

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALLOMA DE ALMEIDA SOARES HOCAYEN

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TIPO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (LARANJA DOCE) EM MODELOS ANIMAIS**

CURITIBA

2017

PALLOMA DE ALMEIDA SOARES HOCAYEN

**AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TIPO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (LARANJA DOCE) EM MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Hocayen, Palloma de Almeida Soares

Avaliação do mecanismo de ação tipo ansiolítica do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce) em modelos animais. / Palloma de Almeida Soares Hocayen. – Curitiba, 2017.

91 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Ansiedade. 2. Farmacologia. 3. Essências e óleos essenciais – Uso terapêutico. I. Título. II. Andreatini, Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de PALLOMA DE ALMEIDA SOARES HOCAYEN intitulada: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TIPO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRUS SINENSIS (LARANJA DOCE) EM MODELOS ANIMAIS, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

Aprovação

Curitiba, 30 de Março de 2017.

ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LEA ROSA CHIOIA FERRO
Avaliador Externo (FacPG)

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL (UFPR)
Avaliador Interno (UFPR)

ROSELI BOERNGEN DE LACERDA
Avaliador Interno (UFPR)

PATRÍCIA ANDRÉIA DOMBROWSKI
Avaliador Externo (PUC/PR)

*“Dedico esta Tese ao Meu Lindo.
O Amor da Minha Vida pois, sem ele ao meu lado
este sonho teria se perdido pelo caminho”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Meu Lindo, meu Marido, Amor da Minha Vida, pelo companheirismo, força, muita ajuda, incentivo e coragem, me fazendo sempre ver o lado bom nos momentos difíceis e não me deixando desistir deste sonho e tudo recheado de muito amor. Obrigada Lindo por tudo!

Agradeço aos meus pais, Robinson e Márcia e irmã, Danielle, que mesmo de longe sempre estavam torcendo por mim, e orgulhosos.

Agradeço ao meu Orientador Roberto Andreatini pela acolhida, pelas orientações, pela troca de conhecimento, pela paciência, pela confiança e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço aos meus irmãos de coração, Etiéli, Luiz e Débora, por terem me acolhido de forma especial, pela amizade, auxílio e risadas.

Agradeço a Técnica Silvia que de forma sempre muito solícita me ajudou muito nos cálculos para a realização dos experimentos.

Agradeço a prof. Dr. Elaine Del Bel e sua aluna Ana e todos no laboratório, USP Ribeirão Preto, que me receberam de forma muito acolhedora para a realização e aprendizagem de experimento.

Agradeço aos demais colegas de laboratório pela acolhida e amizade.

Agradeço aos membros da banca Prof. Maria, Prof. Roseli, Prof. Patrícia e Prof. Léia, pela disponibilidade de participarem da banca e contribuírem para a melhoria do trabalho.

Agradeço a todos os professores do programa que de alguma forma permitiram minha chegada até aqui.

Agradeço a Capes pelo incentivo financeiro, por meio da bolsa de pesquisa.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Farmacologia.

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

A ansiedade está relacionada a alteração nas vias de neurotransmissão. Tem-se que substâncias disponíveis para o tratamento apresentam múltiplos efeitos adversos. Assim, busca-se alternativas para o tratamento. Destacando os óleos essenciais do gênero *Citrus*, como o óleo de *Citrus sinensis*. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito ansiolítico da inalação do óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*) em modelos de ansiedade. Bem como, a relação deste efeito com os sistemas de neurotransmissão. Foram utilizados camundongos machos Swiss. Os animais foram submetidos a 15 minutos de inalação, com óleo essencial (*Citrus sinensis*), antes dos testes Esconder Esferas, Hipofagia Induzida por Neofobia, Caixa Claro-Escuro, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto e Caixa de Movimentação Espontânea. Posteriormente, foram realizados desafios farmacológicos para testar a influência dos sistemas de neurotransmissão (noradrenérgico, gabaérgico, canabinóide, serotonérgico e nitrinérgico) no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial. Adicionalmente foi realizada a análise NADPH-diaforase, no córtex cerebral dos animais. As conclusões acerca do estudo demonstram que o óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentou efeito ansiolítico, no modelo de Esconder Esferas, na concentração de 5% e 10%. O teste da Caixa Claro-Escuro indicou que o tratamento com o óleo essencial aumentou significativamente o tempo de permanência no lado claro. Parâmetro consistentemente relacionado, neste modelo, a um efeito tipo ansiolítico. O teste de Hipofagia Induzida por Neofobia demonstrou uma diminuição do tempo de latência para iniciar a ingesta, sendo este um indicativo de efeito ansiolítico. No teste do Campo Aberto os animais, não apresentaram alteração da atividade locomotora, sendo, entretanto, observada alteração da emocionalidade (diminuição significativa do número de bolos fecais). Sugerindo um efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* no campo aberto. E no teste do Labirinto em Cruz Elevado os animais demonstraram um aumento do número de entradas e da porcentagem de entradas nos braços abertos. Novamente, não foi observada alteração da atividade locomotora na caixa de movimentação o que é coerente com ausência de alteração do número de entradas nos braços fechados neste modelo, parâmetro considerado índice de atividade locomotora no modelo. Neste modelo, este perfil é condizente com um efeito tipo ansiolítico. O pré-tratamento com picrotoxina não influenciou o efeito do óleo essencial de *C. sinensis* no modelo esconder esferas, indicando a não participação GABAérgica neste efeito. O resultado do sistema noradrenérgico pode ser considerado inconclusivo. O pré-tratamento com WAY100635 bloqueou o efeito tipo ansiolítico apresentado pelo óleo essencial de *C. sinensis*, indicando que o sistema serotonérgico mediará o efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*. O antagonista AM251 reverteu o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial. Este resultado sugere que o sistema canabinóide participe do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*. Novamente, o óleo essencial de *C. sinensis* a 5% e o 7-NI apresentaram efeito tipo ansiolítico no modelo esconder esferas, sem alterar significativamente a atividade locomotora. Observou-se que camundongos que receberam inalação de óleo essencial de *C. sinensis* apresentaram menor expressão de NADPH-diaforase no córtex cerebral. Este resultado é coerente com os resultados encontrados no modelo esconder esferas. Finalmente, a compilação de todos os resultados deste estudo permite sugerir que o óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce), administrado por via inalatória, apresentou efeito tipo ansiolítico em vários modelos de ansiedade, e tal efeito, possivelmente, parece estar sendo mediado pelos sistemas de neurotransmissão nitrinérgico, serotonérgico e canabinóide.

Palavras-chave: Ansiedade. Óleo essencial. *Citrus sinensis*. Esconder Esferas.

ABSTRACT

Anxiety is related to changes in neurotransmission pathways. It has been found that substances available for treatment have multiple adverse effects. Thus, alternatives to treatment are sought. Highlighting the essential oils of the genus *Citrus*, such as *Citrus sinensis* oil. The objective of this study was to examine the anxiolytic effect of inhalation of sweet orange essential oil (*Citrus sinensis*) on anxiety models. As well, the relationship of this effect with neurotransmission systems. Swiss male mice were used. The animals were submitted to 15 minutes of inhalation with essential oil (*Citrus sinensis*), before the tests Marble burying, Neophobia-Induced Hypophagia, Light-Dark Box, Elevated plus maze, Open Field and Spontaneous Movement Box. Subsequently, pharmacological challenges were performed to test the influence of neurotransmission systems (noradrenergic, gabaergic, cannabinoid, serotonergic and nitrinergic) on the anxiolytic of essential oil. In addition, NADPH-diaphorase analysis was performed in the cerebral cortex of the animals. The conclusions about the study showed that the essential oil of *Citrus sinensis* showed an anxiolytic effect, in the test of Hide Spheres, in the concentration of 5% and 10%. The Light-Dark Box test indicated that the treatment with the essential oil significantly increased the residence time on the light side. Parameter more consistently related to an anxiolytic effect. The Neophobia-Induced Hypophagia test demonstrated a decrease in the latency time to start the intake, which is indicative of an anxiolytic effect. In the open field test, the animals showed no alteration of the locomotor activity, but an alteration on emotional (significant decrease in the number of stool) was observed. Suggesting an anxiolytic effect of *C. sinensis* essential oil in the open field. And in the Elevated plus maze test the animals showed an increase in the number of entries and the percentage of entries in the open arms. Again, no change in the locomotor activity was observed in the movement box, which is consistent with the absence of a change in the number of entries in the closed arms in this model, a parameter considered as an index of locomotor activity in the model. In this model, this profile is consistent with an anxiolytic effect. Pretreatment with picrotoxin did not influence the effect of the essential oil of *C. sinensis* on the test of Marble burying, indicating the GABAergic non-participation in this effect. The outcome of the noradrenergic system may be considered inconclusive. Pre-treatment with WAY100635 blocked the anxiolytic effect of *C. sinensis* essential oil, indicating that the serotonergic system would mediate the anxiolytic effect of the essential oil of *C. sinensis*. The AM251 antagonist reversed the anxiolytic effect of the essential oil. This result suggests that the cannabinoid system participates in the anxiolytic effect of the essential oil of *C. sinensis*. Again, the essential oil of 5% *C. sinensis* and 7-NI presented an anxiolytic effect in the test of Marble burying, without significantly altering the locomotor activity. It was observed that mice receiving inhalation of *C. sinensis* essential oil showed lower expression of NADPH-diaphorase in the cerebral cortex. This result is consistent with the results found in the test of Marble burying. Finally, the compilation of all the results of this study suggests that the essential oil of *Citrus sinensis* (sweet orange), inhalation, presented an anxiolytic effect in several anxiety models, and this effect possibly seems to be mediated by Nitrinergic, serotonergic and cannabinoid neurotransmission.

Key words: Anxiety. Essential oil. *Citrus sinensis*. Marble burying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1 – <i>Citrus sinensis</i> E ÓLEO ESSENCIAL COMERCIAL.....	26
FOTO 1 – CAIXA DE INALAÇÃO.....	33
FOTO 2 – CAIXAS DO EXPERIMENTO ESCONDER ESFERAS	34
FOTO 3 – APARATO DO EXPERIMENTO CAIXA CLARO-ESCURO	34
FOTO 4 – APARATO DO EXPERIMENTO HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA	35
FOTO 5 – APARATO DO EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	37
FOTO 6 – APARATO DO EXPERIMENTO CAMPO ABERTO	38
FOTO 7 – APARATO DO EXPERIMENTO CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.....	40
ILUSTRAÇÃO 2 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO ESCONDER ESFERAS	43
ILUSTRAÇÃO 3 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO CAIXA CLARO-ESCURO	43
ILUSTRAÇÃO 4 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO CAMPO ABERTO	44
ILUSTRAÇÃO 5 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA	44
ILUSTRAÇÃO 6 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	45
ILUSTRAÇÃO 7 – DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS ESCONDER ESFERAS (SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSÃO)	47
ILUSTRAÇÃO 8 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO PARA ANÁLISE NADPH- DIAFORASE.....	48

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS/CURVA DOSE-RESPOSTA (EXPERIMENTO 1).....	42
QUADRO 2 – ESQUEMA CAIXA CLARO-ESCURO	43
QUADRO 3 – ESQUEMA CAMPO ABERTO	43
QUADRO 4 – ESQUEMA HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA	44
QUADRO 5 – ESQUEMA LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	45
QUADRO 6 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA NORADRENÉRGICO	46
QUADRO 7 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA GABAÉRGICO	46
QUADRO 8 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA CANABINÓIDE	46
QUADRO 9 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA SEROTONÉRGICO	46
QUADRO 10 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA NITRINÉRGICO ...	47
QUADRO 11 – ESQUEMA DA ANÁLISE PARA O TESTE NADPH-DIAFORASE ...	47
QUADRO 12 – SÍNTESE DOS RESULTADOS DO TRABALHO.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE NO MODELO DE ESCONDER ESFERAS	49
FIGURA 2 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 5% DO ÓLEO ESSENCIAL NO MODELO DA CAIXA CLARO-ESCURO	51
FIGURA 3 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO CAMPO ABERTO	52
FIGURA 4 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DE NEOFOBIA ALIMENTAR, COM JEJUM DE 16H	52
FIGURA 5 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DE NEOFOBIA ALIMENTAR, COM JEJUM DE 24H	53
FIGURA 6 – EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	54
FIGURA 7 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM IOIMBINA (1MG/KG, I.P.) SOBRE O EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DE ESCONDER ESFERAS	55
FIGURA 8 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PICROTOXINA (0,5MG/KG, I.P.) SOBRE O EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DE ESCONDER ESFERAS	56
FIGURA 9 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM AM251 (1MG/KG, I.P.) SOBRE O EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO DE ESCONDER ESFERAS	57
FIGURA 10 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM WAY (3MG/KG, I.P.) SOBRE O EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO ESCONDER ESFERAS	58
FIGURA 11 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM L- ARGININA (200MG/KG, I.P.) SOBRE O EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE 5% NO MODELO ESCONDER ESFERAS	60
FIGURA 12 – INTENSIDADE DA COLORAÇÃO DE NADPH-DIAFORASE DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ANSIEDADE.....	13
1.2 NEUROTRANSMISSORES E ANSIEDADE	14
1.2.1 Neurotransmissão GABA	15
1.2.2 Neurotransmissão Serotonérgica.....	15
1.2.3 Neurotransmissão noradrenérgica	18
1.2.4 Neurotransmissão canabinóide	18
1.2.5 Neurotransmissão nitrinérgica.....	20
1.3 PLANTAS MEDICINAIS	21
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
1.4.1 Gênero <i>Citrus</i>	24
1.4.2 Óleo Essencial de Laranja doce (<i>Citrus sinensis</i>)	25
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 ANIMAIS.....	31
4.2 DROGAS E TRATAMENTOS	31
4.3 MÉTODO PARA INALAÇÃO.....	32
4.4 MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	33
4.4.1 Modelos de Ansiedade.....	33
4.4.1.1 Esconder Esferas	33
4.4.1.2 Caixa Claro-Escuro	34
4.4.1.3. Hipofagia Induzida por Neofobia	35
4.4.1.4 Labirinto em Cruz Elevado	37
4.4.2 Atividade Locomotora/Exploratória.....	38
4.4.2.1 Campo Aberto	38
4.4.2.2 Caixa de Movimentação Espontânea	40
4.4.3 NADPH-diaforase	41
4.4.3.1 Remoção e congelamento do tecido	41
4.4.3.2 Secções cerebrais	41

4.4.3.3 NADPH-diaforase reação histoquímica	42
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
4.5.1 Avaliação do Efeito Tipo Ansiolítico	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE (<i>Citrus sinensis</i>).....	49
5.1.1 Esconder Esferas	49
5.1.2 Caixa Claro-Escuro	50
5.1.3 Campo Aberto	51
5.1.4 Hipofagia Induzida por Neofobia	52
5.1.5 Labirinto em Cruz Elevado	53
5.2 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSÃO NO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE (<i>Citrus sinensis</i>).....	55
5.2.1 Sistema Noradrenérgico.....	55
5.2.2 Sistema Gabaérgico	56
5.2.3 Sistema Canabinóide	57
5.2.4 Sistema Serotonérgico	58
5.2.5 Sistema Nitrérgico	59
5.2.6 NADPH – diaforase	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO 1 – ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL <i>Citrus sinensis</i>.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE

Sendo vista como o mal dos tempos modernos, a ansiedade tem atingido milhões de pessoas no Brasil e no mundo. Tendo sido subestimada por décadas, uma vez que as descrições da ansiedade patológica são consideradas recentes, levando em conta o grupo dos transtornos mentais, e só passou a ser vista com maior relevância no final do século XIX (BERNIK, 1999).

Dados da Previdência Social relatam que os transtornos mentais são a terceira causa de afastamentos do trabalho no Brasil, atingindo gastos do INSS (Instituto Nacional do Seguro Social) em torno de R\$ 200 milhões em pagamentos de benefícios anuais (BARBOSA-BRANCO et al., 2012). Levantamentos da Organização Mundial da Saúde mostram que existem pelo menos 264 milhões de pessoas no mundo que sofrem com algum transtorno de ansiedade. E que, atualmente, o Brasil teria o maior índice de pessoas com ansiedade. Cerca de 9,3% da população teria algum tipo de transtorno (OMS, 2017).

A ansiedade é considerada uma condição de aflição e angústia em relação a determinadas circunstâncias decorrentes de experiências desagradáveis, vivenciadas em diferentes contextos no dia a dia. Passa a ser considerada patológica quando sua manifestação ocorre em maior proporção e constância, refletindo em uma série de prejuízos à vida do paciente, levando-o a procurar tratamento (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998; ROSEN; SCHILKIN, 1998).

Fisiologicamente a ansiedade é caracterizada por alterações autonômicas, como taquicardia e palidez, disfunções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), entre outros (MACKENZIE, 1989; GRAEFF, 2007). A ansiedade tem sido associada a alterações nas vias de neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica, gabaérgica e dopaminérgica (MARTIM et al., 2009), além da neurotransmissão nitrinérgica (SPOLIDÓRIO et al., 2007) e canabinóide (MOREIRA; WOTJAK, 2010).

No que se refere à neurobiologia da ansiedade, apesar dos avanços no estudo deste transtorno, as alternativas farmacológicas destinadas ao tratamento dos transtornos de ansiedade ainda são restritas. Os benzodiazepínicos, antidepressivos (tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina e

inibidores da monoamino-oxidase), anti-histamínicos e a buspirona constituem ainda os principais fármacos disponíveis para o tratamento dos transtornos da ansiedade (TONKS, 2003). Mas, recentemente, o anticonvulsivante pregabalina foi incluído nesta lista (BALDWIN et al., 2013).

Além disto, ainda que as substâncias disponíveis apresentem significativa eficácia no tratamento da ansiedade, muitos fármacos utilizados na terapêutica apresentam múltiplos efeitos adversos, ocasionando a não adesão do paciente ao tratamento continuado (KOEN; STEIN, 2011). Assim, tem-se buscado alternativas que possam ser eficazes no tratamento e que causem menos efeitos adversos.

Nesta linha, destacam-se os estudos envolvendo plantas medicinais que utilizam diferentes componentes presentes na sua composição. Dentre estes se sobressaem os óleos essenciais, cujo uso no tratamento de enfermidades remonta períodos históricos antigos (TYRREL, 1990). Tais óleos podem ser designados como uma combinação de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas plantas, como metabólitos secundários. A sua obtenção se dá a partir de diferentes partes das plantas medicinais como frutas, flores e cascas, ou das plantas por completo (SIMÕES et al., 2007), submetidas a diferentes processos físicos de destilação (NAVARRETE et al., 2011).

Conseqüentemente, diversos estudos têm sido realizados com óleos essenciais em modelos animais de ansiedade, utilizando camundongos e ratos. Estudos cujos resultados evidenciam os efeitos ansiolíticos apresentados por certos óleos essenciais, por via inalatória, tais como *Abies sachalinensis*; *Alpinia zerumbet*, *Citrus aurantium* L., *Citrus junos*, *Citrus sinensis*, *Lavandula angustifolia*, Rose e *Santalum album* L. (SOUSA et al., 2015).

1.2 NEUROTRANSMISSORES E ANSIEDADE

Destaca-se a influência de diferentes neurotransmissores envolvidos na ansiedade, como o Gaba, serotonina, noradrenalina, óxido nítrico e canabinóides.

1.2.1 Neurotransmissão GABA

Derivado da glutamina o neurotransmissor GABA, é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (GRAEFF, 1999; GORENSTEIN; POMPEIA, 1999).

Os neurônios GABAérgicos projetam-se para várias estruturas cerebrais prevenindo uma atividade neural excitatória excessiva. Tal atividade é capaz de atuar em regiões envolvidas na modulação da ansiedade, como estruturas corticais do sistema límbico, tais como, hipocampo, septo, amígdala e a matéria cinzenta periaquedutal (BATESON, 2002; MILLAN, 2003).

O sistema GABA apresenta receptores ionotrópicos (GABA-A e GABA-C) e os metabotrópicos (GABA-B). A diferença entre os tipos de receptores está relacionada com a sua localização, utilização e/ou tipo de segundo mensageiro e aspectos farmacológicos (COOPER et al., 1996).

Os receptores GABA-A estão relacionados a sítio de ação de várias substâncias (p.ex. benzodiazepínicos) com atividades ansiolíticas, sedativas, anticonvulsivantes e relaxantes musculares. Estudos sugerem a existência de vários subtipos de receptores GABA-A e pesquisas com roedores sugerem que os diversos efeitos dos ansiolíticos benzodiazepínicos parecem estar ocorrendo em decorrência de sua ação nos diferentes subtipos desse receptor (ROWLETT et al., 2005). Os benzodiazepínicos utilizados no tratamento de distúrbios de ansiedade tem sua ação por meio da via inibitória GABAérgica (RUDOLPH; MÖHLER, 2006; SILVA, 2001).

Os fármacos com alta afinidade pelo receptor GABA-A e que operam no sistema GABA são capazes de desempenhar um papel que culmina na redução da ansiedade; no entanto, quando se diminui a afinidade pelo receptor GABA-A, o efeito passa a ser inverso, ansiogênico (RIBEIRO et al., 1999).

1.2.2 Neurotransmissão Serotonérgica

Como um neurotransmissor, a serotonina (5-HT) atua por meio de receptores de membrana no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), além de locais não neuronais (por exemplo, sistemas: sanguíneo,

gastrointestinal, endócrino, sensorial e cardiovascular) (HANNON; HOYER, 2008). A sua ação ocorre por meio de pelo menos 13 receptores distintos acoplados à proteína G, sendo subdivididos em sete classes (5-HT1 a 5-HT7), com base em características estruturais, de transdução, operacionais e farmacológicas (HOYER et al., 2002; GREEN, 2006; HANNON; HOYER, 2008), sendo que o receptor 5-HT1 se encontra subdividido em 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1C e 5-HT1D (GREEN, 2006).

Enquanto este grau de diversidade física ressalta claramente a importância fisiológica da serotonina, evidencia-se a existência de um grau ainda maior de diversidade operacional. Assim, o desafio para a moderna pesquisa em relação a serotonina tem sido, delimitar mais precisamente as propriedades dos sistemas que fazem essa diversidade possível (HOYER et al., 2002).

Conforme sugerido por Coplan e Lydiard (1998), o sistema serotoninérgico influencia e é influenciado por outros neurotransmissores em estruturas cerebrais essenciais para a transformação e expressão da ansiedade. Griebel (1995) destaca o envolvimento da serotonina na ansiedade, salientando o envolvimento dos diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos na gênese da ansiedade.

No SNC a serotonina (5-HT) desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos e condições patológicas, estando sua transmissão envolvida na regulação do humor, controle de impulso, sono, vigília, fome, libido, e funções cognitivas, como a memória e a aprendizagem (AKIMOVA et al., 2009).

