, Nervoso e demais departamentos;

A todos meus amigos de jogo feitos ao longo destes dois anos que se mostraram presentes tanto on-line como na vida real;

Agradeço de coração a Isabel pela amizade acima de tudo (você é eternamente responsável por aqueles que cativa – continuo acreditando nisso) e a Joyce que apesar de uma amizade recente já provou diversas vezes ser verdadeira e de extrema confiança;

A todos os professores e funcionários da Farmacologia, pois também sempre estiveram presentes nestes dois anos de dissertação;

Obrigado ao pessoal da pós-graduação pelo auxílio às diversas dúvidas (e não foram poucas) no decorrer deste Mestrado;

Agradeço a CAPES pelo auxílio que proporcionou o desenvolvimento desta pesquisa;



RESUMO

A ansiedade é um dos principais distúrbios do sistema nervoso central (SNC) de alta prevalência, cujas ferramentas terapêuticas disponíveis apresentam efeitos colaterais importantes ou não são ativas em parte dos pacientes. Deste modo, a avaliação de novos compostos com potencial atividade ansiolítica pode trazer novas alternativas de tratamento, mais eficazes e seguras. Preparações com base em informações quimiotaxonômicas podem ser uma promissora fonte de novas moléculas com atividade sobre o SNC. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, no modelo do teste de esconder esferas e caixa claro e escuro, um possível efeito ansiolítico das espécies de *Citrus latifolia* (CL) e *Citrus reticulata* (CR), atividade previamente detectada no *Citrus aurantium* (CA). O estudo do perfil da atividade farmacológica foi complementado com a avaliação dos possíveis efeitos sedativos, por meio do teste de sono induzido por éter etílico e a integridade do sistema motor foi avaliada com a utilização do teste da barra giratória. Os diferentes modelos experimentais estão relacionados a diferentes aspectos dos transtornos ansiosos. Assim, enquanto o procedimento do teste de esconder esferas parece refletir o transtorno obsessivo-compulsivo, a caixa claro escuro reflete o transtorno da ansiedade generalizada. Os tratamentos dos óleos essenciais (OE) foram todos realizados oralmente por gavagem e os resultados comparados com seus respectivos grupos-controle, tratados com o volume equivalente do veículo utilizado para a solubilização do OE. No procedimento do teste de esconder esferas, o OE das cascas dos frutos de CL apresentou atividade ansiolítica nas doses de 1,0 e 1,5g/kg e CR somente na maior dose de 1,5g/kg. No procedimento da caixa claro escuro, CL demonstrou atividade ansiolítica na dose de 0,5g/kg, porém CR não foi capaz de alterar os parâmetros avaliados. No teste de sono induzido por éter etílico, os OE de CL, CR e CA apresentaram efeito na maior dose de 2,0g/kg, enquanto CA foi capaz de alterar ainda a latência na dose de 1,0g/kg. Nenhum OE ou droga-padrão avaliada na barra giratória apresentou prejuízo motor, assim pode-se afirmar que o efeito ansiolítico encontrado nos OE não é devido a alterações no sistema motor.



ABSTRACT

The anxiety is one of the main disturb of the central nervous system (CNS) of high prevalence, whose available therapeutical tools present important collateral effect or are not active in part of the patients. In this way, the evaluation of new compounds with potential anxiolytic activity can bring new alternatives of treatment, more efficient and safe. Preparations with basis of quimiotaxonomy information can be a promising source of new molecule with activity on the CNS. Thus, the objective of this work was to evaluate, in the model of the marble burying test and light/dark box test, a possible anxiolytic effect of the species of *Citrus latifolia* (CL) and *Citrus reticulata* (CR), activity previously detected in the *Citrus aurantium* (CA). The study of the profile of the pharmacology activity was complemented with the evaluation of the possible sedative effect, by means of the sleep induced by diethyl ether test and the integrity of the motor system was evaluated with the use of the rota-rod test. The different experimental models are related with the different aspects of the anxious disturbs. Thus, while the procedure of the marble burying test seems to reflect the obsessive-compulsive disorder, the light/dark box test reflect the generalized anxiety disorder. The treatments of essential oils (EO) had been all realized orally by gavage and the results compared with its respective group-control, treated with the volume equivalent to the vehicle used for the dissolved of the EO. In the procedure of the marble burying test, the EO of the rinds of the fruits of CL only presented anxiolytic activity in the doses of 1,0 and 1,5 g/kg and CR in the high dose of 1,5g/kg. In the procedure of the light/dark box test, CL demonstrated anxiolytic activity in the dose of 0,5g/kg, however CR was not capable to modify the evaluated parameters. In the sleep induced by diethyl ether test, the EO of CL, CR and CA had presented effect in the high dose of 2,0g/kg, while CA was capable of modify the latency in the dose of 1,0g/kg. None OE or positive control evaluated in the rota-rod test presented motor damage, thus can be affirmed that the anxiolytic effect in the EO does not have the alterations in the motor system.



SUMÁRIO

1 – Introdução.....	01
2 – Objetivos.....	10
3 – Material e Métodos.....	11
3.1 – Material Vegetal.....	11
3.2 – Obtenção e identificação da composição química dos óleos essenciais.....	11
3.3 – Animais.....	13
3.4 – Procedimentos Gerais.....	13
3.5 – Avaliação da atividade ansiolítica.....	14
a) Teste de esconder esferas.....	14
b) Caixa claro/escuro.....	16
3.6 – Atividade Sedativa.....	17
3.7 – Avaliação da integridade do sistema motor.....	18
3.8 – Análise Estatística.....	19
4 – Resultados.....	21
4.1 – Rendimento das extrações dos óleos.....	21
4.2 – Teste de esconder esferas.....	22
4.3 – Caixa claro/escuro.....	27
4.4 – Avaliação da atividade sedativa.....	30
4.5 – Avaliação da ação sobre o sistema motor.....	33
5 – Discussão.....	35
6 – Conclusões.....	42
7 – Referências Bibliográficas.....	44
8 – Anexos.....	55



INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

A ansiedade é um dos mais freqüentes distúrbios do sistema nervoso central (SNC) e estima-se que aproximadamente 27 milhões de americanos são afetados por esta desordem (DUPONT et al., 1996). Um estudo do Epidemiologic Catchment Area (ECA) de 1988 nos Estados Unidos, revelou que as desordens ansiosas afetam 12,3% da população (REGIER et al., 1993). No Brasil, um estudo semelhante de morbidade psiquiátrica em adultos, realizado nas capitais brasileiras de Brasília, São Paulo e Porto Alegre, demonstrou que os transtornos ansiosos afetam 12,1%, 6,9% e 5,4% da população respectivamente, encontrando-se em primeiro lugar entre os mais prevalentes diagnósticos psiquiátricos (ALMEIDA FILHO et al., 1992). Esta desordem é considerada um significativo problema de saúde pública, afetando um amplo segmento da população e ocasionando grandes gastos relacionados diretamente com os cuidados da doença e hospitalizações ou, indiretamente, como no caso de mortalidades e morbidades (BALLENGER, 2000).

A ansiedade é uma condição afetiva de difícil delimitação teórica e está intimamente associada ao medo, porém enquanto este é fruto de um perigo reconhecido, na ansiedade a ameaça é incerta e indefinida (GRAEFF, 1999; PEREIRA, 2004). De modo geral os quadros ansiosos podem ser definidos como um estado de apreensão ou tensão, difuso ou vago, freqüentemente acompanhado por uma ou mais sensações físicas, associados com um estado de excitação autonômica, como suar, confusão, e respiração ofegante (mais notável em pacientes com ataques de pânico), ou queixas somáticas mais generalizadas como insônia, agitação e dor muscular (GELENBERG, 2000; BRANDÃO, 2001).

É consensual na psiquiatria aceitar-se que todo ser humano tem um *quantum* de ansiedade considerada normal e de valor adaptativo, visto que esta ansiedade é um fenômeno conhecido pelo homem há milhares de anos e não seria um exagero dizer que esse sentimento foi um dos responsáveis pela sobrevivência humana na Terra. O medo do ataque de predadores e a antecipação mental desta possibilidade (característica típica da ansiedade) levaram o homem a adotar estratégias eficazes de fuga ou enfrentamento, resultando na manutenção da espécie (SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004). A distinção entre o estado ansioso patológico e o normal não tem contornos nítidos, mas representa o ponto no qual os sintomas interferem com as atividades produtivas normais. Sabe-se que um pouco de ansiedade é necessário para um melhor desempenho nas tarefas cognitivas, porém quando em exagero pode ser inadequada, perturbando acentuadamente o desempenho. Neste caso pode-se falar em ansiedade patológica, que pode ser considerada uma resposta inapropriada a um estímulo, em virtude de sua intensidade ou duração, e será alvo de intervenção médica quando for desproporcional às possíveis causas aparentes, muito persistente e interferir no funcionamento global do indivíduo de maneira significativa (PAPROCKI, 1990; BRANDÃO, 2001).

A classificação dos transtornos de ansiedade surgiu tardiamente dentro das classificações de transtornos mentais por dois motivos principais: a) não eram reconhecidos como entidades clínicas distintas e b) as primeiras classificações oficiais de que se tem notícia se destinavam basicamente a registrar os pacientes internados em instituições psiquiátricas, deste modo, os sintomas ansiosos quando descritos eram relacionados à depressão grave (FIGUEIREDO, 2004). Além deste surgimento tardio, a classificação dos quadros de transtornos ansiosos vem sofrendo várias alterações com o passar dos anos e atualmente o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-IV) classifica os transtornos ansiosos em onze tipos diferentes.

O transtorno da ansiedade generalizada (TAG) caracteriza-se por uma ansiedade ou preocupação excessiva, na maioria dos dias, por pelo menos seis meses, acompanhada de pelo menos três sintomas que podem incluir inquietação, fadigabilidade, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular ou transtorno do sono. Tais sintomas indicam mal funcionamento no mecanismo de resposta ao estresse. Nesse contexto podemos entender os indivíduos com ansiedade generalizada como pessoas cronicamente preocupadas, inibidas, meticolosas e emocionalmente sensíveis (FIGUEIREDO, 2004; SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004).

O TAG é um transtorno que afeta mais o sexo feminino do que o masculino numa proporção de 2:1 (MURPHY et al., 1988; BLAZER et al., 1991; NARDI et al., 1997) e é provavelmente a desordem que mais se tem encontrado coexistindo com outras desordens mentais, usualmente outro tipo de transtorno de ansiedade ou desordens do humor, fazendo com que o seu diagnóstico diferencial se torne uma tarefa particularmente complexa (BLAZER et al., 1991, FIGUEIREDO, 2004).

O transtorno obsessivo compulsivo (TOC) também apresenta aspectos clínicos semelhantes a vários transtornos mentais podendo confundir os limites diagnósticos (TORRES, 2004). Segundo Cartwright e Hollander (1997), o TOC emergiu como uma importante categoria de desordens que afeta cerca de 10% da população dos Estados Unidos. Esta é uma doença comum e potencialmente incapacitante que consiste em um amplo e instigante espectro de sintomas, não apenas de natureza ansiosa, mas com características que o aproximam de outros transtornos mentais, ao mesmo tempo em que mantém algumas especificidades clínicas, psicopatológicas e cognitivas (CLUVER e SCHUYLER, 2002; TORRES, 2004). No TOC, as características essenciais são obsessões e compulsões recorrentes, suficientemente graves para consumir tempo (mais de uma hora por dia), causar sofrimento acentuado ou prejuízo significativo,

reconhecidas pelo indivíduo como “excessivas e irracionais”. As obsessões podem ser definidas como idéias, pensamentos, impulsos ou imagens persistentes, que são vivenciados como intrusivos e inadequados e causam acentuada ansiedade e sofrimento, enquanto as compulsões seriam comportamentos repetitivos (ex.: lavar mãos, ordenar coisas) ou atos mentais (ex.: contagem, orar, repetir palavras), cujo objetivo seria prevenir ou reduzir a ansiedade. Portanto, enquanto as obsessões gerariam desconforto emocional ou ansiedade, os rituais compulsivos tenderiam a aliviar esse mal-estar, não sendo em si prazerosos (FIGUEIREDO, 2004; TORRES, 2004). Ao contrário do TAG, o TOC não apresenta diferenças significativas de prevalência na idade adulta entre os dois sexos, porém pode acometer mais meninos durante a infância (FLINT, 1994; LECKMAN et al., 1995).

