



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MAX DENISSON MAURÍCIO VIANA

**ATIVIDADE HIPNÓTICO-SEDATIVA E NEUROMODULAÇÃO GABAérgica NA
AÇÃO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* (L.) Burm f. EM
CAMUNDONGOS**

Maceió – AL

2015

MAX DENISSON MAURÍCIO VIANA

**ATIVIDADE HIPNÓTICO-SEDATIVA E NEUROMODULAÇÃO GABAérgica NA
AÇÃO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* (L.) Burm f. EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira.

Coorientadora: Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto.

Maceió – AL

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

- V614a Viana, Max Denisson Maurício.
Atividade hipnótico-sedativa e neuromodulação GABAérgica na ação ansiolítica do óleo essencial de *Citrus limon* (L) Burm f. em camundongos / Max Denisson Maurício Viana. – Maceió, 2015.
79 f.: il.
- Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Coorientadora: Eliane Aparecida Campesatto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2015.
- Bibliografia: f. 66-76.
Apêndices: f. 77-79.
1. *Citrus limon*. 2. Óleo essencial. 3. Hipnótico e sedativo. 4. Ansiolítico.
5. GABAérgico. I. Título.

CDU: 615.214.24

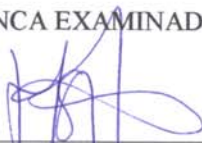
MAX DENISSON MAURÍCIO VIANA

**ATIVIDADE HIPNÓTICO-SEDATIVA E NEUROMODULAÇÃO GABAérgica NA
AÇÃO ANSIOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus limon* (L.) Burm f. EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data da aprovação: 13/02/2015.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Profª. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante (Titular)
Centro de Ciências da Saúde – UFPB



Profª. Dra. Adriana Ximenes da Silva (Titular)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Profª. Dra. Éurica Adélia Nogueira Ribeiro (Titular)
Escola de Enfermagem e Farmácia – UFAL

*Aos meus pais: Márcia Duarte e Hegel Viana
por todo apoio, pela incondicional confiança e
tolerância e por despertar em mim, desde o
início de minha existência, o incansável
desejo de ser melhor a cada dia...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Este estudo tem a parceria de muitas mãos. Mãos de todas as pessoas que estiveram envolvidas comigo nesse período de atividades. Agradeço imensamente a todos que me ajudaram com suas experiências, profissionalismo, dedicação, amizade e prosperaram junto a mim durante esses anos. Destaco o agradecimento:

A Deus pela minha vida, e, por intermédio da minha fé, buscar força para atingir meus objetivos;

A meus pais, Márcia Duarte e Hegel Viana, a meus irmãos, Hegel Filho e Vanessa Ataíde, e a toda minha família, que sempre estiveram ao meu lado, e principalmente pela compreensão nos momentos de estresse ou um pouco afastado e por nunca desistirem de acreditar na minha capacidade;

A minha orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira, pelo respeito e confiança em mim depositados, por todos os ensinamentos que proporcionaram meu crescimento científico, mas principalmente pela paciência em me ensinar o melhor caminho frente às dificuldades;

A minha coorientadora: Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto, que me conferiu os “primeiros passos científicos”, despertou-me para pesquisa, e hoje podemos ver que o projeto que antes era só um ideal se tornou concreto, real;

A todo quadro de professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial aos professores doutores: João Xavier de Araújo Júnior, Êurica Adélia Nogueira Ribeiro e Maria Aline Barros Fidelis de Moura que estiveram ou estão à frente da coordenação e que sempre acreditaram e se mantiveram firmes na execução deste programa;

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Daniel Ricarte, por toda acessibilidade, paciência, esclarecimentos, não só comigo, como também com meus amigos da pós;

Às Profas. Dras. Fabiana Cavalcante e Êurica Ribeiro, pelos ensinamentos fisiofarmacológicos na graduação, essenciais ao meu crescimento principalmente na pesquisa e pela prontidão em aceitar compor a presente banca como titulares;

Às Profas. Dras. Adriana Ximenes e Camila Dornelas pelas considerações feitas na minha qualificação de Mestrado que engrandeceram esta dissertação e por novamente aceitar o convite de compor a presente banca enquanto suplentes;

A todos os meus amigos de pós em especial: Priscilla Fonseca, Ana Patrícia, Samara Malaquias, José Clementino, Elaine Patrícia, Ednaldo Almeida, Daniel Porto, ao G4 da neuro:

Marcela Rabello, Rafaela Soares, Felipe Rebêlo, entre outros, por todos os momentos compartilhados, sejam de alegrias ou dificuldades, dos quais sempre saímos vitoriosos;

Aos ‘Seas’: Mariah Amaral e Geraldo Neto pelos vários conselhos, momentos compartilhados, pelo apoio imprescindível que me concederam nesses últimos anos, por ser um grande estímulo para continuar na caminhada, pelas comemorações das vitórias alcançadas... Enfim, por estarmos, às vezes longe, sempre perto;

Aos meus amigos Ana Carolina Santana Vieira, Luiz Henrique Agra e Maria Alice por todo suporte enquanto precisei, seja em momentos de discussão científica ou não; vocês foram fundamentais!

Assim como todos os graduandos e pós-graduandos e ex-alunos do LaFI: Mariana, Amanda, Aline, Walfrido, Diego, Karol, Luiz Antônio, Jefferson, Liliane, Gicely, Ellymaira, Edla, Layse, João Flávio, João Kaycke, Yolanda, Gabriela, Carolina Brito, Morgana, Thiago, Anderson, Thays e Giane, pela convivência diária, por toda paciência em me ensinar e por compartilhar experiências de trabalho, além das várias discussões científicas, inerentes à forma como nos conhecemos – fazendo pesquisa!

A ‘Família Postiça’: Artur Cesar, Carla Thays, Juliete Baraúna, Jussara Anjos, Izabella Araújo, Kwesten Heiner, Rafael Correia e Stefanie Araruna por todos esses longos anos de amizade, compreensão nos momentos ausentes, mas acima de tudo pelos bons momentos compartilhados juntos que os tornam eternizados na memória e no tempo;

Aos meus grandes amigos de curso e outros de caminhada, em especial: Anna Karla, Igor Nascimento, Ana Karla, Iara Luna, Derek Asp, Mariana de Souza, Nathalee Ribeiro, Sâmara Fontes, entre outros, pelos anos de convivência, e além de tudo por me erguerem sempre e nunca permitirem que cada dificuldade encontrada se tornasse um ponto final;

Aos meus grandes parceiros que a vida os tornou irmãos: André Moraes, Ayron Salatiel, Aryel Sander, Carlos Eduardo, Danilo Gomes, Márlon Salomão e Renato Elysson, pois conhecem cada passo dado e fazem parte dessa trajetória;

A toda equipe do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em especial ao Sr. Railson pelo cuidado com os animais que foram utilizados nesta pesquisa;

Aos funcionários da UFAL que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Muito obrigado!

*“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos transforma.”*

John Ruskin

RESUMO

A alta prevalência de pessoas acometidas por algum distúrbio de ansiedade associada aos efeitos colaterais da farmacoterapia a longo prazo tem possibilitado e motivado a procura por novas terapias. Como terapia complementar e alternativa, infusos obtidos de folhas, cascas e flores de muitas espécies do gênero *Citrus* são utilizados pela população no sentido de minimizar distúrbios emocionais e são recomendados no tratamento da ansiedade. No contexto da busca por novos compostos ansiolíticos e hipnótico-sedativos, o presente estudo objetivou investigar o mecanismo de ação ansiolítico e a atividade hipnótico-sedativa *in vivo* do óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus limon* (OECl). Os procedimentos experimentais foram realizados com o óleo essencial na forma em que é comercializado (Ferquima Ind. e Com. Ltda, São Paulo). Foram utilizados camundongos *Swiss* (n = 8), adultos, machos, pesando 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os testes de potencialização do sono induzido por barbitúrico – objetivando avaliar seu efeito sobre o sono – além do labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa claro-escuro (CCE), utilizando agonistas e antagonistas das vias GABAérgica e/ou serotoninérgica – a fim de se avaliar o mecanismo de ação ansiolítico; bem como a avaliação de um possível comprometimento motor, através dos testes da barra giratória e catalepsia, foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade. No teste de potencialização do sono, o tratamento oral com OECl na dose de 300 mg/kg diminuiu a latência e aumentou o tempo total de sono ($p < 0,001$). Nos modelos experimentais de ansiedade, o OECl (nas doses de 100 e 300 mg/kg) induziu um aumento no número de entradas e na porcentagem de tempo nos braços abertos e, conseqüentemente, reduziu os mesmos parâmetros para os braços fechados quando comparado ao grupo veículo no LCE. Além disso, essas mesmas doses aumentaram o número de transições e a porcentagem de tempo na área clara na CCE, comparando-se ao mesmo grupo controle ($p < 0,001$). O mecanismo de ação ansiolítico do OECl foi investigado através do pré-tratamento com flumazenil, NAN-190 e ketanserina nos mesmos modelos de ansiedade. O efeito ansiolítico foi antagonizado apenas pelo pré-tratamento com flumazenil. Na avaliação da performance motora, não foi observado nenhum prejuízo na função motora dos animais nos testes da barra giratória e catalepsia. Os resultados sugerem que o tratamento oral com OECl induz um comportamento ansiolítico em camundongos sugestivamente modulado pelo sítio de ligação benzodiazepínico no receptor GABA_A ou pelo aumento da neurotransmissão GABAérgica, de modo que não há comprometimento do aparelho locomotor.

Palavras-chave: *Citrus limon*. Óleo essencial. Hipnótico e Sedativo. Ansiolítico. GABAérgico.

ABSTRACT

The high prevalence of people suffering from some anxiety disorder associated with side effects of long-term pharmacotherapy has enabled and motivated the search for new therapies. As a complementary and alternative therapy, infusions obtained from leaves, peels and flowers of many species of the genus *Citrus* are used by the population to minimize emotional disorders and they are recommended in the anxiety treatment. In the context of the search for new anxiolytics and sedative-hypnotic compounds, the present study aimed to investigate the mechanism of anxiolytic action and the hypnotic-sedative activity from fruit's peels of *Citrus limon* essential oil (CLEO). The experimental procedures were performed with essential oil in the way in which it is marketed (Ferquima Ind. & Com. Ltda, São Paulo). Adults male *Swiss* mice (n = 8, each group), weighing 25-35g, from the Central Biotery of the Federal University of Alagoas were used. Tests for potentiation of barbiturate-induced sleep - to evaluate its effect on sleep - in addition to the elevated plus-maze (EPM) and light-dark box (LDB), using agonists and antagonists from GABAergic and/or serotonergic pathways - in order to evaluate the mechanism of anxiolytic action; as well as assessment of a possible motor impairment, through Rota-rod and catalepsy tests, were conducted at the Laboratory of Pharmacology and Immunity. In the sleep test, oral treatment with CLEO at the dose of 300 mg/kg decreased latency and increased the sleep total time ($p < 0,001$). In experimental models of anxiety, CLEO (at doses of 100 and 300 mg/kg) induced an increase in the number of entries and percentage of time spent in the open arms and, accordingly, in the reduction of the same parameters for the closed arms as compared to the vehicle group in the EPM. Furthermore, CLEO increased the number of transitions and the percentage of time in the light area in the LDB, compared to the same control group ($p < 0,001$). The anxiolytic mechanism of action of CLEO was investigated by pretreatment with flumazenil, NAN-190 and ketanserin at the same anxiety models. The anxiolytic effect was only antagonized by pretreatment with flumazenil. In the motor performance evaluation, no injury was observed in motor function of animals evaluated in catalepsy and rota rod tests. Results suggest that oral treatment with CLEO induce an anxiolytic behavior in mice suggestively modulated by the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor or by increased of the GABAergic neurotransmission, so that there is no impairment in the locomotor system.

Keywords: *Citrus limon*. Essential oil. Sedative and Hipnotic. Anxiolytic. GABAergic.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Representação esquemática do receptor GABA _A . A. Estrutura pentamérica do receptor GABA _A . B. Principais sítios de ligação no receptor GABA _A .. | 21 |
| Figura 2 - | Neurotransmissão GABAérgica e ação dos BDZs no sítio de ligação do receptor..... | 22 |
| Figura 3 - | Esquematização da neurotransmissão serotoninérgica e subtipos de receptores para serotonina..... | 24 |
| Figura 4 - | Os dez modelos animais mais comumente usados na descoberta de novos fármacos ansiolíticos..... | 25 |
| Figura 5 - | Labirinto em cruz elevado. A – vista frontal. B – vista superior..... | 26 |
| Figura 6 - | Caixa claro-escuro. A – vista frontal. B – vista superior sem iluminação. C – vista superior com iluminação..... | 27 |
| Figura 7 - | Folha de <i>C. limon</i> | 28 |
| Figura 8 - | Frutos de <i>C. limon</i> | 30 |
| Figura 9 - | D-Limoneno..... | 31 |
| Figura 10 - | Óleo essencial de <i>C. limon</i> | 35 |
| Figura 11 - | Esquematização do teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico..... | 37 |
| Figura 12 - | Esquematização do teste do labirinto em cruz elevado..... | 38 |
| Figura 13 - | Esquematização do teste da caixa claro-escuro..... | 39 |
| Figura 14 - | Esquematização da investigação do mecanismo de ação ansiolítico do OECL..... | 41 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 15 - | Esquematização do teste da barra giratória..... | 42 |
| Figura 16 - | Esquematização do teste de catalepsia..... | 43 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 - | Efeito hipnótico-sedativo do OECl em camundongos no teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico..... | 44 |
| Gráfico 2 - | Efeito ansiolítico do OECl em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado..... | 46 |
| Gráfico 3 - | Efeito ansiolítico do OECl em camundongos no teste da caixa claro-escuro..... | 48 |
| Gráfico 4 - | Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA _A , 5-HT _{1A} e 5-HT _{2A/C} no número de entradas e porcentagem de tempo nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado..... | 50 |
| Gráfico 5 - | Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA _A , 5-HT _{1A} e 5-HT _{2A/C} no número de entradas e porcentagem de tempo nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado..... | 51 |
| Gráfico 6 - | Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA _A , 5-HT _{1A} e 5-HT _{2A/C} no número de transições entre os compartimentos do teste da caixa claro-escuro..... | 53 |
| Gráfico 7 - | Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA _A , 5-HT _{1A} e 5-HT _{2A/C} na porcentagem de tempo de permanência nas áreas clara e escura do teste da caixa claro-escuro..... | 54 |
| Gráfico 8 - | Efeito do OECl sobre a performance motora de camundongos submetidos ao teste de catalepsia..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|---|
| ANOVA | Análise de variância |
| BDZ | Benzodiazepínico |
| BUSP | Buspirona |
| CCE | Caixa claro-escuro |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CLEO | <i>Citrus limon essential oil</i> (do inglês, óleo essencial de <i>Citrus limon</i>) |
| cm | Centímetro |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| DMS-IV | <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> (do inglês, Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) |
| DZP | Diazepam |
| EBA | Entradas nos braços abertos |
| EBF | Entradas nos braços fechados |
| e.p.m. | Erro padrão da média |
| EPM | <i>Elevated Plus-Maze</i> (do inglês, Labirinto em Cruz Elevado) |
| FLU | Flumazenil |
| G_i | Proteína G inibitória |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GABA_A | Receptor GABAérgico tipo A |
| h | Hora |
| HALO | Haloperidol |
| ICBS | Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde |
| IMAO | Inibidor da Monoaminoxidase |
| i.p. | Via intraperitoneal |