O sistema serotoninérgico desempenha um papel importante no processamento neuronal da ansiedade e tem-se no receptor 5-HT1A, seu maior destaque nos distúrbios de ansiedade. Ainda não é certo como as alterações no receptor 5-HT1A em diferentes áreas do cérebro humano estão especificamente associadas com disfunções no processamento da ansiedade. No entanto, a topologia das alterações deste receptor seria um fator relevante (BAILER et al., 2007; AKIMOVA et al., 2009).

O receptor 5-HT1A é expresso em concentrações elevadas no sistema límbico, córtex temporais, e pré-frontais, e tem baixa densidade nas áreas sensoriais primárias. Dada a sua ampla distribuição dentro do córtex, é importante considerar que o receptor 5-HT1A desempenha um papel não somente nos transtornos de ansiedade e afetivos, mas também na regulação de uma variedade de estados

fisiológicos e comportamentais, incluindo medo, agressividade e impulsividade (AKIMOVA et al., 2009).

Receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A} estão presentes nos neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal e medial da rafe e agem como auto-receptores somatodendríticos (GROSS et al., 2000; AKIMOVA et al., 2009). Os receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} estão localizados principalmente em áreas glutamatérgicas e gabaérgicas de neurônios piramidais em regiões límbicas e no córtex entorrinal e frontal (AZMITIA et al., 1996; DAVIDSON et al., 1999; ARTIGAS et al., 2006).

Akimova et al. (2009) enfatiza que a influência do receptor 5-HT_{1A} na fisiopatologia dos distúrbios de ansiedade pode ser combinada com polimorfismos genéticos no sistema serotoninérgico e fatores ambientais de risco, como o stress. Assim os transtornos de ansiedade são condições heterogêneas biologicamente influenciadas pela genética, epigenética e fatores ambientais.

Evidências sugerem, como destacam Menard e Treit (1999) e Engin e Treit (2008), que o controle neural da ansiedade pode ser análogo em organização ao sistema sensório-motor, ou seja, a ansiedade é controlada por múltiplos e complexos sistemas distribuídos ao longo do sistema nervoso central.

As ações da serotonina dependem do local neuroanatomico e do subtipo de receptor de 5-HT envolvidos (CANTO-DE-SOUZA et al., 2002; CORNELIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007). A 5-HT pode aumentar ou diminuir o comportamento da ansiedade em animais. De acordo com Graeff et al. (1997) a 5-HT aumenta a ansiedade, agindo sobre as estruturas prosencefálicas e na substância cinzenta periaquedutal (PAG). Entretanto o aumento da 5-HT estaria associado à redução do pânico (GRAEFF, 2002).

Destaca-se que uma redução da função de vias prosencefálicas serotoninérgicas, muitas vezes leva a um efeito ansiolítico, ao passo que a atividade aumentada destas vias normalmente resultaria em um efeito contrário, ansiogênico (GARDNER, 1986; CHOPIN; BRILEY, 1987). Cools et al. (2007) demonstram que após um processamento aversivo reforçado ocorre redução nos níveis de serotonina. Por sua vez, após um processamento aversivo atenuado ocorre aumento nos níveis de serotonina.

Diante da complexidade do papel da serotonina na ansiedade, conforme enfatizam Engin e Treit (2008) e Menard e Treit (1999), tem existido um gradativo interesse em estudos que visem relacionar regiões cerebrais específicas com o efeito ansiolítico de drogas. Filip e Bader (2009) enfatizam que o conhecimento deste sistema pode, eficientemente, identificar alvos serotoninérgicos específicos capazes de auxiliar em distúrbios do sistema nervoso central (SNC), por meio de intervenções farmacológicas na neurotransmissão serotoninérgica. Conforme apontam Davidson et al. (1999) o receptor 5-HT_{1A} tem sido bem caracterizado graças à disponibilidade farmacológica de agonistas e antagonistas seletivos e potentes.

Desse modo, Cools et al. (2007) reforça que não existe nenhuma dúvida acerca da importância da serotonina, não só em termos de modulação sensorial, mas também em termos de seu papel central na cognição e emoção e implicação em perturbações afetivas, como ansiedade.

1.2.3 Neurotransmissão noradrenérgica

A noradrenalina é uma monoamina que tem sido relacionada, entre outras funções, com o humor, sono e ansiedade. A noradrenalina estaria com sua função alterada nos transtornos de ansiedade, o que culminaria em aumentos ocasionais de sua atividade (RIBEIRO et al., 1999). Evidências demonstram que este neurotransmissor estaria com uma atividade alterada principalmente no transtorno de pânico e no estresse pós-traumático, sendo que a utilização de agonistas adrenérgicos (como o isoproterenol) e antagonistas alfa₂-adrenérgicos (como a ioimbina) seriam capazes de gerar ataques de pânico frequentes e severos em pacientes com este transtorno (RIBEIRO et al., 1999).

1.2.4 Neurotransmissão canabinóide

A maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos realizados salientam que uma sinalização atenuada de endocanabinóides seria capaz de promover a ocorrência de sintomas semelhantes aos observados nos transtornos de ansiedade e depressão (SAITO et al., 2010). Tem-se que a intoxicação por *Cannabis*, em humanos, seria capaz de produzir vários efeitos relacionados às emoções como euforia, redução da

ansiedade, alívio do estresse e aumento na sensação de bem-estar (CURRAN et al., 2002). Tais efeitos seriam também observados em estudos com modelos animais (BAMBICO et al., 2009). A ampla distribuição de receptores canabinóides, destacando o receptor CB1, em áreas do sistema nervoso central, evidenciando sua atuação em regiões cerebrais relacionadas com o controle emocional, são alguns dos dados que apontam a participação deste sistema na regulação da ansiedade (FREUND et al., 2003).

Os receptores canabinóides estão localizados em regiões do sistema nervoso central relacionadas com as emoções tais como, córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, estriado ventral, tálamo e hipotálamo, em humanos (GLASS et al., 1997; MATO; PAZOS, 2004), e roedores (HERKENHAM et al., 1990; HERKENHAM et al., 1991a; HERKENHAM et al., 1991b). Os receptores CB1 podem estar localizados em regiões com projeções excitatórias e inibitórias (FREUND et al., 2003). Estudos têm investigado os efeitos dos receptores CB1 em testes pré-clínicos de ansiedade (CAGNI, 2012).

Entretanto, a ativação dos receptores CB1 na ansiedade teria um efeito dose dependente, onde baixas doses gerariam efeitos ansiolíticos e altas doses induziriam efeitos ansiogênicos (SAITO et al., 2010). Tal efeito seria decorrência de uma saturação diferenciada dos receptores CB1 nas regiões cerebrais relacionadas com as emoções (VIVEROS et al., 2005; HILL; GORZALKA, 2009a).

Outros estudos destacam que animais *knockout* para receptores CB1 apresentariam aumento de comportamentos tipo-ansiosos em modelos animais (MARTIN et al., 2002; HALLER et al., 2002; HALLER et al., 2004). Além disso, seriam mais susceptíveis ao estresse crônico (MARTIN et al., 2002), e teriam respostas reduzidas a estímulos de recompensa, como o açúcar e o álcool (PONCELET et al., 2003).

Estudos pré-clínicos indicaram que bloqueio crônico da sinalização, com a utilização de antagonistas CB1, aumenta a ansiedade e depressão (NISSEN et al., 2008; HILL; GORZALKA, 2009b). Observou-se também que a utilização de antagonistas do receptor CB1 podem ocasionar efeitos ansiolíticos (GRIEBEL et al., 2005), ansiogênicos (NAVARRO et al., 1997) ou até mesmo nenhum efeito (ADAMCZYK et al., 2008) em estudos pré-clínicos. Estes resultados contraditórios poderiam ser explicados pelas diferentes doses utilizadas, da espécie animal

testada, dos testes comportamentais utilizados e suas condições experimentais (CAGNI, 2012).

1.2.5 Neurotransmissão nitrinérgica

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização que se encontra expressa por todo o organismo e é responsável pela regulação de vários processos biológicos (OLIVENZA, 2000; WULTSCH, 2007). O NO é sintetizado pelo seu precursor L-arginina por uma família de enzimas denominadas de NO sintases. No cérebro de um adulto a isoforma neuronal (nNOS) é a mais abundante (CHARLES, 1992; RICHARD, 1994; SILVA, 2000; BARAÑANO, 2001). Estudos demonstram que a inibição seletiva de nNOS aumenta a neurogênese hipocampal (ZHOU, 2007).

Ressaltando a influência do óxido nítrico, tem sido relatado que o mesmo se encontra envolvido com a regulação de comportamentos como a ansiedade, depressão e cognição (CUNNINGHAM et al., 1994; WULTSCH, 2007; KRASS, 2010), incluindo a ansiedade (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000).

O NO atua como um mensageiro intracelular no SNC, desempenhando um papel modulador em várias funções cerebrais, tais como sinapses, apoptose, ativação do sistema imune, neuroproteção e disfunções como neurotoxicidade (PRAST; PHILIPPU, 2001; NAPOLI; IGNARRO, 2003). No SNC o óxido nítrico se encontra presente em regiões cerebrais tais como, cerebelo, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, hipocampo, córtex cerebral, bulbo olfatório, etc. (BREDT et al., 1990). Estudos tem demonstrado a influência do óxido nítrico em distúrbios psiquiátricos, sendo que a enzima nNOS se encontra amplamente distribuída em diferentes regiões encefálicas relacionadas com comportamentos de medo e ansiedade (VINCENT; KIMURA, 1992).

Estudos relatam que o óxido nítrico estaria exercendo um importante controle em estados emocionais relacionados à ansiedade e mesmo possivelmente estaria associado a este transtorno (GUIMARAES et al., 2005).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas como medicamentos é tão antiga quanto à história da humanidade. Desde o início dos tempos, baseado em descobertas ao acaso, de forma empírica, o homem buscava na natureza uma maneira de tentar amenizar os males da saúde (MORS, 1982).

A aplicação de plantas medicinais como fonte de alívio para doenças pode ser percebida em documentos de civilizações primitivas na China, Índia e Europa. Acredita-se, portanto, que as farmacopéias tradicionais foram elaboradas ao longo de muitos séculos de experimentação onde o conhecimento empírico acumulado foi preservado e transmitido de geração em geração (ELISABETSKY; SETZER, 1985). Nesse processo, os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies, gêneros, bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal (LÉVI-STRAUSS, 1989).

Em virtude de eventos históricos, o estudo das plantas medicinais ficou estagnado por um longo período (MARTINS et al., 2000). Durante o século XIX, o uso das ervas ficou mais restrito, com o advento de medicamentos obtidos por meio de processos químicos industriais. No século XX, nas guerras mundiais, o interesse pelas plantas medicinais voltou devido à necessidade de obter remédios eficazes e de baixo custo para múltiplas enfermidades (HOTESTTMANN et al., 2003).

No Brasil, o uso das plantas como medicamento teve influência das culturas indígena, africana e europeia. A flora brasileira foi descoberta por cientistas estrangeiros, especialmente os naturalistas, que realizavam grandes expedições científicas no Brasil desde o descobrimento pelos portugueses até ao final do século XIX (DI STASI, 1996; MARTINS et al., 2000; SILVA, 2004). A cultura e o uso das plantas medicinais no Brasil pela população ocorreram, em geral, no decorrer de gerações, por meio da passagem de conhecimentos adquiridos pelos antepassados.

Desse modo, destaca-se grande quantidade de plantas medicinais existentes em todas as partes do mundo e em especial no Brasil, devido à grande biodiversidade existente. Porém, mesmo com a utilização recorrente de plantas medicinais, realizada a milhares de anos para tratamento de inúmeras doenças, os mecanismos de ação na maioria das vezes são desconhecidos. Assim, o estudo desses mecanismos e dos princípios ativos presentes nas plantas medicinais tornou-

se uma opção na busca de novas alternativas terapêuticas para diferentes patologias existentes (HOSTETTMANN et al., 2003).

1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a antigüidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, e à busca de bem estar físico, por meio dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes e cascas. As substâncias aromáticas também já eram populares na China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incenso, poções e vários tipos de acessórios. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

A primeira referência do uso médico de plantas e óleos, o Kraüterburch, foi publicada em 1551, pelo alemão Alan Loncir. O termo Aromaterapia foi proposto pelo químico francês Gatefossé, a partir da experiência em acelerar sua própria convalescença das queimaduras sofridas após um grave acidente em seu laboratório, por meio do uso da essência de lavanda (SIANI et al., 2012).

Há cerca de duas décadas, vem se consolidando nos meios científicos o termo Aromacologia, que trata do estímulo, por intermédio do olfato, ao sistema límbico e ao hipotálamo. O primeiro responsável pelo controle do comportamento emocional e impulsos motivacionais do ser humano, e o segundo, controlador da maioria das funções vegetativas e endócrinas do corpo (CORAZZA, 2000).

A Aromacologia lida com os efeitos resultantes de estímulos alcançados por vias olfativas até o cérebro. Não trata dos efeitos alcançados por intermédio da introdução de agentes ativos na corrente sangüínea, nem tão pouco da ingestão ou da absorção transdérmica, resultante da aplicação por massagem (JELINEK, 1994).

Os experimentos com o sistema olfativo e inalações são principalmente conduzidos por pesquisadores e especialistas do Japão, dos Estados Unidos e da Europa. Fora a indústria de cosméticos, poucos trabalhos foram desenvolvidos

sobre a aplicação tópica dos óleos, e são concentrados em seus efeitos terapêuticos, associados às práticas de massagens em pacientes hospitalizados. A maior parte da pesquisa realizada com óleos essenciais ingeridos é executada pelas indústrias de alimentos e bebidas, e não visam exatamente seus aspectos farmacológicos (BUCKLE, 1993).

O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço, para quem o componente efetivo de uma droga era a “quinta essência”. Os óleos essenciais podem ser extraídos de várias partes das plantas como frutas, flores, cascas, ou ainda de plantas inteiras (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007).

São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos orgânicos voláteis produzidos como metabólitos secundários nas plantas, de compostos de baixo peso molecular. Alguns se apresentam altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas, constituídos por diferentes substâncias químicas, como, principalmente, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, álcool, aldeídos, fenóis e hidrocarbonetos. Fisicamente, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (RAI; CARPINELLA, 2006; BRASIL, 2007; MALUF, 2008; NAVARRETE et al., 2011).

Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (OE). O óleo obtido de uma planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007).

Dentre os óleos essenciais, os cítricos são extraídos das cascas e podem ser utilizados na indústria dando sabor em bebidas, sorvetes e outros alimentos, e na fabricação de cosméticos, como sabonetes e perfumes (SANTOS et al., 2003). Esses óleos são também bastante utilizados em tratamentos médicos, sendo conhecidos por exibir propriedades antimicrobianas, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária (REHMAN et al., 2007), além de serem utilizados para

minimizar distúrbios do sistema nervoso central, tais como anticonvulsivante (ALMEIDA et al., 2011), antidepressivo (KOMORI et al., 1995) e ansiolítico (LEHMER et al., 2000; LEE et al., 2011; GOES et al., 2012).

1.4.1 Gênero *Citrus*

Citrus é um gênero de plantas que faz parte da ordem Sapindales, família Rutaceae, subfamília Aurantiodeae que engloba cerca de 150 gêneros e 2000 espécies (ANWAR et al., 2008). Os exemplares deste gênero são originários da Ásia e devido às condições favoráveis para o seu desenvolvimento, foram introduzidos no Brasil pelos portugueses (DONADIO et al., 2005). São espécies cultivadas em mais de 100 países ao redor do mundo, em áreas tropicais e subtropicais, em que as temperaturas são sempre quentes (SINGH; RAJAM, 2009).

A família Rutaceae é composta por plantas subarborescentes ou arbóreas. Esta família apresenta folhas alternadas, estípulas ausentes, providas de glândulas oleíferas. Possui árvores com espinhos. Inflorescências perfumadas, pentâmeras, ou tetâmeras, diclamídeas, cíclicas e hermafroditas. Fruto seco capsular de um tipo especial, o esperídio (*Citrus*), indeiscente, com grande desenvolvimento de células papiliformes que formam o endocarpo e que se tornam suculentos englobando as sementes (JOLY, 1985).

Os *Citrus* são arbustos ou árvores de tamanho pequeno a médio, com cerca de 6m de altura, embora algumas espécies atinjam 15m (MANNER et al., 2006). As flores são brancas e aromáticas e frutos do tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (MAGALHÃES JUNIOR et al., 2005).

O Gênero *Citrus* é composto por 16 espécies que inclui: tangerinas (*Citrus reticulata*), toranjas (*C. grandis* Osbeck), laranja-azeda (*C. aurantium* L.), laranja-doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), limas (*C. aurantifolia* [Christm.] Swingle), cidras (*C. medica* L.), limões (*C. limon* Burm. f.) e pomelos (*C. paradisi* Osbeck) (SWINGLE, 1967).

Os *Citrus* estão entre as mais importantes árvores frutíferas do mundo e o seu processo de produção e consumo tem aumentado consideravelmente desde os meados da década de 1980 (STEUER et al., 2001).

As espécies deste gênero (*Citrus*) são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. A maioria dos compostos flavônicos são heterosídeos de flavanonas (hesperidosídeo, neohesperidosídeo, naringosídeo, eriodictiosídeo). Ocorrem também outros flavonóides, como a diosmina e o rutosídeo (BRUNETON, 1999). Por conseguinte, em decorrência de sua ampla distribuição, facilidade de cultivo e extração, as espécies cítricas têm se tornado alvo de estudos e pesquisas que buscam elucidar as propriedades terapêuticas associadas aos seus compostos.

1.4.2 Óleo Essencial de Laranja doce (*Citrus sinensis*)

O termo fruta é aplicado à estrutura que cerca, protege ou guarda as sementes até estarem maduras, no estágio da reprodução das espécies botânicas em todo o reino vegetal (TAYLOR, 2005). Dessa forma, a laranja doce é um dos mais favorecidos frutos do mundo, suas folhas são persistentes, com coloração verde-clara quando novas e passam para o verde mais escuro à medida que envelhecem. Sua forma é elíptica-oval (7-15cm), seu fruto é uma baga (fruto carnudo simples, no qual a parede do ovário inteiro amadurece em um pericarpo comestível), dividido em epicarpo (casca com cor verde a amarelo), mesocarpo e endocarpo dividido em câmaras, podendo ser globulosos ou subglobulosos (DE ARAÚJO et al., 2003).

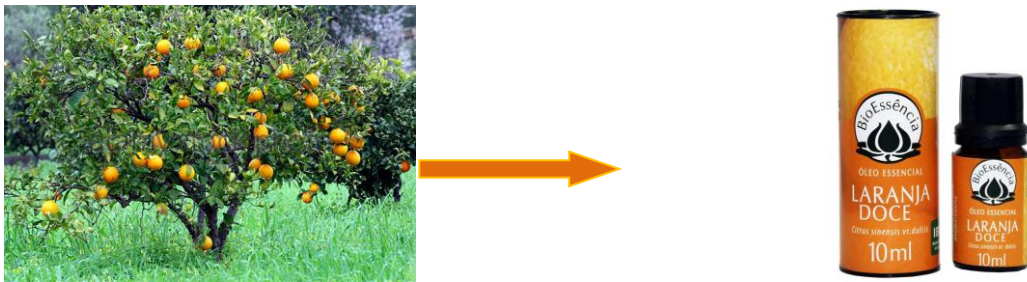
A laranja doce é rica em óleos voláteis, flavanóides, cumarinas e pectinas (BRUNETON, 1999; YU et al., 2005), vitamina C (ácido ascórbico) e terpenóides (OTHA; HIROSE, 1966), com propriedades potenciais de promoção à saúde (YU et al., 2005). Ao chá das folhas se atribui propriedades sudorífera, antigripal, carminativa, para insônia, calmante e antiespasmódica. O chá da casca e dos frutos é indicado contra má digestão (LORENZI; MATOS, 2002).

Segundo Silva-Santos et al. (2002; 2006) o óleo essencial (OE) de laranja, extraído do pericarpo do fruto, é um subproduto da indústria do suco. Derivados do OE de laranja são utilizados na indústria farmacêutica no geral, além de materiais de limpeza, em produtos alimentícios como balas e bebidas. O rendimento máximo da

extração de óleos cítricos é de 0,4%, ou seja, para cada tonelada de fruta processada são obtidos 4kg de óleo.

Este óleo essencial contém compostos com propriedades potencialmente terapêuticas importantes (VALE et al., 1999; 2002). O óleo de laranja doce (*C. sinensis*), (ILUSTRAÇÃO 1), apresenta como princípios ativos hidrocarbonos, monoterpenos, sesquiterpenos e aldeídos (DUGO et al., 2010), salientando que a estes princípios ativos são atribuídos seus potenciais efeitos terapêuticos.

ILUSTRAÇÃO 1 – *Citrus sinensis* E ÓLEO ESSENCIAL COMERCIAL



FONTE: <http://www.alamy.com/stock-photo/orange-tree-citrus-sinensis.html>;
<http://loja.bioessencia.com.br/10-ml-ct-9b16>, 2015.

Destacando que no óleo essencial de laranja doce, utilizado neste estudo apresentou como princípios ativos, a partir da análise cromatográfica, o composto majoritário limoneno com 92,23%, além de compostos minoritários como mirceno com 0,78%, cis óxido de limoneno com 1,55%, trans óxido de limoneno com 0,94%, trans p-menta-2,8-dien-1-ol com 0,51%, cis pmenta-2,8-dien-1-ol com 0,55%, carvona com 0,74%, cis carveol com 0,83% e trans carveol com 0,71%.

Diante disto, Faturi et al. (2010) destaca que o exemplar de óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*) utilizado em seu estudo também apresentou o monoterpeno (limoneno) em maior porcentagem e associa a este o efeito ansiolítico observado em modelos animais de ansiedade.

O estudo clínico de Goes et al. (2012), apresentou propriedades ansiolíticas em voluntários, com o uso do óleo essencial de laranja doce. O odor do óleo de *Citrus sinensis*, foi capaz de reduzir o estado ansioso em estudo realizado com 35 pacientes (LEHRNER et al., 2000). Adicionado a isso outro estudo demonstrou também melhora do humor, maior tranquilidade além da diminuição da ansiedade em 50 pacientes testados (LEHRNER et al., 2005). E em estudo clínico controlado e

randomizado, observou-se que crianças tiveram a diminuição do cortisol salivar e isto associado a uma melhora do estado de ansiedade (JAFARZADEH et al., 2013). Demonstrando, assim, que o óleo essencial de *Citrus sinensis* poderia apresentar uma alternativa acerca do tratamento da ansiedade.