A distinção entre o transtorno de ansiedade generalizada e do transtorno obsessivo compulsivo é que no TAG o conteúdo das cognições ansiogênicas tende a ser mais realístico que no TOC, envolvendo preocupações excessivas com problemas reais do dia-a-dia, sem caráter mágico (RASMUSSEN e EISEN, 1992).

Da mesma maneira que os critérios diagnósticos dos transtornos ansiosos foram se modificando ao longo do tempo, o tratamento dessas condições também evoluiu. O tratamento do TAG pode ser dividido em duas abordagens comprovadamente eficazes: farmacoterapia e psicoterapia. A experiência clínica sugere que a psicoterapia, qualquer que seja sua orientação, aumenta a adesão ao tratamento farmacológico e sua eficácia, diminuindo sua duração (NARDI et al., 1997). A abordagem farmacológica para o TAG compreende uma vasta gama de farmacoterápicos. Durante muitos anos, os benzodiazepínicos (BDZ) foram os fármacos de escolha utilizados, pois são eficazes no controle dos sintomas ansiosos e apresentam a vantagem de oferecer alívio num curto espaço de tempo (SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004). Os BDZ foram descobertos na

década de 1960 e prescritos para milhares de pessoas nas últimas décadas (ROSENBAUM, 2005). O tratamento do TOC pauta-se fundamentalmente em abordagens psicoterápicas e no uso de medicamentos antidepressivos de ação serotoninérgica, sejam eles tricíclicos ou inibidores da recaptação da serotonina. Já BDZ não têm papel central neste tratamento (TORRES, 2004).

Segundo Andreatini e colaboradores (2001), na década de 1990 houve os maiores avanços em compreender as bases neuroanatômicas e neurohumorais da ansiedade, assim como a farmacologia e a psicoterapia do tratamento das desordens ansiosas. Embora na gênese da ansiedade estejam envolvidos diversos sistemas de neurotransmissores integrados, os medicamentos mais comumente empregados no tratamento das desordens ansiosas vão envolver os sistemas GABAérgico e serotoninérgico (NUTT et al., 2002).

Dois achados marcaram a descoberta do modo de ação dos benzodiazepínicos. O primeiro foi a identificação dos receptores BDZ nos neurônios do SNC, e o segundo, que as drogas BDZ facilitam a ação do neurotransmissor GABA (GRAEFF, 1999). O GABA é um importante e abundante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso dos mamíferos. Os BDZ ao atuarem nos receptores GABA_A, acoplados ao canal iônico de cloreto no SNC, inibirão a atividade neuronal, aumentando o influxo de íon cloreto nos neurônios, hiperpolarizando a célula nervosa, o que ocasionaria os efeitos inibitórios (ROSENBAUM, 2005).

Por outro lado, o principal problema do uso terapêutico dos BDZ é que o transtorno da ansiedade generalizada é uma doença crônica que necessita de tratamento em longo prazo (SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004). O uso prolongado dos BDZ pode causar declínio de todos os domínios cognitivos como atenção/concentração, solução de problemas, inteligência geral, velocidade psicomotora, processamento sensorial,

memória verbal e velocidade de processamento do controle motor/desempenho (BARKER et al., 2004). Mesmo o uso de BDZ em curto prazo tem sido associado com algumas alterações como sedação, comprometimento psicomotor, amnésia anterógrada e dificuldade de aprendizagem de novos materiais (BUFFET-JERROT et al., 1998), sendo que pode ocorrer síndrome de abstinência, tolerância e dependência. A tolerância aos efeitos ansiolíticos do diazepam pode ser observada em camundongos após duas semanas de tratamento (FLAISHON et al., 2003). Em humanos, não está bem estabelecido que o tratamento a longo prazo com BDZ possa causar tolerância (CARLSON e ROY-BYRNE, 2002).

Nos últimos 10 anos a terapêutica da ansiedade tem sido beneficiada dos antidepressivos. O sucesso desses fármacos no tratamento do transtorno do pânico fez com que as pesquisas se expandissem para outros transtornos ansiosos, como por exemplo, o transtorno obsessivo compulsivo. Os antidepressivos mais estudados são os inibidores da recaptação das monoaminas: noradrenalina e/ou serotonina. Esses fármacos têm se mostrado muito eficazes e com boa tolerabilidade, porém levam de quatro a oito semanas para apresentar resultados (SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004). Além disso, importantes efeitos colaterais produzidos pelos antidepressivos, como boca seca, visão turva, constipação e retenção urinária, pode limitar o seu uso em certos pacientes (BALLENGER, 2001).

Tendo em vista o padrão de eficácia apresentado pelas drogas atualmente disponíveis para o tratamento dos transtornos de ansiedade, são necessárias pesquisas de novos compostos. A pesquisa com produtos naturais é uma fonte promissora na obtenção de novas moléculas com potencial atividade farmacológica, inclusive sobre o SNC. A história testemunha a importância das espécies vegetais na cultura dos povos. O homem as utiliza para grande diversidade de fins, desde o seu suprimento alimentar ao

emprego como recurso na obtenção de seus bens materiais e forma de expressão cultural ressaltando-se o uso para o tratamento de doenças (CALIXTO, 2000; SCHENKEL et al., 2000). A atividade ansiolítica e/ou antidepressiva de alguns farmacoterápicos tem sido melhorada pela combinação de seu uso com óleos essenciais de diferentes espécies vegetais, resultando na redução da dose dos medicamentos e, portanto, nos seus efeitos colaterais (KOMIYA et al., 2006).

O óleo essencial obtido das cascas das frutas de *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) já teve suas propriedades ansiolíticas demonstradas em trabalhos anteriores (CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; PULTRINI et al., 2006). Esta espécie é popularmente empregada para curar ou aliviar insônia, tratar nervosismo, ansiedade e histeria, e as flores são utilizadas com fins sedativos (SANTOS et al., 1988, SANGUINETTI, 1989, VASQUEZ et al., 1997, MEDICAL ECONOMICS COMPANY, 2000; LEHRNER et al., 2000). Compostos de fragrância pura e óleos essenciais têm vários efeitos em humanos e em outras espécies de mamíferos quando inaladas ou ingeridas, e muitos estudos desses compostos e óleos tem sido conduzidos. Em camundongos, a inalação de óleo essencial de limão (KOMIYA et al., 2006), a administração do óleo de *Rosa centifolia* (UMEZU, 1999; UMEZU et al., 2002) e a administração de óleo essencial de *Passiflora incarnata* (DHAWAN et al., 2001), demonstraram efeito ansiolítico. Tal efeito biológico também pode ser observado em humanos, visto que em trabalho realizado com homens e mulheres expostos a gotas de óleo essencial de *Citrus sinensis*, dispersas na ante-sala de um consultório odontológico, provocou um efeito relaxante nos pacientes, especificamente no caso das mulheres, que apresentaram menor nível de ansiedade, melhora no humor e maior estado de tranquilidade (LEHRNER et al., 2000).

A escolha da espécie *Citrus aurantium* como objeto de estudo foi feita utilizando-se a estratégia etnofarmacológica, segundo a qual as espécies são selecionadas de acordo com o uso popular. Gottlieb e Borin (2000) defendem o uso da estratégia quimiotaxonômica, segundo a qual são avaliadas espécies taxonomicamente próximas de uma cuja atividade já foi detectada.

Seguindo a estratégia quimiotaxonômica, e considerando a disponibilidade e facilidade de acesso, outras espécies do gênero *Citrus* foram avaliadas quanto ao seu potencial atividade sobre o SNC.

A espécie *Citrus latifolia* Tanaka, conhecida popularmente como limão-tahiti ou lima da pérsia é uma lima ácida originária na Índia e no sul da Ásia. É uma das espécies de *Citrus* mais rústicas, se desenvolvendo bem em solos pobres, porém é um dos menos resistentes a climas frios (PIO CORRÊA, 1984). Esta fruta é freqüentemente usada indiscriminadamente no lugar do limão, com o qual compartilha muitas qualidades. *Citrus latifolia* é usada popularmente em casos de febres, infecções, friagens e dores de garganta (LAWLESS, 1995).

A espécie *Citrus reticulata* Blanco, conhecida popularmente como tangerina, mexerica, bergamota, mandarina e laranja-cravo é uma planta originária na Ásia, introduzida e largamente cultivada no Brasil (MAIA et al., 2001). Esta planta é utilizada popularmente como digestiva, antiséptica, diurética e sua atividade sobre o Sistema Nervoso Central inclui ações sedativa, contra nervosismo e agitação (LAWLESS, 1995).

Os modelos experimentais utilizando-se de roedores para avaliação da atividade ansiolítica são diversos e ainda não há um consenso na literatura a respeito daquele mais específico ou com maior poder preditivo, ou seja, prever se a substância que está sendo testada tem ou não potencial para ser usada no tratamento dos transtornos de ansiedade

(ZANGROSSI e GRAEFF, 2004). Segundo o pesquisador inglês Richard Lister (1990) um modelo animal ideal deveria reproduzir todas as características do fenômeno que procura investigar, sendo desta forma mais uma reprodução do que um modelo. No caso dos transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, tais modelos ideais parecem não existir. Deste modo, os modelos animais de ansiedade são tentativas de se modelar em animais de laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia ou tratamento da ansiedade (ZANGROSSI e GRAEFF, 2004).

Como ainda não há consenso na literatura a respeito do modelo mais específico para a avaliação da atividade ansiolítica, para este trabalho foram escolhidos os modelos não condicionados como: caixa claro-escuro e teste de esconder esferas, que apresentam sensibilidade diferenciada para as drogas atualmente disponíveis na terapêutica dos transtornos ansiosos, como os derivados BDZ e os antidepressivos tricíclicos, respectivamente. Os BDZ não apresentaram ser uma boa alternativa no procedimento do teste de esconder esferas, pois acarretam em déficit no sistema motor dos animais, impossibilitando estes de realizarem os seus comportamentos (Pultrini et al., 2006), deste modo uma nova droga-padrão foi necessária para validar este procedimento experimental. O estudo do perfil da atividade farmacológica foi complementado com a avaliação dos possíveis efeitos sedativos, por meio do teste de sono induzido por éter, e a integridade do sistema motor foi avaliada com a utilização do teste da barra giratória.

Assim, os óleos essenciais da cascas dos frutos de *Citrus latifolia* e *Citrus reticulata* foram avaliados com a finalidade de se fazer a comparação com a atividade biológica já detectada em *C. aurantium*.



OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

1. Estabelecer os parâmetros experimentais adequados para a utilização da imipramina como droga-padrão no procedimento experimental do Teste de Esconder Esferas.
2. Avaliar se os animais retornam ao seu desempenho basal (antes do tratamento) após a reexposição tardia no teste de esconder esferas.
3. Avaliar a atividade farmacológica dos óleos essenciais obtidos de diferentes espécies de *Citrus* em procedimentos experimentais adequados para detectar atividade ansiolítica e sedativa.
4. Avaliar a interferência dos óleos essenciais sobre o sistema motor.



MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material Vegetal

Os frutos de *Citrus aurantium* L. (CA) e *Citrus reticulata* Blanco (CR) foram obtidos de espécimes cultivadas em área do Instituto de Biociências (IB) na UNESP - Campus de Botucatu, enquanto o *Citrus latifolia* Tanaka (CL) foi obtido de espécime cultivado em pomar caseiro, localizado no município de Botucatu.

As espécies de CL e CR foram identificadas pelo professor Vinícius Castro Souza do departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e avaliadas em procedimentos de ansiedade e sedação. Enquanto a espécie CA foi identificada e depositada no herbário da UNESP – Botucatu e avaliada somente no teste do sono induzido por éter etílico.

3.2 – Obtenção e identificação da composição química dos óleos essenciais (OE)

Imediatamente após a coleta, as cascas dos frutos foram submetidas à extração do OE por hidrodestilação, com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger (Figura 1). O material vegetal foi cortado em pedaços homogêneos e misturado com água destilada dentro de um balão volumétrico e posto sobre uma manta aquecedora. Assim que o conteúdo entrou em ebulição, o vapor resultante passou por um condensador, retornando ao estado líquido e sendo depositado em um compartimento onde a água foi separada do OE por princípio de densidade. Os óleos essenciais assim obtidos foram armazenados sob refrigeração em frascos protegidos da luz.