| | |
|----------------------------|---|
| ISRS | Inibidores seletivos da recaptação de serotonina |
| KET | (+)-Tartarato de ketanserina |
| kg | Quilograma |
| LaFI | Laboratório de Farmacologia e Imunidade |
| LCE | Labirinto em cruz elevado |
| LDB | <i>Light-dark box</i> (do inglês, Caixa claro-escuro) |
| mg | Miligrama |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| NAN-190 | Bromidrato de 1-(2-Metoxifenil)-4-[4-(2-ftalimido)butil]piperazina |
| NSQ | Núcleo supraquiasmático |
| OE | Óleo essencial |
| OECI | Óleo essencial de <i>Citrus limon</i> |
| PENTO | Pentobarbital |
| REM | <i>Rapid Eyes Movements</i> (do inglês, Movimento Rápido dos Olhos) |
| r.p.m. | Rotações por minuto |
| s | Segundos |
| SAL | Salina |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TAG | Transtorno de ansiedade generalizada |
| TOC | Transtorno obsessivo compulsivo |
| TP | Transtorno do pânico |
| UFAL | Universidade Federal de Alagoas |
| v.o. | Via oral |
| vs | <i>Versus</i> (do latim, em oposição a) |
| α | Alfa |

| | |
|------------------------------------|--|
| α-Me-5-HT | Alfa-Metilserotonina |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| °C | Grau Celsius |
| %TPAC | Porcentagem de tempo de permanência na área clara |
| %TPAE | Porcentagem de tempo de permanência na área escura |
| %TBA | Porcentagem de tempo nos braços abertos |
| %TBF | Porcentagem de tempo nos braços fechados |
| 5-HT | 5-Hidroxitriptamina (serotonina) |
| 5-HT_{2A} | Receptor serotoninérgico subtipo 2A |
| 5-HT_{2C} | Receptor serotoninérgico subtipo 2C |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Transtornos de ansiedade | 17 |
| 1.2 | Aspectos gerais do ciclo sono-vigília e a insônia | 19 |
| 1.3 | Sistemas neurotransmissores e farmacoterapia nos transtornos de ansiedade... | 20 |
| 1.4 | Modelos animais de ansiedade | 24 |
| 1.5 | Estudos sobre <i>Citrus limon</i> | 28 |
| 1.5.1 | Aspectos botânicos..... | 28 |
| 1.5.2 | Usos populares..... | 28 |
| 1.5.3 | Estudos fitoquímicos..... | 30 |
| 1.5.4 | Estudos farmacológicos..... | 31 |
| 1.6 | Justificativa | 32 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 | Objetivo geral | 34 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 34 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | Óleo essencial de <i>Citrus limon</i> | 35 |
| 3.2 | Substâncias | 35 |
| 3.3 | Animais | 36 |
| 3.4 | Teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico | 36 |
| 3.5 | Avaliação da atividade ansiolítica do OECl | 37 |
| 3.5.1 | Labirinto em cruz elevado..... | 37 |
| 3.5.2 | Caixa claro-escuro..... | 38 |
| 3.6 | Investigação do mecanismo de ação ansiolítico do OECl | 39 |
| 3.6.1 | Envolvimento do receptor GABA _A sobre o efeito ansiolítico do OECl..... | 39 |
| 3.6.2 | Envolvimento do receptor 5-HT _{1A} sobre o efeito ansiolítico do OECl..... | 40 |
| 3.6.3 | Envolvimento do receptor 5-HT _{2AC} sobre o efeito ansiolítico do OECl..... | 40 |
| 3.7 | Avaliação da performance motora | 41 |
| 3.7.1 | Teste da barra giratória..... | 41 |
| 3.7.2 | Teste de catalepsia..... | 42 |
| 3.8 | Análise estatística | 43 |
| 4 | RESULTADOS | 44 |
| 4.1 | Efeito hipnótico-sedativo do OECl em camundongos | 44 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2 | Efeito ansiolítico do OECl em camundongos..... | 45 |
| 4.2.1 | Labirinto em cruz elevado..... | 45 |
| 4.2.2 | Caixa claro-escuro..... | 47 |
| 4.3 | Neuromodulação GABAérgica sobre o efeito ansiolítico do OECl..... | 49 |
| 4.3.1 | Labirinto em cruz elevado..... | 49 |
| 4.3.2 | Caixa claro-escuro..... | 52 |
| 4.4 | OECl não altera a performance motora de camundongos..... | 55 |
| 4.4.1 | Teste da barra giratória..... | 55 |
| 4.4.2 | Teste de catalepsia..... | 55 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 57 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 65 |
| | REFERÊNCIAS..... | 66 |
| | APÊNDICE A – Ficha de avaliação do 1º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória..... | 77 |
| | APÊNDICE B – Ficha de avaliação do 2º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória..... | 78 |
| | ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL..... | 79 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de ansiedade

A ansiedade é considerada o transtorno psiquiátrico de maior incidência mundial, sendo caracterizada pela fobia desproporcional frente a situações que representem estresse, perigo, ameaças reais ou desafios cotidianos. Entretanto, pode ser manifestada também na ausência de perigo real. Apresenta componentes fisiológicos e psicológicos com sintomas emocionais, perceptivos, somáticos, cognitivos e comportamentais, podendo culminar na falência da capacidade adaptativa (BENUTE et al., 2009; BRAGA et al., 2010; RIBEIRO, 2010).

O quadro do paciente com ansiedade crônica é caracterizado pelo comprometimento das atividades diárias, implicando em alterações no pensamento, na percepção e no aprendizado, gerando diminuição da habilidade de concentração, redução da memória e perturbação na capacidade de relacionar-se (SADOCK, 2009).

Nesse sentido, a ansiedade crônica é considerada um problema de saúde pública, em virtude do seu progressivo crescimento na população e do seu elevado potencial comprometedor da qualidade de vida dos indivíduos, seja em suas relações pessoais, sociais ou profissionais (GONÇALVES; KAPCZINSKI, 2008).

De acordo com um estudo recente multicêntrico desenvolvido por Wittchen et al. (2011), abrangendo 30 países europeus e uma população de 514 milhões de pessoas, os transtornos de ansiedade tiveram as maiores estimativas de prevalência em 12 meses (um total de 14%) em comparação com todas as outras condições psiquiátricas.

Andrade et al. (2012) reuniram dados epidemiológicos de 24 países e constataram que no Brasil, onde a região metropolitana de São Paulo foi o único local de estudo, 29,6% dos habitantes apresentaram transtornos mentais, sendo a mais alta registrada em todas as áreas pesquisadas. Dentre os transtornos avaliados, os de ansiedade foram os mais comuns, afetando 19,9% dos entrevistados. Em seguida, apareceram transtornos de comportamento (11%), transtornos de controle de impulso (4,3%) e abuso de substâncias (3,6%). Os Estados Unidos, por exemplo, nesta pesquisa, apareceram em segundo lugar, com pouco menos de 25%. A razão da alta prevalência, de acordo com o grupo de pesquisa, pode ser explicada pelo cruzamento de duas variáveis incluídas no estudo: a alta urbanização e a privação social, concluindo que o componente social está diretamente envolvido no desencadeamento da ansiedade.

Dessa forma, a ansiedade crônica depende da interação entre predisposição e fatores ambientais, incluindo os de natureza socio-cultural (DUARTE et al., 2007). A predisposição é, em parte, determinada geneticamente, sofrendo influência de experiências marcantes durante o desenvolvimento (episódios traumáticos na infância, por exemplo) e do meio ambiente (CUTIN et al., 2003).

O quadro patológico de ansiedade acomete de 10 a 30% da população mundial de modo debilitante (MULUMO et al., 2012) e, segundo o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DMS-IV-TR), os transtornos de ansiedade são classificados em: transtornos de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico (TP), fobias, transtorno obsessivo compulsivo (TOC), desordem do estresse pós-traumático e outros transtornos de ansiedade ligado à uma condição clínica, ao uso de substâncias ou não especificados; sendo diferenciados devido à natureza dos sintomas envolvidos (DMS-IV-TR, *American Psychiatric Association*, 2002).

Dentre eles, o TAG é considerado o distúrbio mais frequente nos indivíduos atendidos nos serviços de saúde que receberam diagnóstico de ansiedade. De acordo com os critérios do DMS-IV-TR, o TAG é caracterizado por preocupação excessiva e tensão contínua durante os vários eventos diários do cotidiano com duração de, pelo menos, seis meses, e incapacidade de controlar estes sentimentos. A condição vem acompanhada por, no mínimo, três ou mais sintomas adicionais, que podem ser psíquicos – como agitação, irritabilidade, dificuldade de concentração – ou somáticos – incluindo fadiga, tensão muscular e distúrbios do sono (DMS-IV-TR, *American Psychiatric Association*, 2002; STAHL, 2010).

Embora muitos estudos tenham sido realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos fisiopatológicos e comportamentais cruciais na gênese da ansiedade, ainda não há uma hipótese totalmente consolidada. Entretanto, três vertentes principais tentam explicar o mecanismo pelo qual as desordens de ansiedade são desencadeadas. A primeira delas se refere às teorias psicanalíticas, que foi definida por Sigmund Freud como o resultado do conflito psíquico entre desejos inconscientes sexuais e agressivos, com ameaças correspondentes do superego e da realidade externa. Em resposta a isso, o ego mobilizaria mecanismos de defesa para evitar que pensamentos e sentimentos inconscientes inaceitáveis emergissem para a percepção consciente. A segunda, associada às teorias comportamentais, defende a ideia que a ansiedade é uma resposta condicionada aos estímulos específicos do ambiente. A última, a teoria existencial, afirma que não há um estímulo específico identificável para a sensação crônica da ansiedade. Deste modo, os indivíduos teriam na ansiedade a resposta para o vazio de sentido e existência (SADOCK, 2009).

1.2 Aspectos gerais do ciclo sono-vigília e a insônia

O ciclo sono-vigília é um ritmo circadiano, isto é, em condições naturais este ritmo apresenta sincronização com fatores ambientais e oscila com um período de 24 horas. A alternância do dia-noite (claro-escuro), os horários escolares, os horários de trabalho, horários de lazer, as atividades familiares, todos são fatores exógenos que sincronizam o ciclo sono-vigília. Além dessa sincronização ambiental, o ciclo sono-vigília é gerado e regulado endogenamente por estruturas neurais localizadas no hipotálamo que são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), considerados como o relógio biológico central para os mamíferos (ASCHOFF, 1979).

Há uma relação temporal entre o ciclo sono-vigília e outros ritmos biológicos no próprio organismo como, por exemplo, a melatonina, o hormônio de crescimento, o cortisol, entre outros. Esta relação de fase entre os ritmos endógenos é conhecida como ordem temporal interna (GOICHOT et al., 1998).

Existe uma série de evidências apontando para o fato de que a sincronização com o meio ambiente e a ordem temporal interna representem uma necessidade para a expressão fisiológica e comportamental normal de um organismo. A perturbação tanto da ordem temporal interna quanto da externa pode levar a problemas de saúde (MOORE-EDE; RICHARDSON, 1985).

O equilíbrio entre as influências dos sincronizadores e a ordem temporal interna pode ser perturbado por mudanças abruptas em jornadas de trabalho, vôos trans-meridianos ou trabalho noturno (MONK et al., 1998). Isto pode desencadear uma série de perturbações como sensação de mal-estar, alterações gastrintestinais, flutuações no humor (irritabilidade, tensão, confusão, ansiedade), reduções no desempenho em tarefas que requerem atenção e concentração e principalmente transtornos do sono, dentre eles a insônia (GASPAR; MORENO; MENNA-BARRETO, 1998).

A insônia é um distúrbio do sono que consiste na incapacidade de iniciar ou manter o sono, ou ter uma duração e qualidade adequada para restaurar a energia e o estado de vigília normal (SECCHI; VIRTUOSO, 2012). É o distúrbio do sono que mais acomete a população e tem sido associado com a diminuição no desempenho do trabalho, o aumento na incidência de acidentes de carro e maior propensão às doenças (SARRAIS; MANGLANO, 2007).

De acordo com o DSM-IV, a característica essencial da insônia é a dificuldade para iniciar ou manter o sono, ou um sono não reparador por pelo menos um mês. Para serem considerados clinicamente significativos, os sintomas devem estar associados com sofrimento

ou com debilidade social, ocupacional ou outras áreas importantes. Ainda, não deve ocorrer exclusivamente na presença de outros distúrbios do sono, distúrbios mentais, ou efeitos fisiológicos diretos de uma substância ou condições médicas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002).

De forma geral, a privação de sono prejudica o funcionamento diurno do indivíduo, comprometendo aspectos cognitivos (concentração, memória) e habilidades psicomotoras (MULLER; GUIMARÃES, 2007). Savard e Morin (2001) apontam que, comparados aos bons dormidores, indivíduos insones reportam maior frequência de problemas de saúde, consultas médicas e hospitalização.

A dificuldade com o sono frequentemente está associada a condições psiquiátricas, como ansiedade e depressão. Embora essas condições possam contribuir para o desenvolvimento da insônia, o inverso também pode ocorrer, como as condições sendo consequência do problema de sono. Pesquisas indicam a insônia como fator de risco e consequência para o desenvolvimento ou complicação de sintomas depressivos (BUYSSE et al., 2008; FLEMING; GILLESPIE; ESPIE, 2010; ROSEKIND; GREGORY, 2010; HINDI et al., 2011).

Os hipnóticos constituem o tratamento mais comum para a insônia, e seu uso é desproporcionalmente mais elevado em adultos mais velhos (TARIQ; PULISSETTY, 2008). Nesta classe de fármacos, os benzodiazepínicos (BDZs) são os mais utilizados. Porém, seu uso prolongado produz efeitos adversos como dependência, sedação diurna (ressaca), má qualidade do sono, o que induz a busca por tratamentos alternativos seguros entre eles os fitoterápicos (FERNÁNDEZ-SAN-MARTÍN et al., 2010).

De acordo com uma pesquisa realizada por Pearson, Johnson e Nahin (2006), cerca de 1,6 milhões de americanos fazem uso de medicina alternativa e complementar para tratamento de distúrbio do sono. Desta forma, os medicamentos naturais fornecem uma alternativa segura, eficaz e mais econômica para a população, de modo que as pesquisas confirmam estes achados.