2 JUSTIFICATIVA

Óleos essenciais de cítricos, espécies do gênero *Citrus*, são ricos em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (BRUNETON, 1999). Estudos com estes óleos essenciais têm demonstrado que os mesmos possuem atividades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária (REHMAN et al., 2007), além de propriedades antidepressivas e ansiolíticas (LOPES et al., 2011). Com comprovada atividade ansiolítica destacam-se os óleos cítricos de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* e *Citrus limon* (FATURI et al., 2010; LOPES et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Particularmente em relação ao óleo essencial de *Citrus sinensis*, pode-se observar o estudo de Faturi et al. (2010), que utilizando o óleo essencial em modelos animais de ansiedade (labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro), por via inalatória, apontou o limoneno como principal composto volátil (97,66%) identificado na amostra utilizada, atribuindo ao mesmo o efeito ansiolítico observado. Resultado corroborado pelo estudo de Lima et al. (2013), que ao utilizar o princípio ativo limoneno, observou atividade tipo ansiolítica no modelo do labirinto em cruz elevado.

Dentre as alternativas para pesquisa de novos fármacos, tem-se nas plantas medicinais um representativo arcabouço de possibilidades terapêuticas devido à diversidade de substâncias ativas encontradas. Contudo, os mecanismos de ação, correspondentes à atividade farmacológica, na maioria das vezes, são desconhecidos (HOSTETTMANN et al., 2003). Este fato leva à investigação, não só dos princípios ativos (substância ou conjunto delas que é responsável pelos efeitos terapêuticos) presentes nas plantas, como também dos mecanismos de ação envolvidos.

Sendo assim, espera-se com o presente estudo contribuir para o conhecimento acerca do mecanismo de ação do óleo essencial de laranja doce e conseqüentemente, a compreensão da fisiopatologia do transtorno; o desenvolvimento de novos fármacos com novo mecanismo de ação; e a possibilidade de associação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação aumentando assim a potenciação.

Justifica-se ainda em virtude das limitações acerca da terapêutica farmacológica atual do transtorno de ansiedade generalizada, visando à descoberta

de novas fontes terapêuticas e, assim, despertar o advento de estudos pré-clínicos e clínicos capazes de corroborar com a formulação de medicamentos que tenham eficácia, efetividade e eficiência. Medicamentos, que possam trazer maior adesão do paciente ao tratamento, em virtude do aparecimento de menos efeitos adversos e, assim, melhor qualidade de vida.

Assim, no presente trabalho assume-se como propósito analisar o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*) em modelos animais de ansiedade, como Esconder Esferas, Caixa Claro-Escuro, Hipofagia Induzida por Neofobia, Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado (aumentando a validade dos resultados), apontando sua relação com os mecanismos de neurotransmissão serotoninérgicos, gabaérgicos, noradrenérgicos, nitinérgicos e canabinóides.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito ansiolítico do óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*), por via inalatória, em modelos animais de ansiedade, apontando sua relação com os mecanismos de neurotransmissão por meio da co-administração de fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito ansiolítico de concentrações crescentes do óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*), em camundongos, no modelo Esconder Esferas;
- Avaliar o efeito ansiolítico do óleo essencial de laranja doce em modelos de ansiedade: Labirinto em Cruz Elevado, Hipofagia Induzida por Neofobia e Caixa Claro-Escuro;
- Avaliar a atividade locomotora e sedação: Campo Aberto e Caixa de Movimentação Espontânea;
- Analisar se o efeito ansiolítico do óleo essencial de laranja doce, no modelo de Esconder Esferas, é alterado pela administração prévia de:
 - Picrotoxina, antagonista receptor GABA-A;
 - WAY 100635, antagonista receptor 5HT-1A;
 - L-arginina, precursor NO;
 - Ioimbina, antagonista receptor alfa2;
 - AM251, antagonista receptor CB1; e
- Analisar o NADPH-diaforase no córtex cerebral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados para o desenvolvimento deste trabalho camundongos adultos machos Swiss (30-45g), fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas) e temperatura (21 ± 1 °C), com comida e água *ad libitum*. Para cada experimento realizado no estudo, foram utilizados animais ingênuos.

No estudo adotou-se medidas para utilizar o menor número de animais possível e de minimizar o seu sofrimento. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei número 11.794 (Lei Arouca) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR, pelo número 803.

4.2 DROGAS E TRATAMENTOS

As drogas administradas:

- Óleo essencial de *Citrus sinensis* (Bioessência, Jaú, Brasil) nas concentrações de 1; 2,5; 5; e 10% em propilenoglicol (v/v);
- Acetato de amila (Sigma), essência de banana, utilizada como odor neutro que não produz alteração comportamental tipo ansiolítica, na concentração de 5% em propilenoglicol (v/v);
- Diazepam (União Química, Brasil), modulador alostérico positivo do GABA no receptor GABA-A, 1 mg/kg, i.p, dissolvida em água destilada (CHIOCA et al., 2013);
- Picrotoxina (Sigma), antagonista receptor GABA-A, 0,5 mg/kg, i.p, dissolvida em salina (CHIOCA et al., 2013);
- 8-OH-DPAT (Sigma), agonista do receptor 5-HT1A, 3,0 mg/kg, i.p, dissolvido em salina (CHIOCA et al., 2013);

- WAY100635 (Sigma), antagonista receptor 5HT-1A, 3,0 mg/kg, i.p, dissolvido em salina (CHIOCA et al., 2013);
- loimbina (Sigma), antagonista receptor alfa₂, 1,0 mg/kg, i.p, dissolvida em salina (NICOLAS et al., 2006);
- Nortriptilina (Eurofarma, São Paulo, Brasil), inibidor da recaptção de NA, 15 mg/kg, i.p dissolvida em salina;
- WIN 55,212-2 (Sigma), agonista CB1, 1 mg/kg, i.p, dissolvido em 2% de tween 80 em salina (CASAROTTO et al., 2010);
- AM251 (Sigma) antagonista receptor CB1, 1mg/kg, i.p, dissolvido em 2% de tween 80 em salina (CASAROTTO et al., 2010);
- 7-nitroindazole (7-NI; Sigma), inibidor da NOS, 10 mg/kg, i.p, dissolvido em óleo de milho e mantido em gelo (UMATHE et al., 2009); e
- L-arginina (Sigma), precursor NO, 200 mg/kg, i.p, dissolvida em salina (UMATHE et al., 2009; CHIOCA et al., 2013).

Todas as drogas foram preparadas minutos antes dos experimentos e administradas no volume de 10 ml/kg de peso.

Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta com diferentes concentrações de óleo essencial de *C. sinensis* (1 a 10%) no modelo Esconder Esferas, utilizando-se o diazepam como controle positivo e acetato de amila como controle negativo. Em seguida, foram realizados experimentos com outros modelos de ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado, Caixa-Claro Escuro etc.) e, posteriormente, foram feitas avaliação de cada sistema de neurotransmissão associado ao efeito do óleo essencial de laranja doce, sendo eles, sistema gabaérgico, sistema noradrenérgico, sistema serotoninérgico, sistema canabinóide e sistema nitrinérgico.

4.3 MÉTODO PARA INALAÇÃO

Para a realização da inalação os animais foram acondicionados dentro de um recipiente plástico com tampa (32x24x32cm) (FOTO 1). Os camundongos foram mantidos por 15 minutos na inalação e imediatamente após foram colocados no

experimento teste. Água destilada (controle), acetato de amila 5% (odor neutro) e óleo essencial de *C. sinensis* (OECs) nas concentrações de 1,0, 2,5, 5,0 e 10% (v/v), em volume constante de 1ml, foram instilados sobre um chumaço de algodão (0,7 a 0,8g), que foi colocado dentro do recipiente plástico. Cada algodão foi utilizado apenas uma vez e renovado para cada inalação.

FOTO 1 – CAIXA DE INALAÇÃO



FONTE: A autora (2016).

4.4 MODELOS COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Modelos de Ansiedade

4.4.1.1 Esconder Esferas

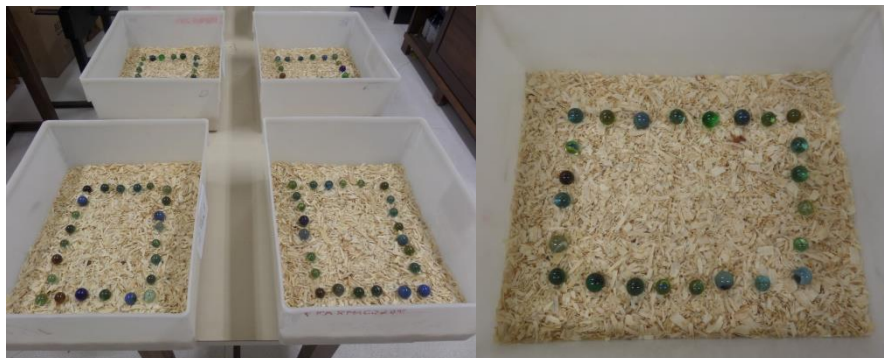
O teste de esconder esferas se baseia no comportamento característico de cobrir com cepilho novos objetos (p.ex. esferas de vidro) colocados no ambiente do camundongo, o que ocorria devido à aversão em decorrência de situações aversivas aos animais, como objetos nocivos, alimentos associados como desagradáveis, sendo descrito como um comportamento defensivo que reflete um estado de ansiedade dos animais (WILKIE et al., 1979)

O modelo é utilizado para detectar efeitos ansiolíticos de drogas. Por exemplo, moduladores alostéricos positivos do receptor GABA-A como o diazepam (ARCHER et al., 1987; BROEKKAMP et al., 1986; GYERTYAN, 1995) tendem a diminuir o número de esferas escondidas (BROEKKAMP et al., 1986).

Um procedimento alternativo proposto Njung'e e Handley (1991) que mediram a atividade locomotora em experimentos separados, mostraram que, em contraste com a ioimbina, o diazepam e a zimelidina tinham a capacidade de reduzir o número de esferas escondidas sem afetar a atividade locomotora. Estes dados demonstram que tal modelo seria sensível a ansiolíticos e antidepressivos com atividade ansiolítica (NICOLAS et al., 2006). Portanto, a combinação do teste de esconder esferas com medições da atividade locomotora teriam a capacidade de melhorar a validade preditiva para drogas com ação tipo-ansiolítica. Além disso, permite limitar o número de animais utilizados e, por conseguinte, pode ser utilizado como um modelo de rastreio valioso para a detecção de compostos com efeitos ansiolíticos (NICOLAS et al., 2006).

O modelo consiste em colocar camundongos individualmente no centro de uma caixa de polietileno (40X34X16cm), forrada com 5cm de cepilho, contendo 24 esferas de vidro (15mm de diâmetro) distribuídas uniformemente pela periferia da caixa (5cm das paredes) (FOTO 2). Após um período de 20 minutos, o animal foi removido da caixa e foi contado o número de esferas com pelo menos 2/3 da sua superfície coberta por cepilho. Após cada procedimento a caixa foi trocada para o próximo animal e as esferas limpas com álcool 10%.

FOTO 2 – CAIXAS DO EXPERIMENTO ESCONDER ESFERAS



FONTE: A autora (2016).

4.4.1.2 Caixa Claro-Escuro

O teste de transição Claro-Escuro foi inicialmente descrito por Crawley e Goodwin (1980) para investigar as propriedades ansiolíticas de determinadas drogas. O modelo baseia-se na aversão inata que os roedores têm por áreas

iluminadas. Os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos e de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} já foram detectadas nesse modelo animal (BOURIN; HASCOET, 2003).

O instrumento consiste em uma caixa com dois compartimentos iguais, conectados por uma pequena porta (FOTO 3). Um compartimento é iluminado, colocando uma luz de 60W, e o outro escuro. Coloca-se o animal no compartimento claro. Cada animal permanece explorando ambos os compartimentos por 5 min. e vários parâmetros foram analisados: o número de transições entre os compartimentos, o tempo gasto em cada compartimento e latência para a primeira transição. O número total de transições parece ser um índice de atividade locomotora, ao passo que o aumento seletivo no número de transições do ambiente escuro para o claro e um maior tempo de permanência no lado claro são considerados índices de atividade tipo-ansiolítica.

FOTO 3 – APARATO DO EXPERIMENTO CAIXA CLARO-ESCURO



FONTE: A autora (2016).

4.4.1.3. Hipofagia Induzida por Neofobia

Tal experimento representa um poderoso modelo com validade para avaliação de drogas potencialmente ansiolíticas (DULAWA; HEN, 2005). Este modelo refere-se à inibição da alimentação produzida pela exposição à novidade. Avaliação da hiponeofagia tipicamente envolve apresentar a roedores comida em um ambiente ansiogênico, tal como um campo aberto ou gaiola desconhecida para medir a latência para alimentar e/ou quantidade consumida. Os animais são privados de alimentos antes do experimento ou são treinados para consumir um

produto altamente palatável (DULAWA; HEN, 2005). Os tratamentos ansiolíticos diminuem a latência e aumentam o consumo, enquanto os tratamentos ansiogênicos aumentam a latência e diminuem o consumo no novo ambiente (DULAWA; HEN, 2005).

A redução da alimentação em resposta a um ambiente, denominado "hiponeofagia", tem uma longa história na avaliação da emocionalidade e ansiedade (DULAWA; HEN, 2005). Hall (1934) observou uma relação inversa entre alimentação e defecação em animais expostos a um novo ambiente. Os paradigmas baseados em hiponeofagia são testes de conflito nos quais os animais enfrentam uma escolha entre aproximar-se e consumir um alimento desejável, em ambiente novo, e evitar o novo ambiente. Este modelo é tido como etologicamente relevante, não requerendo treinamento complexo, não causando estímulos dolorosos, sendo simples de conduzir e rentáveis, no sentido de se conseguir resultados satisfatórios (BELZUNG et al., 2001; BLANCHARD et al., 1998).

Os paradigmas do modelo de hiponeofagia demonstram boa validade para avaliação dos efeitos tipo-ansiolíticos de fármacos. O modelo foi padronizado por Soubrie e colaboradores (1975), proposto para avaliação de comportamentos do tipo-ansio-gênico/ansiolítico (SOUBRIE et al., 1975; STEPHENS, 1973; POSCHEL et al., 1974; DULAWA et al., 2004).

Este modelo foi empregado em duas versões. Na primeira versão os animais permaneceram em jejum de 16h, antes do experimento. Foram colocadas dentro das caixas viveiros com peletes de ração previamente pesados. Passados 30min os animais foram retiradas das caixas e foi pesada a quantidade de ração consumida, pelo diferença do peso do pelete (g) antes e pelo peso do pelete (g) depois.

Na segunda versão os animais foram colocados em uma caixa diferente da caixa viveiro, forrada com cepilho, e disposta uma placa de petri com ração previamente pesada, no centro da caixa (FOTO 4). A caixa foi colocada em uma sala iluminada, com a adição de uma iluminação com uma lâmpada de 60W, direcionada para o interior da caixa. Os animais foram mantidos em jejum de 24h antes do início do experimento, sendo mantido o acesso irrestrito à água. No momento do teste o animal foi colocado dentro da caixa e observado durante 30min. Os parâmetros analisados nesse experimento foram a quantidade de ração ingerida (similar a versão 1) e a latência para início da ingesta.

FOTO 4 – APARATO DO EXPERIMENTO HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA



FONTE: A autora (2016).

4.4.1.4 Labirinto em Cruz Elevado

Atualmente, o labirinto em cruz elevado figura entre os modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental de drogas ansiolíticas. Desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e posteriormente validado para estudos de farmacologia, fisiologia e comportamento por Pellow et al. (1985), o modelo explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão natural dos roedores a altura e espaços abertos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Este modelo consiste numa estrutura feita em madeira, em formato de cruz, composta por dois braços abertos (30X10cm) perpendiculares a dois braços fechados (escuros) (30X10X25cm). Os braços emergem do centro da plataforma (10x10cm), sendo que o aparato é elevado a 45cm do chão, FOTO 5 (LISTER, 1987). Para evitar que os animais caiam, os braços abertos são cercados por um aro de madeira de 0,5cm de altura. O modelo consiste em colocar o camundongo na plataforma central, voltado para um dos braços abertos.

Neste modelo os animais tendem a explorar mais os braços fechados que os abertos. A tendência de evitar os braços abertos se deve mais ao espaço aberto do que a altura. Ansiolíticos como os benzodiazepínicos aumentam as porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas

promovem efeito oposto. Esses índices clássicos de ansiedade no modelo não são, contudo, sensíveis a drogas serotoninérgicas (CRUZ et al., 1994; SETEM et al., 1999).

Neste modelo considera-se que o animal está num dos braços quando estiver com as quatro patas no mesmo braço do labirinto. O experimento teve duração de 5min e os experimentos foram filmados para registro do número de entradas nos braços abertos e fechados e do tempo de permanência em ambos os braços. O número de entradas nos braços fechados foi considerado índice de atividade locomotora, e o comportamento tipo ansioso pela porcentagem de entradas nos braços abertos [% entrada nos braços abertos = número de entradas nos braços abertos/total de entradas (abertos e fechados) x 100] e da porcentagem de tempo em que o animal permanece nos braços abertos (LISTER, 1987; BARETTA et al., 2012; CHIOCA et al., 2013).

FOTO 5 – APARATO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



FONTE: A autora (2016).

4.4.2 Atividade Locomotora/Exploratória

4.4.2.1 Campo Aberto

O experimento do campo aberto é realizado em uma arena circular ou quadrada cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir. O assoalho é marcado com pequenos quadrantes, o que permite a quantificação da atividade

locomotora do animal. Esse modelo foi desenvolvido por Hall (1934) sugerindo que a defecação e a atividade motora do animal no campo aberto seria um indicativo de seu estado emocional. Alta defecação e baixa atividade locomotora indicariam a ansiedade do animal. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do campo aberto como medida mais seletiva de ansiedade, enquanto a atividade locomotora na periferia do aparato como um indicador da atividade locomotora do animal. O efeito de drogas ansiolíticas tem sido amplamente demonstrado nesse modelo (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

No âmbito experimental, é possível avaliar os índices de ansiedade através de diferentes modelos comportamentais dos quais se destaca este modelo do campo aberto que é também empregado na avaliação do comportamento exploratório de roedores, sendo um instrumento válido para medir ansiedade, investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (SCHMITT; HIEMKE, 1998). Assim este modelo possibilita avaliar respostas comportamentais tais como a atividade motora, comportamentos exploratórios e emocionalidade (HALL, 1934; SIMON et al., 1994; POLTYREV et al., 1996).

O aparato do Campo Aberto utilizado neste experimento é constituído de uma arena circular (50X63cm), dividida em 25 regiões, sendo 9 regiões centrais e 16 regiões periféricas (FOTO 6). Os camundongos foram colocados individualmente no centro do Campo Aberto e foram observados por 5min para registrar a frequência de locomoção (medida que é avaliada pelo número de quadrantes que o animal cruzar com as 4 patas) e também o número de bolos fecais, como um parâmetro de emocionalidade. Após o experimento, a arena foi limpa com solução de água-álcool 10% antes de colocar o próximo animal. O experimento foi filmado para análise posterior.

FOTO 6 – APARATO DO CAMPO ABERTO



FONTE: A autora (2016).

4.4.2.2 Caixa de Movimentação Espontânea

A Caixa de Movimentação Espontânea é utilizada para medir a atividade locomotora dos animais, verificando se os tratamentos realizados são capazes de alterar a locomoção, causando uma hiperlocomoção, hipolocomoção (efeito sedativo), ou nenhuma alteração locomotora.

Os animais foram colocados individualmente no interior de uma caixa (40X20 X26cm) a qual possui um sistema sensível a movimentação, devido a presença de três fotocélulas nas suas paredes (FOTO 7), e o número de interrupções dos feixes foi registrado por um período de 5 minutos (TONELLI et al., 2013).

FOTO 7 – APARATO DO EXPERIMENTO CAIXA DE MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA



FONTE: A autora (2016).

4.4.3 NADPH-diaforase

O óxido nítrico (NO) tem sido reconhecido como um neuromediador neuronal com inúmeras funções no sistema nervoso central. A distribuição dos neurônios que apresentam o NO pode ser analisada através de métodos histoquímicos como a histoquímica do NADPH-diaforase que permite indicar a localização da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no sistema nervoso (evidenciado pela atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase - NADPH-d). Tem sido demonstrado que a enzima óxido nítrico sintase causa evidenciação neuronal através da redução do nitroblue tetrazolium na presença de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH-reduzido), indicando que a histoquímica da NADPH-diaforase pode ser usada como marcador de neurônios nitrérgicos (SANTER, 1994; HOPE et al., 1991).

4.4.3.1 Remoção e congelamento do tecido

Os animais utilizados para esta análise não foram utilizados em nenhum experimento anterior. Para a análise os animais passaram primeiramente pela inalação com óleo essencial, por 15min, e foram imediatamente sacrificados e os encéfalos foram removidos e fixados em solução de PFA 4%, pH 7,4, por 5 dias e crioprotetidos em solução de sacarose 30% por 72h na temperatura de 4 graus. Posteriormente, foi realizado o congelamento em nitrogênio líquido e foram mantidos em freezer a -20 graus até o processamento do tecido.

4.4.3.2 Secções cerebrais

Os encéfalos foram cortados em criostato Leica ® na espessura de 25 μ m na temperatura em torno de -20 graus nas regiões de interesse. A estrutura de interesse, córtex, foi identificada pelo Atlas Paxinos e Franklin (1997).

4.4.3.3 NADPH-diaforase reação histoquímica

As secções cerebrais foram incubadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, contendo 0,3% de Triton-X100, 0,1 mg/ml e nitrobluetetrazolium 1,0 mg/ml β -NADPH a 37°C durante 2h no escuro. Em seguida, as secções foram lavadas em tampão fosfato e montadas em lâminas para observação em microscopia ótica.