Figura 1 – Hidrodestilador utilizado para extração do óleo essencial das cascas dos frutos

Alíquotas dos óleos foram encaminhadas para a identificação de seus principais componentes. Tal procedimento foi realizado pela Dra. Márcia Ortiz no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A identificação das substâncias foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30m x 0,25mm x 0,25µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70eV.). 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 e 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 (C_9H_{20} - $C_{25}H_{52}$, 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 e KRATZ, 1963).

3.3 – Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com 60 dias de idade, pesando entre 40-50 gramas, originados no Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições controladas de luz (fase claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso de água e alimento por um período mínimo de uma semana até serem utilizados nos procedimentos experimentais.

3.4 – Procedimentos Gerais

Os testes foram realizados em uma sala isolada com som atenuado, controle de temperatura e luminosidade e exaustão de ar, na qual nenhuma outra atividade estava sendo realizada no momento do experimento. As sessões experimentais foram realizadas sempre no mesmo período do dia para evitar qualquer variação devido ao ciclo circadiano dos animais. Duas horas antes do início dos experimentos, os animais foram trazidos para o laboratório para habituação, onde permaneceram sem acesso a água e alimento até o final dos procedimentos experimentais. O período de jejum de duas horas é suficiente para o completo esvaziamento gástrico, condição importante para homogeneidade de absorção.

Os OE das espécies de *Citrus* testadas foram administrados por via oral, por meio de uma cânula gástrica. Esses OE foram solubilizados com auxílio monoleato de polioxietilenossorbitano (Tween 80® a 12%, Synth, Brasil), agente que também foi utilizado como controle negativo, administrado via oral. O diazepam e imipramina, controles positivos utilizados para a sessão experimental, foram solubilizados em salina 0,9% e a administração foi realizada por via intraperitoneal.

Todos os procedimentos experimentais utilizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) (Anexos I).

3.5 – Avaliação da atividade ansiolítica

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

Este procedimento foi bem descrito em ratos por Poling e colaboradores (1981), mas também tem seus resultados bem reproduzidos em camundongos, visto que os roedores exibem o comportamento de esconder esferas na presença de estímulos aversivos como uma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados (BROEKKAMP et al., 1986).

Após os tratamentos aos quais os diferentes grupos de animais foram submetidos, cada camundongo foi colocado individualmente em uma das gaiolas-teste, medindo 27 cm de comprimento, 16 cm de largura e 13 cm de altura com o fundo recoberto por uma camada de 5 cm de maravalha, sobre a qual foram distribuídas de maneira uniforme 25 esferas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. Segundo Njung’e e Handley (1990) os animais sem tratamento escondem um maior número de esferas quando elas estavam espalhadas de forma uniforme do que quando agrupadas no centro ou nos cantos.

Cada camundongo permaneceu durante 30 minutos, sendo então retirado para contagem das esferas escondidas. Foram consideradas escondidas aquelas que estavam totalmente cobertas pela maravalha (Figura 2B). Para evitar que os animais se esquivem do contato com as esferas, cada gaiola-teste permanece coberta por uma placa de acrílico transparente, lisa, com pequenos furos para ventilação (Figura 2A).

Foram submetidos aos procedimentos experimentais os animais previamente selecionados utilizando-se como critério de seleção o comportamento de esconder pelo menos 13 das 25 esferas em três dias consecutivos anterior ao dia do teste. A pré-seleção indica o nível de ansiedade basal dos animais e é recomendada para diminuir a variabilidade dos resultados (BROEKKAMP et al., 1986). Este procedimento atesta a consistência do comportamento de esconder as esferas, que não se extingue com a re-exposição, caracterizando o procedimento como modelo para o TOC. Na literatura encontram-se outros indícios que relacionam este modelo com o TOC, como o fato das drogas eficazes neste transtorno, por exemplo os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (CARTWRIGHT e HOLLANDER, 1998), influenciarem no número de esferas escondidas pelos roedores. Estudos sobre o comportamento dos camundongos evidenciaram que após terem sido expostos às esferas de vidro, eles exibem intensa atividade de esconder mesmo em sua ausência. Tal comportamento compulsivo contribui para sustentar a hipótese de que este modelo esteja relacionado com o TOC (GYERTAN, 1995).

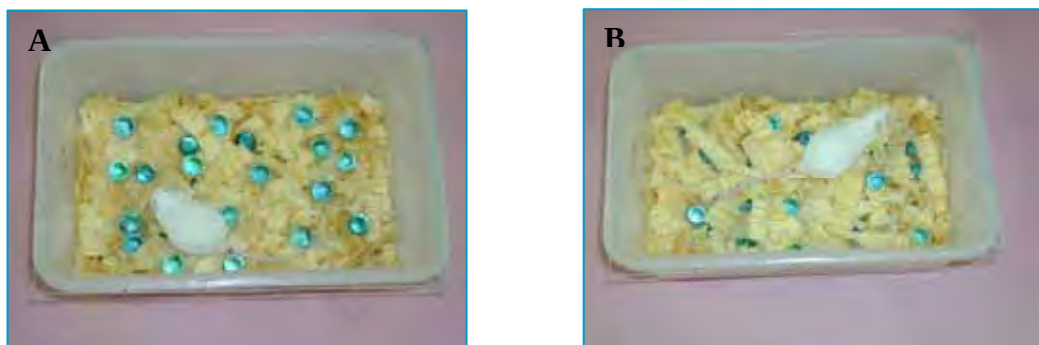


Figura 2 – Gaiola-teste utilizada no teste de esconder esferas

A – no início do procedimento

B – no final do procedimento

❖ Caixa Claro/Escuro (“Light/Dark Box”)

O procedimento experimental da Caixa Claro/Escuro (CCE) foi elaborado por Crawley e Goddwin em 1980. Este modelo experimental apresenta um alto grau de homologia para o TAG (ZANGROSSI Jr. & GRAEFF, 2004), e é baseado no conflito natural que ocorre quando os animais são expostos a um ambiente não familiar. Tal conflito é gerado devido à tendência exploratória natural dos roedores e a tendência 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 o ambiente claro e escuro, sem um aumento na locomoção espontânea, é considerado reflexo da atividade ansiolítica (BOURIN & HASCÖET, 2003).

A CCE é composta por uma arena em acrílico (46 x 27 x 30cm de altura) dividida em dois compartimentos: o menor (15 x 27 x 30 cm) é preto e dotado de tampa, e o maior (31 x 27 x 30 cm) é branco e iluminado diretamente por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20 W. Os dois compartimentos são separados por uma placa de acrílico preta de 27 x 30cm (base x altura) com uma abertura de 7,5 x 7,5cm localizada no centro da divisão, ao nível do chão (Figura 3).

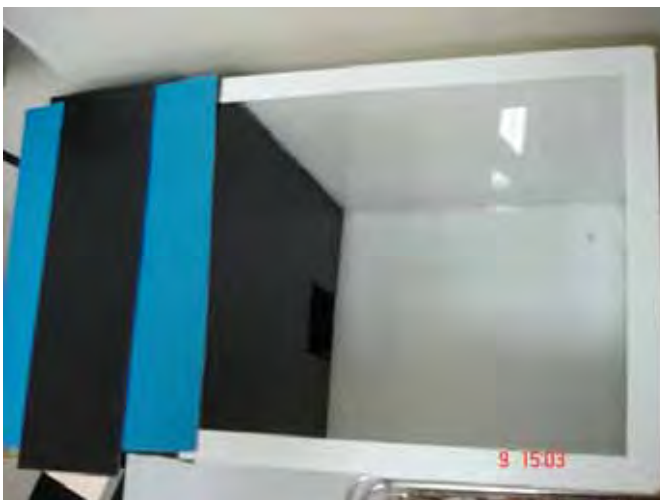


Figura 3 – Aparato da caixa claro/escuro

Cada camundongo foi colocado individualmente no centro da parte iluminada de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa. Os comportamentos executados durante 5 minutos após a sua primeira entrada no lado escuro foram registrados em fita de vídeo (VHS) para posterior quantificação dos seguintes parâmetros comportamentais: número de transições entre os dois compartimentos; tempo gasto no compartimento claro; e número de levantamentos (“rearing”) realizados no compartimento claro.

A transição (entrada em um compartimento) é definida como a passagem das quatro patas do animal pela divisória e serve como medida da atividade locomotora. O levantamento, índice de exploração, 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. Depois do período de observação o animal será retirado e o aparelho limpo com uma esponja embebida em água (COSTALL et al., 1989; CRAWLEY & GODDWIN, 1980; LEPICARD et al., 2000).

3.6 – Atividade Sedativa

❖ Sono Induzido por Éter Etílico

A atividade sedativa das espécies de *Citrus* foi avaliada no modelo de sono induzido por éter etílico. A efetividade dos OE foi medida pela sua capacidade em reduzir a latência e/ou aumentar o tempo de duração do sono, quando comparada com o veículo - grupo controle negativo. A droga padrão utilizada como controle-positivo foi o diazepam na dose de 5 mg/kg.

Trinta minutos após o tratamento com os diferentes óleos, os animais foram induzidos ao sono pela inalação de éter etílico em câmara saturada. A câmara é composta por um frasco hermético com capacidade para 3 L, na qual um pedaço de algodão embebido por 5 ml de éter era fixado em sua tampa (Figura 4A). O tempo entre a colocação do animal na câmara, e a perda do reflexo postural, foi considerado como a latência para o início do sono (Figura 4B). O animal ainda permanece na câmara por 60 segundos após a perda de seus reflexos, para logo em seguida ser colocados em caixas individuais para a avaliação da duração do sono, representado pelo período entre a perda e a recuperação do reflexo postural.

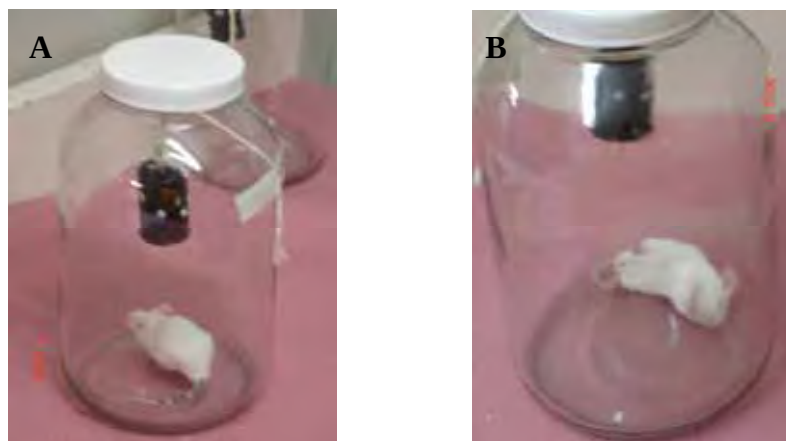


Figura 4 – Animal na câmara saturada com éter etílico

A – no início do procedimento experimental

B – após a perda do reflexo postural

3.7 – Avaliação da integridade do sistema motor – Teste da Barra Giratória

Em modelos animais de ansiedade a detecção de atividade pode ser devida à própria ação ansiolítica ou a outras alterações menos específicas sobre o sistema motor que venham a impossibilitar a execução dos comportamentos que fornecem os parâmetros para avaliação da atividade ansiolítica (RODGERS et al., 1997b).

Descrita por Dunhan e Miya (1957), o teste da barra giratória (“Rota-rod”) é capaz de detectar prejuízos neurológicos mínimos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade, pois animais normais podem se manter por um longo período de tempo sobre a barra giratória (Figura 5) (SWINYARD e KUPFERBERG, 1985).

O aparato consiste de uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento que gira a uma velocidade de 5 r.p.m. Esta barra é dividida em 5 seções iguais para possibilitar a avaliação individual de 5 animais ao mesmo tempo. A altura da barra em relação à base do aparelho é de 25 cm.

Os animais foram selecionados 24 horas antes do procedimento experimental, tendo-se adotado como critério de seleção os mesmo parâmetros utilizados no teste, ou seja, a habilidade dos mesmos em se manter em equilíbrio, durante 1 minuto em no máximo três tentativas sobre a barra girando a 5 r.p.m.



Figura 5 – Animal na Barra Giratória

3.8 – Análise Estatística

Os dados quantitativos obtidos de amostras independentes foram comparados por análise de variância não paramétrica (Kruskal Wallis), e os obtidos de amostras dependentes foram comparadas pelo teste de Friedman. Em ambos os casos, testes a

posteriori, para contraste entre os grupos, foram utilizados quando necessário. As proporções foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. Foram consideradas significantes as diferenças associadas a $p \leq 0,05$.



RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Rendimento das Extrações dos OE

Na tabela 1 estão apresentados os períodos de extração dos OE das três espécies estudadas, assim como os rendimentos de cada extração. Alíquotas dos OE foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para determinação de sua composição, apresentada na tabela 2.

O composto majoritário de todas as extrações foi o limoneno, que aparece em quantidade um pouco menor em CL do que nas outras duas espécies. Por outro lado, a espécie de *Citrus latifolia* apresenta maiores concentrações de β -pineno (cerca de 10 vezes) e γ -terpineno (cerca de 4 vezes). Os demais compostos apresentam menor variação de concentração nas diferentes espécies.

Observamos ainda que o OE de CL, extraído em diferentes períodos do ano, difere na quantidade de alguns compostos minoritários, como por exemplo o Neral e genaral, cujas concentrações na extração realizada em março encontram-se três vezes maiores quando comparadas com a extração de dezembro.

Tabela 1 – Rendimento total dos OE das cascas dos frutos de *Citrus latifolia* – CL, *Citrus reticulata* – CR e *Citrus aurantium* – CA, extraídos por hidrodestilação.

Substância	CL		CR	CA
	Dezembro/2005	Março/2006	Abril/2006	Maio/2005
Peso das cascas (g)	1137	634	1700	1200
Rendimento (mL)	3,4	3,7	8,8	7,5
pH	6-7	6-7	6-7	6-7

Tabela 2 – Composição química dos OE de CL, CR e CA

Substância	CL % (Dez/05)	CL % (Mar/06)	CR % (Abril/06)	CA % (Maio/05)
α -tujeno	0,42	0,23	0,18	-
α -pineno	2,03	1,82	0,67	0,57
sabineno	1,04	1,22	0,23	-
β -pineno	12,79	12,76	0,35	1,16
mircenol	1,27	1,21	1,67	1,09
Paracimeno	1,38	1,16	0,28	-
limoneno	58,43	57,85	90,22	87,01
γ -terpineno	17,22	16,94	4,18	-
terpinoleno	0,45	0,49	-	-
linalol	0,35	tr	1,03	2,76
terpin-4-ol	0,30	tr	0,11	-
α -terpineol	0,49	0,78	-	1,26
neral	0,52	1,51	-	-
geranial	0,73	2,04	-	-
acetato de nerila	0,80	0,67	-	-
α -trans-bergamoteno	0,71	0,53	-	-
α -bisaboleno	1,06	0,79	-	-

(tr) traços da substância ($\text{tr} \leq 0,22$)

4.2 – Teste de Esconder Esferas

Experimentos anteriores com o OE da espécie *Citrus aurantium* demonstraram a sua efetividade em reduzir o número de esferas escondidas tanto após um único tratamento quanto após tratamentos repetidos por 15 dias. No entanto, nestes procedimentos o diazepam foi utilizado como droga-padrão, na dose de 2 mg/kg, o que promoveu déficit motor no teste da barra giratória (Pultrini et al., 2006).

Conforme mencionado anteriormente, o teste de esconder esferas está relacionado com o transtorno obsessivo-compulsivo, desordem que se beneficia dos antidepressivos para sua terapêutica. Os derivados benzodiazepínicos não são úteis no tratamento deste tipo de transtorno. Os antidepressivos tricíclicos são amplamente utilizados na clínica, e representantes desta classe terapêutica se mostraram ativas no teste de esconder esferas (ICHIMARU et al., 1995).

Para substituir o diazepam como droga-padrão foi escolhida a imipramina, fármaco pertencente à classe dos antidepressivos tricíclicos e para estabelecer os parâmetros adequados do grupo controle tratado com essa droga, foi construído uma curva dose-resposta. Grupos de 7 a 8 animais foram tratados com imipramina, solubilizada em salina 0,9%, por via intraperitoneal com doses de 7,5 a 30 mg/kg. Cada procedimento experimental foi acompanhado de um grupo controle com Tween 80® a 12% (10 mL/Kg). Os resultados obtidos pelos animais dos grupos tratados com Tween dos diferentes procedimentos foram comparados e não tendo sido observados diferenças significantes, foram agrupados para proceder à comparação com as diferentes doses de Imipramina.

Podemos observar que a imipramina nas doses de 20, 25 e 30 mg/kg foi capaz de reduzir o número de esferas escondidas pelos animais, comportamento relacionado como sendo ansiolítico (Figura 6). Optamos por utilizar a dose de 30mg/kg como controle, pois nesta dose a variabilidade de esferas escondidas pelos animais foi menor.

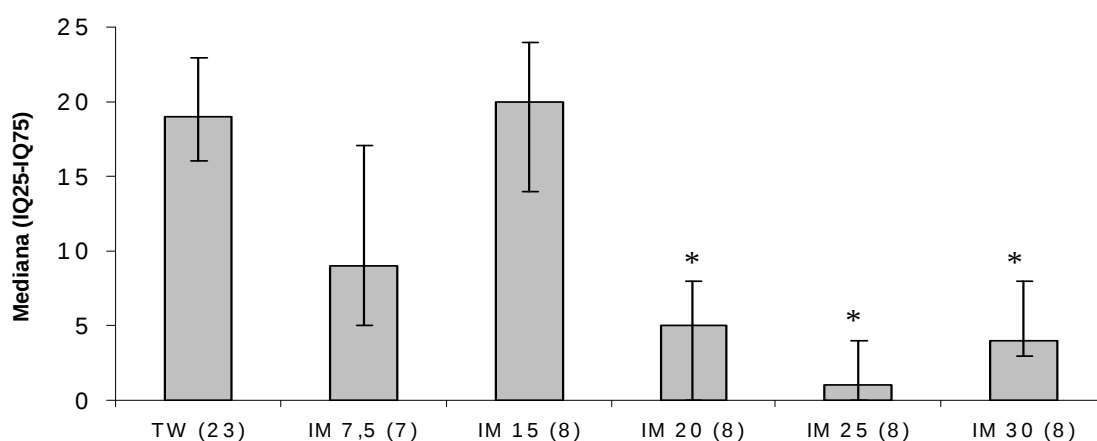


Figura 6 – Número de esferas escondidas por animais tratados com imipramina (IM) nas diferentes doses em mg/kg, ip. Entre parênteses aparece o número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

❖ *Citrus latifolia* Tanaka

Os animais foram pré-tratados (30 min) com o OE nas doses 0,5; 1,0 ou 1,5g/kg. O grupo controle foi tratado com o agente de solubilização do óleo e um grupo positivo tratado com 30mg/kg de imipramina. Foi registrado o número de esferas escondidas pelos animais e os resultados obtidos estão expressos na Figura 7.

Os grupos de animais submetidos ao tratamento com o OE nas doses de 1,0 e 1,5g/kg, apresentaram redução significativa no número de esferas escondidas, quando comparados com o grupo controle, comportamento este considerado ansiolítico.

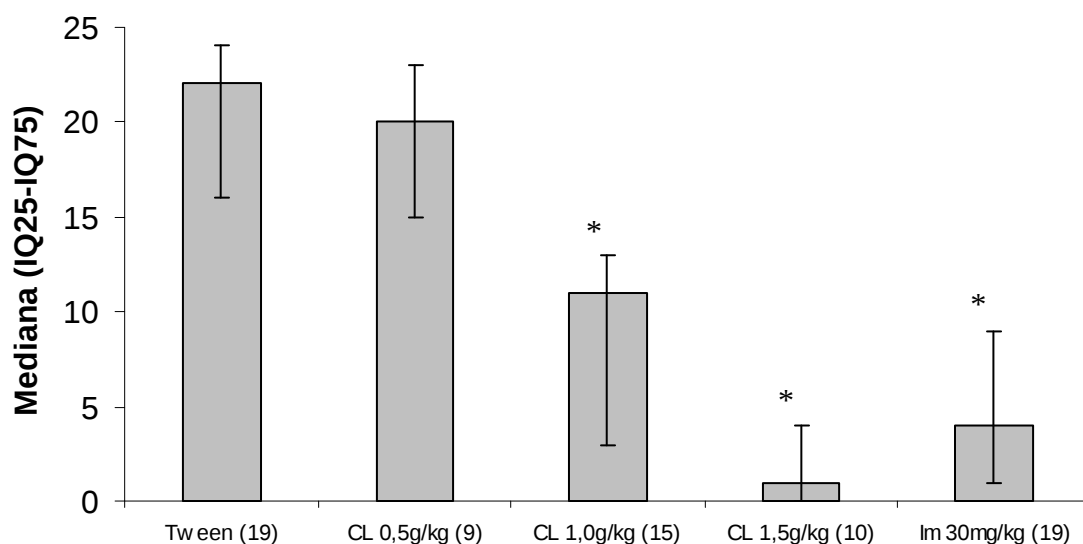


Figura 7 – Número de esferas escondidas por animais tratados com óleo essencial de *Citrus latifolia* (CL) e imipramina (IM). Entre parênteses aparece o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

❖ *Citrus reticulata* Blanco

Os animais foram submetidos ao tratamento com o veículo (TW), OE de *Citrus reticulata* nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5g/kg ou imipramina na dose de 30mg/kg. Observamos que o OE somente na dose de 1,5g/kg foi capaz de reduzir

significativamente o número de esferas escondidas pelos animais submetidos ao modelo experimental (Figura 8).

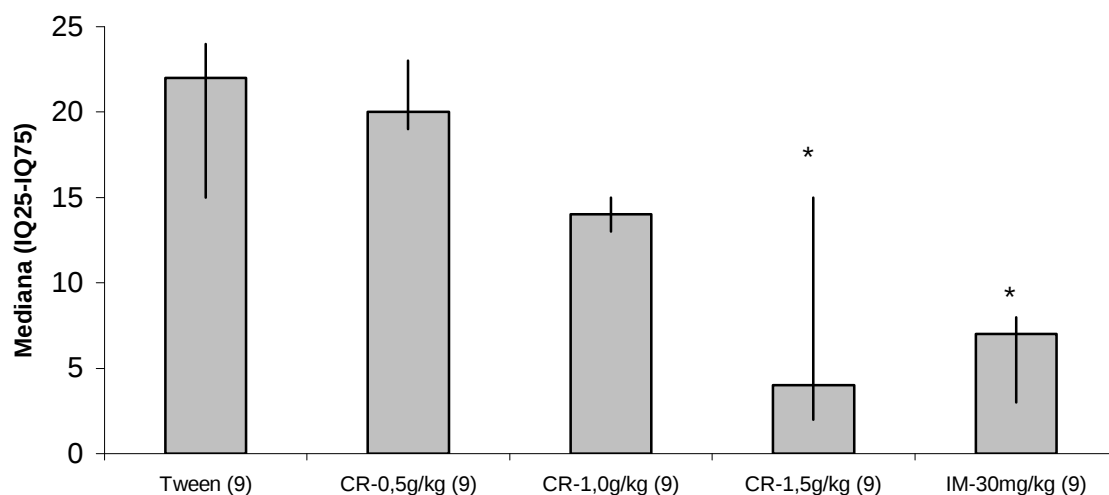


Figura 8 – Número de esferas escondidas por animais tratados com óleo essencial de *Citrus reticulata* (CR) nas respectivas doses e imipramina (IM). Entre parênteses aparece o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

❖ Desempenho na Reexposição tardia

Uma parte significativa de animais provenientes de uma colônia não pôde ser utilizada neste procedimento experimental por não apresentar o apto de esconder esferas no nível pré-fixado: esconder pelo menos 13 das 25 esferas disponíveis, em três dias consecutivos. De cada lote de 20 animais, em média eram selecionados 15 camundongos, o que resulta cerca de 75% de animais que estão aptos para o procedimento.

Assim, um protocolo foi desenvolvido com o objetivo de verificar se os animais já utilizados em um procedimento experimental retornam ao seu desempenho basal (apresentado antes do tratamento). Deste modo seria possível reaproveitar os animais selecionados, reduzindo o número total de animais necessários.

Os animais foram submetidos à seleção conforme já descrito, e após a realização do experimento, foram devolvidos ao biotério onde permaneceram por uma semana, para então uma nova seleção ser realizada. O resultado do processo de seleção (3 primeiras colunas) e o desempenho na exposição tardia (4^a. coluna) são apresentados na Figura 9.