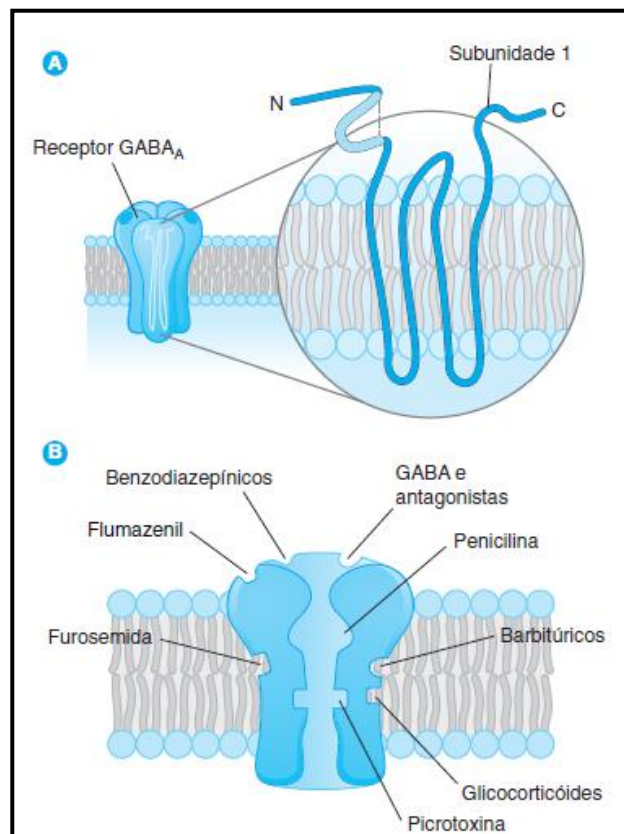
1.3 Sistemas neurotransmissores e farmacoterapia nos transtornos de ansiedade

A farmacoterapia das desordens ansiosas envolve diversas classes de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC), dentre os quais podem ser citados: os BDZs, agonistas e antagonistas serotoninérgicos, inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs), entre outros.

Os BDZs são os fármacos mais utilizados para efeitos ansiolíticos, já que são eficazes no controle dos sintomas ansiosos e apresentam a vantagem de oferecer alívio num curto intervalo de tempo (SCHMITT; KAPCZINSKI, 2004).

Estes agem sobre o sistema GABA-canal de cloreto, aumentando a afinidade do mediador endógeno ácido gama-aminobutírico (GABA) pelo receptor $GABA_A$. O receptor GABA se apresentam em três subtipos distintos: o receptor $GABA_A$, o receptor $GABA_B$ e o receptor $GABA_C$. Os ansiolíticos benzodiazepínicos possuem afinidade pelo subtipo $GABA_A$ (**Figura 1A**), que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC. Esse receptor se apresenta na forma de canal pentamérico de íons cloreto, com sítios de afinidade e ligação para diversos fármacos como barbitúricos, anestésicos gerais e neuroesteroides (**Figura 1B**). É composto por várias subunidades, dentre as quais a subunidade α tem se mostrado diretamente relacionada à afinidade pelos BDZs ao receptor $GABA_A$, enquanto que a subunidade γ parece estar diretamente relacionada à eficácia destes fármacos (GRAEFF, 1999; KORPI; GRUNDER; HARTMUT, 2002; KRALIC et al., 2002).

Figura 1 – Representação esquemática do receptor $GABA_A$. A. Estrutura pentamérica do receptor $GABA_A$. B. Principais sítios de ligação no receptor $GABA_A$.

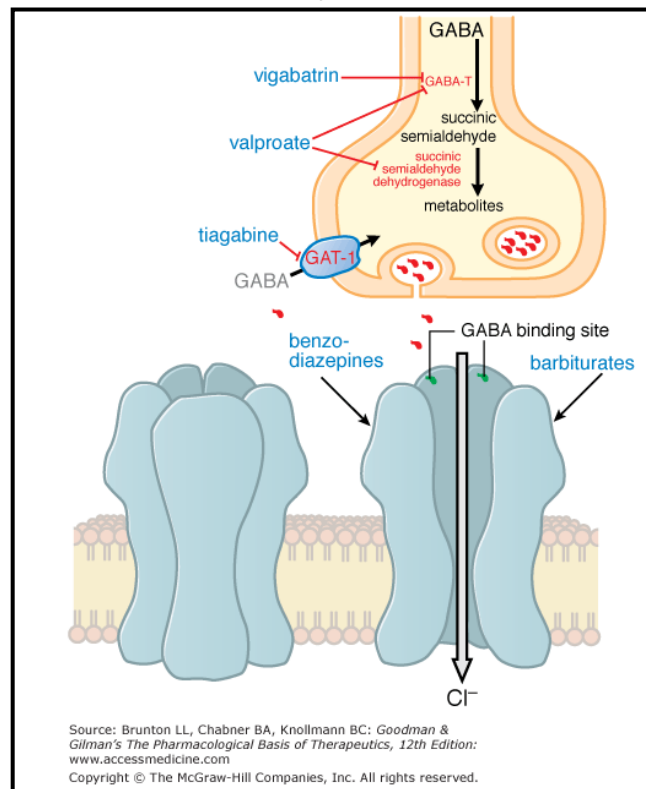


Fonte: Forman et al., 2009.

Os BDZs, ligando-se ao seu sítio específico (**Figura 2**), aumentam a afinidade do GABA, aumentando a frequência de abertura do canal e consequente entrada dos íons cloreto, levando a uma hiperpolarização da membrana, acarretando em uma diminuição da excitabilidade neuronal, resultando em efeitos como: sedação, hipnose, amnésia anterógrada, miorelaxamento e atividade anticonvulsivante (KORPI; GRUNDER; HARTMUT, 2002; KRALIC et al., 2002).

Os transtornos de ansiedade, por sua vez, necessitam de um longo período de tratamento, o que compromete o uso dos BDZs visto seus efeitos colaterais em longo prazo. O uso prolongado pode causar declínio dos domínios cognitivos como atenção/concentração, solução de problemas, inteligência geral, velocidade psicomotora, processamento sensorial, memória verbal e velocidade de processamento do controle motor/desempenho (BARKER; GREENWOOD; JACKSON, 2004). Além disso, eles também estão associados com sedação, dependência física, tolerância e ansiedade rebote.

Figura 2 – Neurotransmissão GABAérgica e ação dos BDZs no sítio de ligação do receptor.



Fonte: Mcnamara, 2012.

Em um estudo retrospectivo realizado por Huh et al. (2011), entre os anos de 1980 e 2010, menos da metade dos pacientes acometidos por estes transtornos mantiveram remissão

após a cessação do tratamento com os BDZs. A tolerância aos efeitos ansiolíticos do diazepam, por exemplo, pode ser observada em camundongos após duas semanas de tratamento (FLAISHON et al., 2003).

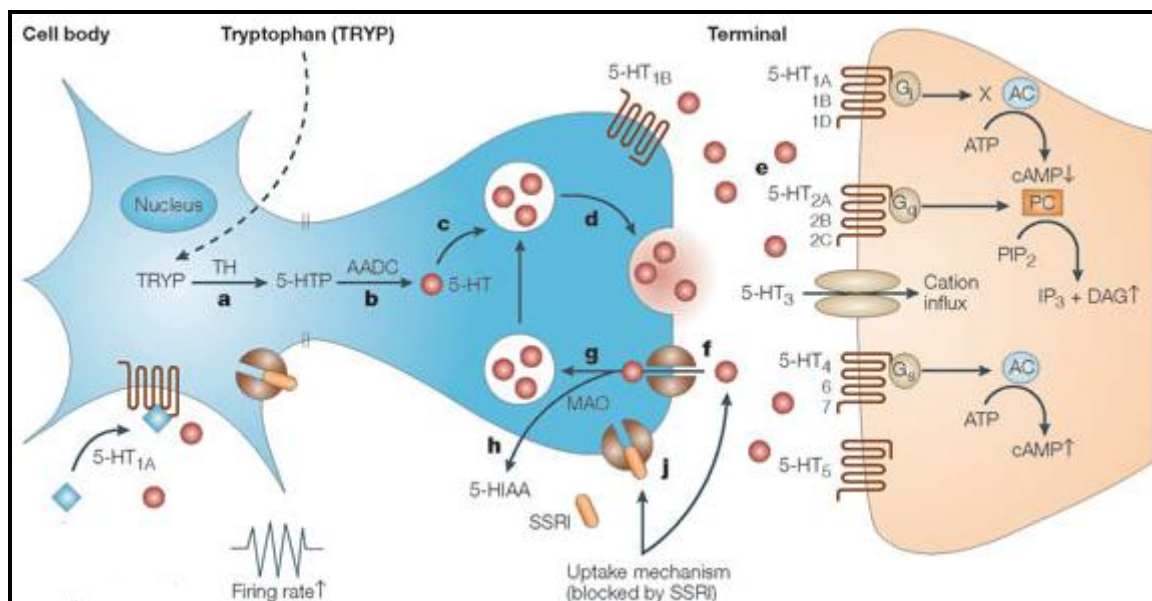
A desregulação do sistema serotoninérgico parece ter um efeito central na ansiedade, mais especificamente na gênese do TP, embora ainda não esteja bem-estabelecido como os mecanismos de ação dos ISRSs produzem o efeito desejado. Na prática clínica, são atualmente os fármacos de primeira escolha no TP, pois, além da sua eficácia já comprovada, combinam um espectro eficaz para condições co-mórbidas (depressão, fobia social, TOC e TAG), associado à segurança e à tolerabilidade (BARKER; GREENWOOD; JACKSON, 2004).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) desempenha um papel complexo e ainda pouco esclarecido na ansiedade, porém considerado fundamental (BRAGA et al., 2010). Graeff e Hetem (2004) esclarecem que este neurotransmissor desempenha atividade tanto estimulatória como inibitória (em receptores 5-HT₂ e 5-HT_{1A}, respectivamente), de modo que várias teorias explicam sua relação, bem como de seus receptores, com fármacos ansiolíticos.

Desde as primeiras demonstrações de que antagonistas da neurotransmissão serotoninérgica promoviam efeitos ansiolíticos comparáveis aos dos BDZs em testes de conflito (GRAEFF; SHOENFELD, 1970), o papel da 5-HT na ansiedade vem sendo amplamente investigado. Estes resultados, em conjunto com as observações de que os ansiolíticos BDZs diminuíam a atividade dos neurônios serotoninérgicos, favoreceram a proposição da teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, a qual atribui um papel ansiogênico para a 5-HT na maioria de seus receptores (STEIN; WISE; BERGER, 1973).

Mais recentemente, a utilização de agentes serotoninérgicos com potencial ansiolítico parece fortalecer esta hipótese. Por exemplo, antagonistas dos subtipos 5-HT₂ (como a ritanserina e a ketanserina) promovem efeitos ansiolíticos em vários modelos animais (HANDLEY; McBLANE, 1993; CRUZ et al., 1997) e em ensaios clínicos com humanos (GRAEFF et al., 1996), por inibirem a condução do impulso nervoso mediada por estes receptores excitatórios (**Figura 3**).

Figura 3 – Esquemática da neurotransmissão serotoninérgica e subtipos de receptores para serotonina.



Fonte: Wong; Perry; Bymaster, 2005.

Estudos neuroquímicos também indicam que a buspirona, primeiro ansiolítico seletivo de ação serotoninérgica introduzido na clínica médica (NINAN; COLE; YONKERS, 1998), atua como agonista preferencialmente em auto-receptores 5-HT_{1A} nos núcleos da rafe (HOYER; MARTIN, 1997). A ativação desses auto-receptores pré-sinápticos diminui a quantidade de 5-HT em nível pós-sináptico (provavelmente na amígdala e hipocampo) por estarem acoplados à proteína G_i e, conseqüentemente, resultarem em uma resposta inibitória nesses neurônios (**Figura 3**). Desta forma, a ação ansiogênica da 5-HT parece ser minimizada sob o efeito desse fármaco.

É importante destacar que este tratamento tem custos elevados, constituindo um importante problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2004). Estima-se que em 1990 nos Estados Unidos foram gastos US\$ 42,3 bilhões, chegando a US\$ 63,1 bilhões em 1998 e US\$ 83,1 bilhões em 2000 na terapia dos transtornos de ansiedade (GREENBERG et al., 2003). A associação entre alto custo e a ampla gama de efeitos colaterais é o que tem possibilitado e estimulado a procura por novas terapias.

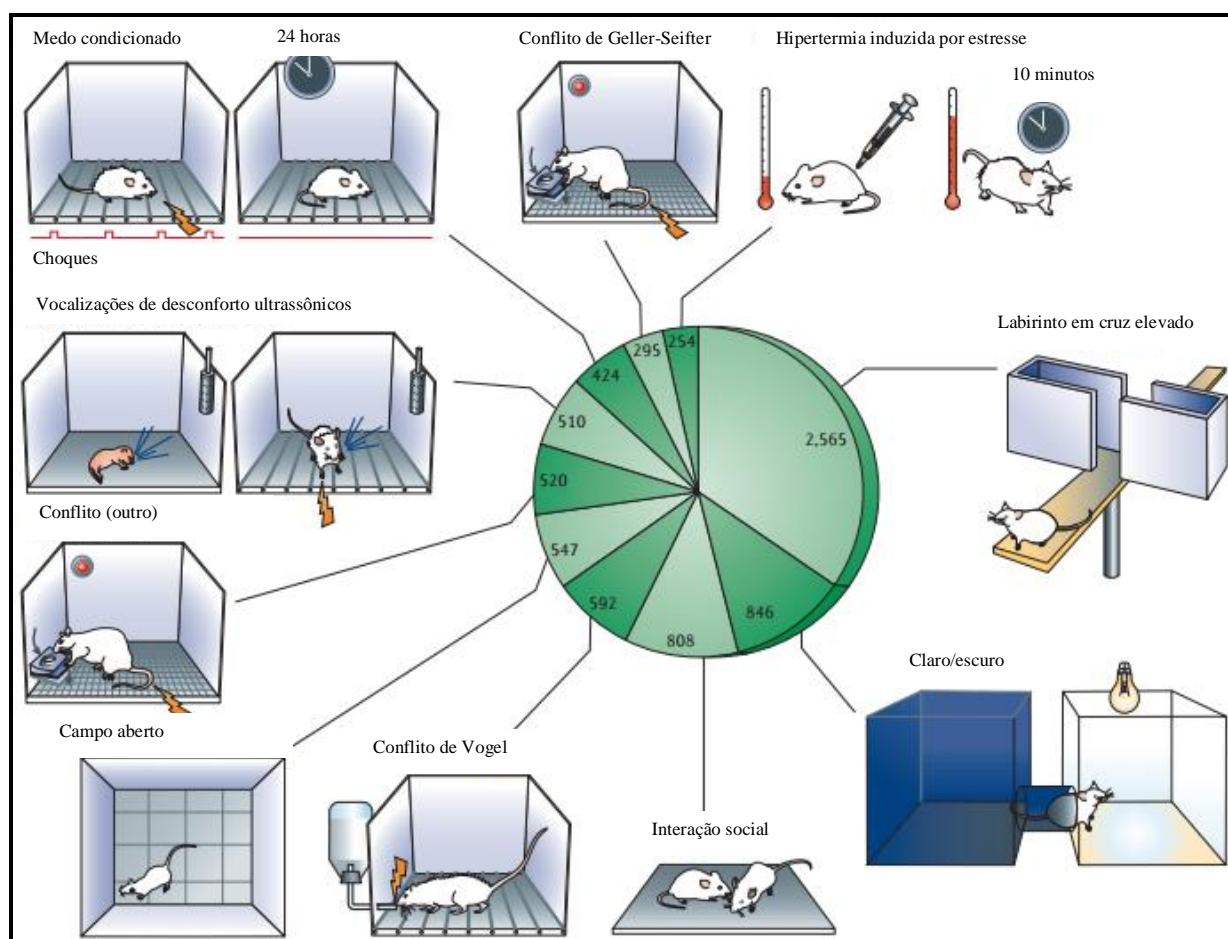
1.4 Modelos Animais de Ansiedade

Na clínica, a ansiedade é diagnosticada e avaliada principalmente pela anamnese dos pacientes, indicando a natureza subjetiva desse transtorno, o que traz uma limitação

aparentemente intransponível aos modelos animais. Entretanto, apesar desta limitação, o desenvolvimento destes modelos recebeu maior importância com o advento de novos fármacos ansiolíticos e melhor compreensão da neurobiologia da ansiedade (LACERDA, 2006). A **Figura 4** demonstra os principais modelos animais utilizados na pesquisa por fármacos ansiolíticos.