As lâminas foram scaneadas pelo Labconfocal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, utilizando o software MetaSystems Image Viewer – Version 2.0. Posteriormente, foram tiradas fotos e quantificados os neurônios marcados por meio do programa ImageJ. As medições foram realizadas bilateralmente. Não foi detectada diferença entre os hemisférios do número de células NADPH-diaforase. Foram observados 40 campos ao acaso, de cada animal de todos os grupos, e contados os neurônios NADPH-diaforase reativos.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

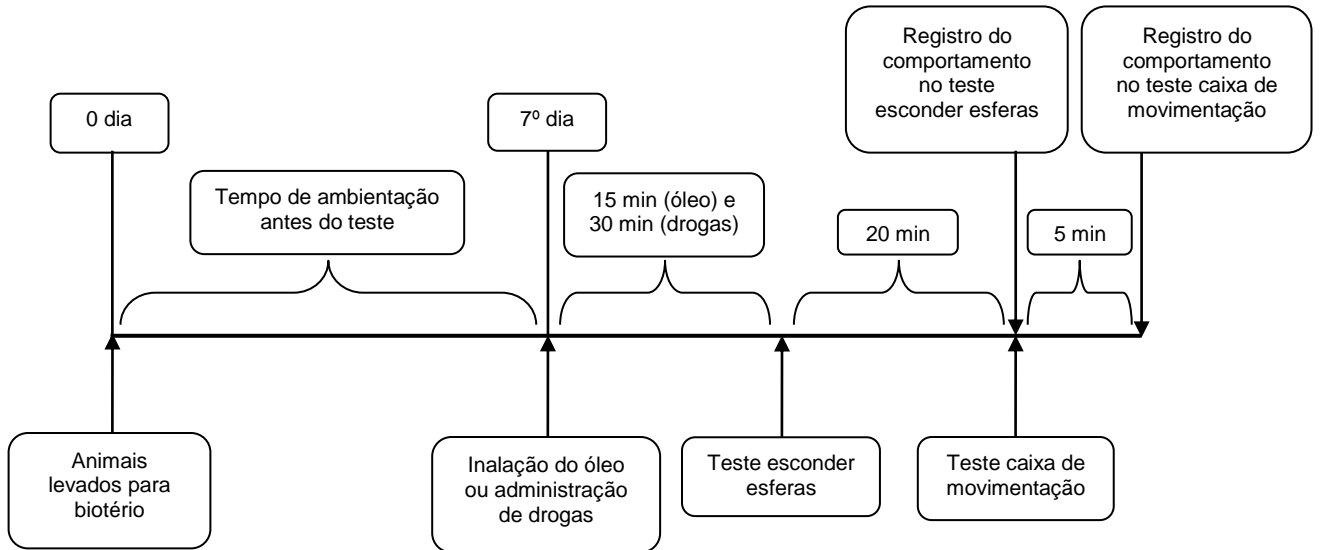
4.5.1 Avaliação do Efeito Tipo Ansiolítico

QUADRO 1 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS/CURVA DOSE-RESPOSTA (EXPERIMENTO 1)

Grupos	Administração	Modelos Comportamentais
Veículo	inalação	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
<i>C.sinensis</i> 1%	inalação	
<i>C.sinensis</i> 2,5%	inalação	
<i>C.sinensis</i> 5%	inalação	
<i>C.sinensis</i> 10%	inalação	
Acetato de amila 5%	inalação	
Diazepam	Intraperitoneal (i.p.)	

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 2 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO ESCONDER ESFERAS



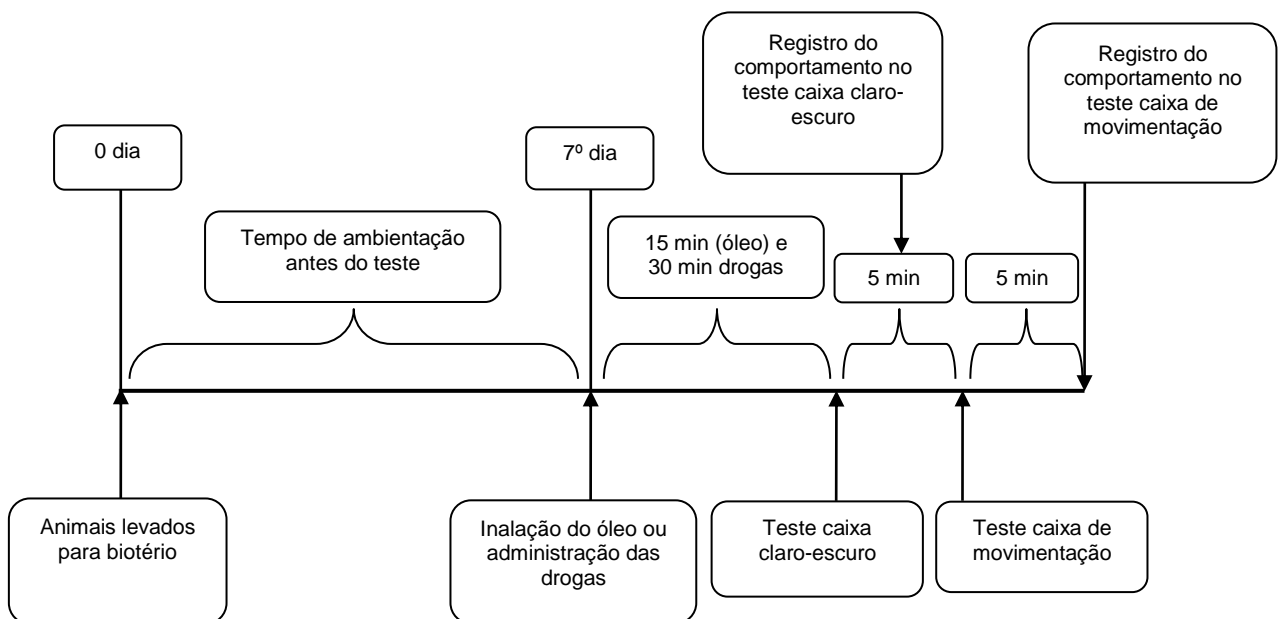
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 2 – ESQUEMA CAIXA CLARO-ESCURO

Grupos	Administração	Modelos Comportamentais
Veículo	inalação	Caixa Claro-Escuro
<i>C.sinensis</i> 5%*	inalação	Caixa de Movimentação
Diazepam	Intraperitoneal (i.p.)	Espontânea

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 3 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO CAIXA CLARO-ESCURO



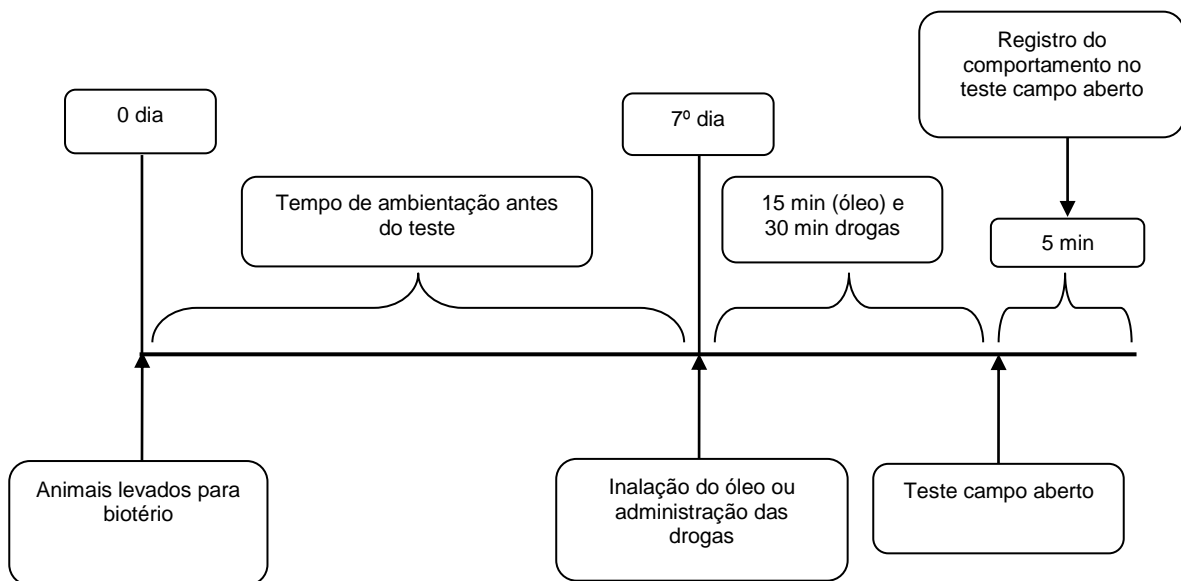
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 3 – ESQUEMA CAMPO ABERTO

Grupos	Administração	Modelos Comportamentais
Veículo	inalação	Campo Aberto
<i>C.sinensis</i> 5%*	inalação	
Diazepam	Intraperitoneal (i.p.)	

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 4 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO CAMPO ABERTO



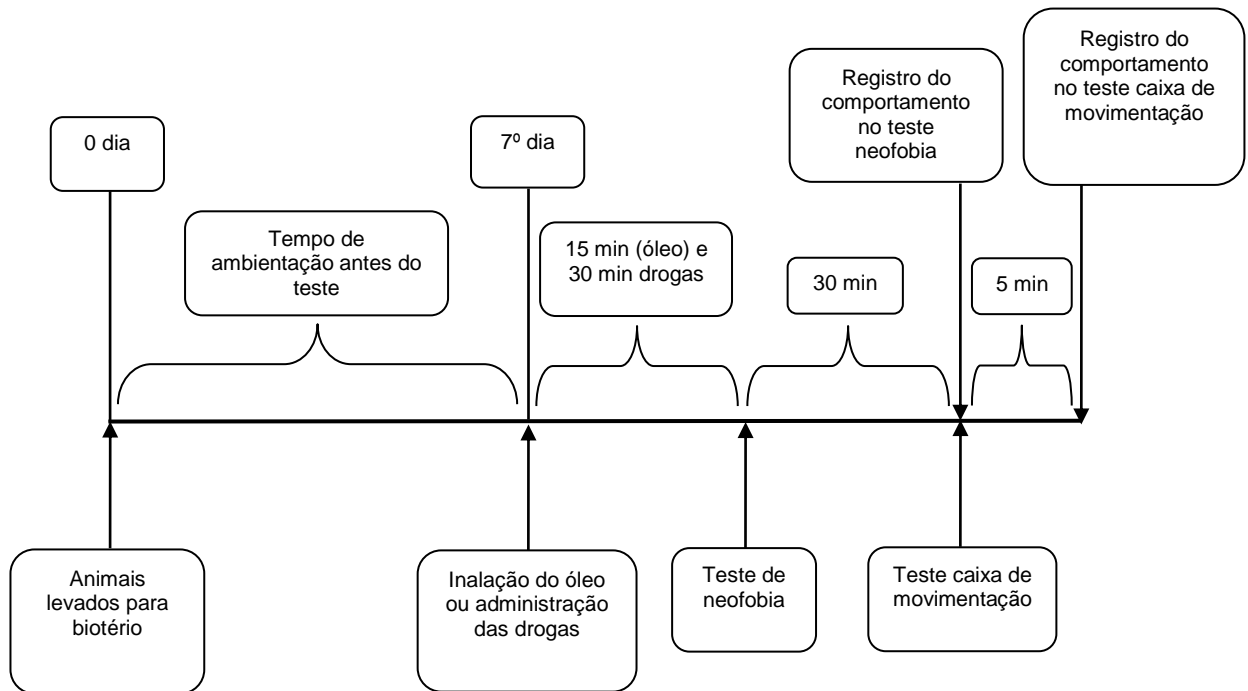
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 4 – ESQUEMA HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA

Grupos	Administração	Modelos Comportamentais
Veículo	inalação	Hipofagia Induzida por Neofobia
<i>C.sinensis</i> 5%*	inalação	Caixa de Movimentação
Diazepam (versão 1)	Intraperitoneal (i.p.)	Espontânea

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 5 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO HIPOFAGIA INDUZIDA POR NEOFOBIA



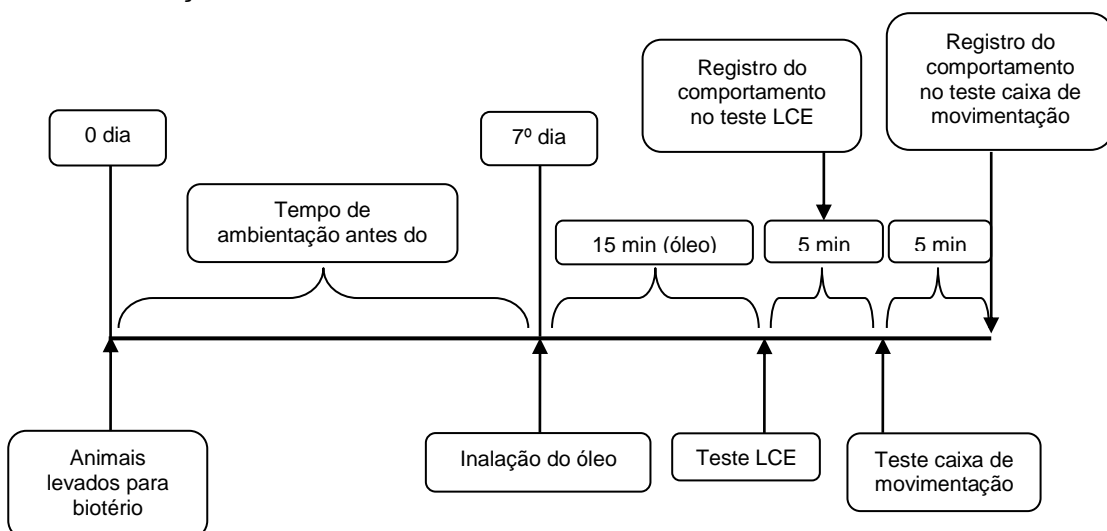
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 5 – ESQUEMA LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Grupos	Administração	Modelos Comportamentais
Veículo	inalação	Labirinto em Cruz Elevado
<i>C.sinensis</i> 5%*	inalação	Caixa de Movimentação
		Espontânea

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 6 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



FONTE: A autora (2016).

4.5.2 Avaliação dos Sistemas de Neurotransmissão no efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de laranja doce

Para avaliação do comportamento tipo ansioso, nesta etapa optou-se por utilizar o modelo Esconder Esferas. Ao final de cada experimento, os camundongos foram submetidos à caixa de movimentação espontânea.

QUADRO 6 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA NORADRENÉRGICO

Grupos	Modelos Comportamentais
Veículo/Veículo	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
Ioimbina/Veículo	
Veículo/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Ioimbina/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Veículo/Nortriptilina	
Ioimbina/Nortriptilina	

FONTE: A autora (2016).

QUADRO 7 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA GABAÉRGICO

Grupos	Modelos Comportamentais
Veículo/Veículo	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
Picrotoxina/Veículo	
Veículo/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Picrotoxina/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Veículo/Diazepam	
Picrotoxina/Diazepam	

FONTE: A autora (2016).

QUADRO 8 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA CANABINÓIDE

Grupos	Modelos Comportamentais
Veículo/Veículo	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
AM251/Veículo	
Veículo/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
AM251/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Veículo/WIN 55,212-2	
AM251/WIN 55,212-2	

FONTE: A autora (2016).

QUADRO 9 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA SEROTONÉRGICO

Grupos	Modelos Comportamentais
Veículo/Veículo	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
WAY100635/Veículo	
Veículo/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
WAY100635/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Veículo/8-OH-DPAT	
WAY100635/8-OH-DPAT	

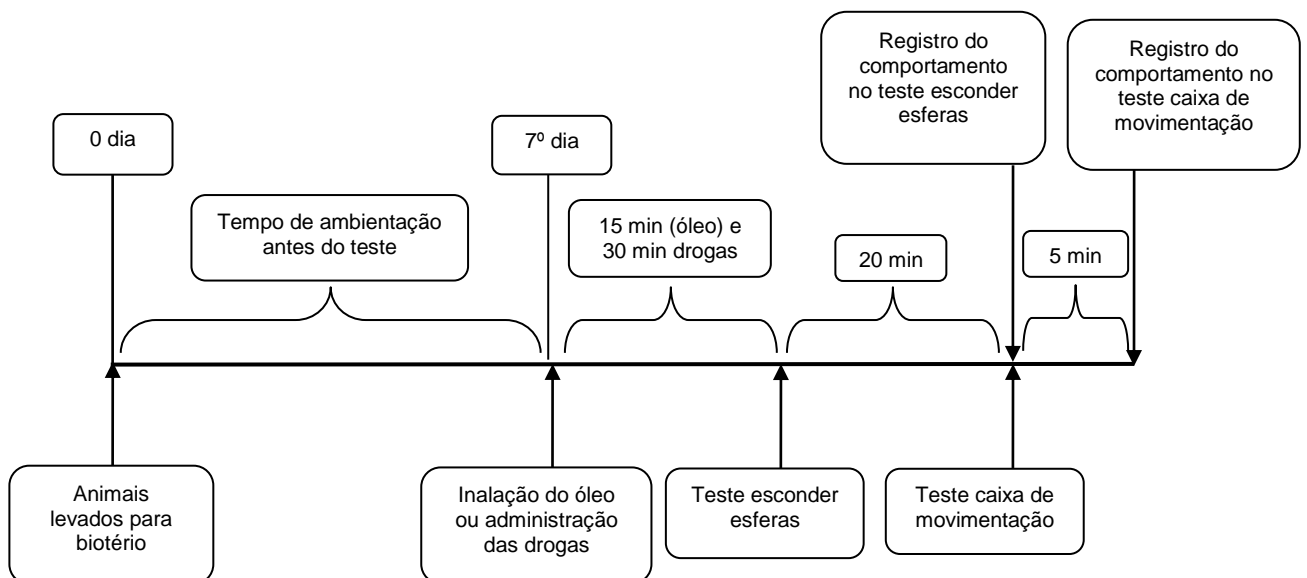
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 10 – ESQUEMA ESCONDER ESFERAS - SISTEMA NITRINÉRGICO

Grupos	Modelos Comportamentais
Veículo/Veículo	Esconder Esferas Caixa de Movimentação Espontânea
L-arginina/Veículo	
Veículo/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
L-arginina/ <i>C.sinensis</i> 5%*	
Veículo/7-NI	
7-NI/L-arginina	

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 7 – DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS ESCONDER ESFERAS (SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSÃO)



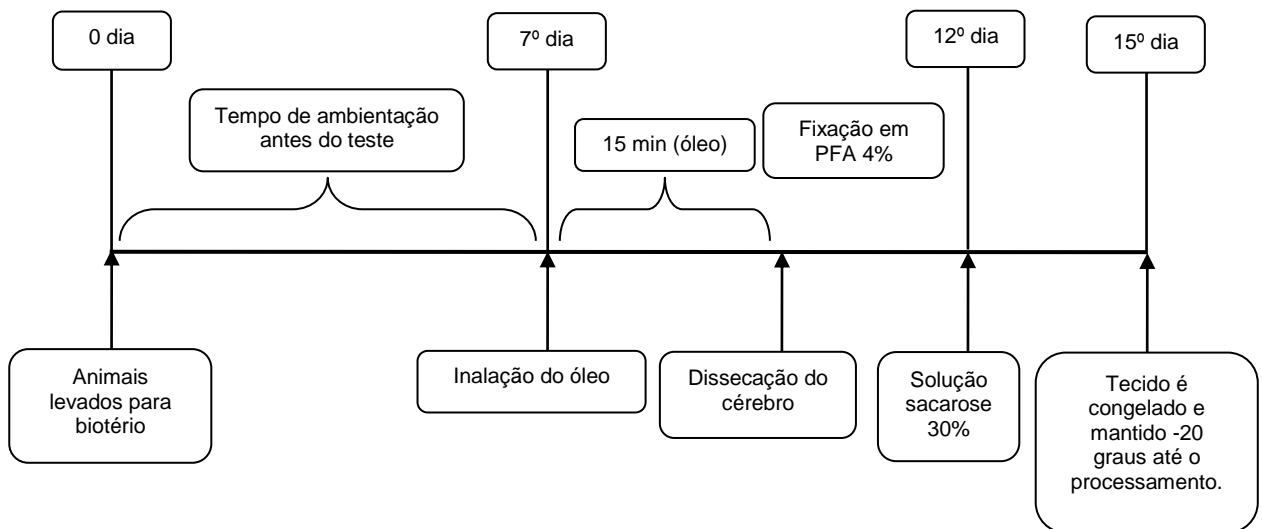
FONTE: A autora (2016).

QUADRO 11 – ESQUEMA DA ANÁLISE PARA O TESTE NADPH-DIAFORASE

Grupos	Análise NADPH-diaforase
Veículo	Foram preparadas lâminas com cortes histológicos do tecido cerebral e realizada a técnica do NADPH-diaforase
<i>C.sinensis</i> 5%*	

FONTE: A autora (2016).

ILUSTRAÇÃO 8 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO PARA ANÁLISE NADPH-DIAFORASE



FONTE: A autora (2016).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística dos dados paramétricos, foi utilizada ANOVA de uma via (ou quando necessário ANOVA de duas vias) seguida do post-hoc de Newman-Keuls. Em análises de apenas dois grupos estatísticos, foi utilizado o teste t de Student. Em todas as análises, foram consideradas como diferenças estatísticas significantes, $p < 0,05$.

*Concentração escolhida a partir do experimento 1.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis*)

5.1.1 Esconder Esferas

Foi observado, que as concentrações mais elevadas (5% e 10%) do óleo essencial de laranja doce (*Citrus sinensis*) e o grupo diazepam (controle positivo) apresentaram uma redução significativa do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo e ao grupo acetato de amila ($p < 0,05$; FIGURA 1A). Não foi observada diferença significativa entre as concentrações do óleo essencial analisadas, assim como também não se observou diferença significativa entre os grupos veículo e acetato de amila ($p < 0,05$). Na caixa de movimentação não foi observada nenhuma alteração locomotora entre os grupos analisados ($p < 0,05$; FIGURA 1B).

Desse modo, com base nos resultados encontrados neste experimento, foi definida a concentração de 5% do óleo essencial de laranja doce para a realização dos demais experimentos.