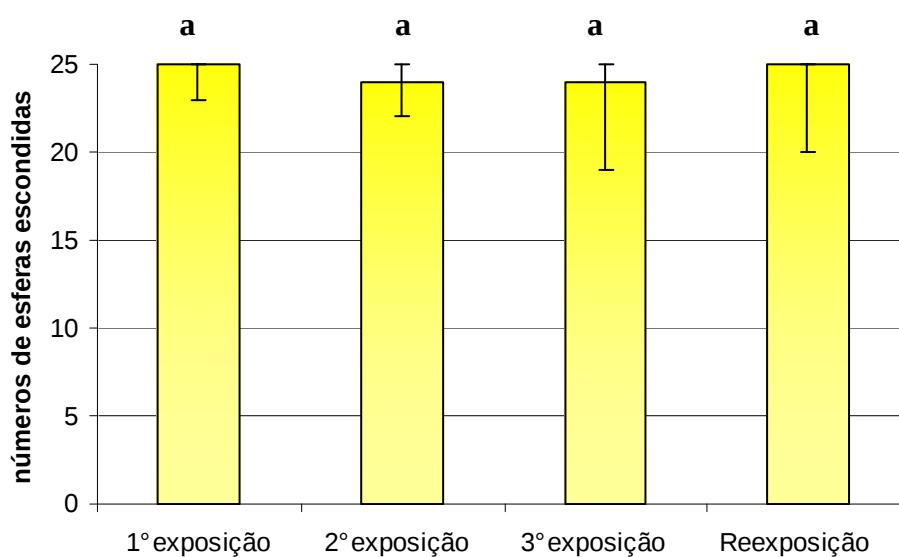


Figura 9 – Mediana e intervalo inter-quartil do número de esferas escondidas durante o procedimento de seleção dos animais (colunas 1, 2 e 3). A coluna 4 apresenta o desempenho dos animais após 1 semana do procedimento experimental. Letras iguais indicam que não há diferença estatística (Teste de Friedman), $n = 29$.

Não foram observadas diferenças significantes entre as quatro sessões experimentais. O uso deste protocolo deve, ainda, ser avaliado com relação a possíveis efeitos residuais do tratamento realizado após a 3^o sessão, e caso não se observe interferências pode ser utilizado como uma forma de reduzir o número total de animais ou, ainda, de modo a refinar o processo de seleção, aumentando a exigência do número de esferas escondidas.

4.3 - Caixa Claro/Escuro

Os parâmetros avaliados neste modelo experimental foram: tempo de permanência no compartimento claro, número de transição entre os compartimentos e número de “rearing”. Os animais foram tratados com o veículo (TW), os OE de CL ou CR nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0g/kg ou a droga-padrão diazepam na dose de 1mg/kg.

❖ *Citrus latifolia* Tanaka

O OE na dose de 0,5g/kg aumentou significativamente o tempo de permanência dos animais no compartimento claro e o número de levantamentos, quando comparado com o grupo controle. O número de transições entre os compartimentos não foi alterado por qualquer dos tratamentos (Figura 10).

❖ *Citrus reticulata* Blanco

O OE de CR não modificou qualquer dos parâmetros avaliados, em nenhuma das doses testadas, embora tenha se observado uma tendência no grupo tratado com 0,5g/kg (Figura 11).

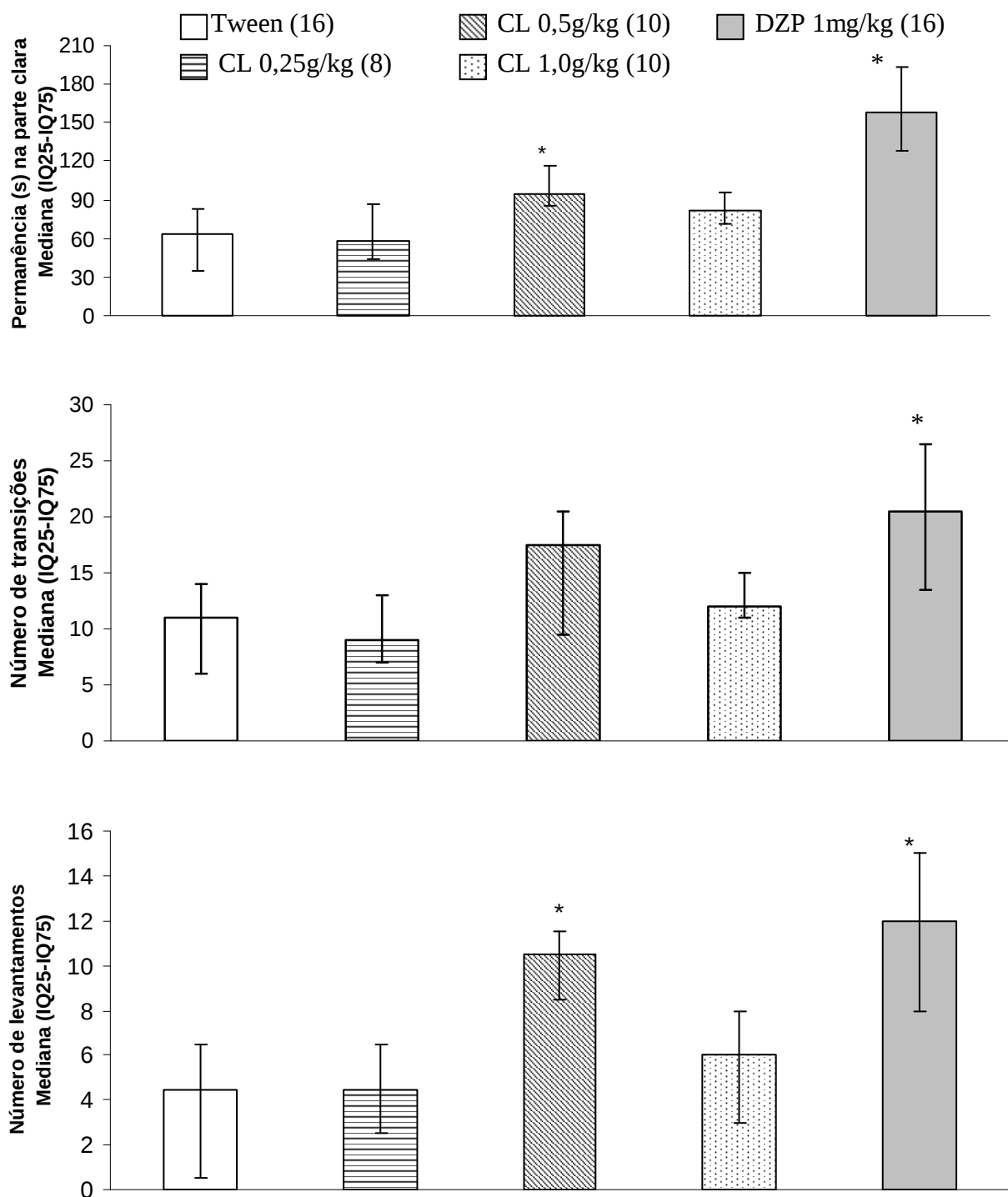


Figura 10 – Tempo de permanência no compartimento claro, número de transições e “rearings” que os animais realizaram após 30 minutos do tratamento com OE ou diazepam. Entre parênteses, o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney

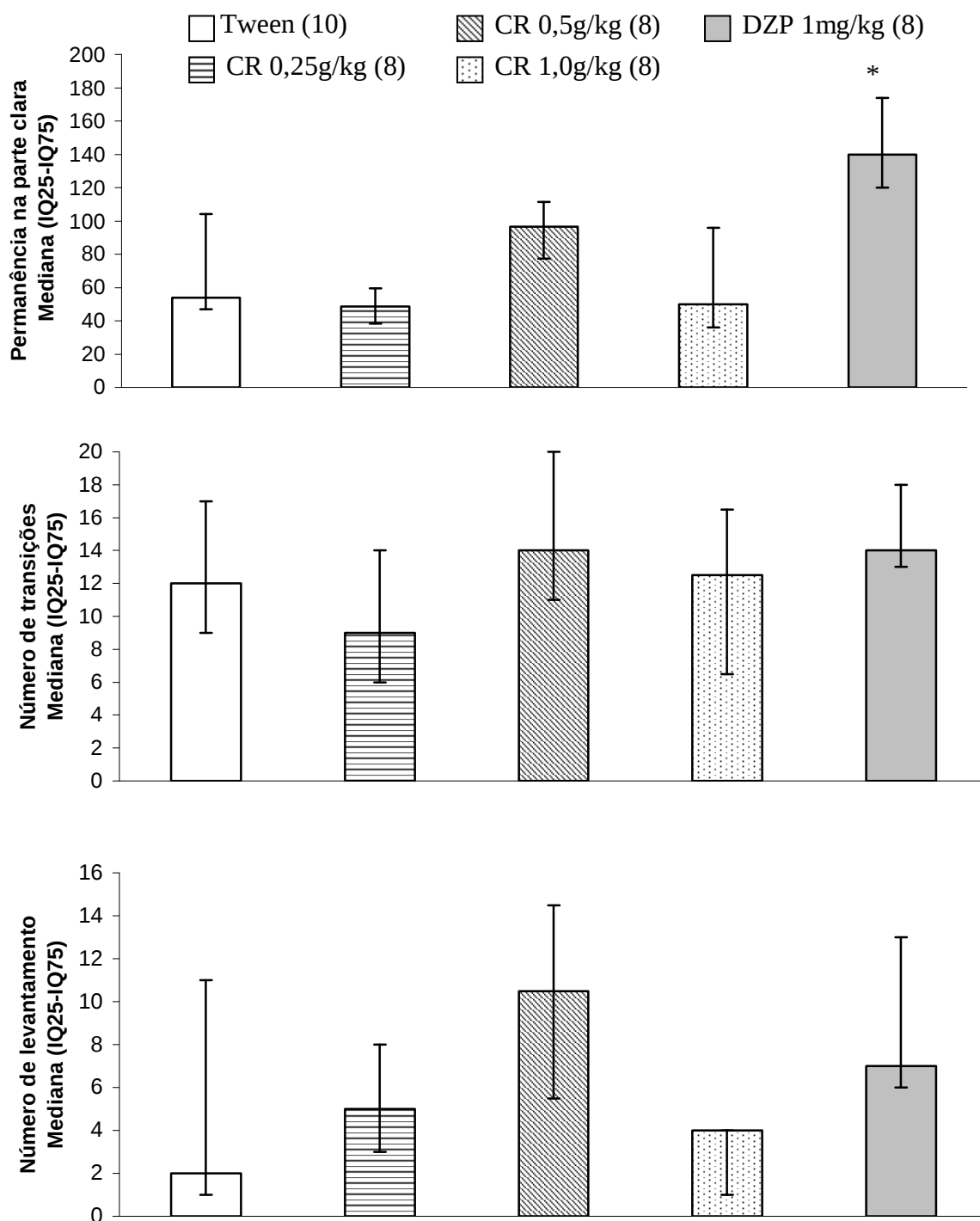


Figura 11 – Tempo de permanência no compartimento claro, número de transições e “rearings” que os animais realizaram após 30 minutos do tratamento com OE ou diazepam. Entre parênteses, número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney

4.4 – Avaliação da Ação Sedativa do Óleo Essencial das Espécies de Citrus

A este modelo experimental foram submetido animais tratados com os OE de *Citrus latifolia*, *Citrus reticulata* ou *Citrus aurantium* nas doses de 1,0; 1,5 e 2,0g/kg. O grupo controle negativo foi submetido ao tratamento do agente usado na solubilização do OE (TW) e um grupo foi tratado com a droga-padrão diazepam na dose de 5mg/kg (i.p.). Foram registrados o tempo de latência e a duração do sono.

❖ *Citrus latifolia* Tanaka

O OE nas doses avaliadas não foi capaz de alterar significativamente a latência para o início do sono, e apenas na dose de 2,0 g/kg observa-se aumento significativo na duração do sono (Figura 12).