Atualmente, modelos animais de ansiedade têm permitido a análise das modificações mensuráveis em pacientes doentes (SADOCK, 2009). Os testes usualmente utilizados na avaliação de propriedades ansiolíticas de fármacos incluem tanto os que confrontam roedores com novos ambientes, como os que envolvem o uso de estímulos nocivos, como choque elétrico ou substâncias ansiogênicas (BELZUNG; LE PAPE, 1994).

Figura 4 – Os dez modelos experimentais *in vivo* mais comumente usados na descoberta de novos fármacos ansiolíticos.



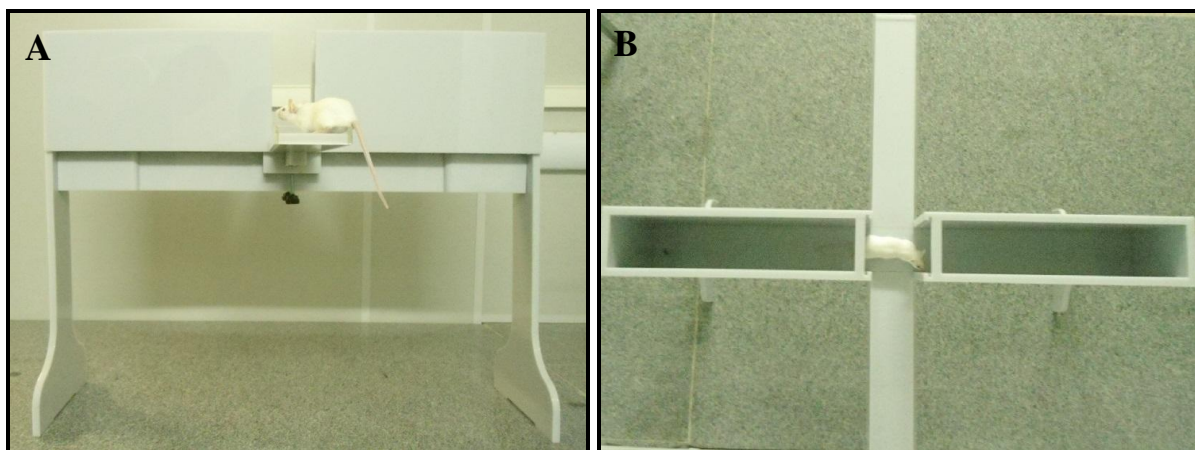
Fonte: Adaptado de Griebel e Holmes, 2013.

No entanto, vários procedimentos envolvidos nestes modelos podem interferir com o comportamento exibido pelo animal, sem necessariamente refletir uma ação ansiolítica dos

compostos. Por exemplo, fármacos analgésicos podem falsear resultados ansiolíticos em modelos que envolvem estimulação das fibras nervosas nas patas. Assim, há um maior enfoque e preferência nos testes que se baseiam na exposição do animal a um ambiente novo, o que por sua vez provoca reação de medo e diminuição do comportamento exploratório (BELZUNG; LE PAPE, 1994). Como exemplo destes últimos, os mais utilizados são: o labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa claro-escuro (CCE), como se pode observar na **Figura 4**, os quais foram utilizados nesta pesquisa e será dado maior ênfase.

O LCE (**Figura 5**) se baseia em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Proposto por Montgomery (1955), a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva, constatando que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos (RODGERS; JOHNSON, 1995, RODGERS et al., 1997, RAMOS; MORMEDE, 1998). Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do braço aberto.

Figura 5 – Labirinto em cruz elevado. A – vista frontal. B – vista superior.



Fonte: Autor, 2015.

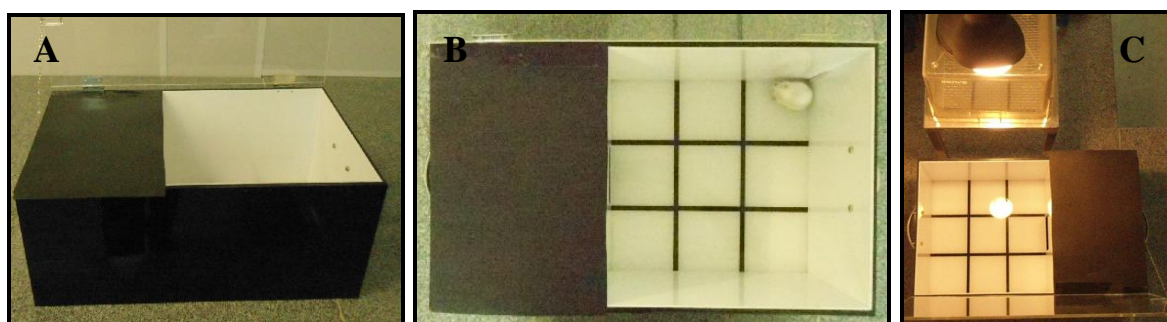
Outros estudos com o LCE foram realizados por Handley e Mithani (1984) quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. O aparelho situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares. Os braços fechados apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que ansiolíticos, como diazepam, aumentavam a proporção entre as entradas nos braços abertos e o total de entradas, ao passo

que agentes ansiogênicos, como a picrotoxina, diminuam esta proporção, concluindo que o LCE seria um modelo válido de comportamento motivado pelo medo.

Apesar da proposição inicial que associa a aversão dos braços abertos à altura, observou-se posteriormente que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no LCE (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). A tigmotaxia refere-se à tendência de roedores de se esquivarem de áreas abertas desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinada (CHOLERIS et al., 2001).

Desenvolvido por Crawley e Goodwin (1980), o teste de transição claro-escuro ou caixa claro-escuro (CCE – **Figura 6**), assim como o LCE, se caracteriza como um modelo de conflito, baseado na tendência natural a explorar ambientes novos *versus* a esquia de tais ambientes devido à possibilidade potencial da presença de estímulos aversivos nesse ambiente novo, como por exemplo o estímulo luminoso aversivo.

Figura 6 – Caixa claro-escuro. A – vista frontal. B – vista superior sem iluminação. C – vista superior com iluminação.



Fonte: Autor, 2015.

Trata-se de um modelo animal baseado em comportamentos incondicionados, ou seja, respostas que não necessitam de aprendizagem, ancorando-se na aversividade inata de roedores a ambientes excessivamente claros, sendo tal aversividade medida a partir de componentes ansiogênicos expressados como a menor exposição ao compartimento claro da caixa e o menor número de alternância entre os compartimentos (BOURIN; HASCOET, 2003).

Esse modelo recebeu várias versões desde o original em 1980, porém caracteriza-se por apresentar um compartimento claro, que na maioria das vezes é iluminado com uma intensidade relativamente alta, além de, em alguns casos, o compartimento claro ter suas

paredes e piso brancos; além de um compartimento escuro, com pouca ou nenhuma luminosidade, sendo na maioria das vezes composto por paredes e piso pretos (BRITO, 2011).

1.5 Estudos sobre *Citrus limon*

1.5.1 Aspectos botânicos

A espécie *Citrus limon* pertence à família Rutaceae que compreende cerca de 150 gêneros, 1.600 espécies, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo mais abundante na América Tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (MELO; ZICKEL, 2004).

Trata-se de uma árvore perenifólia, aromática, de médio porte, com numerosos ramos e espinhos. As folhas unifolioladas (**Figura 7**) são de cor verde com formato lanceolados, elíptica-ovada de 6 a 12,5 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura, apresentam a ponta obtusa, margem serrada-dentada, pecíolo curto e extensamente alado; as folhas jovens são avermelhadas apresentam flores solitárias ou em ráculos axilares, avermelhadas em forma de botão com pétalas brancas na parte superior e púrpura abaixo. Apresenta de 20 a 40 estames com fruto oblongo ou oval, 7 a 12 cm de comprimento, amarelo claro ou dourado, a casca é pouco espessa e com presença de glândulas, dependendo das variedades, as sementes são pequenas, ovais e pontiagudas (Em <<http://www.institutohorus.org.br>>. Acesso em 06 de setembro de 2014).

Figura 7 – Folha de *C. limon*.



Fonte: Campêlo et al., 2011.

1.5.2 Usos populares

O fruto (**Figura 8**), conhecido popularmente como limão, é utilizado há centenas de anos com inúmeras propriedades medicinais e nutricionais. Apresenta outros sinônimos como: limão-verdadeiro ou limão-siciliano. Desde a época das colonizações, era utilizado para combater e prevenir o escorbuto, uma doença causada pela carência de vitamina C. Na culinária, o fruto é utilizado no tempero de frutos do mar, aves e suínos, além de servir para o preparo de sucos, refrigerantes e doces. As sementes são usadas no preparo de óleos fixos (MONAGEMI et al., 2010).

De acordo com Ortencio (1997), o limão também é usado para controlar altas taxas de ácido úrico, anemia, arterioesclerose, gripe, diabetes, reumatismo e varíola. Ezzat (2001) demonstrou que o óleo essencial (OE) obtido do pericarpo causou inibição no crescimento de *Candida albicans*. Dessa casca extraem-se essências aromáticas usadas nas indústrias de perfumes, farmacêutica, de produtos de limpeza e higiene pessoal e no preparo de licores (MONAGEMI et al., 2010).

A população nordestina usa preparações de chás das folhas e/ou cascas do limão como tranquilizantes. Pesquisas têm sido conduzidas no sentido de confirmar esta atividade, uma vez que os metabólitos isolados desta espécie demonstraram um perfil de atividade ansiolítica encontrados nas folhas de *C. limon*. Em uma triagem farmacológica comportamental, realizada por Campêlo et al. (2011) a fim de avaliar atividade antidepressiva e anticonvulsivante do OE das folhas de *C. limon*, os animais tratados mostraram diminuição da resposta ao tato, ataxia, analgesia, sedação e diminuição da atividade motora. Estas mudanças comportamentais sugerem um possível efeito depressor do SNC, semelhante aos fármacos que agem neste sistema.

Figura 8 – Frutos de *C. limon*.

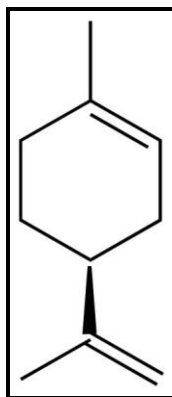


Fonte: <http://www.botanic.jp/plants-ra/lemon.htm>. Acesso em 06 de setembro de 2014.

1.5.3 Estudos fitoquímicos

Dentre vários metabólitos secundários, os flavonoides, cumarinas e pectinas são os mais encontrados nas espécies do gênero *Citrus* (KUSTER; ROCHA, 2003). As plantas desse gênero apresentam também compostos fenólicos das flavonas (sinensetina, nobiletina), glicosídeos flavonoides (hesperidina, neoesperidina, narirutina, naringina, eriocitrina) e cumarinas (umbeliferona, aesculetina e scopolina); sendo a casca do limão mais rica em flavonoides que as sementes (TRIPOLI et al., 2007).

Um estudo realizado por interpretação automatizada de espectros de massa para identificar os compostos voláteis do OE das folhas de *C. limon* mostrou um total de nove compostos, exclusivamente monoterpenos, que correspondeu a 93,38% dos derivados identificados. O constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *C. limon* foi o D-limoneno (52,77%) (**Figura 9**), seguido por geraniol (9,92%), *trans*-óxido limoneno (7,13%), neral (6,85%), geraniol (5,49%), nerol (4,04%), citronelol (2,77%), *cis*-óxido limoneno (2,68%) e linalol (1,73%) (CAMPÊLO et al., 2011). Já no estudo de Vekiari et al. (2002), foi constatado que o óleo volátil da casca do fruto de *C. limon* é rico em D-limoneno, β -pineno, γ -terpineno, terpinoleno, neral e geranial.

Figura 9 – D-Limoneno.

Fonte: Navarro e Navarro, 2004.

O OE das espécies de *C. limon* contém ainda derivados de terpenos, sesquiterpenos alifáticos, derivados oxigenados e hidrocarbonetos aromáticos. A composição das várias misturas de terpenos depende da tipologia da espécie examinada. No entanto, a mistura de cada tipologia compreende proporções de: limoneno, α -pineno, β -pineno, mirceno, linalol e terpineno (MONAGEMI et al., 2010).

1.5.4 Estudos farmacológicos

Os flavonoides antioxidantes do limão têm sido estudados e identificados como eriocitrina e flavonas de c-glucosil, 6,8-di-c- β -glucosil-diosmina e 6-c- β -glucosil-diosmina. O flavonoide eriocitrina e seus metabólitos foram poderosos antioxidantes quando testados no modelo de oxidação *in vitro* para doenças cardíacas (MIYAKE et al., 1997).

As atividades dos flavonoides das espécies do gênero *Citrus* têm sido demonstradas *in vitro* (BOCCO et al., 1998; RAPISARDA; FANELLA; MACCARONE, 2000; BURDA; OLESZEK, 2001) e *in vivo*. Os flavonoides têm importantes propriedades relacionadas à saúde como: antimicrobiana (BYLKA; MATLAWSKA; PILEWSKY, 2004), anticarcinogênica (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; KOHNO et al., 2004), antiagregante plaquetário (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000), e são conhecidos ainda por proteger contra doenças cardiovasculares (HOLLMAN et al., 1996).

Monoterpenos são importantes constituintes do OE dos frutos do gênero *Citrus* e outras plantas. Uma parte destes monoterpenos tem atividades antitumorais (MONAGEMI et al., 2010). Um exemplo disto é o D-limoneno, que compreende mais de 90% do óleo da casca da laranja, que tem atividade quimiopreventiva nos roedores contra câncer de mama, pele,

fígado, pulmão e estômago (CROWEL, 1999), e tem sido mostrada a indução de apoptose nas células tumorais (HATA et al., 2003).

O óleo volátil extraído do pericarpo de *Citrus aurantium* apresentou atividade hipnótico-sedativa, não corroborando o extrato etanólico das folhas, que não apresentou essa atividade (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). O extrato alcoólico da casca dos frutos mostrou efeito antiespasmódico (FOSTER et al., 1980). Testes farmacológicos *in vitro*, com os frutos demonstraram potente efeito inibidor contra a atividade do rotavírus (HYUN et al., 2000). O suco do fruto apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* (CACERES et al., 1987).