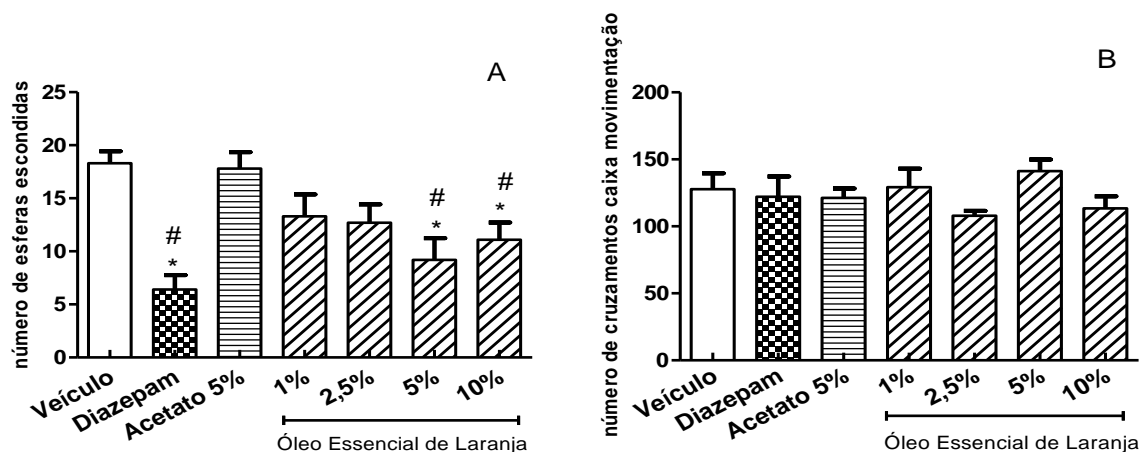
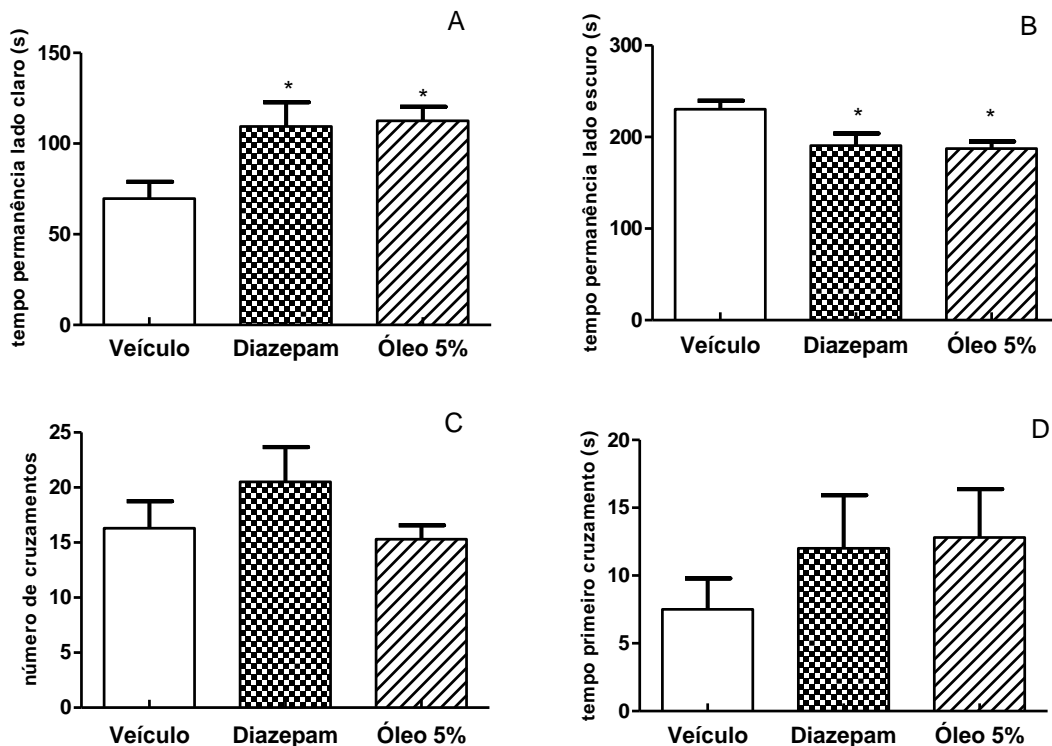


FIGURA 1 – Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de laranja doce no modelo de esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); $n = 10$ camundongos / grupo. * $p < 0,05$ comparando com o grupo veículo; # $p < 0,05$ comparando com o grupo acetato 5%.

5.1.2 Caixa Claro-Escuro

Neste experimento observa-se, que os animais do grupo diazepam e do grupo óleo essencial 5%, apresentaram um aumento significativo do tempo de permanência no lado claro em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 2A). Concomitantemente, os animais dos grupos diazepam e óleo, apresentaram uma diminuição significativa da permanência de tempo no lado escuro em comparação com o grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 2B). Não foram observadas diferenças significativas no número de cruzamentos entre os lados claro e escuro, ($p < 0,05$; FIGURA 2C), assim como não foi detectado nenhuma alteração no tempo para efetuar o primeiro cruzamento, ($p < 0,05$; FIGURA 2D). Nota-se que não foi constatado nenhum prejuízo motor entre os grupos analisados, como se pode perceber na análise da caixa de movimentação ($p < 0,05$; FIGURA 2E).



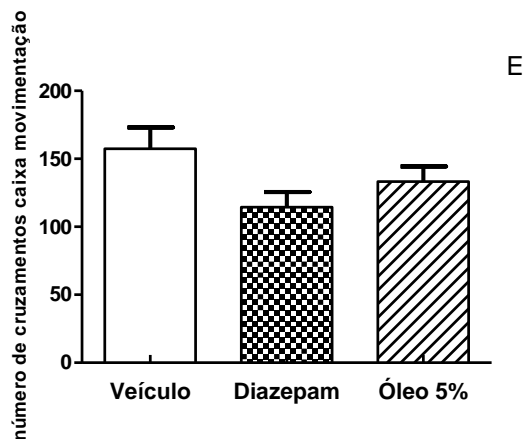
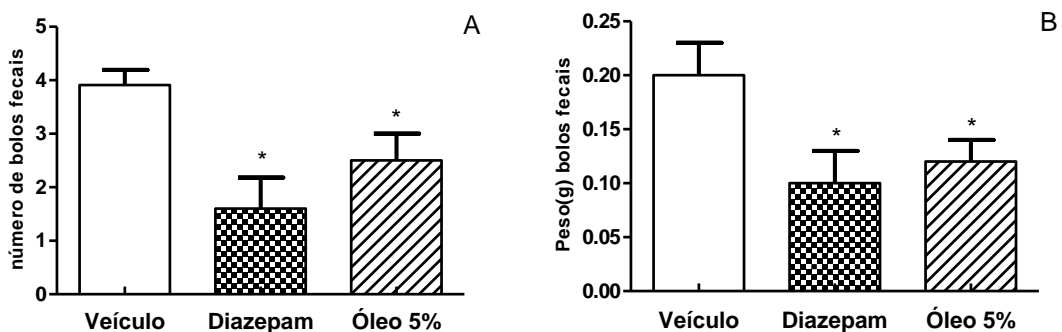


FIGURA 2 – Efeito da concentração de 5% do óleo essencial no modelo da caixa claro-escuro (A/B/C/D) e na caixa de movimentação (E). Dados representam média \pm EPM, tempo de permanência no lado claro (A); tempo de permanência no lado escuro (B); número de cruzamentos (C) e tempo para o primeiro cruzamento (D), ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (E); $n = 10$ camundongos / grupo. $*p < 0,05$ comparando com o grupo veículo.

5.1.3 Campo Aberto

No campo aberto observa-se uma diminuição significativa do número de bolos fecais nos grupos diazepam e óleo essencial de laranja em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 3A). Observa-se também uma diminuição significativa, do peso (g) dos bolos fecais nos grupos diazepam e óleo em comparação com o grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 3B). Nenhuma alteração locomotora (número de cruzamentos totais) foi encontrada no experimento do Campo aberto ($p < 0,05$; FIGURA 3C).



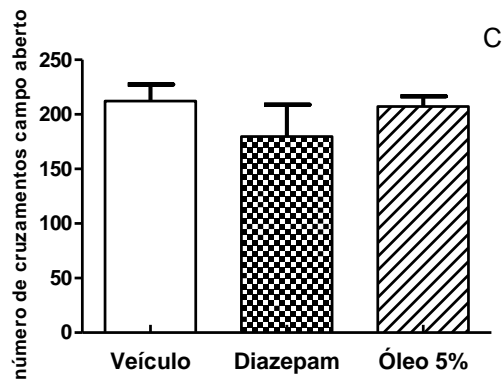


FIGURA 3 – Efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no campo aberto (A/B/C). Dados representam média \pm EPM, do número de bolos fecais (A), peso dos bolos fecais (B) durante 5 min. ou no número de cruzamentos no campo aberto durante 5 min. (C); $n = 10 - 11$ camundongos / grupo. $*p < 0,05$ comparando com o grupo veículo.

5.1.4 Hipofagia Induzida por Neofobia

Foi observado na primeira versão, que o grupo diazepam apresentou um aumento significativo do consumo de ração (primeiro experimento de neofobia - realizado na caixa viveiro), e o grupo óleo essencial de laranja apresentou uma diminuição do consumo desta ração em relação ao grupo diazepam. E não houve diferença entre o grupo óleo e o grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 4A). Nota-se que não houve alteração da atividade locomotora, na caixa de movimentação ($p < 0,05$; FIGURA 4B).

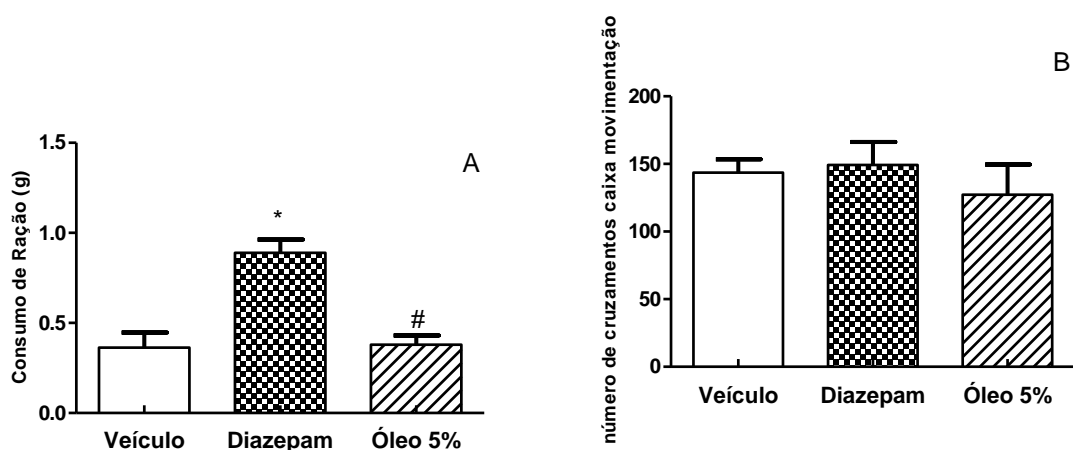


FIGURA 4 – Efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo de neofobia alimentar (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do consumo de ração durante 30 min.(A) com jejum de 16h ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); $n = 8 - 10$ camundongos / grupo. $*p < 0,05$ comparando com o grupo veículo, # $p < 0,05$ comparando com o grupo diazepam.

Na segunda versão, realizado em um ambiente diferente da caixa viveiro, com jejum de 24h, constatou-se que não houve diferença no consumo de ração (g) (FIGURA 5A), mas foi encontrada diferença significativa na latência para ingesta dos animais do grupo óleo em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$; FIGURA 5B).

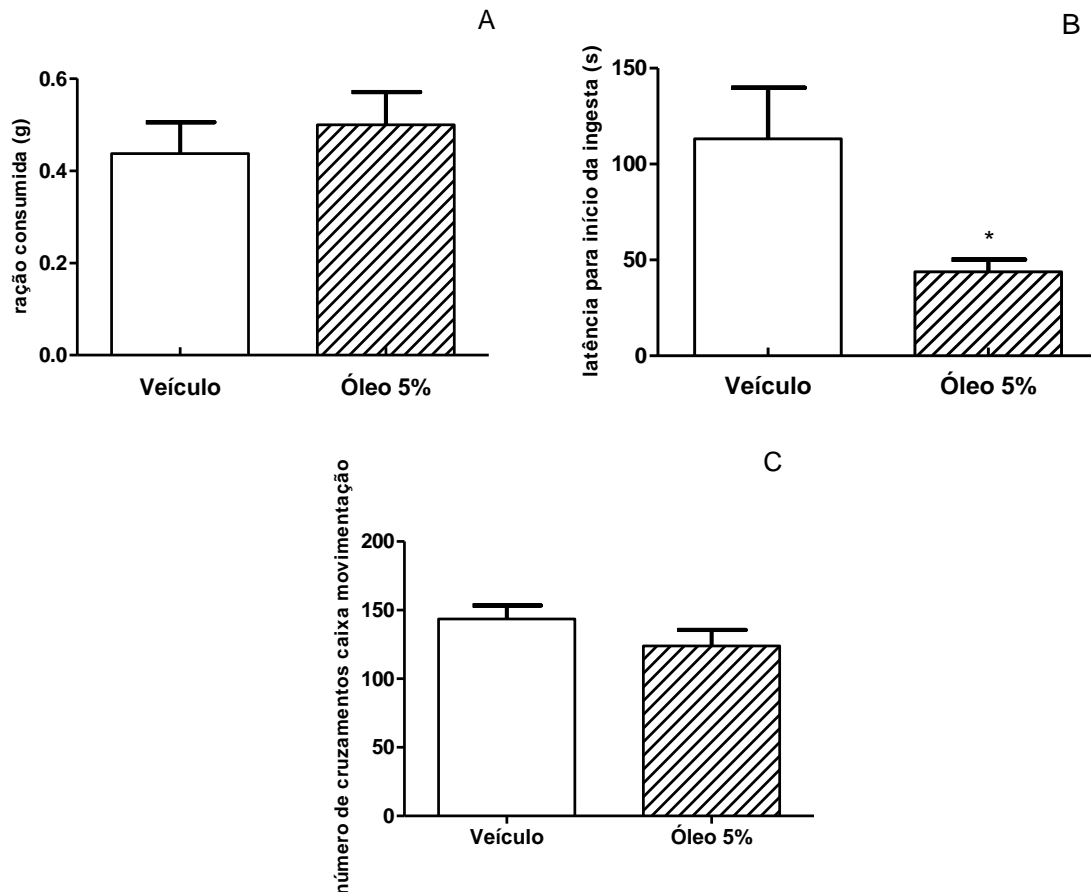


FIGURA 5 – Efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo de neofobia alimentar, com jejum de 24h. Dados representam média \pm EPM, do consumo de ração durante 30 min.(A) ou da latência para iniciar a ingesta (B); número de interrupções dos feixes durante 5 min. (C); $n = 8$ camundongos / grupo. * $p < 0,05$ comparando com o grupo veículo.

5.1.5 Labirinto em Cruz Elevado

No modelo do Labirinto em Cruz Elevado, o grupo óleo essencial de laranja 5%, apresentou um aumento significativo do número de entradas e da porcentagem de entradas nos braços abertos (FIGURA 6A e FIGURA 6C, respectivamente), em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). Não foi observada diferença no tempo de permanência nos braços abertos (FIGURA 6B) e nem na porcentagem de tempo

gasto nos braços abertos (FIGURA 6D). Também não foi encontrada diferença no número de entradas nos braços fechados (FIGURA 6E). E da mesma maneira não foi detectada diferença locomotora na caixa de movimentação (FIGURA 6F).

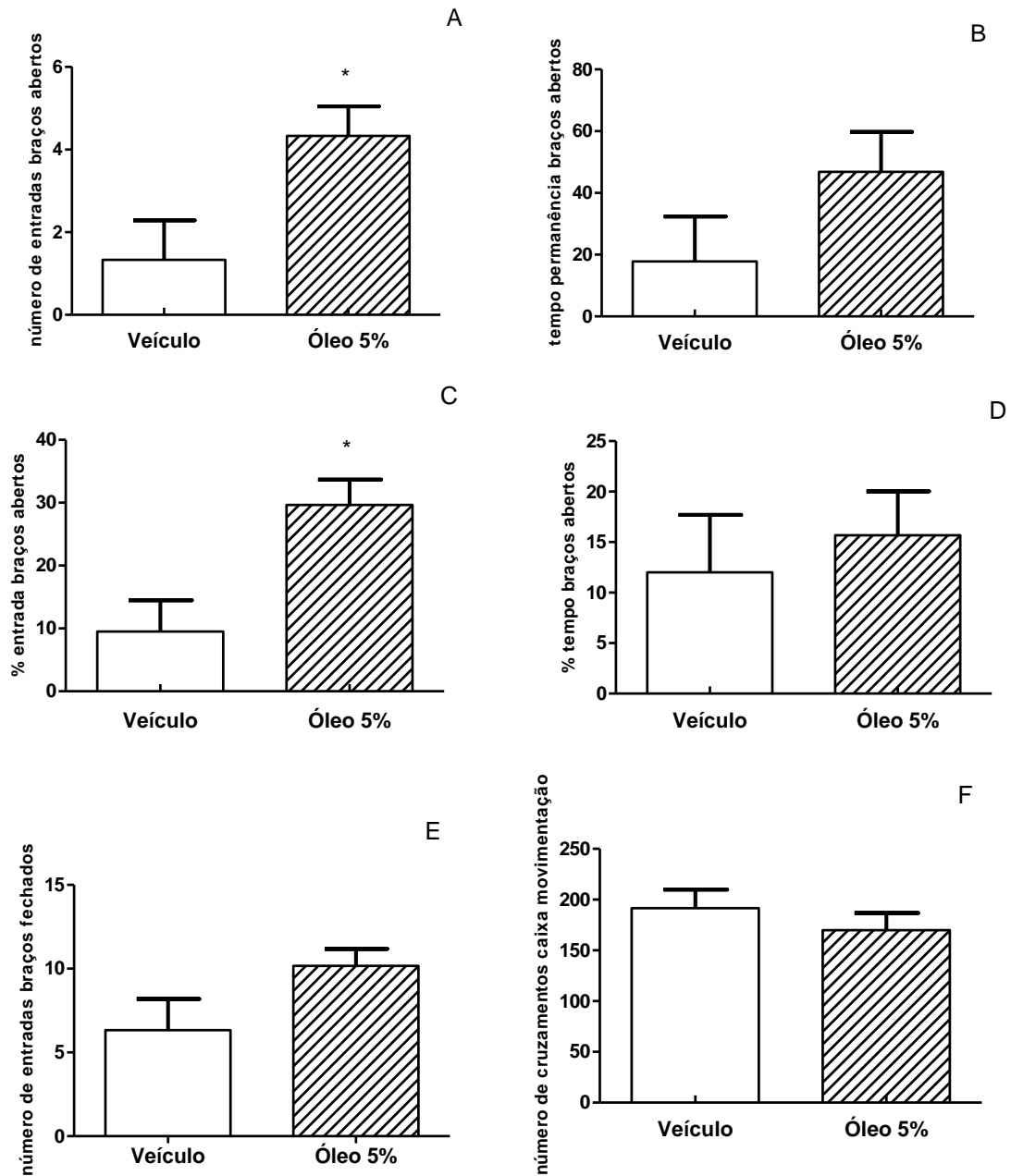


FIGURA 6 – Efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo do labirinto em cruz elevado (A/B/C/D/E) e na caixa de movimentação (F). Dados representam média +/- EPM do número de entradas nos braços abertos (A); tempo de permanência nos braços abertos (B); % entrada nos braços abertos (C); % tempo nos braços abertos (D); e cruzamentos caixa de movimentação (F); n= 6 camundongos / grupo. *p<0,05 comparando com o grupo veículo.

5.2 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSÃO NO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis*)

5.2.1 Sistema Noradrenérgico

Na avaliação do Sistema Noradrenérgico (FIGURA 7A), os grupos veículo/ioimbina (1mg/Kg), nortriptilina/veículo, óleo/veículo, nortriptilina/ioimbina (15mg/Kg/1mg/Kg) e óleo/ioimbina apresentaram uma diminuição do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo/veículo ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas na locomoção dos animais analisados, na caixa de movimentação ($p < 0,05$; FIGURA 7B).

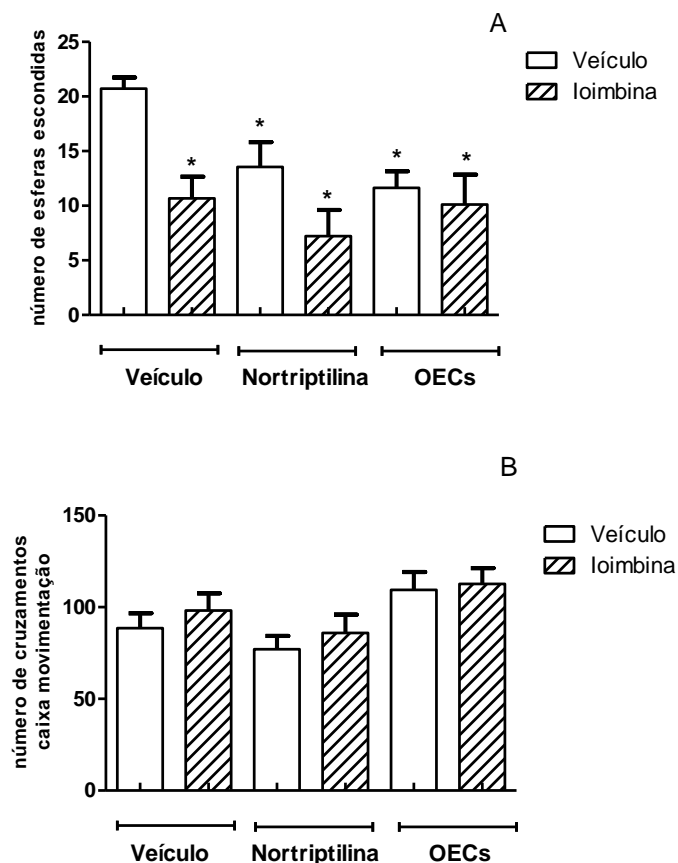


FIGURA 7 – Efeito do pré-tratamento com ioimbina (1mg/Kg, i.p.) sobre o efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo de esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); $n = 7 - 10$ camundongos / grupo. * $p < 0,05$ comparando com o grupo veículo/veículo.

5.2.2 Sistema Gabaérgico

Na avaliação da participação do Sistema Gabaérgico, nota-se que os grupos diazepam/veículo (1mg/Kg), óleo/veículo e óleo/picrotoxina apresentaram uma diminuição significativa do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo/veículo ($p < 0,05$; FIGURA 8A). Também foi observada diferença significativa, com diminuição do número de esferas escondidas, nos grupos diazepam/veículo; óleo/veículo e óleo/picrotoxina em relação ao grupo veículo/picrotoxina ($p < 0,05$). Já na caixa de movimentação (FIGURA 8B), não foi encontrada nenhuma diferença significativa na locomoção entre os grupos.