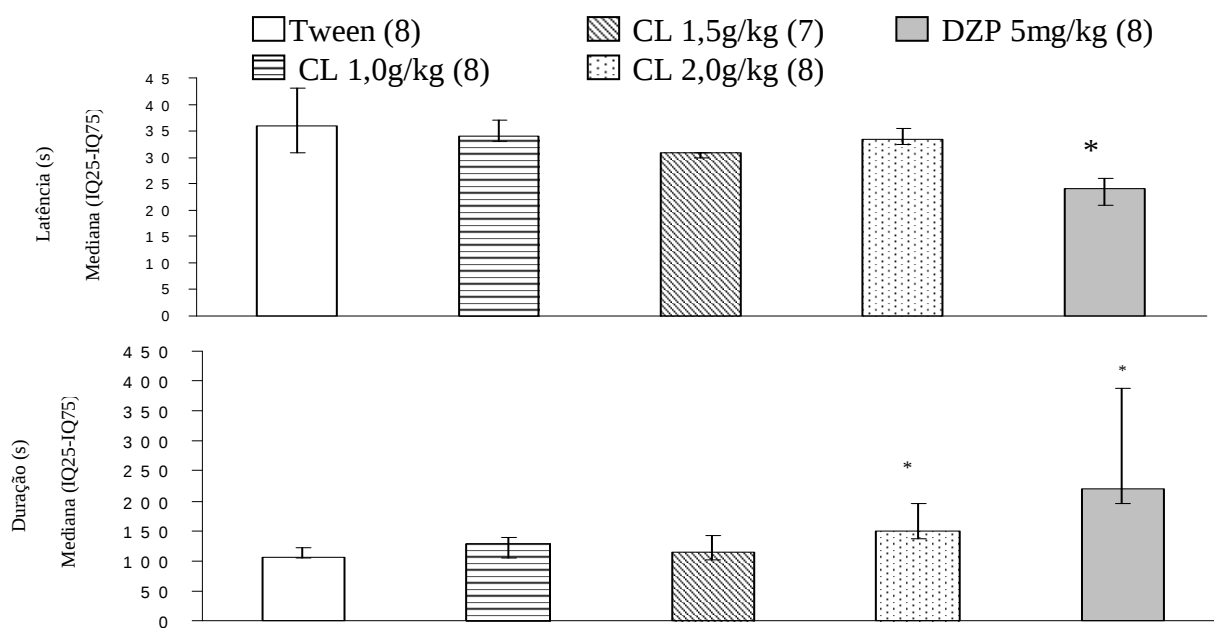


Figura 12 – Tempo (s) de latência e duração do sono induzido por éter etílico. Animais tratados 30 minutos antes do procedimento experimental. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney

❖ *Citrus reticulata* Blanco

O OE nas doses avaliadas não foi capaz de alterar o tempo de latência para os animais iniciarem o sono. O OE na dose de 2,0g/kg aumentou o tempo de duração de sono significativamente quando comparado com o grupo controle, mostrando atividade sedativa (Figura 13).

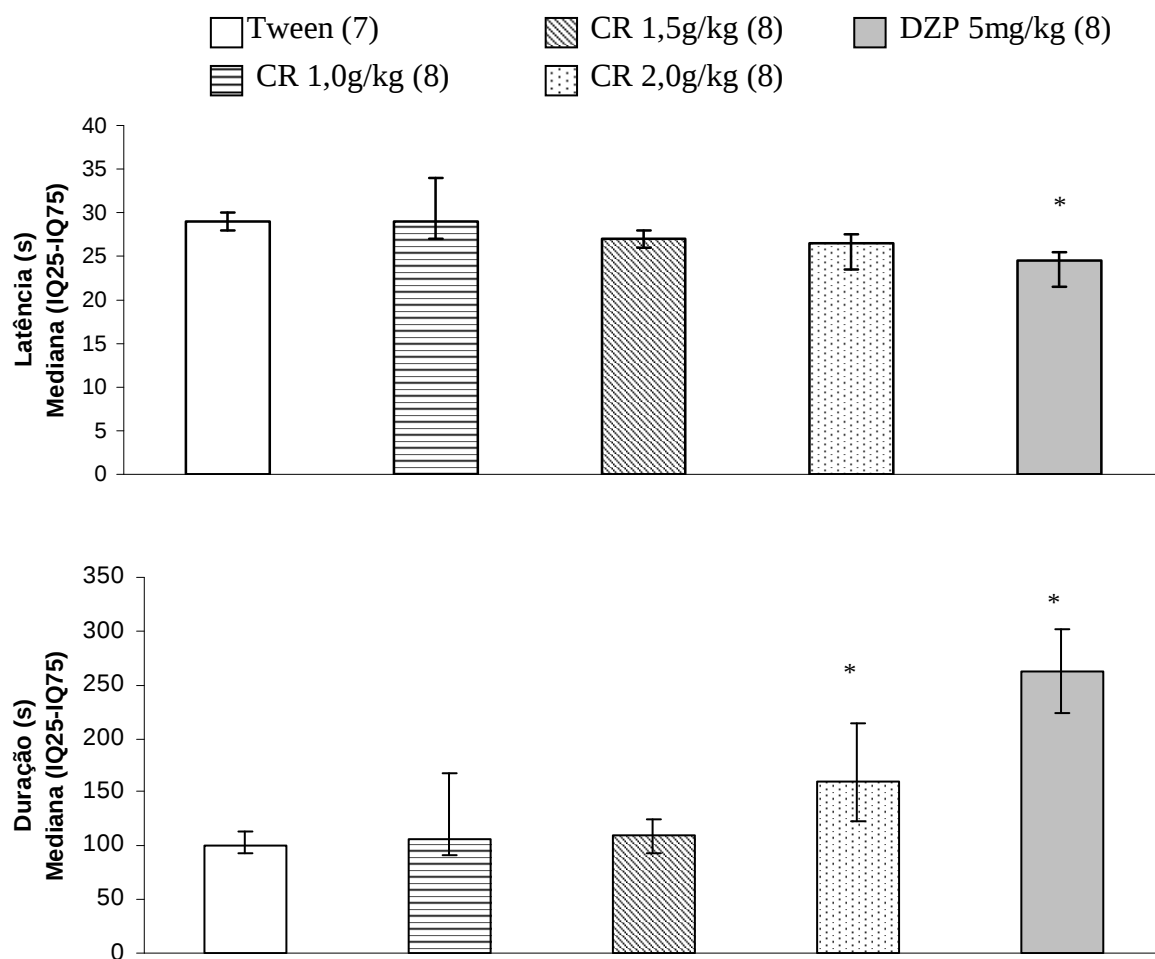


Figura 13 – Tempo (s) de latência e duração do sono induzido por éter etílico. Animais tratados 30 minutos antes do procedimento experimental. Entre parênteses o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney

❖ *Citrus aurantium* L.

O OE na dose de 1,0g/kg promoveu uma redução significativa no período de latência do sono. Já as demais doses não foram capazes de alterar este parâmetro. A duração do sono dos animais aumentou quando foram tratados com o OE na dose de 2,0g/kg e pelo grupo controle positivo diazepam (Figura 14).

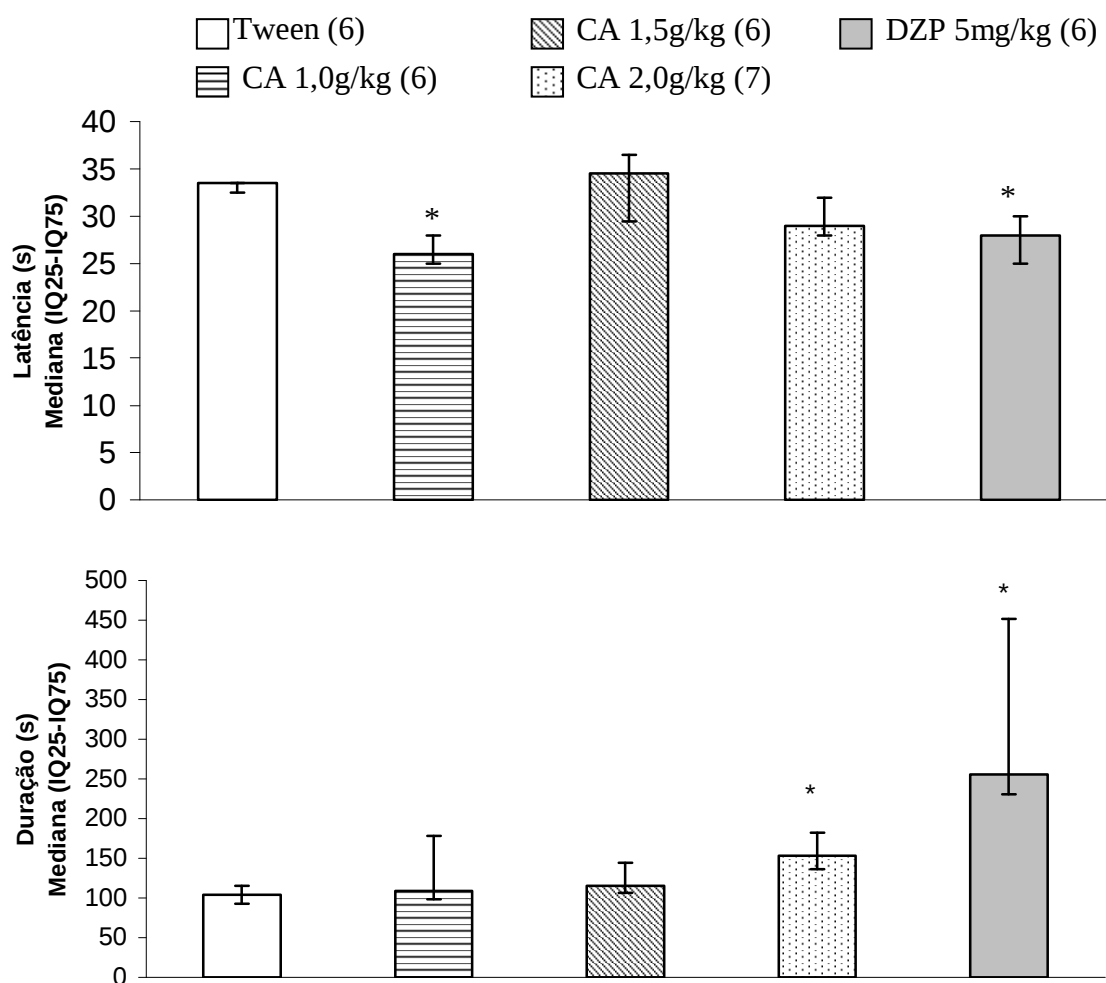


Figura 14 – Tempo (s) de latência e duração do sono induzido por éter etílico. Animais tratados 30 minutos antes do procedimento experimental. Entre parênteses aparece o número de animais em cada grupo.

* $p < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney

4.5 – Avaliação da Ação sobre o Sistema Motor

4.5.1 – Teste da Barra Giratória

O teste da barra giratória tem a finalidade de detectar prejuízo no sistema nervoso motor que possam impossibilitar os animais de executarem os comportamentos analisados nos procedimentos experimentais. Tal teste foi realizado com o objetivo de verificar se o efeito observado nas drogas testadas é devido a sua ação ansiolítica propriamente dita.

Os animais foram tratados com imipramina nas doses de 20,0; 25,0 e 30,0mg/kg, que foram ativas no teste de esconder esferas ou com os OE de *Citrus latifolia* e *Citrus reticulata*, nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5g/kg. Não foi observado prejuízo de desempenho sobre a barra giratória em nenhuma das drogas testadas, quando comparados com o controle, apesar de uma pequena parte deles falharem em se manter o equilíbrio durante o 1 minuto (Figura 15).