O fruto de *C. limon* é usado para tratar doenças hepáticas, reumatismo, febre e diabetes (GRAY; FLATT, 1997), além de apresentar ação antidisentérica, antiespasmódica e antitussígena (DE FEO et al., 1992). É também usado para o tratamento do escorbuto, cólicas intestinais e artrite (VAZQUEZ; SUAREZ; PEREZ, 1997).

A espécie *C. limon* contém um grande número de componentes funcionais fisiológicos, como ácido cítrico, ácido ascórbico e minerais. O ácido ascórbico é um antioxidante utilizado na prevenção a espécies reativas derivadas do oxigênio mediadas pela peroxidação lipídica microsomal e degradação de proteína *in vivo* e *in vitro*, e, ainda, previne contra a oxidação de colágeno e protege o tecido mamário contra dano oxidativo em níveis intracelulares e extracelulares (CHATTERGEE; MUKHOPADHYAY; GHOSH, 1995).

1.6 Justificativa

Os BDZs têm sido os fármacos de escolha extensivamente utilizados nos últimos 45 anos para tratar as diversas formas de ansiedade (RABBANI; SAJJADI; MOHAMMADI; 2007). Apesar dos fármacos desta classe apresentar benefícios bem descritos e caracterizados, os efeitos colaterais são predominantes, incluindo amnésia anterógrada, tolerância e dependência física (KAPLAN; SADOCK, 2005). Em razão desses efeitos adversos é que aproximadamente 43% dos pacientes que apresentam transtornos de ansiedade usam alguma forma complementar de terapia e, por isso, muitas indústrias farmacêuticas estão conduzindo estudos para encontrar alternativas medicinais que apresentem efeitos ansiolíticos mais específicos (ERNST, 2006).

A pesquisa com produtos naturais é uma área que tem sido cada vez mais explorada e que tem muitas contribuições no tocante a sua ação central para tratar este distúrbio. Mesmo que desde a antiguidade o homem já usasse a fitoterapia como tratamento para diversas

doenças, o uso de plantas medicinais na terapêutica tem ganhado crescente aceitação tanto por profissionais da saúde, como pelos próprios pacientes (CARLINI, 2003).

Entre as plantas medicinais, o grupo das “aromáticas”, cujo gênero *Citrus* está inserido, tem despertado muito interesse à comunidade científica, pois essas espécies possuem substâncias odoríferas com importantes funções biológicas (BAKKALI et al., 2008). Trabalhos relatam que os monoterpenos e seus derivados sintéticos apresentam várias propriedades farmacológicas no SNC, tais como: anticonvulsivante e neuroprotetora como: o citronelol (DE SOUSA et al., 2006), α,β -epóxi-carvona (DE SOUSA et al, 2007a), e o α -terpineol (DE SOUSA et al, 2007b).

Dentro desta perspectiva, compostos de origem natural como os isolados das espécies do gênero *Citrus* estão sendo estudadas diante da necessidade da busca e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas eficazes e com menores efeitos adversos, além de maior acessibilidade aos pacientes para o tratamento da ansiedade e outros transtornos psicossociais.

Desta forma, o presente estudo visou avaliar o efeito hipnótico-sedativo e o mecanismo ansiolítico do óleo essencial da casca do fruto de *Citrus limon* em camundongos, visto sua fácil disponibilidade e seu uso popular, a fim de agregar conhecimento científico às propriedades desta espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito hipnótico-sedativo e o possível mecanismo de ação ansiolítico do óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus limon* em camundongos, contribuindo, assim, para o estudo farmacológico de produtos naturais e seu uso popular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do OECl sobre o sono, averiguando em que concentrações demonstram melhores resultados;
- Investigar a participação de receptores centrais GABA_A, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} na neuromodulação ansiolítica do OECl em modelos experimentais de ansiedade;
- Investigar efeitos adversos centrais, através da via dopaminérgica em receptores D2, sobre a performance motora de camundongos submetidos a diferentes testes de motricidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Óleo essencial de *Citrus limon*

Os procedimentos experimentais foram realizados a partir da aquisição do óleo essencial das cascas do fruto de *C. limon* (Ferquima Ind. e Com. Ltda, São Paulo – **Figura 10**), obtido industrialmente a partir do método de prensagem a frio das cascas desta espécie.

Figura 10 – Óleo essencial de *C. limon*



Fonte: Autor, 2015.

3.2 Substâncias

O Haloperidol (HALO, Halo[®], Cristália) foi utilizado como antagonista competitivo dos receptores dopaminérgicos, enquanto o Pentobarbital sódico (PENTO, Abott), usado como um indutor do sono. Diazepam (DZP, Compaz[®], Cristália), fármaco ansiolítico padrão, cloridrato de buspirona (BUSP, Pharmanostra) e maleato de α -Metilserotonina (α -Me-5-HT, Sigma-Aldrich) foram usados como agonistas dos receptores GABA_A, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C}, respectivamente. Flumazenil (FLU, Flumazil[®], Cristália), bromidrato de 1-(2-Metoxifenil)-4-[4-(2-ftalimido)butil]piperazina (NAN-190, Sigma-Aldrich) e (+)-Tatarato de ketanserina (KET, Sigma-Aldrich) foram utilizados como antagonistas dos receptores de BDZs, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C}, respectivamente. Para administração por via intraperitoneal (i.p.), todos agonistas e antagonistas foram dissolvidos em solução salina isotônica (SAL, 0,9%). Para administração oral (v.o.), o OECl foi emulsificado com monoleato polioxietilenossorbitano (Tween 80[®],

Sigma-Aldrich, 0,01% (v/v) em SAL 0,9%), e em água destilada. Esses veículos também foram utilizados no tratamento dos grupos controles negativos (grupo veículo). Todas as soluções foram preparadas no dia do teste, e administradas na dose de 10 mL/kg, exceto o flumazenil, que foi administrado na dose de 20 mL/kg, devido à baixa concentração (0,1 mg/mL) da sua forma comercial.

3.3 Animais

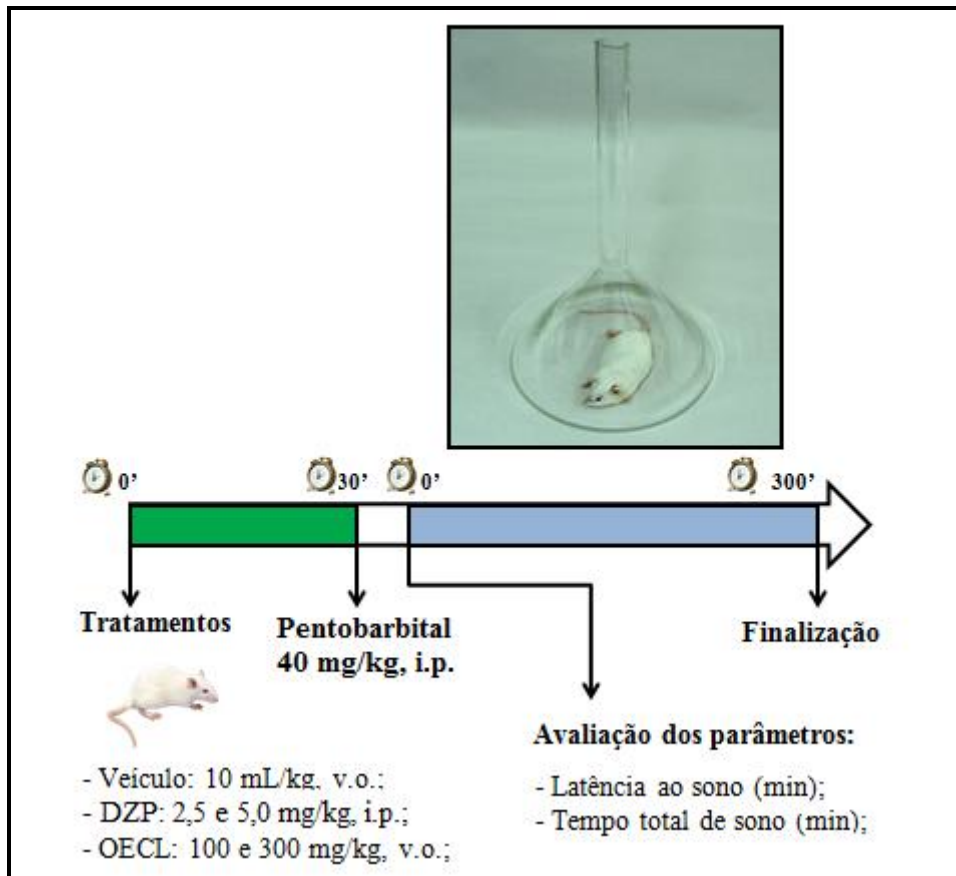
Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, adultos (6 a 8 semanas), pesando entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos em grupos de 5 por caixa, 2 dias antes dos procedimentos experimentais no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) para fins de adaptação, onde foram aclimatados a 22 ± 2 °C, em um ciclo claro-escuro de 12/12h (fase escura: 19:00 às 07:00h) e tratados com água e ração *ad libitum*, ou jejum de 6 horas para os grupos que receberam tratamento por via oral. Todos os experimentos foram realizados no período de 09h00 às 16h00.

Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (protocolo nº 055/2013) – **Anexo 1**.

3.4 Teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico

Os animais foram divididos em 5 grupos (n = 8) e pré-tratados com: DZP (2,5 e 5,0 mg/kg, i.p.); veículo, na dose de 10 mL/kg, v.o.; e os grupos tratados com OECL nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. Após 30 minutos, foi administrado pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), um barbitúrico de ação longa em receptores GABAérgicos. Em seguida, os animais foram colocados em béqueres e posteriormente dispostos na bancada em funis de vidro na posição de decúbito dorsal, e assim registrados a latência para o sono e o tempo total de sono (ambos em minutos), os quais foram representados, respectivamente, pela perda e recuperação do reflexo postural quando o mesmo saiu da posição imposta por três vezes. Foram estabelecidos 300 minutos como valor máximo na duração do sono (CARLINI; BURGOS, 1979) – **Figura 11**.

Figura 11 – Esquemática do teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico.



Fonte: Autor, 2015.

3.5 Avaliação da atividade ansiolítica

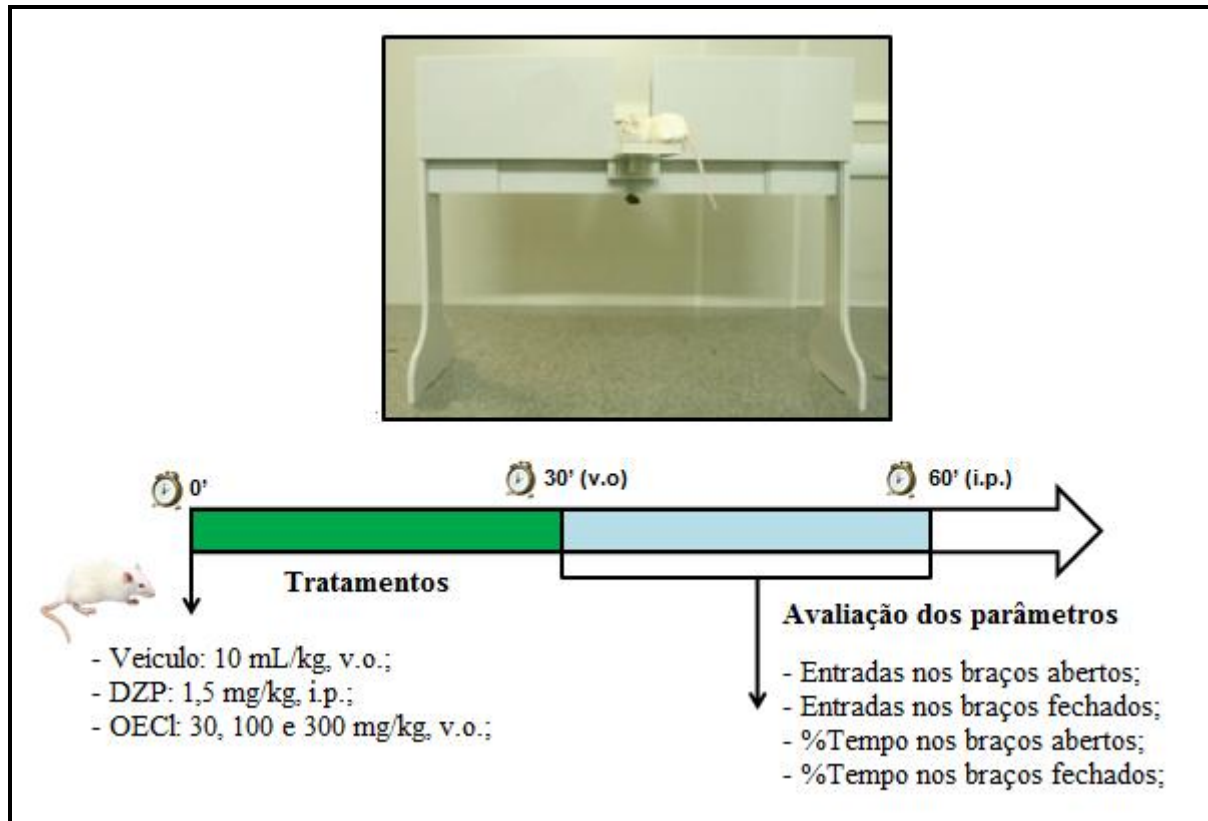
3.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O aparato utilizado é constituído de acrílico cinza, em forma de cruz grega, com dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), sendo conectados por uma área central aberta (5 x 5 cm) e elevado a uma altura de 38,5 cm sobre o chão o qual evoca uma resposta de medo aos animais.

Os animais foram divididos em 5 grupos (n = 8) e tratados com: veículo (10 mL/kg, v.o.); DZP (1,5 mg/kg, i.p.); e OECL (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). Após 30 minutos dos tratamentos orais e sessenta minutos do tratamento i.p., os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a face voltada para um dos braços abertos, sendo avaliados durante 5 minutos: o número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF) e o tempo de permanência em ambos em valores percentuais – %TBA e %TBF –

calculado da seguinte forma: $\%TBA = TBA/300 \times 100$, na qual 300 representa o tempo total do teste (em segundos, equivalente a 5 minutos); o mesmo raciocínio para os braços fechados – **Figura 12**.

Figura 12 – Esquematização do teste do labirinto em cruz elevado.



Fonte: Autor, 2015.