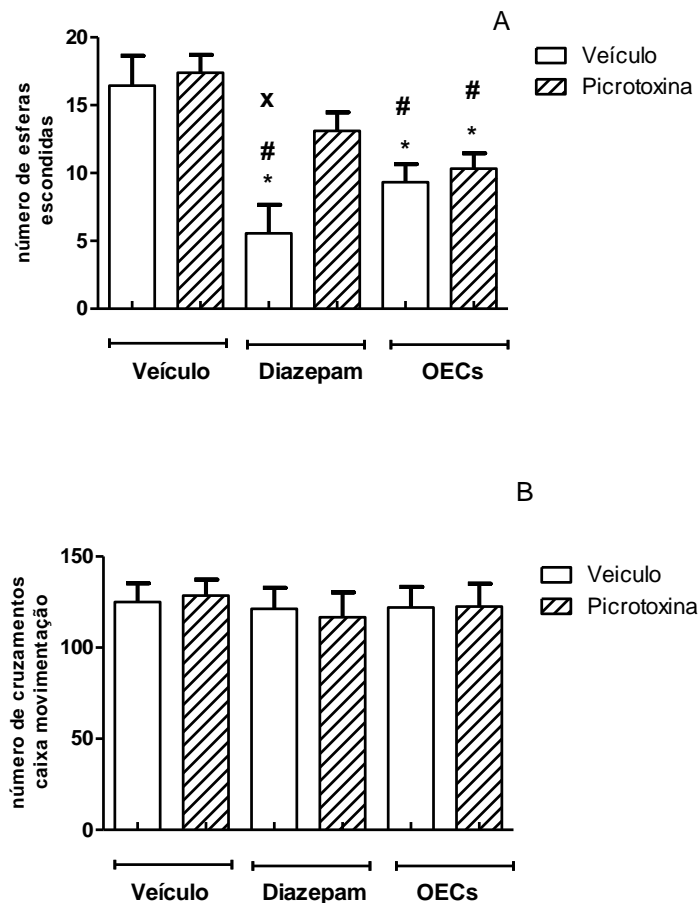


FIGURA 8 – Efeito do pré-tratamento com picrotoxina (0,5mg/Kg, i.p.) sobre o efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo de esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); $n = 10 - 11$ camundongos / grupo. * $p < 0,05$ comparando com o grupo veículo/veículo; # $p < 0,05$ comparando com o grupo veículo/picrotoxina; $x_p < 0,05$ comparando com o grupo diazepam/picrotoxina.

5.2.3 Sistema Canabinóide

Na FIGURA 9A, pode-se observar a avaliação da participação do Sistema Canabinóide. O grupo óleo/veículo apresentou uma diminuição do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo/veículo ($p < 0,05$). Os grupos WIN/veículo (1mg/Kg), veículo/AM251 (1mg/Kg), WIN/AM251 e o grupo óleo/AM251 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo veículo/veículo. Na caixa de movimentação (FIGURA 9B) não foi constatada nenhuma alteração significativa da atividade locomotora entre os grupos analisados.

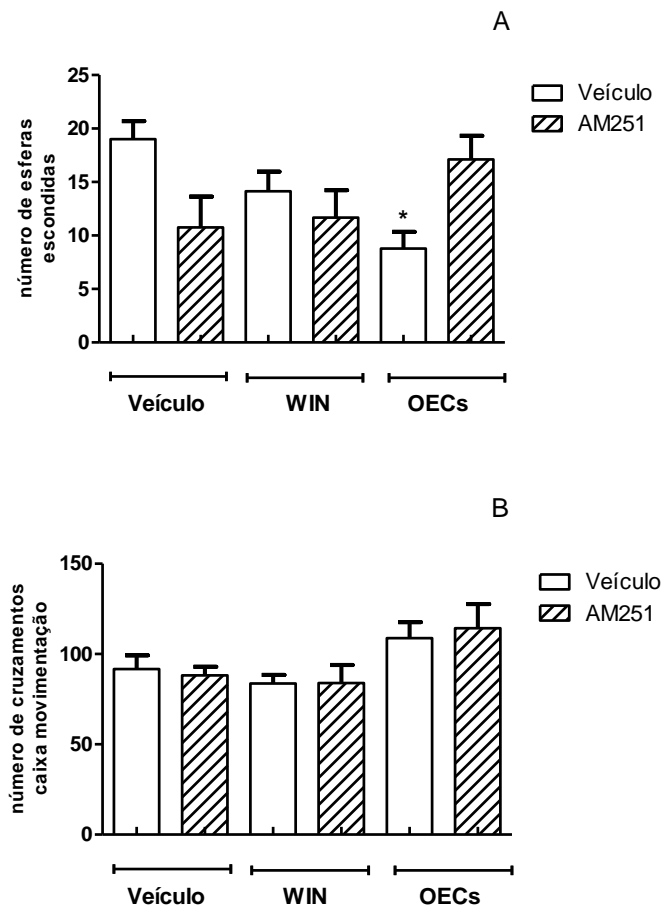


FIGURA 9 – Efeito do pré-tratamento com AM251 (1mg/Kg, i.p.) sobre o efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo de esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); $n = 8 - 9$ camundongos / grupo. * $p < 0,05$ comparando o grupo óleo/veículo com o grupo veículo/veículo.

5.2.4 Sistema Serotonérgico

A avaliação da participação do Sistema Serotonérgico pode ser observada na FIGURA 10A. O agonista serotonérgico 8-OH-DPAT (3mg/Kg) e o antagonista WAY100635 (3mg/Kg), apresentaram uma diminuição significativa do número de esferas escondidas em relação aos grupos veículo/veículo, óleo/veículo, óleo/WAY e 8-OH-DPAT/WAY ($p < 0,05$). Destaca-se também que a inalação com o óleo essencial de laranja (óleo/veículo) apresentou diminuição significativa do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo/veículo ($p < 0,05$), enquanto que o grupo óleo/WAY apresentou um aumento significativo do número de esferas escondidas em relação ao grupo óleo/veículo ($p < 0,05$). Os tratamentos realizados não causaram alteração locomotora nos animais, na caixa de movimentação (FIGURA 10B).

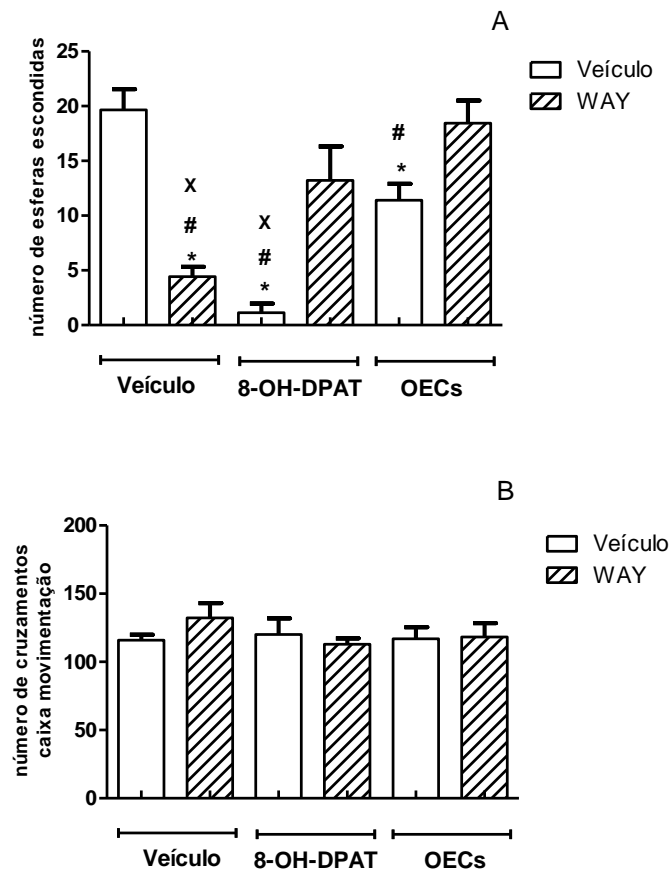
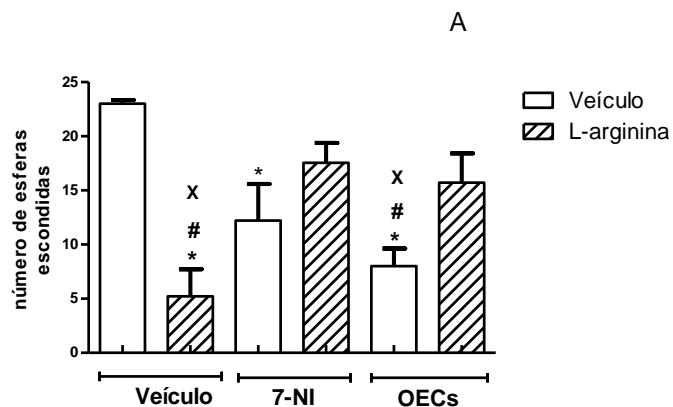


FIGURA 10 – Efeito do pré-tratamento com WAY (3mg/Kg, i.p.) sobre o efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média \pm EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de

interrupções dos feixes durante 5 min. (B); n= 7 – 10 camundongos / grupo. *p<0,05 comparando com o grupo veículo/veículo; # p<0,05 comparando com o grupo óleo/WAY; xp<0,05 comparando com o grupo 8-OH-DPAT/WAY.

5.2.5 Sistema Nitrérgico

Na avaliação da participação do Sistema Nitrérgico (FIGURA 11A), a L-arginina (200mg/Kg) apresentou diminuição do número de esferas escondidas em relação aos grupos veículo/veículo; 7-NI/L-arginina; óleo/L-arginina, e os grupos 7-NI (10mg/Kg), 7-NI/veículo e 7-NI/L-arginina apresentaram diminuição significativa do número de esferas escondidas comparado ao grupo veículo/veículo (ambos p<0,05). O grupo óleo/L-arginina, apresentou uma diminuição significativa do número de esferas escondidas em relação ao grupo veículo/veículo (p<0,05). O grupo óleo 5% (óleo/veículo) apresentou diminuição significativa no número de esferas escondidas comparado ao grupo veículo/veículo; 7-NI/L-arginina e óleo/L-arginina (p<0,05). Na caixa de movimentação (FIGURA 11B) não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, indicando que os tratamentos realizados não induziram nenhuma alteração locomotora.



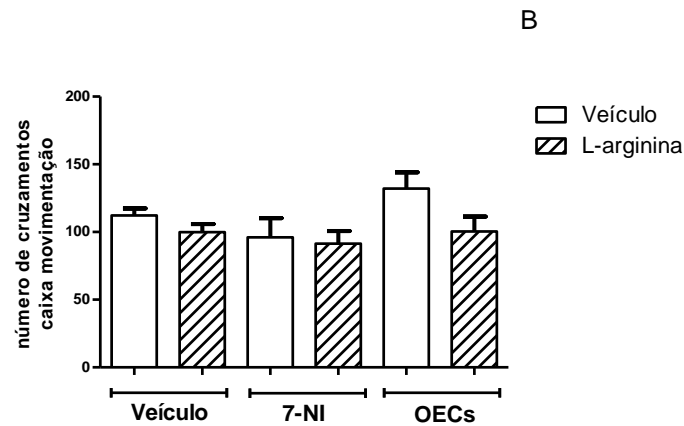
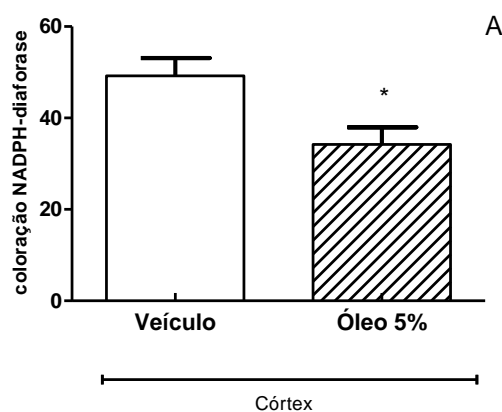


FIGURA 11 – Efeito do pré-tratamento com L- arginina (200mg/Kg, i.p.) sobre o efeito do óleo essencial de laranja doce 5% no modelo esconder esferas (A) e na caixa de movimentação (B). Dados representam média +/- EPM, do número de esferas escondidas durante 20 min. (A) ou do número de interrupções dos feixes durante 5 min. (B); n= 9 – 11 camundongos / grupo. *p<0,05 comparando com o grupo veículo/veículo; #p<0,05 comparando com o grupo 7-NI/L-arginina; xp<0,05 comparando com o grupo óleo/L-arginina.

5.2.6 NADPH – diaforase

Em relação à intensidade de neurônios positivos para a reação de NADPH-diaforase, na região do córtex cerebral, os animais do grupo óleo 5% apresentaram uma diminuição da intensidade de neurônios positivos em relação ao grupo veículo (p<0,05).



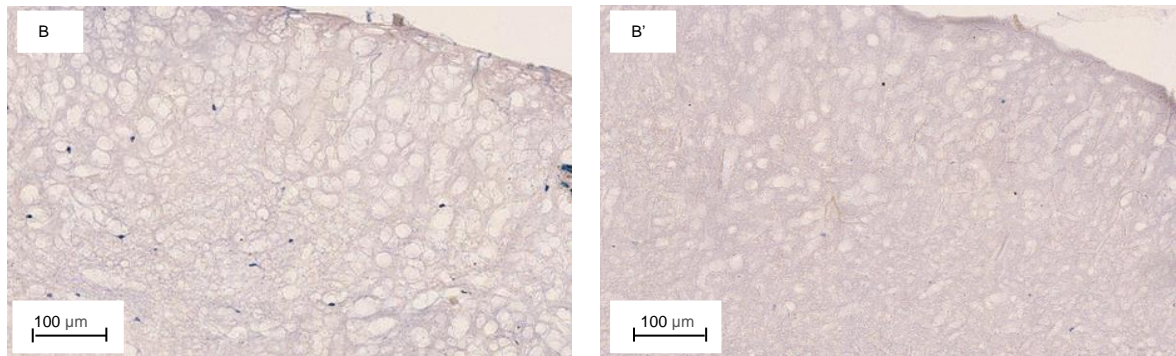


FIGURA 12 – Intensidade da coloração de NADPH-diaforase de neurônios do córtex (A), fixados 15 min após a inalação com o óleo essencial de laranja doce 5% e representação dos neurônios marcados positivamente na região cortical (B/B'), reação do NADPH-diaforase, no grupo veículo e óleo, respectivamente. Dados representam média +/- EPM, do número de neurônios corados, em 40 campos analisados por animal. n = 5 camundongos / grupo. *p<0,05 comparando o grupo óleo 5% com o grupo veículo.

QUADRO 12 – SÍNTESE DOS RESULTADOS DO TRABALHO

OBJETIVOS	VIAS DE NEUROTRANSMISSÃO	MODELOS	SÍNTESE DOS RESULTADOS
Avaliar o efeito tipo ansiolítico de concentrações crescentes do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> (laranja doce) no modelo Esconder Esferas.	_____	Esconder Esferas	Efeito tipo ansiolítico (concentração 5% e 10%)
Avaliar o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> no Labirinto em Cruz Elevado, Neofobia Alimentar, Campo Aberto e Caixa Claro-Escuro.	_____	Caixa claro-escuro	Efeito tipo ansiolítico
		Neofobia Alimentar	Efeito tipo ansiolítico
		Labirinto em cruz elevado	Efeito tipo ansiolítico
		Campo Aberto	Efeito tipo ansiolítico
Analisar a participação dos sistemas de neurotransmissão no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de <i>C. sinensis</i>	Sistema Noradrenérgico	Esconder Esferas	Inconclusivo
	Sistema Canabinoide		Envolvimento no efeito tipo ansiolítico
	Sistema Gabaérgico		Não envolvimento no efeito tipo ansiolítico
	Sistema Serotonérgico		Envolvimento no efeito tipo ansiolítico
	Sistema Nitrinérgico		Envolvimento no efeito tipo ansiolítico

FONTE: Resultados encontrados na pesquisa (2014; 2015; 2016).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo buscou-se demonstrar o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce) em diferentes modelos animais e avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Nesse sentido, o presente estudo corroborou o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* no modelo de claro/ escuro e no labirinto em cruz elevado como observado por Faturi e colaboradores (2010) em ratos, mas também o estendendo a uma outra espécie animal (camundongos) e a outros modelos animais, como o esconder esferas e a neofobia alimentar. Portanto, todos estes dados reforçam o potencial efeito ansiolítico deste óleo essencial, pois indicam a sua consistência em diferentes modelos e espécies (SOUSA et al., 2015). Os experimentos comportamentais com desafios farmacológicos indicaram a participação dos sistemas serotoninérgico, canabinóide e nitrérgico no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de laranja. Este efeito nitrérgico é reforçado pela redução da NADPH-diaforase após inalação do óleo essencial.

Inicialmente realizou-se uma curva concentração-resposta do óleo essencial *C. sinensis* no modelo esconder esferas (FIGURA 1A), sendo que as concentrações mais elevadas (5% e 10%) reduziram o número de esferas escondidas, enquanto concentrações menores (1 e 2,5%) não foram efetivas. Portanto, observou-se um efeito concentração-dependente. Estas concentrações não alteraram a atividade locomotora dos camundongos, sendo que este resultado negativo na atividade locomotora com a concentração de 5% foi consistentemente replicado nos experimentos posteriores. Diante destes resultados, pode-se sugerir um efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* no modelo de esconder esferas nas concentrações de 5 e 10%, sendo que a concentração de 5% do óleo essencial foi escolhida para emprego nos outros modelos de ansiedade.

No modelo da caixa claro-escuro os camundongos que receberam inalação com o óleo essencial de *C. sinensis* apresentaram um aumento significativo do tempo de permanência no lado claro (FIGURA 2A). Por outro lado, o óleo essencial de *C. sinensis* não alterou a latência para o primeiro cruzamento nem o número total de cruzamentos. Embora estes últimos parâmetros sejam eventualmente associados a efeito ansiolítico, o tempo gasto no lado claro é o parâmetro mais

consistentemente relacionado a um efeito tipo ansiolítico (HOSCÖET et al., 2001). Além disto, o diazepam apresentou o mesmo perfil neste modelo. Na caixa de movimentação não se observou alteração da locomoção, o que é coerente com ausência de efeito na latência para o primeiro cruzamento, que pode ser um índice de efeito sedativo (HOSCÖET et al., 2001). Os dados deste experimento reforçam a hipótese do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*.

No modelo de hipofagia induzida por neofobia o óleo essencial de *C. sinensis* reduziu a latência para início do consumo, mas não alterou a quantidade de ração consumida. Novamente, o óleo essencial não alterou a atividade locomotora dos camundongos. Embora o resultado com o diazepam tenha apresentado um perfil um pouco diferente (com aumento da quantidade de ração consumida), o resultado com o óleo essencial de *C. sinensis* indica um efeito tipo ansiolítico (DULAWA; HEN, 2005). É interessante notar que neste experimento, um efeito sedativo não acarretaria efeito tipo ansiolítico falso-positivo, o que ocorreria nos outros modelos de ansiedade utilizados no presente estudo, mas um efeito tipo ansiogênico falso-positivo (aumento da latência para iniciar o consumo). A inclusão do modelo da hipofagia induzida por neofobia no presente estudo foi baseada nesta diferença da influência da sedação neste modelo em relação aos demais modelos de ansiedade utilizados.

Por fim, avaliou-se o potencial ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* no labirinto em cruz elevado, modelo de ansiedade mais empregado na literatura. Os resultados demonstraram que os animais que foram submetidos à inalação do óleo essencial de *C. sinensis* 5% apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos. Novamente, não foi observada alteração da atividade locomotora na caixa de movimentação o que é coerente com ausência de alteração do número de entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado, parâmetro considerado índice de atividade locomotora no modelo. Neste modelo, este perfil é condizente com um efeito tipo ansiolítico, o que corrobora estudo de Faturi et al. (2010) e está alinhado com os resultados observados no presente estudo.

Outro modelo utilizado para avaliação do potencial ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* foi o campo aberto. Embora este modelo seja freqüentemente empregado para avaliação da locomoção e comportamentos exploratórios dos animais, ele também pode ser utilizado para analisar a

emocionalidade (HALL, 1934; ARCHER, 1973). Os parâmetros associados à ansiedade/ emocionalidade seriam a exploração da área central do campo aberto e o número de bolos fecais eliminados (LEITE et al., 2008). Os resultados encontrados indicam que os camundongos tratados com óleo essencial de *C. sinensis* não apresentaram alteração da atividade locomotora (número de áreas percorridas), sendo, entretanto, observada alteração da emocionalidade (diminuição significativa do número de bolos fecais). Estes resultados sugerem um efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* no campo aberto.

Na análise da participação dos sistemas de neurotransmissão envolvidos no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de laranja optou-se pelo emprego de uma abordagem farmacológica comportamental, através do uso de fármacos inibidores (e.g. antagonistas) de determinado sistema, avaliando se ocorre uma diminuição deste efeito tipo ansiolítico (p.ex. SINNATHAMBIE et al., 2013; YOUNG et al. 2006; ICHIMARU et al., 1995; SHIMADA et al., 1995; IMAIZUMI et al., 1994).

O modelo escolhido foi o esconder esferas, pois este modelo é bem validado, mostrou-se sensível ao efeito do óleo essencial de *C. sinensis*, é de fácil e rápida execução e permite a realização de vários sujeitos experimentais simultaneamente.

Considerando os sistemas de neurotransmissão relacionados ao potencial efeito ansiolítico de um fármaco, o sistema gabaérgico tem grande relevância, pois este sistema de neurotransmissão inibitória tem influência supressiva sobre vias de neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica, sendo estes três sistemas mais freqüentemente associados à ansiedade (MARTIJENA, 2002; MILLAN, 2003). Por exemplo, drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, que são eficazes no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e utilizadas na validação de modelos animais de ansiedade, têm como mecanismo de ação uma ação modulatória alostérica positiva no receptor GABA-A, aumentando a inibição GABAérgica (MILLAN, 2003). No estudo de uma possível mediação GABAérgica no efeito do óleo essencial de *C. sinensis* foi utilizada a picrotoxina, um antagonista GABAérgico. O pré-tratamento com picrotoxina não influenciou o efeito do óleo essencial de *C. sinensis* no modelo esconder esferas, indicando a não participação deste sistema neste efeito. O diazepam foi utilizado como controle positivo e o bloqueio de seu efeito ansiolítico pela picrotoxina validou o procedimento

empregado. Este resultado é interessante, pois a busca por novos ansiolíticos tem procurado fármacos com novos mecanismos de ação, particularmente por fármacos sem ação GABAérgica, mecanismo freqüentemente associado aos efeitos adversos dos benzodiazepínicos (MICHELINI et al., 1996; ARGYROPOULOS; NUTT, 1999; LADER, 1999).

Considerando que os dados evidenciaram a não participação do sistema gabaérgico no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*, foi conduzida a análise do sistema noradrenérgico. Millan (2003) enfatiza que projeções noradrenérgicas ascendentes são responsáveis por inervar regiões cerebrais envolvidas na resposta da ansiedade. As vias serotoninérgicas e noradrenérgicas têm sido destacadas em estudos sobre a neurobiologia e sobre o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, como exemplificado pela eficácia e grande utilização dos antidepressivos (MILLAN, 2003).

Na avaliação do sistema noradrenérgico foram utilizadas a nortriptilina (inibidor seletivo da recaptação de NA) e a ioimbina (antagonista receptor α_2). Observou-se que a ioimbina não bloqueou o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*, que seria indicativo do não envolvimento deste sistema no efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*. Entretanto, a ioimbina também não foi eficaz em bloquear o efeito ansiolítico da nortriptilina, questiona a capacidade do procedimento empregado em avaliar a participação do sistema noradrenérgico. Portanto, o resultado com o óleo essencial de *C. sinensis* pode ser considerado inconclusivo.