O desempenho dos animais quando submetidos ao tratamento do OE de *C.aurantium* no teste da barra giratória foi previamente estudada por Pultrini e cols (2006) e observou-se que o óleo em questão não apresenta qualquer prejuízo sobre o sistema motor

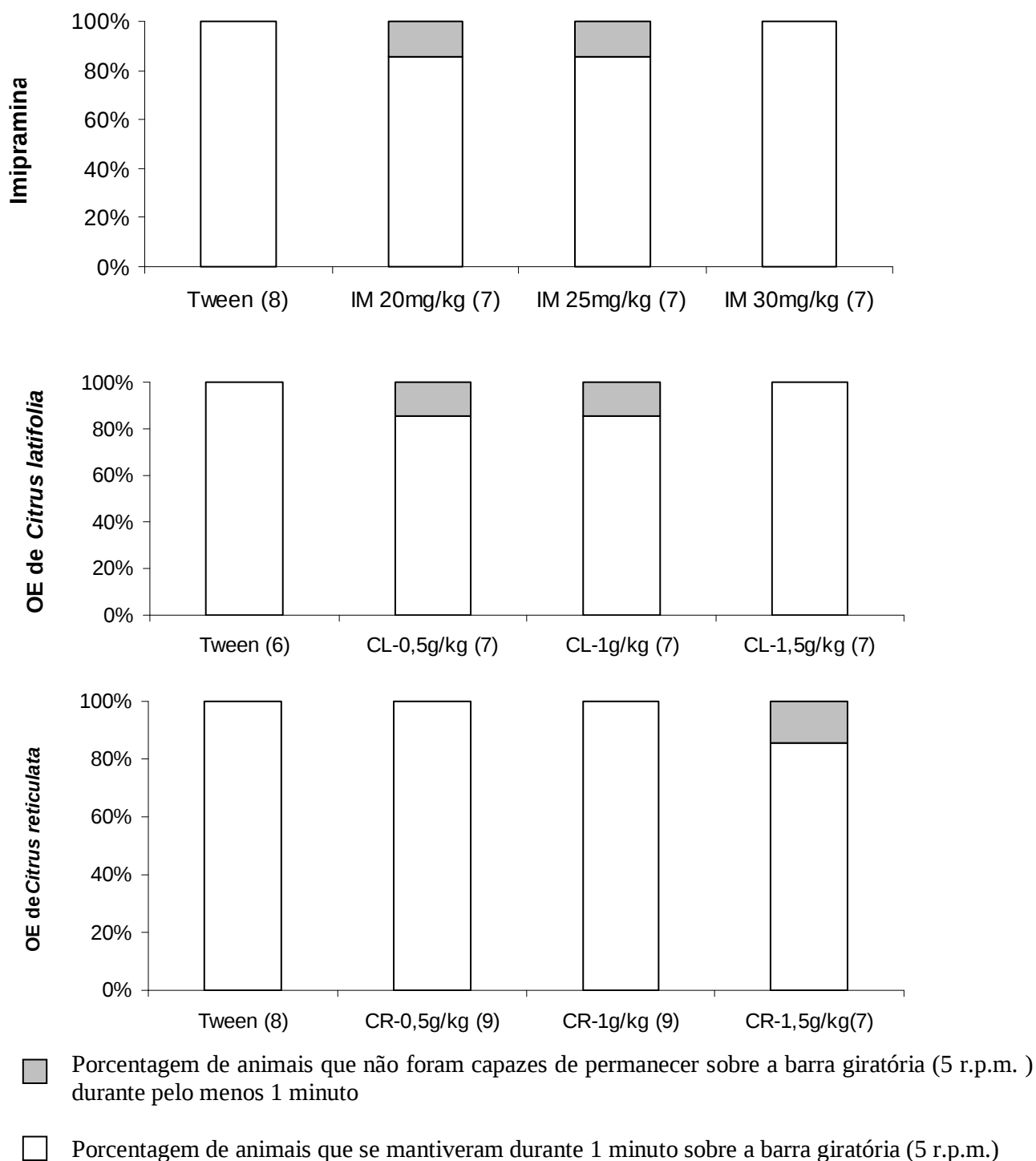


Figura 15 – Avaliação do desempenho dos animais tratados com o óleo essencial de imipramina, *Citrus latifolia* e *Citrus reticulata*, no teste da barra giratória 5 rpm. Entre parênteses aparece o número de animais em cada grupo.



DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A ansiedade é uma desordem com alta prevalência e cujas ferramentas terapêuticas disponíveis apresentam efeitos colaterais importantes ou não são ativas em parte dos pacientes. Estas características estimulam a procura por novas ferramentas farmacológicas, e a pesquisa com plantas medicinais é uma importante fonte de novas drogas. Compostos de fragrância pura ou óleos essenciais têm vários efeitos em humanos e outras espécies de mamíferos quando inalados ou ingeridos e muitos estudos com esses compostos tem sido conduzidos (KOMIYA et al., 2006). Estudos anteriores mostraram que o óleo essencial (OE) de *Citrus aurantium* tem atividade em modelos experimentais que reproduzem os principais transtornos de ansiedade (PULTRINI et al., 2006). Diferentes procedimentos experimentais são utilizados para verificar os transtornos ansiosos, pois cada procedimento analisa um aspecto diferente da desordem.

O procedimento experimental do teste de esconder esferas se baseia no comportamento dos animais em esconder objetos que representam ou são associados a estímulos aversivos, sendo considerado um comportamento defensivo. Tal comportamento é observado em ratos e camundongos quando estes enterram alguma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados sobre uma camada de material (BROEKKAMP et al., 1986). O procedimento das esferas parece estar mais relacionado com o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) do que com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), apresentando tanto evidências farmacológicas como comportamentais. Farmacologicamente foi mostrado que drogas utilizadas na terapêutica do TOC, como a clomipramina e inibidores da recaptação da serotonina, diminuem o número de esferas escondidas pelos animais, comportamento considerado ansiolítico, tanto em tratamento agudo como crônico (ICHIMARU et al., 1995). Já em

nível comportamental, há evidências que os animais não modificam seus comportamentos quando expostos as esferas de vidro neste modelo, ou seja, continuam a enterrar as esferas quando reexpostos nos dias consecutivos. Podemos notar na figura 9 que os animais reexpostos ao modelo experimental, depois de uma semana, mantiveram seu comportamento basal, ou seja, continuaram a esconder as esferas de vidro, deste modo reforçando a hipótese que este procedimento não altera o comportamento dos animais. Tal comportamento de esconder as esferas é associado às compulsões, diferente de modelos clássicos do TAG, como o labirinto em cruz elevado e caixa claro e escuro, nos quais o animal ao ser exposto por uma segunda vez já demonstra alteração comportamental do que o observado na sua primeira exposição (NJUNG'E et al., 1990).

O procedimento da caixa claro-escuro, relacionado com o TAG, foi desenvolvido por Crawley e Goddwin (1980) e se baseia na aversão inata dos roedores por áreas iluminadas contrariando seu comportamento exploratório (Bourin, 2002). Deste modo, o camundongo é posto em uma situação na qual deve reprimir seu comportamento de exploração e ficar na área escura (protegida) ou superar o medo do ambiente iluminado para explorá-lo, atividade esta demonstrativa de redução da ansiedade. Deste modo os parâmetros avaliados foram o tempo de permanência no compartimento claro, número de transições e o número de “rearing”. Segundo Young e Johnson (1991) a medida de tempo gasto no compartimento claro, mas não o número de transições, é o parâmetro mais consistente para avaliar a atividade ansiolítica, idéia esta também defendida por Lepicard (2000), o qual afirma que o tempo gasto no lado claro é o indicador mais robusto no estudo da ansiedade, enquanto as transições estariam relacionadas tanto com a ansiedade quanto a atividade exploratória do animal. Por outro lado, Zangrossi Jr e Graeff (2004) afirmam que as medidas que avaliam a ansiedade são

o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições. Não há controvérsias na literatura quanto ao fato de que o número de “rearing” realizados reflete a atividade exploratória (ESPEJO, 1997) e não está relacionado com a ansiedade.

Como já descrito, a espécie *Citrus aurantium* apresentou atividade ansiolítica em modelos que refletem os transtornos de ansiedade. Tanto no procedimento do teste de esconder esferas, quanto no procedimento da caixa claro e escuro, o OE do CA apresentou atividade, reduzindo o número de esferas escondidas e alterando os parâmetros avaliados na caixa, respectivamente, nas doses de 0,5 e 1,0g/kg (PULTRINI et al., 2006). Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de atividade semelhante em óleos essenciais obtidos de outras espécies de *Citrus*.

Visto que as três espécies estudadas apresentaram diversos compostos químicos semelhantes, poderíamos esperar que *Citrus latifolia* (CL) ou *Citrus reticulata* (CR) demonstrasse também efeito ansiolítico. No procedimento do teste de esconder esferas, CL apresentou atividade na dose de 1,0 e 1,5g/kg (Figura 7), enquanto CR apenas da dose mais alta de 1,5g/kg (Figura 8), mantendo a atividade ansiolítica esperada. Já no procedimento da caixa claro e escuro, CL mostrou efeito somente na dose de 0,5g/kg (Figura 10), porém, surpreendentemente, CR mostrou apenas uma tendência de atividade na dose de 0,5g/kg (Figura 11). Nos três parâmetros avaliados é possível observar uma curva em “U” invertido, ou seja, a maior e a menor dose utilizadas não apresentam efeitos.

No procedimento do sono induzido por éter etílico, todas as espécies avaliadas mostraram atividade sedativa, prolongando a duração do sono, nas doses de 2,0g/kg, enquanto o CA, ainda, foi capaz de reduzir a latência de início do sono na dose de 1,0g/kg (Figuras 12; 13 e 14).

No teste da barra giratória nenhum dos OE nas doses avaliadas nos modelos de ansiedade mostrou interferência sobre a habilidade dos animais em se manter em equilíbrio (Figura 15). Com isto, podemos concluir que a atividade detectada nos OE não foi devida à presença de comprometimento motor.

As atividades biológicas avaliadas mostraram-se presentes nas três espécies de *Citrus* testadas, portanto pode-se esperar uma relação entre suas composições químicas e os efeitos encontrados, identificando um possível composto ativo comum.

Foram realizadas duas extrações do óleo essencial de *Citrus latifolia* em diferentes períodos do ano e, ao comparar seus constituintes, verificamos que as extrações diferem entre si em alguns compostos minoritários (Tabela 2). Segundo Freire e colaboradores (2005), condições climáticas e a disponibilidade de água no solo podem alterar o metabolismo secundário das plantas e, conseqüentemente, alterar a composição dos óleos essenciais, durante as estações do ano. Tal trabalho verificou que o óleo de *Ocimum gratissimum* L., extraído em diferentes estações do ano, apresenta variabilidade em suas atividades sedativas. No entanto, o OE de *C. latifolia*, extraído em diferentes épocas do ano, não apresentou diferença nas suas atividades biológicas no decorrer dos experimentos.

Um dos principais alvos dos procedimentos experimentais é identificar os compostos responsáveis pela atividade observada no OE ou extrato. É incomum que um único constituinte seja responsável pela atividade observada e muitos dos compostos isolados podem exercer o mesmo efeito biológico, embora possam diferenciar na potência. Entretanto não podemos assumir que os compostos mais ativos resultam na maior atividade do extrato, sendo importante determinar a concentração de cada composto e relacionar com suas características dose-resposta em procedimentos experimentais. Assim é muito importante quantificar os compostos presentes em

extratos e OE antes que qualquer conclusão possa ser feita sobre o possível composto responsável pelos efeitos observados (HOUGHTON et al., 2007).

O limoneno é o composto majoritário presente nas três espécies, porém, em menor quantidade no CL, cerca de 58%. Se tal composto fosse o responsável pelo efeito biológico avaliado seria de se esperar atividades semelhantes entre os OE de CA e CR, pois estes apresentaram uma equivalência nas concentrações, cerca de 90%. No entanto, não foi isso o observado, já que o OE de CR só se mostrou ativo no procedimento do teste de esconder esferas com a maior dose testada, diferente do ocorrido com o OE de CA. Efeitos no SNC devido à exposição a altas doses de limoneno têm sido reportados em estudos experimentais realizados com animais. A administração oral de *d*-limoneno (3ml) para ratos e camundongos resultou em déficit motor (TSUJI et al., 1974). Efeito similar também foi observado em camundongos em administração oral de limoneno na dose de 1000mg/kg por dia, durante 13 semanas (NTP, 1990). Entretanto, tais efeitos sobre o SNC podem tanto ser devido à ação direta do constituinte químico quanto a uma intoxicação, considerando os altos níveis de doses.

O segundo composto de maior proporção nos OE de CL e CR foi o γ -terpineno – cerca de 17% e 4% respectivamente – porém o efeito ansiolítico também não deve estar relacionado com tal substância, pois está ausente no óleo de CA.

O linalol, segundo maior constituinte presente no óleo de CA (2,76%), também encontrado nos OE de CR (1,03%) e CL (0,35%). A concentração de linalol em CL é cerca de 8 vezes menor do que em CA, espécies que apresentaram atividade biológica semelhante. Deste modo, não parece ser o linalol o constituinte responsável pelos efeitos encontrados.

Deste modo, ao analisar a tabela 2, não conseguimos apontar um composto como sendo o principal agente da atividade ansiolítica e sedativa encontrada nos três

óleos das espécies testadas, porém é possível supor que tal efeito possa surgir do efeito do sinergismo entre os constituintes.