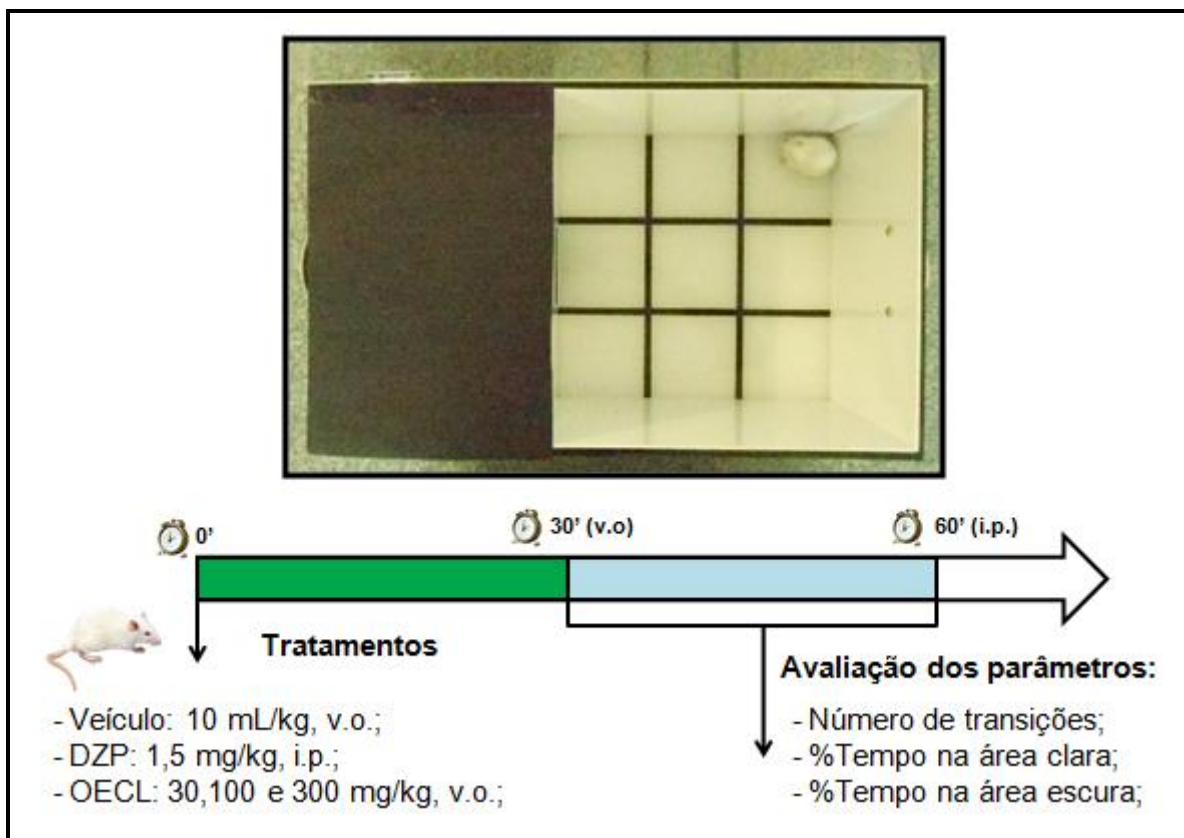
3.5.2 Caixa claro-escuro (CCE)

A caixa claro-escuro é constituída de acrílico e dividida em dois compartimentos: um claro, feito de acrílico branco (29 x 30 x 20 cm) e iluminada por uma lâmpada de 100 W a 70 cm da caixa, e um escuro de acrílico preto totalmente vedado (25 x 30 x 20 cm); unidos por uma passagem (8 x 10 cm) por onde o animal transitará entre ambos locais.

Os animais foram divididos em 5 grupos (n = 8) e tratados com: veículo (10 mL/kg, v.o.); DZP (1,5 mg/kg, i.p.); ou OECl (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). Decorridos 30 minutos dos tratamentos orais e sessenta minutos do tratamento i.p., os animais foram colocados individualmente no centro da área clara com a face voltada para a área escura, sendo avaliados durante 5 minutos o número de transições entre os dois compartimentos (claro e escuro) e o tempo de permanência em ambos em valores percentuais – %TPAC e %TPAE –

calculado da seguinte forma: $\%TPAC = TPAC/300 \times 100$, na qual 300 representa o tempo total do teste (em segundos, equivalente a 5 minutos); o mesmo raciocínio para a área escura – **Figura 13**.

Figura 13 – Esquemática do teste da caixa claro-escuro.



Fonte: Autor, 2015.

3.6 Investigação do mecanismo de ação ansiolítico do OECL

3.6.1 Envolvimento do receptor GABA_A sobre o efeito ansiolítico do OECL

Para a avaliação do possível envolvimento do receptor GABA_A no mecanismo de ação ansiolítico do óleo, os animais foram divididos em 3 grupos (n = 8, para cada modelo experimental), todos pré-tratados com flumazenil (2 mg/kg, i.p., antagonista do sítio de ligação dos BDZs no receptor GABA_A). Após 20 minutos, foi administrado no primeiro grupo o OECL na dose de 300 mg/kg, v.o.; no segundo, DZP (1,5 mg/kg, i.p.); e por fim, o veículo (10 mL/kg, v.o.). Após trinta minutos dos tratamentos orais e sessenta minutos do tratamento i.p., os diferentes grupos de animais foram analisados no labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro, assim como descrito no item 3.5 – **Figura 14**.

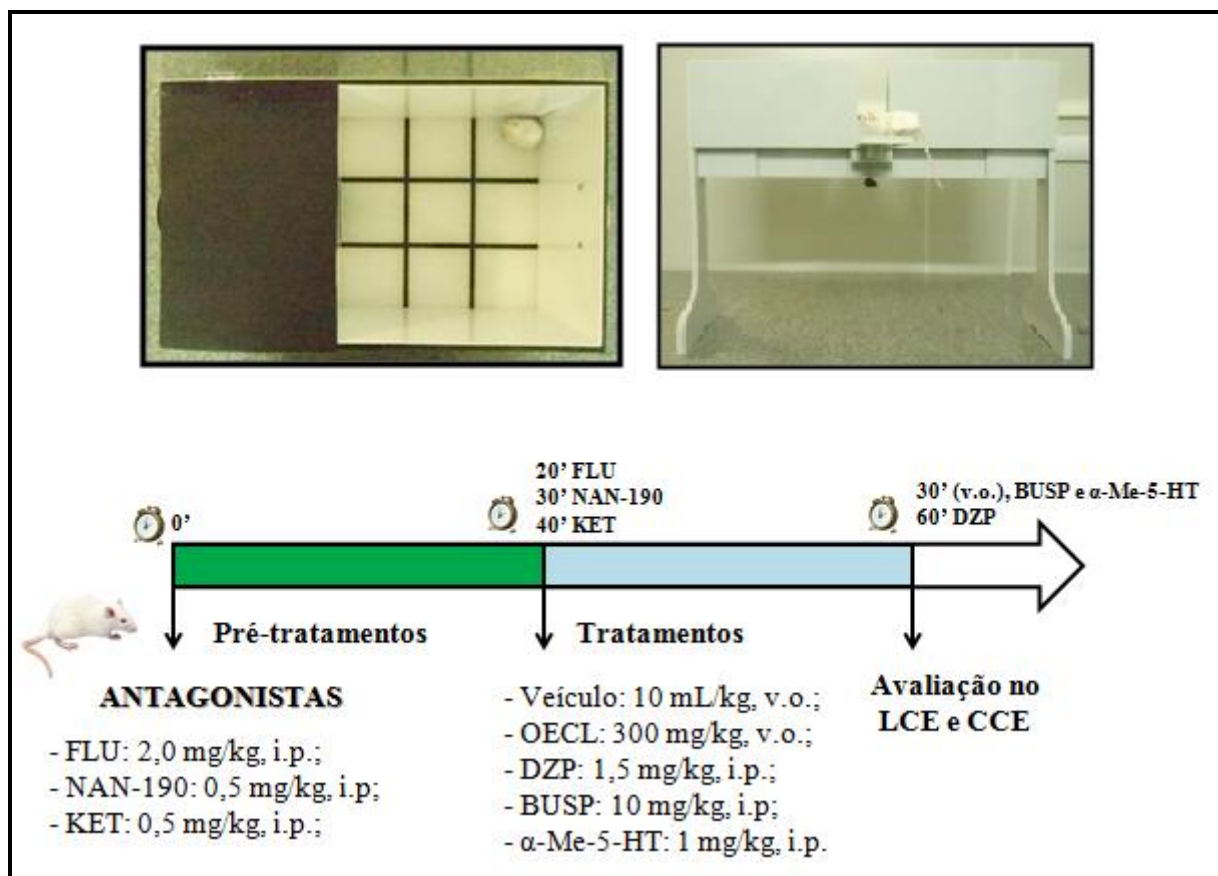
3.6.2 Envolvimento do receptor 5-HT_{1A} sobre o efeito ansiolítico do OECl

Para a avaliação do possível envolvimento do receptor 5-HT_{1A} no mecanismo de ação ansiolítico do óleo, os animais foram divididos em 3 grupos (n = 8, para cada modelo experimental), todos pré-tratados com NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}). Após 30 minutos, os animais foram tratados oralmente com OECl (300 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg); ou buspirona (10 mg/kg, i.p.) – agonista de receptores 5-HT_{1A}. Decorridos 60 minutos dos tratamentos i.p. e 30 minutos do tratamento oral, os animais foram avaliados nos mesmos modelos experimentais citados no item 3.5 – **Figura 14**.

3.6.3 Envolvimento do Receptor 5-HT_{2A/C} sobre o efeito ansiolítico do OECl

Para a avaliação do possível envolvimento do receptor 5-HT_{2A/C} no mecanismo de ação ansiolítico do óleo, os animais foram divididos em 3 grupos (n = 8, para cada modelo experimental), todos pré-tratados com ketanserina (0,5 mg/kg, i.p., antagonista dos receptores 5-HT_{2A/C}). Após 40 minutos, os animais foram tratados oralmente com OECl (300 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg); ou α -Metilserotonina (1 mg/kg, i.p. – agonista de receptores 5-HT_{2A/C}). Após 30 minutos de tratamento, os animais foram avaliados nos mesmos modelos experimentais citados no item 3.5 – **Figura 14**.

Figura 14 – Esquemática da investigação do mecanismo de ação ansiolítico do OECL.



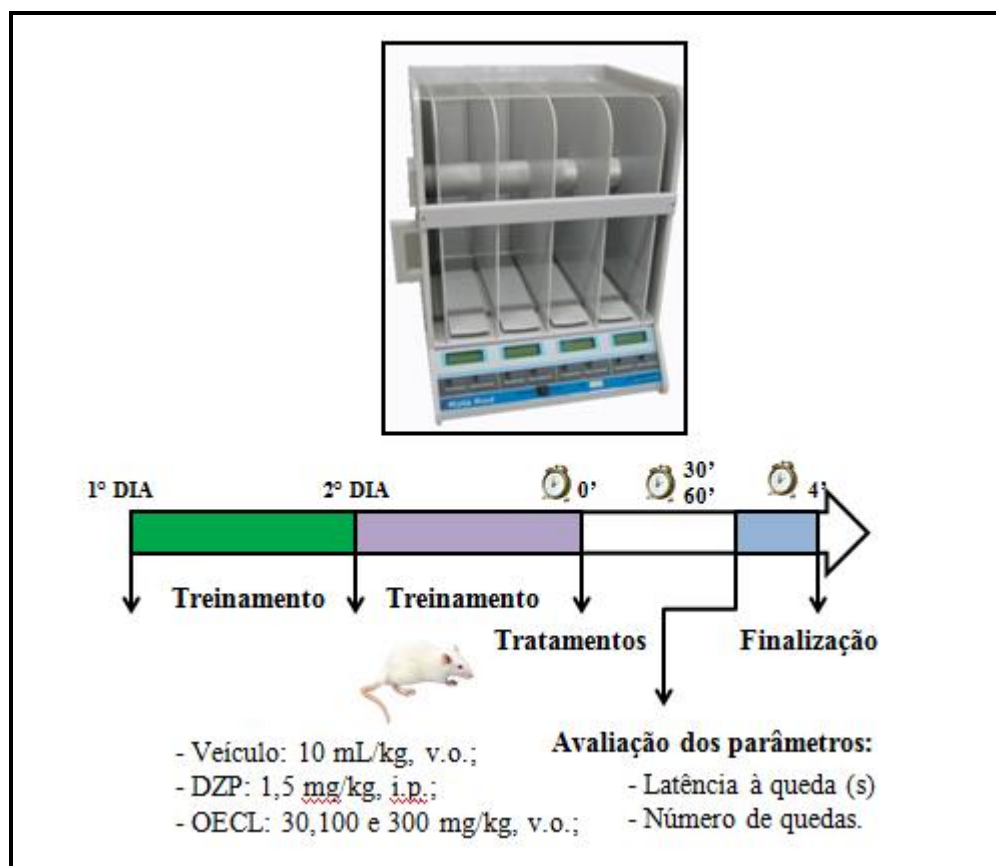
Fonte: Autor, 2015.

3.7 Avaliação da performance motora

3.7.1 Teste da barra giratória

Neste teste, os animais foram pré-selecionados a partir de duas sessões de treino 24 e 48 horas antes do ensaio (**Anexos 2 e 3**) com base na sua capacidade de permanecer por duas vezes, em sete possibilidades, em uma barra anti-derrapante, com 3,0 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento, girando a 16 rpm, a uma altura de 25 cm, durante 4 minutos. No 3º dia, os 5 grupos de animais pré-selecionados (n = 8) foram então tratados com: veículo (10 mL/kg, v.o.), DZP (1,5 mg/kg, i.p.), ou OECL nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. Sessenta e trinta minutos após a administração i.p. e dos tratamentos oral, respectivamente, os animais foram colocados com as quatro patas sobre a barra, onde então foram registrados o número de quedas e a latência à queda (em segundos) num tempo máximo de 4 minutos (DUNHAM; MIYA, 1957) – **Figura 15**.

Figura 15 – Esquemática do teste da barra giratória.

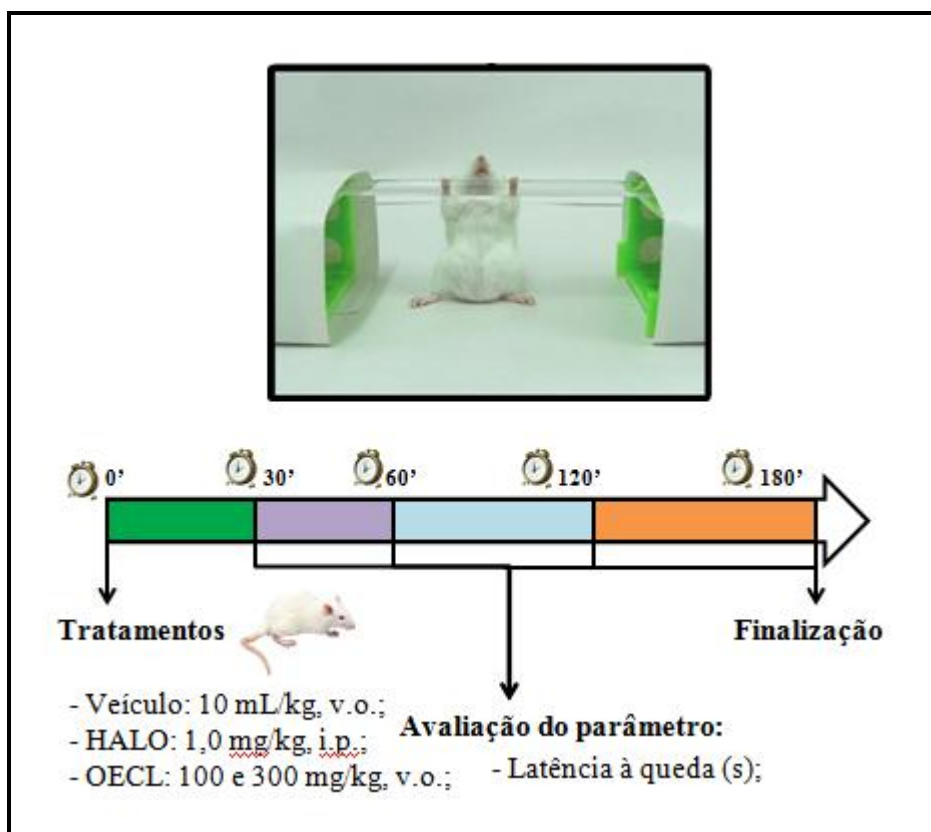


Fonte: Autor, 2015.