A ioimbina tem sido utilizada para induzir ansiedade em humanos (CHARNEY, 1983) e para produzir efeitos ansiogênico em vários modelos animais de ansiedade (PELLOW, 1985a; PELLOW, 1985b). Assume-se que muitas ações comportamentais da ioimbina surgem de um aumento da atividade noradrenérgica central secundário ao bloqueio dos receptores α_2 pré-sinápticos (PAPESCHI, 1975; HOEHN-SARIC, 1982). Evidências sugerem que a ação ansiogênica da ioimbina estaria relacionada com os sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos (CHARNEY et al., 1984; CHARNEY et al., 1987; JOHNSTON; FILET, 1989). Entretanto, no presente estudo observou-se um efeito tipo ansiolítico da ioimbina. Entretanto, a mesma ioimbina, segundo Millan (2003), pode estar associada a efeitos tipo ansiolíticos, quando bloqueia os receptores α_2 adrenérgicos pós-

sinápticos. Nesta linha, Cole e colab. (1995) observaram que a ioimbina induziu efeito tipo ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado.

O estudo da participação serotoninérgica no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* avaliou-se a participação dos receptores 5-HT_{1A}, alvo celular da ação ansiolítica da buspirona (CHOPIN; BRILEY, 1987; JANN, 1988; CARLI et al., 1989) e, frequentemente, associado a ação tipo ansiolítica de vários fármacos, como por exemplo do óleo essencial de lavanda e de *Citrus aurantium*, (CHIOCA et al., 2013; COSTA et al., 2013). Nesta etapa empregou-se o WAY100635, antagonista dos receptores 5-HT_{1A}. O pré-tratamento com WAY100635 bloqueou o efeito tipo ansiolítico apresentado pelo óleo essencial de *C. sinensis*, indicando que o sistema serotoninérgico mediará o efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*. O bloqueio do efeito tipo ansiolítico do 8-OH-DPAT pelo WAY100635 validou o procedimento empregado. Curiosamente, embora o WAY100635 tenha sido capaz de bloquear o efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* e do 8-OH-DPAT, quando administrado isoladamente ele também induziu efeito tipo ansiolítico.

Em estudo realizado por Nunes-de-Souza et al. (2002), onde os animais receberam infusões no hipocampo ventral de WAY100635, observou-se um aumento da exploração dos braços abertos e redução da avaliação de risco. Estes efeitos foram observados na ausência de significativa de alterações na atividade locomotora. Os resultados sugerem que os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipocampo ventral (mas não dorsal) desempenham um papel significativo na mediação da ansiedade (NUNES-DE-SOUZA et al., 2002), ressaltando a possibilidade de ocorrência de efeito ansiolítico do antagonista WAY100635.

O sistema endocanabinóide tem sido relacionado com transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão, atuando em várias regiões do cérebro, como hipocampo e amígdala (HERKENHAM et al., 1990). Os neurotransmissores canabinóides (p.ex. anandamida) atuam em receptores canabinóides CB1 e CB2, sendo o CB1 mais frequentemente associado à ansiedade. Nesta linha, o sistema canabinóide tem despertado interesse como alvo potencial para desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos (HALL; SOLOWIJ, 1998; BRAIDA et al., 2006; PATEL; HILLARD, 2006; RUTKOWSKA et al., 2006).

No presente estudo a participação do sistema canabinóide no efeito ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis* foi avaliada empregando-se o WIN 55,212-2, agonista do receptor canabinóide CB1, e o AM251, antagonista receptor CB1. Neste experimento, tanto o agonista, quanto o antagonista canabinóide não alteraram o número de esferas escondidas, embora o WIN 55,212-2 tenha apresentado uma tendência não significativa. Por outro lado, o antagonista AM251 reverteu o efeito tipo ansiolítico do óleo essencial. Este resultado sugere que o sistema canabinóide participe do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*. Embora o controle positivo (WIN 55,212-2) não tenha reduzido o número de esferas escondidas, não sendo possível avaliar a efetividade da administração do AM251 no bloqueio do receptor CB1, o bloqueio do efeito do óleo essencial pelo AM251 já seria suficiente para indicar esta mediação.

Na avaliação da neurotransmissão nitrérgica empregou-se o pré-tratamento com L-arginina, precursor do NO, no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*, utilizando-se o 7-NI, inibidor da NOS, como controle positivo. Adicionalmente, avaliou-se também o efeito da inalação óleo essencial de *C. sinensis* na expressão de neurônios positivos ao NADPH-diaforase no córtex cerebral.

Novamente, o óleo essencial de *C. sinensis* a 5% e o 7-NI apresentaram efeito tipo ansiolítico no modelo esconder esferas, sem alterar significativamente a atividade locomotora. O pré-tratamento com a L-arginina foi capaz de bloquear os efeitos do óleo essencial e do 7-NI, uma vez que, os grupos óleo ou 7-NI + L-arginina não apresentaram alterações significativas do número de esferas escondidas em relação ao grupo óleo + veículo. Protocolos similares têm sido utilizados para avaliar a mediação nitrérgica no efeito tipo ansiolítico de fármacos. Por exemplo, a L-arginina reverteu o efeito ansiolítico dos antidepressivos no labirinto em cruz elevado e no campo aberto (BEIJAMINI et al., 2006) e também no modelo esconder esferas (CHIOCA et al., 2013). Além disso, o pré-tratamento com L-arginina bloqueou o efeito dos antidepressivos citalopram e paroxetina, inibidores seletivos de recaptação de serotonina, no comportamento de esconder esferas (KRASS et al., 2010). Do mesmo modo, inibidores da nNOS (por exemplo, 7-NI) induziram efeito ansiolítico no modelo de labirinto em cruz elevado (VOLKE et al., 1995; DUNN et al., 1998) e no modelo esconder esferas (KRASS et al., 2010).

Adicionalmente, na avaliação do sistema nitrérgico, utilizou-se o método da NADPH-diaforase. Hope et al. (1991) enfatizam que a histoquímica do NADPH-diaforase permite indicar a localização da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no sistema nervoso. Esta reação serve também para detectar mudanças da atividade da NOS em neurônios, sendo que a intensidade da reação varia em diferentes grupos de células cerebrais, como, por exemplo, uma maior intensidade de coloração nos neurônios do córtex cerebral do que nos neurônios do estriado (MORRIS et al., 1997). Finalmente, em tecidos fixados com formaldeído, como no presente estudo, a NADPH-diaforase marca exclusivamente neurônios também marcados com NOS (DEL BEL; GUIMARÃES, 2000).

Assim, no presente estudo, observou-se que camundongos que receberam inalação de óleo essencial de *C. sinensis* apresentaram menor expressão de NADPH-diaforase no córtex cerebral que camundongos controles. Este resultado é coerente com os resultados encontrados no modelo de esconder esferas.

Finalmente, a compilação de todos os resultados deste estudo permite sugerir que o óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce), administrado por via inalatória, apresentou efeito tipo ansiolítico em vários modelos de ansiedade, e tal efeito, possivelmente, parece estar sendo mediado pelos sistemas de neurotransmissão nitrinérgico, serotonérgico e canabinóide.

Estudos indicam que o óxido nítrico teria a capacidade de modular vários sistemas de neurotransmissão no sistema nervoso central, tais como a serotonina, a dopamina, o GABA e o glutamato (LORRAIN et al., 1993; STRASSER et al., 1994; SEGOVIA et al., 1997; WEGENER et al., 2000). Além disso, o óxido nítrico poderia atuar na síntese de serotonina, via triptofano hidroxilase (KUHN et al., 1996), influenciando também sua liberação (KAEHLER et al., 1999). Além disso, Chanrion e Colaboradores (2007) demonstraram que a interação física entre o transportador de serotonina e a nNOS teria uma modulação recíproca. Esta interação pode ser observada comportalmente pelo bloqueio do efeito tipo antidepressivo da inibição da nNOS com a depleção de serotonina (HARKIN et al., 2003; WEGENER, et al., 2003; GIGLIUCCI et al., 2010).

Estes dados reforçam os achados encontrados em nosso estudo, onde temos a influência dos sistemas nitrinérgico e serotonérgico no efeito ansiolítico encontrado para o óleo essencial de *C. sinensis*, ressaltando também a influência do

sistema canabinóide neste efeito. Portanto, pode-se sugerir uma possível interação destes sistemas, atuando em regiões cerebrais relacionadas à ansiedade, modulando assim os mecanismos de neurotransmissão, culminando no efeito ansiolítico apresentado pelo óleo essencial.

Assim sendo, considerando que o efeito tipo ansiolítico do óleo de *C. sinensis* não envolve o receptor GABA-A (e seu sítio benzodiazepínico), há a perspectiva de que ele não induza sedação (conforme observado no presente estudo), prejuízos de memória ou risco de abuso/dependência. Mais ainda, em relação ao seu uso clínico, a facilidade da administração dos óleos essenciais por via inalatória permitiria o seu emprego em situações de ansiedade antecipatória, como, por exemplo, na sala de espera de consultórios odontológicos (LEHRNER et al., 2000; LEHRNER et al., 2005), o que seria uma vantagem adicional em relação aos fármacos ansiolíticos atuais.

7 CONCLUSÃO

- A inalação do óleo essencial de *C. sinensis* (laranja doce) apresentou efeito tipo ansiolítico nos modelos Esconder Esferas, Caixa Claro-Escuro, Campo Aberto, Hipofagia Induzida por Neofobia e no Labirinto em Cruz Elevado.
- Nas doses com efeito tipo ansiolítico não foram observados efeitos sedativos.
- O sistema de neurotransmissão gabaérgico não está envolvido no efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*.
- O sistema serotoninérgico (possivelmente mediado pelo receptor 5HT1A), canabinóide (possivelmente mediado pelo receptor CB1) e o sistema nitrérgico (inibição) participam do efeito tipo ansiolítico do óleo essencial de *C. sinensis*.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, P.; GOLDA, A.; MCCREARY, A. C. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, p. 217-228, 2008.
- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 627 - 635, 2009.
- ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F.; MAIOR, F. N. S.; SOUSA, D. P. Review Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. **Molecules**, v. 16, p. 2726-2742, 2011.
- ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.
- ANWAR, F.; NASEER R.; BHANGER, M. I.; ASHRAF, S.; NAZ, T. F.; ALADEDUNYE F. A. Physico-Chemical Characteristics of *Citrus* Seeds and Seed Oils from Pakistan. **J Am Oil Chem So**, v. 85, p. 321-330, 2008.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- ARCHER, T.; FREDRIKSSON, A.; LEWANDER, T.; SODERBERG, U., Marble burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam. **Scand. J. Psychol.**, v. 28, p. 242-249, 1987.
- ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, suppl. 6, p. S407-S412, 1999.
- ARTIGAS, F.; ADELL, A.; CELADA, P. Pindolol augmentation of antidepressant response. **Curr Drug Targets**, v. 7, p. 139 - 147, 2006.
- AZMITIA, E. C.; GANNON, P. J.; KHECK, N. M.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 35 - 46, 1996.
- BAILER, U. F.; FRANK, G. K.; HENRY, S. E.; PRICE, J. C.; MELTZER, C. C.; MATHIS, C. A. Exaggerated 5-HT_{1A} but normal 5-HT_{2A} receptor activity in individuals ill with anorexia nervosa. **Biol Psychiatry**, v. 61, p. 1090 - 1099, 2007.
- BALDINGER, P.; HÖFLICH, A. S.; MITTERHAUSER, M.; HAHN, A.; RAMI-MARK, C.; SPIES, M.; WADSAK, W.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. Effects of Silexan on the serotonin-1A receptor and microstructure of the human brain: A randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over study with molecular and structural neuroimaging. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 4, p. 1-9, 2015.

BALDWIN, D. S.; AJEL, K.; MASDRAKIS, V. G.; NOWAK, M.; RAFIQ, R. Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. **Neuropsychiatr Dis Treat.**, v. 9, p. 883-892, 2013.

BAMBICO, F. R.; DURANTI, A.; TONTINI, A. E. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. **Curr Pharm Des.**, v. 15, p. 1623-1646, 2009.

BARBOSA-BRANCO, A.; BÜLTMANN, U.; STEENSTRA, I. Sickness benefit claims due to mental disorders in Brazil: associations in a population-based study. **Cad Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1854-1866, 2012.

BARETTA, I. P.; FELIZARDO, R. A.; BIMBATO, V. F.; DOS SANTOS, M. G.; KASSUYA, C. A.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; DA SILVA, C. R.; DE OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, J.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 46-54, 2012.

BARJAVEL, M. J.; BHARGAVA, H. N. Nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice and rats: kinetic analysis. **Pharmacology**, v. 50, p. 168-174, 1995.

BATESON, A. N. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 1, p. 5-21, 2002.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 4, p. 347-355, 2006.

BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 400-408, 2001.

BERNIK, M. A. **Benzodiazepínicos**: quatro décadas de experiência. 1.ed. São Paulo: Edusp, 1999.

BILKEI-GORZO, A.; RACZ, I.; MICHEL, K.; ZIMMER, A. Diminished anxiety and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 10046–10052, 2002.

BLANCHARD, R. J.; HEBERT, M. A.; FERRARI, P.; PALANZA, P.; FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D. C.; PARMIGIANI, S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. **Physiol. Behav.**, v. 65, p. 201-209, 1998.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G. J.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 265-270, 2009.

BLOTTNER, D.; GROZDANOVIC, Z.; GOSSRAU, R. Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system. **Histochem. J.**, v. 27, p. 785-811, 1995.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol.**, v. 463, p. 55-65, 2003.

BRAIDA, D.; LIMONTA, V.; MALABARBA, L.; ZANI, A.; SALA, M. 5-HT_{1A} receptors are involved in the anxiolytic effect of Delta9-tetrahydrocannabinol and AM 404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 555, n. 2-3, p. 156-163, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **Resolução – RDC**, nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/10/2015.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768-770, 1990.

BRITTON, D. R.; BRITTON, K. T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 577-582, 1981.

BROEKKAMP, C. L.; RIJK, H. W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K. L. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur. J. Pharmacol.** v. 126, p. 223-229, 1986.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2.ed. Paris: Lavoisier, 1999.

BUCKLE, J. Aromatherapy. **Nurs. Times**, v. 89, n. 20, p. 32-35, 1993.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Res.** v. 22; n. 928(1-2), p. 50 – 59, 2002.

CARLI, M.; PRONTERA, C.; SAMANIN, R. Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. **Br. J. Pharmacol.**, v. 96, p. 829-836, 1989.

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, n. 12, p. 1629-1633, 2002.

CASAROTTO, P. C.; GOMES, F. V.; RESSEL, L. B.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behav Pharmacol.**, v. 21, n. 4, p. 353-358, 2010.

CHANRION, B.; MANNOURY LA COUR, C.; BERTASO, F.; LERNER-NATOLI, M.; FREISSMUTH, M.; MILLAN, M. J.; BOCKAERT, J.; MARIN, P. Physical interaction

between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 104, p. 8119-8124, 2007.

CHARLES, J.; LOWENSTEIN; SOLOMON, H.; SNYDER. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell**, v. 70, n. 5, p. 705-707, 1992.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R.; BREIER, A. Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 41, n. 8, p. 751-763, 1984.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R.; REDMOND, D. E. Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans: effects of diazepam and clonidine. **Life Sci.**, v. 33, p. 19-29, 1983.

CHARNEY, D. S.; WOODS, S. W.; GOODMAN, W. K.; HENINGER, G. R. Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks. **Am J Psychiatry**, v. 144, n. 8, p. 1030-1036, 1987.

CHEN, S. W.; MIN, L.; LI, W. J.; KONG, W. X.; LI, J. F.; ZHANG, Y. J. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 79, p. 377-382, 2004.

CHIOCA, L. R.; FERRO, M. M.; BARETTA, I. P.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; FERREIRA, J.; LOSSO, E. M.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. **J. Ethnopharmacol.**, v. 147, p. 412-418, 2013.

CHOPIN, P.; BRILEY, M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. **Tips Review**, v. 8, n. 10, p. 383-388, 1987.

COLE, J. C.; BURROUGHS, G. J.; LAVERTY, C. R.; SHERIFF, N. C.; SPARHAM, E. A.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against 2-adrenoceptor mediation. **Psychopharmacology**, v. 118, p. 425-436, 1995.

COOLS, R.; ROBERTS, A. C.; ROBBINS, T. W. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. **Trends in cognitive sciences**, v. 12, n. 1, p. 31 - 40, 2007.

COOPER, J. R.; FLOYD, E. B.; ROTH, R. H. **The biochemical basis of neuropharmacology**, 7 ed. New York: Oxford University Press, 1996.

COPLAN, J. D.; LYDIARD, R.B. Brain circuits in panic disorder. **Biol Psychiatry**, v. 44, p. 1264 – 1276, 1998.

CORAZZA, S. A Aromacologia através dos tempos. **Cosméticos & Perfumes**, v. 4, p. 39-44, 2000.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 178, p. 82 - 89, 2007.

COSTA, C. A. R. A.; CURY, T. C.; CASSETTARI, B. O.; TAKAHIRA, R. K.; FLÓRIO, J. C.; COSTA, M. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 42, p. 1-10, 2013.

COSTA, C. A.; KOHN, D. O.; DE LIMA, V. M.; GARGANO, A. C.; FLÓRIO, J. C.; COSTA, M. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 828-836, 2011.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, p. 167-70, 1980.

CRUZ, A. P. M.; E LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), **Métodos em Neurociência**, p. 192-217, 2012.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of the rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 49, p. 171-176, 1994.

CUNNINGHAM, M. D.; FERKANY, J. W.; ENNA, S. J. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sciences**, v. 54, p. 135-148, 1994.

CURRAN, H. V.; BRIGNELL, C.; FLETCHER, S. E. Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. **Psychopharmacol (Berl.)**, v. 164, p. 61-70, 2002.

DAVIDSON, J. R.; DUPONT, R. L.; HEDGES, D.; HASKINS, J. T. Efficacy, safety, and tolerability of venflaxine extended release and buspirone in outpatients with generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 60, p. 528 - 535, 1999.

DE ARAUJO, E. F.; QUEIROZ, L. P.; MACHADO, M. A. What is citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, v. 3, n. 1, p. 55-62, 2003.

DE OLIVEIRA, R. M. W.; DEL BEL E. A; GUIMARÃES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, v. 51, p. 457-464, 2000.

DE VENTE, J.; HOPKINS, D. A.; MARKERINK-VAN, I. M.; EMSON, P. C.; SCHMIDT, H. H.; STEINBUSCH, H. W. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. **Neuroscience**, v. 87, p. 207-241, 1998.

DEL BEL, E. A.;-GUIMARÃES, F. S. Sub-chronic inhibition of nitric-oxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice. **Psychopharmacology**, v. 147, p. 356-361, 2000.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 1996.

DONADIO, L. C.; MOURÃO, F. A. A. F.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.) **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundag, 2005.

DUGO, G.; COTRONEO, A.; BANACCORSI, I. Composition of "petitgrain" oils. In: DUGO, G; MONDELLO, L. (Eds). **Citrus Oils: composition, advanced analytical techniques, contaminantes, and biological activity**. London: CRC Press, 2010.

DULAWA, S. C.; HEN, R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Estados Unidos, v. 29, n. 4-5, p. 771-783, 2005.

DULAWA, S. C.; HOLICK, K. A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety, depression, and sensorimotor gating. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 1321-30, 2004.

DUNN, R. W.; REED, A. T.; COPELAND, P. D.; FRYE, C. A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 899-904, 1998.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Reserch**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ELISABETSKY, E.; SETZER. R. Caboclo concepts of disease, diagnosis and therapy: implications for ethnopharmacology and health systems in Amazonia. In: PARKER, E. P. (Ed.). The amazon caboclo: historical and contemporary perspectives. Williamsburgh. **Studies in Third World Societies Publication Series**, v. 32, p. 243-278, 1985.

ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals unconditioned fear reactions: A systematic review. **Progress in Neurosychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1399 - 1419, 2008.

FATURI, C. B.; LEITE, J. R.; ALVES, P. B.; CANTON, A. C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605-609, 2010.

FILIP, M.; BADER, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 761 - 777, 2009.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiol Rev.**, v. 83, p. 1017-1066, 2003.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V.; FLORENTINO, I. F.; LINO, R. C.; FAJEMIROYE, J. O.; CHAIBUB, B. A.; DE PAULA, J. R.; DE LIMA, T. C.; COSTA, E. A. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 38, p. 276–284, 2012.

GARDNER, C. R. Recent developments in 5-HT-related pharmacology of animal models of anxiety. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1479 - 1485, 1986.

GARGANO, A. C.; ALMEIDA, C. A. R.; COSTA, M. Essential oils from *Citrus latifolia* and *Citrus reticulata* reduce anxiety and prolong ether sleeping time in mice. **Tree For. Sci. Biotechnol.**, v. 2, p. 121-124, 2008.

GIGLIUCCI, V.; BUCKLEY, K. N.; NUNAN, J.; O'SHEA, K.; HARKIN, A. A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-Nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 94, n.4, p. 524-533, 2010.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M.; FAULL, R. L. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. **Neuroscience**, v. 77, p. 299-318, 1997.

GOES, T. C. G.; ANTUNES, F. D.; ALVES, P. B.; TEIXEIRA-SILVA, F. Effect of Sweet Orange Aroma on Experimental Anxiety in Humans. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 8, p. 798-804, 2012.

GORENSTEIN C, POMPEIA S. **Farmacocinética e farmacodinâmica dos benzodiazepínicos**. In: BERNIK, M. A. (ed). Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência. São Paulo: EDUSP, 1999.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29 (Supl I), p. S3-S6, 2007.

GRAEFF, F. G. **Medicamentos ansiolíticos**. Em: Graeff, F. G. e Guimarães, F. S. (eds). Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467 - 476, 2002.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual Role of 5-HT in Defense and Anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 6, p. 791 - 799, 1997.

GREEN, A. R. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 145 - 152, 2006.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Psychopharmacology Therapeutics**, v. 2365, n. 3, p. 319 - 395, 1995.

GRIEBEL, G.; STEMMELIN, J.; SCATTON, B. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 261-267, 2005.

GROSS, C. T.; SANTARELLI, L.; BRUNNER, D.; ZHUANG, X.; HEN, R. Altered fear circuits in 5-HT1A receptor KO mice. **Biol. Psychiatry**, v. 48, p. 1157 - 1163, 2000.

GUIMARAES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; DE LUCCA, A. C. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 29, p. 1313-1322, 2005.