Em teoria, a atividade observada em uma mistura, como um OE ou extrato, pode ocorrer devido à soma das atividades individuais dos constituintes. Assim, o seu fracionamento, cujo objetivo seria isolar os compostos, pode resultar em alíquotas que possuem uma maior atividade do que o extrato original. Em alguns casos, a atividade do extrato total pode ser menor do que a atividade de seus principais componentes, entretanto não é incomum que o extrato original tenha uma atividade maior que algumas frações (HOUGHTON et al., 2007).

O sinergismo, ação conjunta de mais de um constituinte, pode resultar em melhor atividade no extrato total que em seus constituintes isolados. Freire e colaboradores. (2005) observaram que o óleo essencial do *Ocimum gratissimum* apresentou efeito anticonvulsivante, porém Galindo (2005), em trabalho posterior com os constituintes isolados deste OE, não conseguiu observar os mesmos efeitos protetores, sugerindo que a atividade possa ser devida a um possível sinergismo dos constituintes.

Outras interações importantes entre os constituintes podem ocorrer, como por exemplo, somação, potencialização ou até mesmo um antagonismo entre alguns compostos, deste modo impossibilitando a identificação de um composto principal responsável pelas atividades observadas.

Deste modo, podemos concluir que as atividades biológicas observadas neste trabalho, não podem ser relacionadas com algum composto comum entre os óleos, podendo ser resultado da ação conjunta entre seus compostos, sinergismo, ou de uma possível interação entre os constituintes que venha a impossibilitar a identificação do principal composto ativo. O óleo essencial das espécies de *Citrus* demonstrou ser uma

grande fonte com potencial para gerar novas alternativas fitoterápicas, com possível efeito sobre os transtornos ansiosos.



CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- A padronização das condições experimentais utilizando a imipramina como droga de referência no procedimento do teste de esconder esferas, se mostrou uma alternativa mais consistente, pois é uma droga utilizada na clínica para o tratamento do transtorno obsessivo compulsivo, e não apresentou déficit no sistema motor.
- O óleo essencial das cascas dos frutos de *Citrus latifolia* Tanaka apresentou atividade ansiolítica no modelo do teste de esconder esferas nas doses de 1,0 e 1,5 g/kg e no modelo da caixa claro escuro na dose de 0,5 g/kg. O óleo também apresentou atividade sedativa no modelo de sono induzido por éter etílico na dose de 2,0 g/kg.
- O óleo essencial das cascas dos frutos de *Citrus reticulata* Blanco apresentou atividade ansiolítica no modelo das esferas somente na maior dose testada (1,5 g/kg) e não mostrou efeitos no modelo da caixa claro-escuro. O óleo também apresentou atividade sedativa no modelo de sono induzido por éter etílico na dose de 2,0 g/kg.
- O óleo essencial das cascas dos frutos de *Citrus aurantium* L. (ativo nos procedimentos de ansiedade em doses menores que 1,0 g/kg) também apresentou atividade sedativa, diminuindo a latência para o início do sono na dose de 1,0 g/kg e aumentando a duração do sono na doses de 2 g/kg no modelo de sono induzido por éter.
- A avaliação da integridade do sistema motor não identificou prejuízo nos animais em nenhuma dose testada, tanto dos óleos quanto das drogas-padrão utilizadas nos modelos.

- Não foi possível apontar algum constituinte como sendo o responsável pelas atividades biológicas observadas, sugerindo um suposto sinergismo entre os compostos presentes nos OE ou alguma interação entre os compostos que impossibilitou a identificação do constituinte ativo.



REFERÊNCIAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publ. Corp, Carol Stream, 2001.

ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J. F.; FERNANDES, J. G.; ANDREOLI, S. B.; BUSNELLO, E. A. 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.; BIANCHARD, C.; BIANCHARD, R; BRANDÃO, M. L.; CAROBREZ, A. P.; GRIEBEL, C.; GUIMARÃES, F. S.; HANDLEY, S. L.; JENCK, F.; LEITE, J. R.; RODGERS, J.; SCHENBERG, L.C.; DA CUNHA, C.; GRAEFF, F. G. The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p145-154, 2001.

ARIKIAN, S. R.; GORMAN, J. M. A review of the diagnosis, pharmacologic treatment, and economic aspects of anxiety disorders. **J. Clin. Psychiatry**, v.3, p.110-117, 2001.

BALLENGER, J. C. Anxiety and Depression: Optimizing Treatments. **J. Clin. Psychiatry**, v.2, p.71-79, 2000.

BARKER, M. J.; GREENWOOD, K. M.; JACKSON, M. Cognitive effects of long-term benzodiazepine use: a meta-analysis. **CNS drugs**, v.18, p.37-48, 2004.

BLAZER D. G.; HUGHES, D.C.; GEORGE, L. K. Generalized anxiety disorder. In: BOBUS, L. N.; REGIER, D. A. **Psychiatric Disorders in América: the Epidemiological Catchments Area Study**. New York: Fress Press, 1991. p.180-203.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.55-65, 2003.

BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional. In: _____. **Psicofisiologia**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.126-149.

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.

BUFFET-JERROTT, S. E.; STEWART, S. H.; BIRD, S.; TEEHAN, M. An examination of differences in the time course of oxazepam's effects on implicit vs explicit memory. **Journal of Psychopharmacology**, v.12 (4), p.338-347, 1998.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.179-189, 2000.

CARLSON, G.; ROY-BYRNE, P. P. Treatment of generalized anxiety disorder: do benzodiazepines still have a role? In: NUTT, D.; RICKELS, K.; STEIN, D. J. **Generalized Anxiety Disorder: Symptomatology, Pathogenesis and Management**. London: Martin Dunitz Ltda, 2002. p.111-123.

CARTWRIGHT, C.; HOLLANDER, E. SSRIs in treatment of obsessive-compulsive disorder. **Depression and Anxiety**, v.8 (1), p.105-113, 1998.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25(12), p.1629-1633, 2002.

CECARELLI, I.; LARIVIERE, W. R.; FIORENTINI, P.; SACERDOTE, P.; ALOISI, A. M. Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. **Brain Research**, v.1001, p.78-86, 2004.

CLUVER, J. S.; SCHUYLER, D. Cognitive Therapy Lite. **J. Clin. Psychiatric**, v.4, p.246-248, 2002.

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.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.13, p.167-170, 1980.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **J. Ethnopharmacol.**, v.78, p.165-170, 2001.

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.

DUPONT, R. L.; RICE, D. P.; MILLER, L. S. Economic costs of anxiety disorders. **Anxiety**, v.2, p.167-172, 1996.

ESPEJO, E. F. Structure oh the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav. Brain Res.**, v.86, p.105-112, 1997.

FIGUEIREDO, M. S. L. Classificação. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.29-51.

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. **Anesth. Analg.**, v. 97, p. 1046-1052, 2003.

FLINT, A. J. Epidemiology and comorbidity of anxiety disorders in the elderly. **Am. J. Psychiatry**, v.151, p.640-649, 1994.

FREIRE, C. M. M.; MARQUEZ, M. O. M.; COSTA, M. Effects os seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimun* L. essential oil. **Journal of Etnopharmacology**, v.105, p.161-166, 2006.

GALINDO, L. A. Caracterização dos efeitos centrais de compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Ocimum gratissimun* L., 2005. 55p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GELENBERG, A. J. Psychiatric and Somatic Markers of Anxiety: Identification and Pharmacologic Treatment. **J. Clin. Psychiatry**, v.2, p.49-54, 2000.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quimiossistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004, p.91-105.

GRAEFF, F. G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p.123-160.

GYERTYAN, L. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. **Behav. Pharmacol.**, v.6, p.24-31, 1995.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. -J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of ethnopharmacology*, v.110, p.391-400, 2007.

ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT_{1A} receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on a marble-burying behavior in mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.68, p.65-70, 1995.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.240-249, 2006.

LAWLESS, J. The illustrated encyclopedia of essential oils: the complete guide to the use of oils in aromatherapy and herbalism. Elements Books, 1995, p.115.

LECKMAN, J. F; GRICE, D. E.; BOARDMAN, J.; ZHANG, H.; VITALE, A.; BONDI, C.; ALSOBROOK, J.; PETERSON, B. S.; COHEN, D. J.; RASMUSSEN, S. A., GOODMAN, W. K.; McDOUGLE, C. J.; PAULS, D. L. Symptoms of Obsessive-Compulsive Disorder. **Am J Psychiatry**, v.154, p.911-917, 1997.

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

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.

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

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Plantas aromáticas na Amazônia. Belém: Goeldi Editoração, 2001, p.63.

McLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. New York: John Wiley Sons, 1989.v.1-2.

MEDICAL ECONOMICS COMPANY. **PDR for herbal medicines**. 2.ed. Montvale, 2000. p.86-87.

MURPHY, J. M.; OLIVER, D. C.; MONSON, R. R.; SOBOL, A. M.; LEIGHTON, A. H. Incidence os Depression and Anxiety: The Stirling Country Study. **American Journal of Public Health**, v.78, p.534-540, 1988.

NARDI, A.E.; FIGUEIRA, I.; VERCIANI, M. Transtornos de ansiedade generalizada. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Ansiedade e transtornos da ansiedade**. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional Ltda, 1997. p. 323-353.

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.

NUTT, D.; RICKELS, K.; STEIN, D. J. Neurotransmitter function and GAD. In: **Generalized Anxiety Disorder: Symptomatology, Pathogenesis and Management**. London: Martin Dunitz Ltda, 2002. p.60-66.

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F344/N rats and B6C3F₁mice. Springfield, VA, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report nº. 347), 1990.

PAPROCKI, J. O emprego de ansiolíticos benzodiazepínicos pelo clínico geral e por especialistas não psiquiatras. **Arq. Bras. Med.**, v.64, p.305-312, 1990.

PEREIRA, M. E. C. O Conceito de Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.3-27.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, 1984, p.655.

POLING, A.; CLEARY, J.; MONAGHAN, M. Burying by rats in response to aversive and non-aversive stimuli. **J. Exp. Anal. Behav.**, v.35, p.31-44, 1981.

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

RASMUSSEN, S. A.; EISEN, J. L. The epidemiology and differential diagnosis of obsessive compulsive disorder. **J. Clin. Psychiatric**, v.53 (4), p.4-10, 1992.

REGIER, D. A.; NARROW, W. E.; ERA, D. S.; MANDERSCHIED, R.W.; LOCKE, B.Z.; GOODWIN, F. K. The de Facto US Mental and Addictive Disorders Service System: Epidemiologic Catchment Area Prospective 1-Year Prevalence Rates of Disorders and Services. **Arch Gen Psychiatry**, v.50, p. 85-94, 1993.

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

ROSENBAUM, C. J. F. Benzodiazepines: revisiting clinical issues in treating anxiety disorders. **J. Clin. Psychiatry**, v.7 (1), p.23-30, 2005.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. 2.ed. Porto Alegre: Rígel, 1989. p.140.

SANTOS, C.A.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas medicinais**. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1988. p.115

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.;

GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Editora UFSC, 2004, p.371-395.

SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.265-283.

SWINYARD, E. A.; KUPPERBERG, H. J. Antiepileptic drugs: detection, quantification and evaluation. **Fed. Proc.**, v.44, p.2629-2633.

TORRES, A.R. Transtorno obsessivo-compulsivo. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.285-308.

TSUJI, M.; FUJASAKI, Y.; YAMACHIKA, K.; NAKAGAMI, K.; FUJISAKA, F.; MITO, M.; AOKI, T.; KINOSHITA, S.; OKUBO, A.; WATANABE, I. Studies on *d*-limonene, as gallstone solubilizer. In: **General pharmacological studies**. Japão: Oyo Yakuri, 1974, v.8, p.1439-1459.

UMEZU, T. Anticonflict effects of plant-derived essential oils. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.64, p.35-40, 1999.

UMEZU, T.; ITO, H.; NAGANO, K; YAMAKOSHI, M.; OOUCHI, H; SAKANIWA, M; MORITA, M. Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. **Life Sciences**, v.72, p.91-102, 2002.

VAN DEN DOOL H & KRATZ D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Cromatography**, v. 11, p.463-467, 1963.

VÁSQUEZ, F.M.; SUAREZ, M.A.; PÉREZ, A. Medicinal plants used in the Barros Área, Badajoz Province (Spain). **J. Ethnopharmacol.**, v.55, p.81-85, 1997.

YOUNG, R.; JOHNSON, D. N.; A fully automated light/dark apparatus useful fpr comparing anxiolytc agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.40, p. 739-743, 1991.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.55-73.



ANEXOS



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências

**CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 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