3.7.2 Teste de catalepsia

A catalepsia, definida como a retenção duradoura e involuntária do animal em uma posição não usual (sobre suas patas traseiras), foi mensurada através do modelo descrito por Sanberg et al. (1988) com algumas modificações. Os animais foram divididos em 4 grupos ($n = 8$) e tratados com: veículo (10 mL/kg, v.o.), haloperidol (1 mg/kg, i.p.) – um antagonista competitivo dos receptores dopaminérgicos, principalmente do tipo D2 –, ou OECL (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) e colocados com as patas dianteiras cuidadosamente sobre uma barra horizontal (0,5 cm de diâmetro), fixada a uma altura de 10 cm acima da superfície de trabalho. Após 30, 60, 120 e 180 minutos do tratamento, foi registrado o tempo (em segundos) durante o qual os animais permaneceram retidos nesta posição, por três vezes, até a remoção de uma das suas patas dianteiras, durante um tempo máximo de 5 min – **Figura 16**.

Figura 16 – Esquematização do teste de catalepsia.



Fonte: Autor, 2015.

3.8 Análise estatística

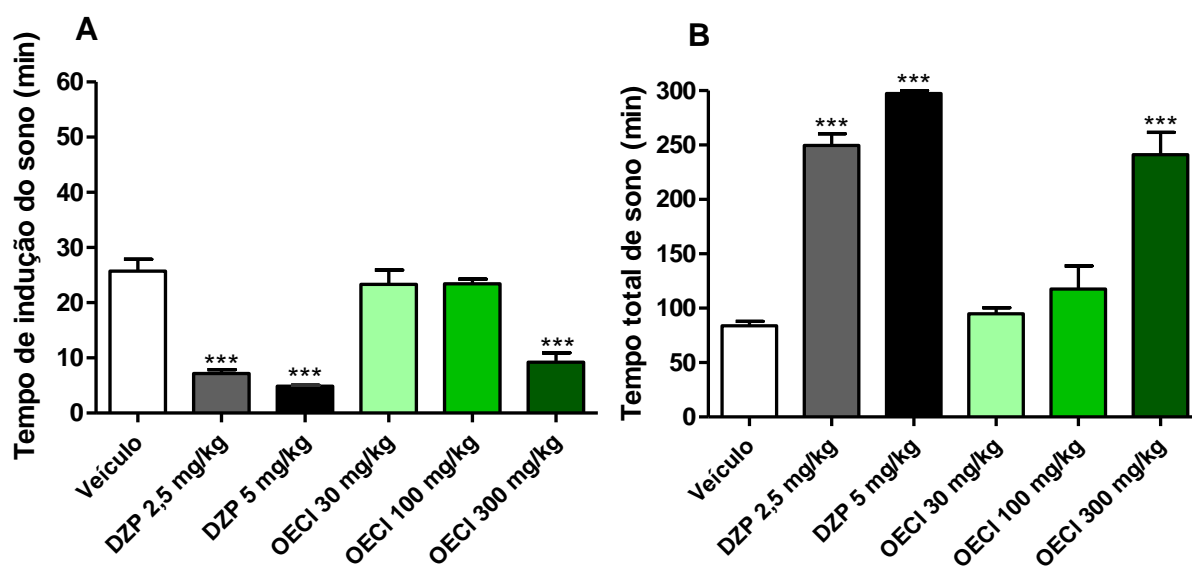
Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA) *One-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni, onde para valores de $p < 0,05$, as diferenças entre as médias foram consideradas significantes. Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito hipnótico-sedativo do OECl em camundongos

O **Gráfico 1** mostra o efeito do tratamento com OECl no teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico. A administração do OECl na dose máxima utilizada (300 mg/kg, v.o.) diminuiu a latência para o sono ($9,21 \pm 1,73$ min; $p < 0,001$), assim como as duas doses de diazepam (2,5 e 5,0 mg/kg, i.p.; $7,18 \pm 0,67$ e $4,87 \pm 0,21$ min, respectivamente; $p < 0,001$) quando comparados ao grupo veículo ($25,73 \pm 2,16$ min) – **Gráfico 1A**. Além disso, esses tratamentos também aumentaram significativamente ($p < 0,001$) o tempo total de sono induzido pelo barbitúrico (OECl 300 mg/kg: $241,1 \pm 20,39$ min; DZP 2,5 mg/kg: $249,7 \pm 10,74$ min; DZP 5 mg/kg: $297,4 \pm 2,62$ min vs veículo: $83,8 \pm 3,97$ min), potencializando a ação do pentobarbital, sugerindo uma ação hipnótico-sedativa nos camundongos – **Gráfico 1B**. As doses de 30 e 100 mg/kg, v.o., não apresentam efeito neste teste. Vale ressaltar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a dose de 300 mg/kg do óleo e as duas doses de diazepam em ambos os parâmetros analisados.

Gráfico 1 – Efeito hipnótico-sedativo do OECl em camundongos no teste de potencialização do sono induzido por barbitúrico.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Tempo de indução do sono (min); **B** – Tempo total de sono (min). Veículo (10 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (2,5 e 5,0 mg/kg, i.p.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

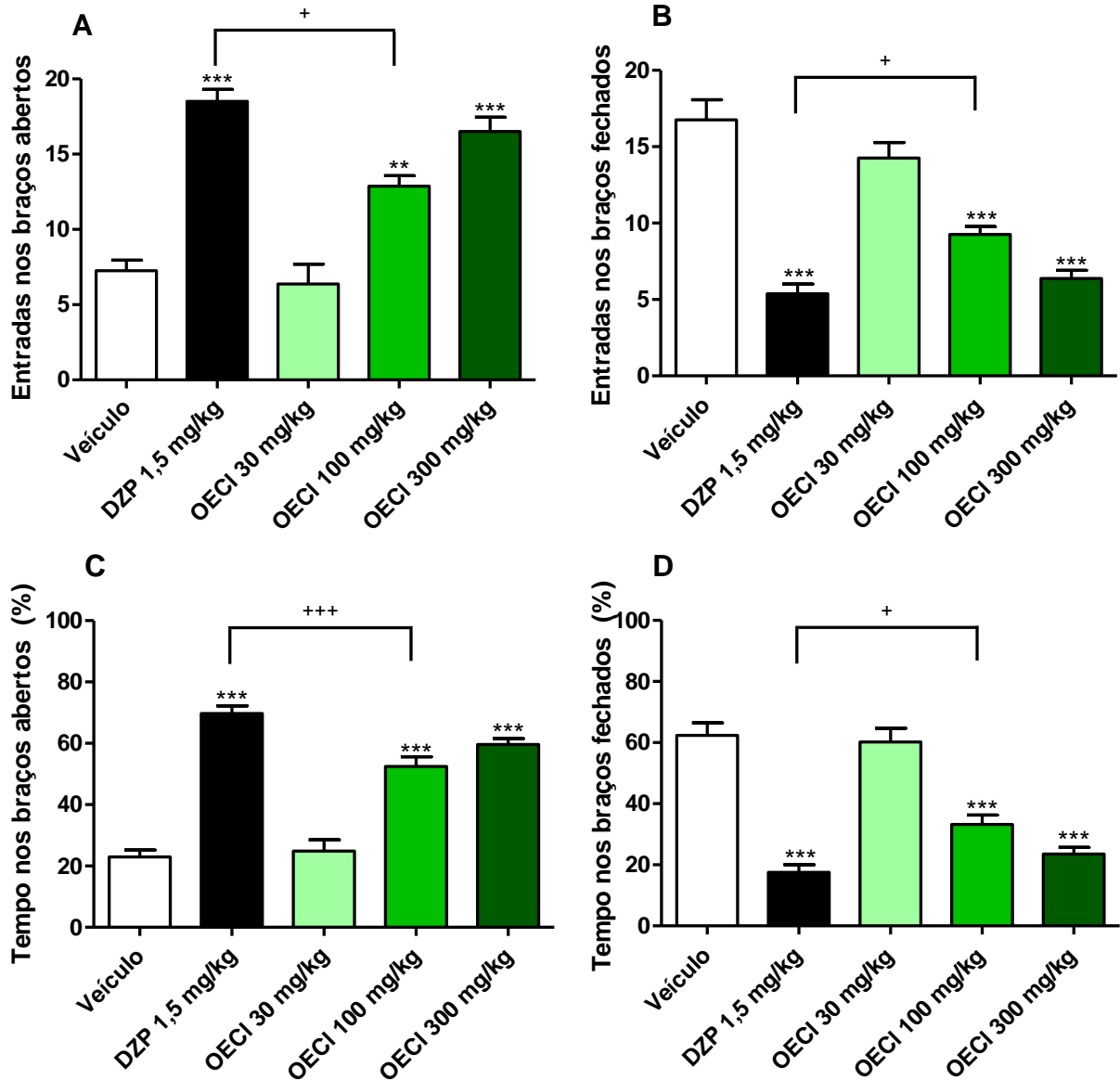
4.2 Efeito ansiolítico do OECl em camundongos

4.2.1 Labirinto em cruz elevado

No **Gráfico 2** é possível observar o efeito após administração de OECL sobre o comportamento ansiolítico dos animais no labirinto em cruz elevado, avaliado pelo número de entradas e porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados.

O tratamento com OECl apenas nas doses de 100 e 300 mg/kg induziu um aumento estatisticamente significativo no número de entradas nos braços abertos ($12,88 \pm 0,69$ e $16,5 \pm 0,96$, respectivamente) e, conseqüentemente, na porcentagem de tempo nos braços abertos ($52,42 \pm 3,19$ e $59,64 \pm 1,92\%$, respectivamente). O resultado foi semelhante ao observado com o tratamento i.p. do fármaco padrão, diazepam (1,5 mg/kg; EBA: $18,5 \pm 0,8$ e %TBA: $69,73 \pm 2,51\%$), quando comparados ao grupo veículo (EBA: $7,25 \pm 0,7$ e %TBA: $22,98 \pm 2,2\%$) – **Gráficos 2A** e **2C**, respectivamente. Além disso, esses tratamentos também reduziram a frequência de entradas nos braços fechados (OECl 100 mg/kg: $9,25 \pm 0,52$; OECl 300 mg/kg: $6,37 \pm 0,53$; DZP 1,5 mg/kg: $5,37 \pm 0,62$) e a porcentagem de tempo nos braços fechados (OECl 100 mg/kg: $33,18 \pm 3,09\%$; OECl 300 mg/kg: $23,57 \pm 2,14\%$; DZP 1,5 mg/kg: $17,56 \pm 2,51\%$), quando comparados ao mesmo grupo controle (EBF: $16,75 \pm 1,33$ e %TBF: $62,4 \pm 4,03\%$) – **Gráficos 2B** e **2D**, respectivamente. Entre as duas doses de óleo que demonstraram-se efetivas, apenas a de 100 mg/kg diferiu significativamente do diazepam nos parâmetros analisados.

Gráfico 2 – Efeito ansiolítico do OECl em camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.



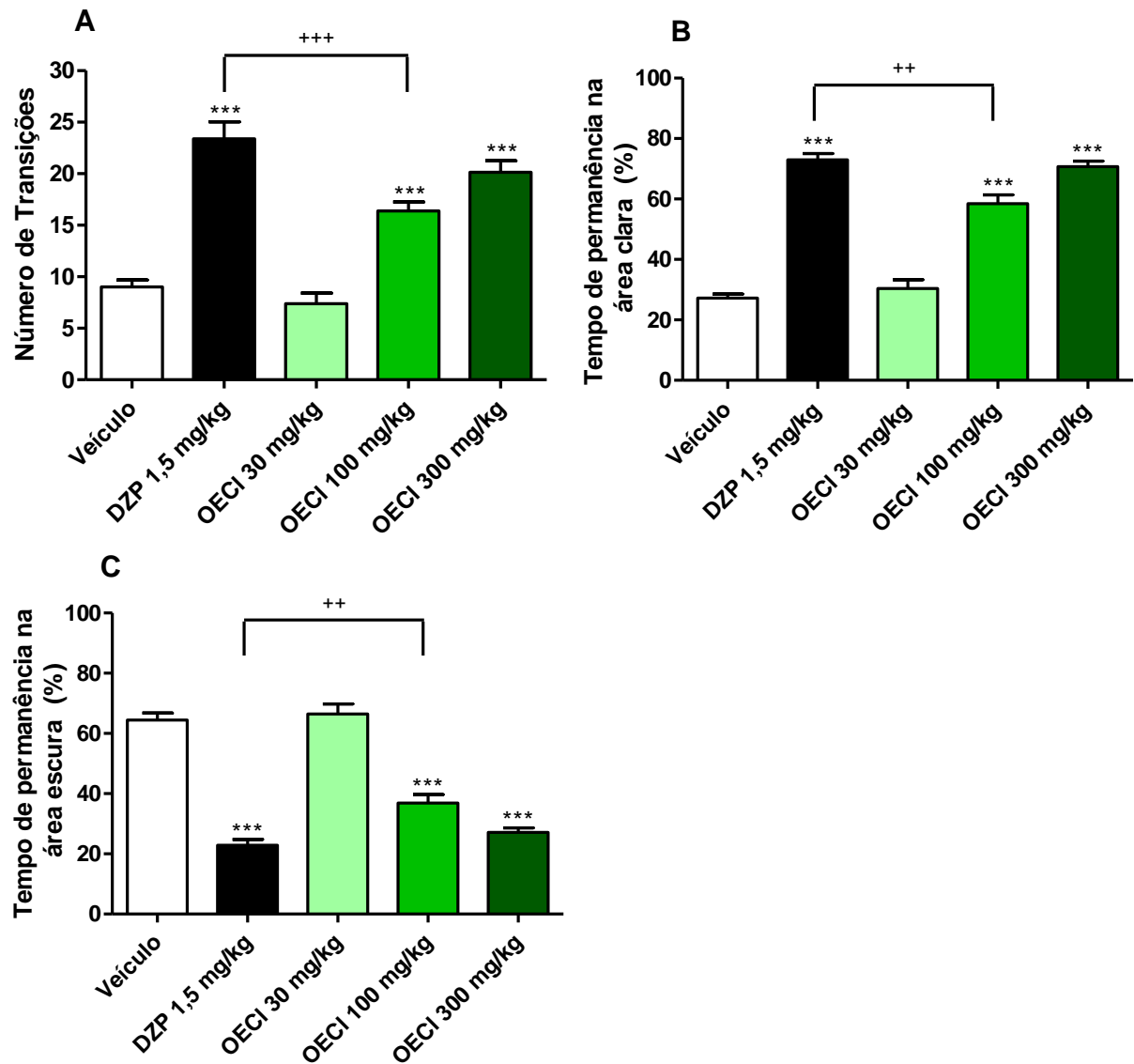
Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Número de entradas nos braços abertos (EBA); **B** – Número de entradas nos braços fechados (EBF); **C** – Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA); **D** – Porcentagem de tempo nos braços fechados (%TBF). Veículo (10 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo veículo; + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$, quando comparados ao grupo DZP, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.2.2 Caixa claro-escuro