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

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HALL, W.; SOLOWIJ, N. Adverse effects of cannabis. **Lancet**, v. 352, n. 9140, p. 1611-1616, 1998.

HALLER, J.; BAKOS, N.; SZIRMAY, M. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. **Eur J Neurosci.**, v. 16, p. 1395-1398, 2002.

HALLER, J.; VARGA, B.; LEDENT, C. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. **Eur J Neurosci.**, v. 19, p. 1906-1912, 2004.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 327p. 1-5, 1984.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, p. 198 - 213, 2008.

HARA, H.; WAEBER, C.; HUANG, P. L.; FUJII, M.; FISHMAN, M. C.; MOSKOWITZ, M. A. Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [3H]L-NG-nitro-arginine autoradiography. **Neuroscience**, v. 75, p. 881-890, 1996.

HARKIN, A.; CONNOR, T. J.; WALSH, M. S. T.; JOHN, N.; KELLY, J. P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 5, p. 616-623, 2003.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B. A. The mouse light-dark paradigm: a review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 25, n. 1, p. 141-66, 2001.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; DE COSTA, B. R. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. **Brain Res.**, v. 547, p. 267-274, 1991a.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M. R. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **J Neurosci.**, v. 11, n. 2, p. 563-583, 1991b.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 87, n. 5, p. 1932-1936, 1990.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. **JAMA.**, v. 301, p.1165-1166, 2009b.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**; v. 8, p. 451-458, 2009a.

HOEHN-SARIC, R. Neurotransmitters in anxiety. **Arch. Gen. Psychiat.**, v. 39, p. 735-742, 1982.

HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGET, K. M.; VINCENT, S. R. Neurobiology Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase (endothelium-derived relaxing factor/arginine/citrilline/cGMP). **Proc. Nati. Acad. Sci.**, v. 88, p. 2811-2814, 1991.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais**: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química IV. São Carlos, SP: EdUFSCar, 152p. 2003.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 533 - 554, 2002.

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. **Jpn J Pharmacol.**, v. 68, n. 1, p. 65-70, 1995.

IMAIZUMI, M.; SUZUKI, T.; MACHIDA, H.; ONODERA, K. A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v. 14, n. 2, p. 83-91, 1994.

JAFARZADEH, M.; ARMAN, S.; POUR, F. F. Effect of aromatherapy with orange essential oil on salivary cortisol and pulse rate in children during dental treatment: A randomized controlled clinical trial. **Adv Biomed Res.**, v. 2, p. 10-18, 2013.

JANN, M. W. Buspirone: an update on a unique anxiolytic agent. **Pharmacotherapy**, V. 8, n. 2, p. 100-116, 1988.

JELLINEK, J. S. Aroma-Chology: a status review. **Cosm. Toil**, v. 109, p. 83-101, 1994.

JOHNSTON, A. L.; FILET, S. E. Yohimbine's Anxiogenic Action: Evidence for Noradrenergic and Dopaminergic Sites. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 32, p. 151-156, 1989.

JOLY, A. B. **Botânica – introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1985.

KAEHLER, S. T.; SINGEWALD, N.; SINNER, C.; PHILIPPU, A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. **Brain Res.**, v. 835, p. 346-349, 1999.

KASPER, S.; GASTPAR, M.; MÜLLER, W. E.; VOLZ, H. P.; MÖLLER, H. J.; SCHLÄFKE, S.; DIENEL, A. Lavender oil preparation Silexan is effective in generalized anxiety disorder—a randomized, double-blind comparison to placebo and paroxetine. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 17, p. 859-869, 2014.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423-437, 2011.

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.

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

KRASS, M.; RÜNKORG, K.; WEGENER, G.; VOLKE, V. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. **Neurosci Lett.**, v. 480, n. 1, p. 55-58, 2010.

KUHN, D. M.; ARTHUR, R. E. JR. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 1072-1077, 1996.

KUMAR, D.; BHAT, Z. A.; KUMAR, V.; KHAN, N. A.; CHASHOO, I. A.; ZARGAR, M. I.; SHAH, M. Y. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. **Eur. J. Integr. Med.**, v. 4, p. 169-176, 2012.

LADER, M. H. Limitations on the use of benzodiazepines in anxiety and insomnia: are they justified? **Malcolm European Neuropsychopharmacology**, v. 9, Suppl. 6, p. S399-S405, 1999.

LEE, Y. L.; WU, Y.; TSANG, H. W. H.; LEUNG, A. Y.; CHEUNG, W. M. A Systematic Review on the Anxiolytic Effects of Aromatherapy in People with Anxiety Symptoms. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 2, p. 101-108, 2011.

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, n. 1-2, p. 83-86, 2000.

LEHRNER, J.; MARWINSKI, G.; LEHR, S.; JOHREN, P.; DEECKE, L. Ambient odors of orange and lavender reduced anxiety and improve mood in a dental office. **Physiol. Behav.**, v. 86, p. 92-95, 2005.

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

LÉVI-STRAUSS, C. A ciência do concreto. In: **O pensamento selvagem**. Campinas: Papyrus, 1989.

LIMA, N. G. P. B.; SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C.; ALVES, M. F.; SOUZA, F. S.; MACEDO, R. O.; CARDOSO, R. B.; MORAIS, L. C. S. L.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 450-454, 2013.

LISTER, R. G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Berl, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOPES, C. L. M.; GONÇALVES, J. P. C.; MARQUES, T. H.; FEITOSA, C. M.; SALDANHA, G. B. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Pharmazie**, v. 66, n. 8, p. 623-627, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p, 2002.

LORRAIN, D. S.; HULL, E. M. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. **Neuroreport**, v. 5, p. 87-89, 1993.

MACKENZIE, J. W. Daycase anaesthesia and anxiety. A study of anxiety profiles amongst patients attending a Day Bad Unit. **Anaesthesia**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 437-440, 1989.

MAGALHÃES JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D. P.; PALHARES JÚNIOR, J. **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 924p. 2005.

MALUF, S. **Aromaterapia**. São Paulo: Ed. do Autor, 2008.

MANNER, H. I.; BUKER, R. S.; SMITH, V. E.; ELEVITCH, C. R. Citrus species (citrus). In: ELEVITCH, C. R. (editors). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Permanent Agriculture Resources (PAR): Hawai'i, p: 1-35, 2006.

MARTIJENA, I. D.; MANDANARES, P. A. R.; LACERRA, C.; MOLINA, V. A. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdale. **Synapse**, v. 45, p. 86-94, 2002.

MARTIN, E. I.; RESSLER, K. J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C. B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 865-891, 2009.

MARTIN, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M. E. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacol (Berl)**, v. 159, p. 379-387, 2002.

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

MATO, S.; PAZOS, A. Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. **Neuropharmacol.**, v. 46, p. 716-726, 2004.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 591 - 613, 1999.

MICHELINI, S.; CASSANO, .G. B.; FRARE, F.; PERUGI, G. Long-term use of benzodiazepines: tolerance, dependence and clinical problems in anxiety and mood disorders. **Pharmacopsychiatry**, v. 29, n. 4, p. 127-134, 1996.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol.**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MOREIRA, F. A.; WOTJAK, C. T. Cannabinoids and anxiety. **Current Topics Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 429-450, 2010.

MORRIS, B. J.; SIMPSON, C. S.; MUNDELL, S.; MACEACHERN, K.; JOHNSTON, H. M.; NOLAN, A. M. Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 11-12, p. 1589-1599, 1997.

MORS, W. Plantas medicinais. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 51-54, 1982.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric Oxide- Releasing Drugs. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 97-123, 2003.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. Improvement of Essential oil steam distillation by microwave pretreatment. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 8, p. 4667-4671, 2011.

NICOLAS, L. B.; KOLB, Y.; PRINSSEN, E. P. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. **Eur J. Pharmacol.**, v. 547, n. 1-3, p. 106-115, 2006.

NISSEN, S. E.; NICHOLLS, S. J.; WOLSKI, K. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. **JAMA.**; v. 299, p. 1547-1560, 2008.

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.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res.**, v. 927, n. 1, p. 87-96, 2002.

OLIVENZA, R.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. **J Neurochem.**, v. 74, p.785-791, 2000.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: World Health Organization; 2017.

OTHA, Y.; HIROSE, Y. Constituents of Cold-Pressed oil of *Citrus natsudaidai* HAYATA. **Agric. Biol. Chem.**, v. 30: p. 1196-1201, 1966.

PAPESCHI, R.; THEISS, P. The effect of yohimbine on the turnover of brain catecholamines and serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 33, p. 1-12, 1975.

PATEL, S.; HILLARD, C. J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 318, n. 1, p. 304-311, 2006.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates – compact second edition**. California: Elsevier Science; 1997.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? **Neurosci. Lett.**, v. 55, p. 5-9, 1985a.

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

POLTYREV, T.; KESHET, G. I.; KAY, G.; WEINSTOCK, M. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. **Dev Psychobiol.**, v. 29, n. 5, p. 453-462, 1996.

PONCELET, M.; MARUANI, J.; CALASSI, R.; SOUBRIÉ, P. Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptors deleted mice. **Neurosci Lett.**, v. 343, p. 216-218, 2003.

POSCHEL, B. P. A simple and specific screen for benzodiazepine-like drugs. **Psychopharmacologia**, v. 19, p. 193-198, 1971.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in neurobiology**, v. 64, p. 51-68, 2001.

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, p. 1720-1725, 2006.

RAI, M.; CARPINELLA, M. C. **Naturally occurring bioactive compounds**. Oxford, Elsevier, 514p., 2006.

REHMAN, S. U.; HUSSAIN, S.; NAWAZ, H.; MUSHTAQ, A. M.; MURTAZA, M. A.; RIZVI, A. J. Inhibitory effect of Citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 558-561, 2007.

RIBEIRO, L.; BUSNELLO, J. V.; KAPCZINSKI, F. Neurofisiologia dos transtornos da ansiedade. IN: BERNIK MA. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 45-57. 1999.

RICHARD, C.; GAO, J.; LAFLEUR, B.; CHRISTMAN, B. W.; ANDERSON, J.; BROWN, N.; REESE, J. Patency of the preterm fetal ductus arteriosus is regulated by endothelial nitric oxide synthase and is independent of vasa vasorum in the mouse. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R652-R660, 2004.

ROSEN, J. B.; SCHILKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, v. 105, n. 2, p. 325-350, 1998.

ROWLETT, J. K.; PLATT, D. M.; LELAS, S. Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepinelike drugs in primates. **Proc Nat Acad Sci USA (PNAS)**, v. 102, n. 3, p. 915-920, 2005.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABA-based therapeutics approach: GABAA receptor subtype functions. **Cur Opinion Pharmacol.**, v. 6, p. 18-23, 2006.

RUTKOWSKA, M.; JAMONTT, J.; GLINIAK, H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. **Pharmacol Rep.**, v. 58, n. 2, p. 200-206, 2006.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C.T.; MOREIRA, F.A. Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 1, p. S7-S14, 2010.

SAIYUDTHONG, S.; MARSDEN, C. A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behavior and corticosterone level in rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 858-862, 2011.

SAKETI, S.; BANANEJ, M.; JAHROMY, M. H. Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil and its interaction with fluoxetine on anxiety in male mice. **J. Behav. Brain Sci.**, v. 4, p. 285-290, 2014.

SALTER, M.; DUFFY, C.; GARTHWAITE, J.; STRIJBOS, P. J. Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N omega-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME). **Neuropharmacology**, v. 34, p. 639-649, 1995.

SANTER, R. M. Survival of the population of NADPHdiaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J. Aut. Nervous System**, Amsterdam, v. 49, p.115-121, 1994.

SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. **Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas**. Caxias do Sul: Educs, 112p., 2003.

SATOU, T.; MIYAHARA, N.; MURAKAMI, S.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Differences in the effects of essential oil from *Citrus junos* and (+)-limonene on emotional behavior in mice. **J. Essent. Oil Res.**, v. 24, p. 493-500, 2012.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 59, n. 4, p. 807-811, 1998.

SEGOVIA, G.; DEL ARCO, A.; MORA, F. Endogenous glutamate increases extracellular concentrations of dopamine, GABA, and taurine through NMDA and AMPA/kainate receptors in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 1476-1483, 1997.

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

SHIMADA, T.; MATSUMOTO, K.; OSANAI, M.; MATSUDA, H.; TERASAWA, K.; WATANABE, H. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. **Gen Pharmacol.**, v. 26, n. 1, p. 205-210, 1995.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS M. F. S. Óleos essenciais potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA SANTOS, A.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, I. A. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 8-13, 2006.

SILVA, F. T. **Alterações psicológicas e fisiológicas em voluntários saudáveis submetidos à situação ansiogênica do “Video-recorded Stroop color-word test”**: efeitos do diazepam. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 223p. 2001.

SILVA, N. M. A fitoterapia na história do Brasil. **Informativo Herbarium Saúde**, n. 29, 2004. Disponível em: <www.herbarium.com.br/herbarium_site/jornais/herbarium_saude.asp>. Acesso em: 15, abril, 2011.

SILVA-SANTOS, A. **Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 202p. 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; PETROVICK, L. A. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behav Brain Res.**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.

SINGH, S.; RAJAM, M. V. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 15, p. 3-22, 2009.

SINNATHAMBIE, A.; MAZUMDER, P. M.; LOHIDASAN, S.; THAKURDESAI, P. Dopaminergic effect of *Alstonia scholaris* Linn. R.Br. in experimentally induced anxiety. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 3, n. 2, p. 51-57, 2013.

SOUBRIE, P.; KULKARNI, S.; SIMON, P.; BOISSIER, J. R. Effects of antianxiety drugs on the food intake in trained and untrained rats and mice (author's transl). **Psychopharmacologia**, v. 45, p. 203-210, 1975.

SOUSA, D. P.; HOCAYEN, P. A. S.; ANDRADE, L. N.; ANDREATINI, R. A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. **Molecules**, v. 20, p. 18620-18660; 2015.

SPOLIDÓRIO, P. C.; ECHEVERRY, M. B.; IYOMASA, M.; GUIMARÃES, F. S.; DEL BEL, E. A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology**, Berl, v. 195, n. 2, p. 183-192, 2007.

STEPHENS, R. J. Proceedings: the influence of mild stress on food consumption in untrained mice and the effect of drugs. **J. Br. Pharmacol.**, v. 49, p. 146, 1973.

STEUER, B., SCHULZ, H.; LAGER, E. Classification and analysis of Citrus oils by NIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 72, p. 113-117, 2001.

STRASSER, A.; MCCARRON, R. M.; ISHII, H.; STANIMIROVIC, D.; SPATZ, M. L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. **Neuroreport**, v. 5, p. 2298-2300, 1994.

SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley, California: University of California, p. 190-430, 1967.

TAYLOR, B. Fruit and juice processing. In: ASHURST, P. R. **Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices**. Hereford (UK): Blackwell Publishing Ltd., p. 35-66, 2005.

TONELLI, D.; PEREIRA, M.; SIBA, I. P.; MARTYNHAK, B. J.; CORREIA, D.; CASAROTTO, P.; BIOJONE, C.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L.; ANDREATINI, R. The antimanic-like effect of phenytoin and carbamazepine on methylphenidate-induced hyperlocomotion: role of voltage-gated sodium channels. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 650-655, 2013.

TONKS, A. Extracts from Best treatments Treating generalised anxiety disorder. **British Medical Journal (BMJ)**, v. 326, n. 7391, p. 700-701, 2003.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

TYRREL, M. H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**, v. 44, p. 68-72, 1990.

UMATHE, S. N.; BHUTADA, P. S.; JAIN, N. S.; MUNDHADA, Y. R.; BORKAR, S. S.; DHUMAL, B. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. **Nitric Oxide**, v. 21, p. 140-147, 2009.

VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS JR., J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-14, 2002.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; LIMA, T. C. M.; VIANA, G. S. B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. **Journal Ethnopharmacology**, v. 167, p. 127-33, 1999.

VINCENT, S R; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, p. 755-784, 1992.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p.331-42, 2005.

VOLKE, V.; KÖKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEIN, J.; MÄNNISTÖ, P. T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. **Neuroreport**, v. 6, p. 1413-1420, 1995.

WEGENER, G.; VOLKE, V.; HARVEY, B. H.; ROSENBERG, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Res.**, v. 959, n. 1, p. 128-134, 2003.

WEGENER, G.; VOLKE, V.; ROSENBERG, R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 575-580, 2000.

WILKIE, D. M.; MACLENNAN, A. J.; PINEL, J. P., Rat defensive behavior: burying noxious food. **J. Exp. Anal. Behav.**, v. 31, p. 299-306, 1979.

WOELK, H.; SCHLÄFKE, S. A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. **Phytomedicine**, v. 17, p. 94-99, 2010.

WULTSCH, T.; CHOURBAJI, S.; FRITZEN, S.; KITTELT, S.; GRÜNBLATT, E.; GERLACH, M.; GUTKNECHT, L.; CHIZAT, F.; GOLFIER, G.; SCHMITT, A.; GASS, P.; LESCH, K. P.; REIF, A. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. **J Neural Transm Suppl.**, v. 72, p. 69-85, 2007.

YOUNG, R.; BATKAI, S.; DUKAT, M.; GLENNON, R. A. TDIQ (5,6,7,8-tetrahydro-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinoline) exhibits anxiolytic-like activity in a marble-burying assay in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 62-73, 2006.

YU, J.; WANG, L.; WAZEN, R. L.; MILLER, E. G.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Antioxidant activity of citrus limonoids flavonoids and coumarins. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 53, n. 6, p. 2009-2014, 2005.




ZHOU, Q. G.; HU, Y.; HUA, Y.; HU, M.; LUO, C. X.; HAN, X. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J. Neurochem.**, v. 103, p. 1843-1854, 2007.

ANEXO 1 – ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL *Citrus sinensis*

CAIB - UCS

CERTIFICADO DE ANÁLISE – CAIB 073/14

ANEXO 1 – pg 1 de 3

		Central de Análises Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Petrópolis- Caxias do Sul - RS – Brasil - CEP 95070-560 Tel: +55 54-3218 2149 ramal 2668 fagost11@ucs.br/sidnel.moura@ucs.br	
CERTIFICADO DE ANÁLISE – CAIB - 073/14			
Solicitante:		Roberto Andreatini	
Nome da amostra:		Óleo essencial de Laranja Doce	
Código da Amostra (Cliente):		Óleo essencial de Laranja Doce BioEssência Lote: 140421 Validade: 01/2016	
Data de Recebimento da Amostra:		dezembro-2014	
Data do Certificado:		22-dez-14	
Análises Realizadas			
Tipo de Análise para Óleos Essenciais		Análise Solicitada	
Características Gerais		()	
Análise quantitativa em cromatografia gasosa (GC)		(x)	
Análise qualitativa em espectrômetro de massas (GC/MS)		(x)	
Densidade		()	
Índice de refração		()	
Ponto de ebulição		()	
Desvio polarimétrico		()	
Solubilidade no álcool diluído		()	
Resíduo de evaporação		()	
Índice de acidez		()	
Índice de peróxido		()	
Tipo de Análise para Ervas e Chás		Análise Solicitada	
Conteúdo de óleos essenciais por hidrodestilação em bancada		()	
Conteúdo de óleos essenciais por arraste a vapor em semi-piloto		()	
Informações adicionais e detalhamento		Anexo I - Relatório de Análise	
Resultados			
-Análise por cromatográfica gasosa: mirreno com 0,78%, limoneno com 92,23%, cis óxido de limoneno com 1,55%, trans óxido de limoneno com 0,94%, trans p-menta-2,8-dien-1-ol com 0,51%, cis p-menta-2,8-dien-1-ol com 0,55%, carvona com 0,74%, cis carveol com 0,83% e trans carveol com 0,71%.			
 Drª. Fabiana Agostini			
 Dr. Sidnel Moura e Silva			

Relatório de Análise

1. Equipe

Supervisor	Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva	
Técnico Responsável/Analista	Dr ^a . Fabiana Agostini	

2. Garantia da Qualidade

O Certificado de Análises e este relatório seguem o ISO GUIA 31:2004 na maioria dos requisitos, quando aplicável. Os dados de rastreabilidade das análises encontram-se nos arquivos do CAIB.

As amostras foram preparadas de forma rastreável, e as análises instrumentais realizadas em laboratórios conveniados com CAIB, sob a supervisão da nossa equipe.

2.1. Incerteza da Medição

Uma vez que todas as metodologias utilizadas têm probabilidades de ocorrência de falso-negativo muito baixas, quando utilizadas simultaneamente fazem com que a probabilidade de interpretação errônea tenda a zero. Dessa forma, considera-se a incerteza da medição desprezível e por isso ela não é relatada.

3. Informações Gerais

Solicitante: Roberto Andreatini

Este relatório descreve as análises realizadas e interpretação dos resultados para uma amostra de Óleo essencial de laranja doce.

Código Interno (CAIB): 073/14

Sinonímia: Óleo essencial de *Citrus sinensis*

4. Análise Instrumental

4.1. Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS)

Cromatografia gasosa é um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico. Apresenta como princípio a separação dos componentes de um líquido, o qual é volatilizado em uma coluna cromatográfica. Tem por finalidade identificar os componentes da amostra. O parâmetro utilizado é o tempo de retenção, que é o tempo transcorrido desde a injeção da amostra até o máximo do pico gerado. Na análise quantitativa a área de cada pico no cromatograma é proporcional à concentração do

componente na amostra e usada na determinação da concentração de um ou mais componentes de uma mistura (Cienfuegos & Vaitzman, 2000).

A análise em GC foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado Hewlett Packard 6890 Series, equipado com software HP Chemstation. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 m x 320 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Temperatura da coluna, 40°C (8 min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); temperatura do Injetor 250°C; razão de split 1:50; detector de ionização de chama com temperatura de 250°C; gás de arraste H₂ (34KPa); volume Injetado 1µL diluído em hexano (1:10).

A análise em GC/MS foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroscopia Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 m x 250 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Temperatura da coluna, 40°C (8 min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); interface 280°C; split ratio 1:100; gás de arraste He (56 KPa); razão de fluxo: 1,0 mL/min.; energia de ionização 70 eV; volume Injetado 0,4 µL diluído em hexano (1:10).

5. Conclusão

A partir da análise cromatográfica obteve-se como composto majoritário limoneno com 92,23%, além de compostos minoritários como mirreno com 0,78%, cis óxido de limoneno com 1,55%, trans óxido de limoneno com 0,94%, trans p-menta-2,8-dien-1-ol com 0,51%, cis p-menta-2,8-dien-1-ol com 0,55%, carvona com 0,74%, cis carveol com 0,83% e trans carveol com 0,71%.

6. Referências

1. Cienfuegos, F.; Vaitzman, D. (2000). *Análise Instrumental*. Rio de Janeiro: Interciência. pp. 221-337.

7. Figuras