Os resultados do tratamento com OECl no teste da caixa claro-escuro podem ser vistos no **Gráfico 3**. Neste teste, o número de transições entre os compartimentos claro e escuro foi aumentado pelos tratamentos com OECl nas doses de 100 e 300 mg/kg ($16,38 \pm 0,88$ e $20,13 \pm 1,12$, respectivamente; $p < 0,001$) e com diazepam (1,5 mg/kg; $23,38 \pm 1,65$) de modo estatisticamente significativo ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo ($9,0 \pm 0,68$) – **Gráfico 3A**. Nos **Gráficos 3B** e **3C**, observa-se que os mesmos tratamentos anteriormente citados induziram um aumento na atividade exploratória dos animais pela elevação na porcentagem de tempo de permanência no compartimento claro (OECl 100 mg/kg: $58,46 \pm 2,88\%$; OECl 300 mg/kg: $70,68 \pm 1,85\%$; DZP 1,5 mg/kg: $72,96 \pm 2,05\%$) e, conseqüentemente, reduziram o tempo na câmara escura (OECl 100 mg/kg: $36,84 \pm 2,83\%$; OECl 300 mg/kg: $27,14 \pm 1,48\%$; DZP 1,5 mg/kg: $22,84 \pm 1,93\%$), ambos de modo estatisticamente significativo ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle negativo ($64,43 \pm 2,37\%$), sugerindo desta forma um efeito ansiolítico ao tratamento nos animais. Para estes mesmos parâmetros, a maior dose do óleo não diferiu estatisticamente do tratamento com o benzodiazepínico, ao contrário do que foi visto com a dose de 100 mg/kg que diferiu em todos os critérios analisados do teste.

Gráfico 3 – Efeito ansiolítico do OECl em camundongos no teste da caixa claro-escuro.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Número de transições; **B** – Porcentagem de tempo de permanência na área clara (%TPAC); **C** – Porcentagem de tempo de permanência na área escura (%TPAE). Veículo (10 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). ^{***} $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo; ⁺⁺ $p < 0,01$ e ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo DZP, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.3 Neuromodulação GABAérgica sobre o efeito ansiolítico do OECl

4.3.1 Labirinto em cruz elevado

Os tratamentos i.p. com diazepam (1,5 mg/kg - agonista de receptores GABA_A), ou buspirona (10 mg/kg - agonista de receptores 5-HT_{1A}), ou ketanserina (0,5 mg/kg - antagonista de receptores 5-HT_{2A/C}) aumentaram as EBA de 7,25 ± 0,7 (grupo veículo) para 18,5 ± 0,8 ($p < 0,001$), 12,88 ± 0,47 ($p < 0,01$) e 11,75 ± 1,2 ($p < 0,05$), respectivamente (**Gráfico 4A**); e a %TBA de 22,98 ± 2,2 % (controle negativo) para 69,73 ± 2,51% ($p < 0,001$), 52,37 ± 2,71% ($p < 0,001$) e 39,98 ± 2,0% ($p < 0,01$), respectivamente (**Gráfico 4B**), demonstrando suas ações como fármacos ansiolíticos.

Os pré-tratamentos i.p. com flumazenil (2 mg/kg - antagonista no sítio de ligação dos benzodiazepínicos em receptores GABA_A), NAN-190 (0,5 mg/kg - antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) e α -Me-5-HT (1 mg/kg - agonista de receptores 5-HT_{2A/C}) não promoveram alterações nestes mesmos parâmetros comparados ao grupo veículo, entretanto, seus valores foram significativamente reduzidos em comparação aos ansiolíticos utilizados (**Gráficos 4A e 4B**).

Quando associados flumazenil + diazepam, NAN-190 + buspirona e ketanserina + α -Metilserotonina, observou-se reversão estatisticamente significativa dos comportamentos no labirinto em cruz elevado de entradas e porcentagem de tempo nos braços abertos quando comparados aos ansiolíticos utilizados (**Gráficos 4A e 4B**).

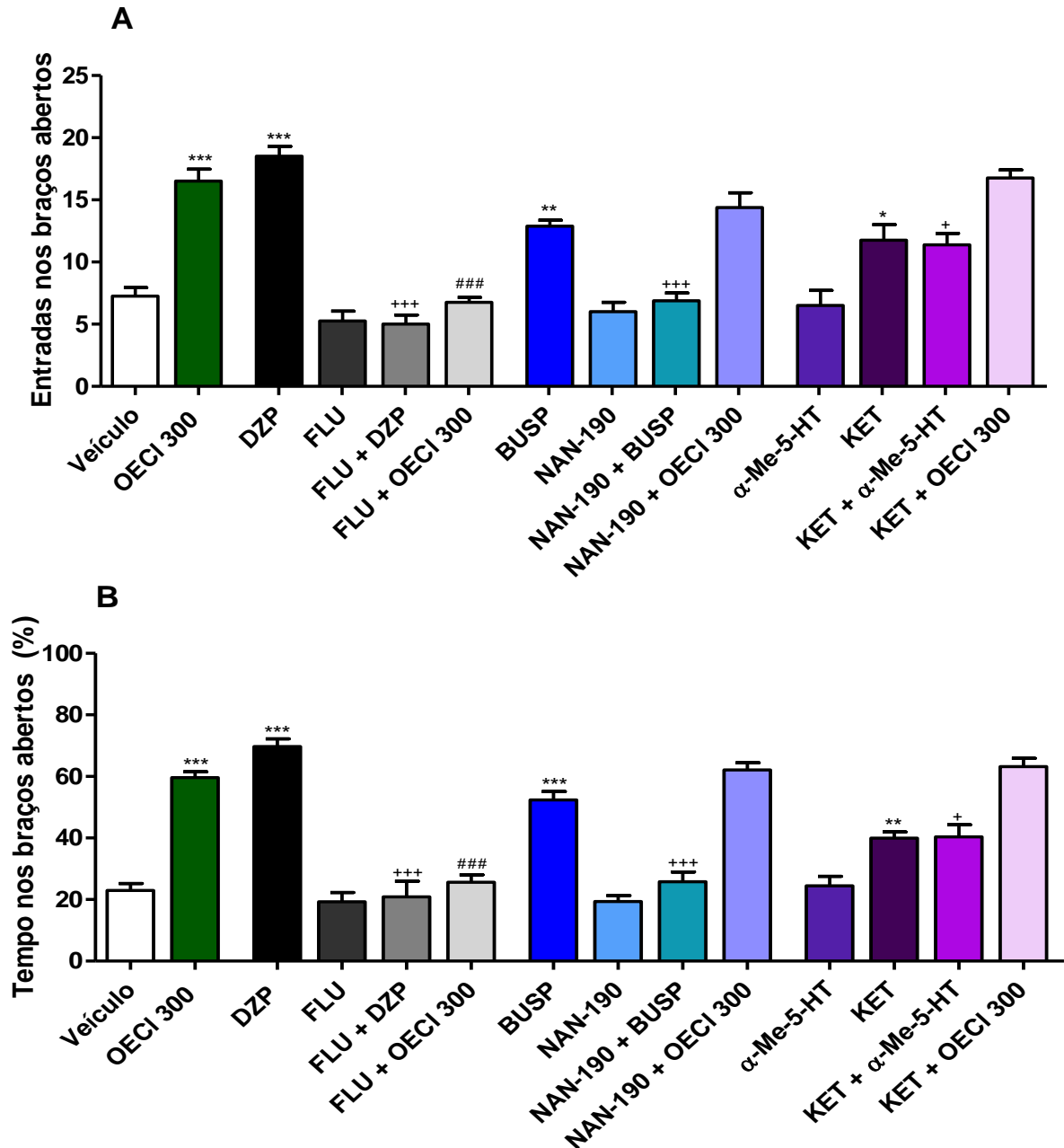
Entretanto, quando os mesmos antagonistas foram pré-administrados e em seguida os animais receberam OECl (300 mg/kg), v.o., apenas o flumazenil foi capaz de reverter os efeitos comportamentais avaliados, diferentemente das vias serotoninérgicas onde não houve diferenças significativas destes parâmetros (**Gráficos 4A e 4B**).

Os **Gráficos 5A e 5B** mostram que quando se administrou diazepam (1,5 mg/kg), ou buspirona (10 mg/kg), ou ketanserina (0,5 mg/kg) reduziram as entradas os braços fechados de 16,75 ± 1,3 (grupo veículo) para 5,37 ± 0,62 ($p < 0,001$), 6,87 ± 0,62 ($p < 0,01$) e 10,5 ± 1,08 ($p < 0,01$), respectivamente; e a porcentagem de tempo nos braços fechados de 62,4 ± 4,03% (controle negativo) para 17,56 ± 2,51% ($p < 0,001$), 28,94 ± 2,22% ($p < 0,001$) e 43,94 ± 1,85% ($p < 0,01$), respectivamente (**Gráficos 5A e 5B**).

Os pré-tratamentos com os antagonistas reverteram significativamente o efeito dos agonistas quanto ao número de entradas e porcentagem de tempo nos braços fechados. Ao

contrário do que foi visto com a administração de OECl (300 mg/kg), onde os antagonistas serotoninérgicos não diferiram significativamente deste grupo (**Gráficos 5A e 5B**).

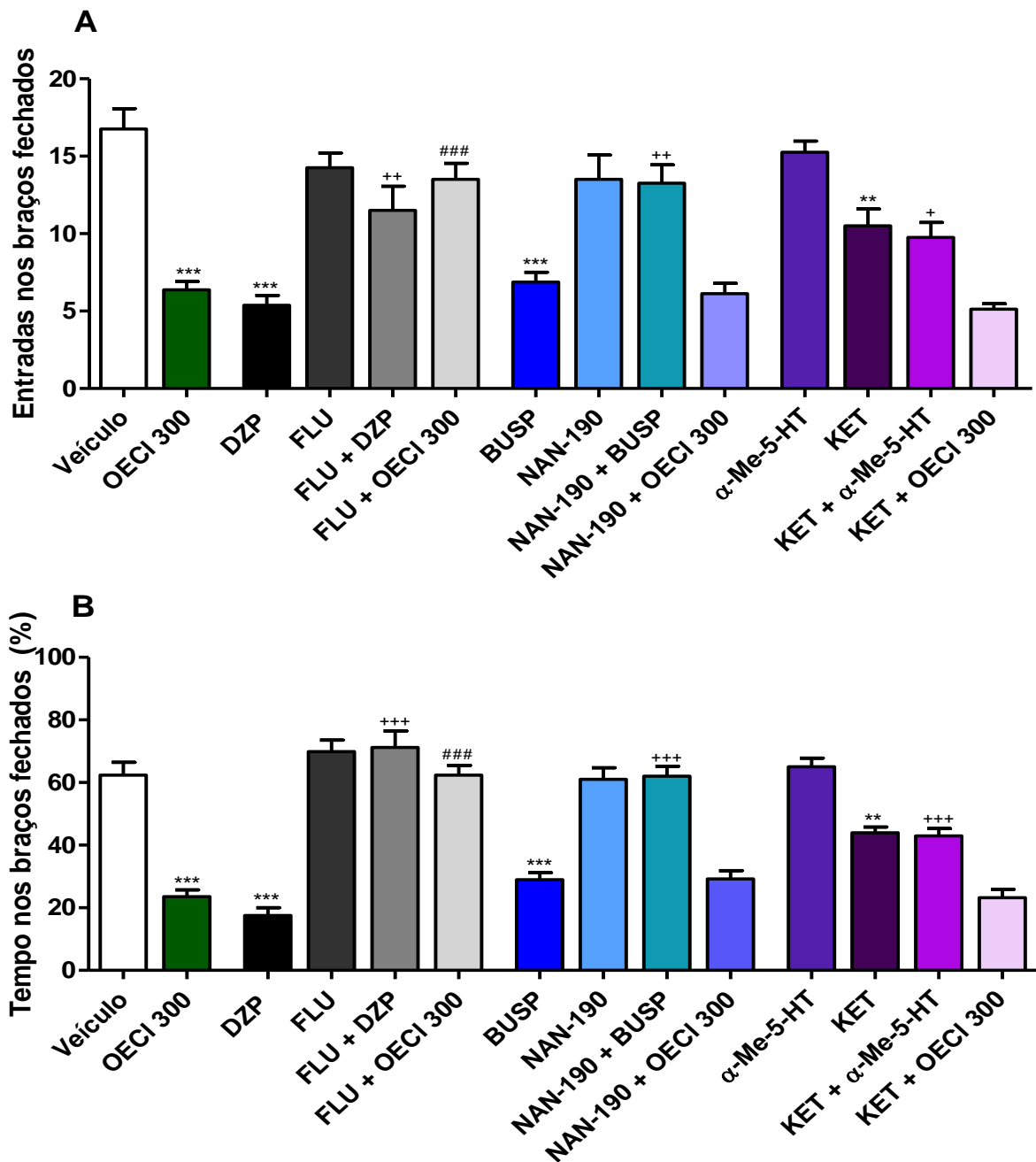
Gráfico 4 - Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA_A, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} no número de entradas e porcentagem de tempo nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Número de entradas nos braços abertos (EBA); **B** – Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA). Veículo (10 mg/kg, v.o.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (300 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); FLU: Flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.); BUSP: Buspirona (10 mg/kg, i.p.); α-Me-5-HT: α-Metilserotonina (1 mg/kg, i.p.); KET: Ketanserina (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m., respectivamente (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo veículo; + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$, quando comparados com o respectivo agonista; ### $p < 0,001$, quando comparados ao grupo tratado com OECl 300, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Gráfico 5 - Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA_A, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} no número de entradas e porcentagem de tempo nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Número de entradas nos braços fechados (EBF); **B** – Porcentagem de tempo nos braços fechados (%TBF). Veículo (10 mg/kg, v.o.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (300 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); FLU: Flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.); BUSP: Buspirona (10 mg/kg, i.p.); α -Me-5-HT: α -Metilserotonina (1 mg/kg, i.p.); KET: Ketanserina (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001, comparados ao grupo veículo; + p < 0,05 e +++ p < 0,001, quando comparados com o respectivo agonista; ### p < 0,001, quando comparados ao grupo tratado com OECl 300, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.3.2 Caixa claro-escuro

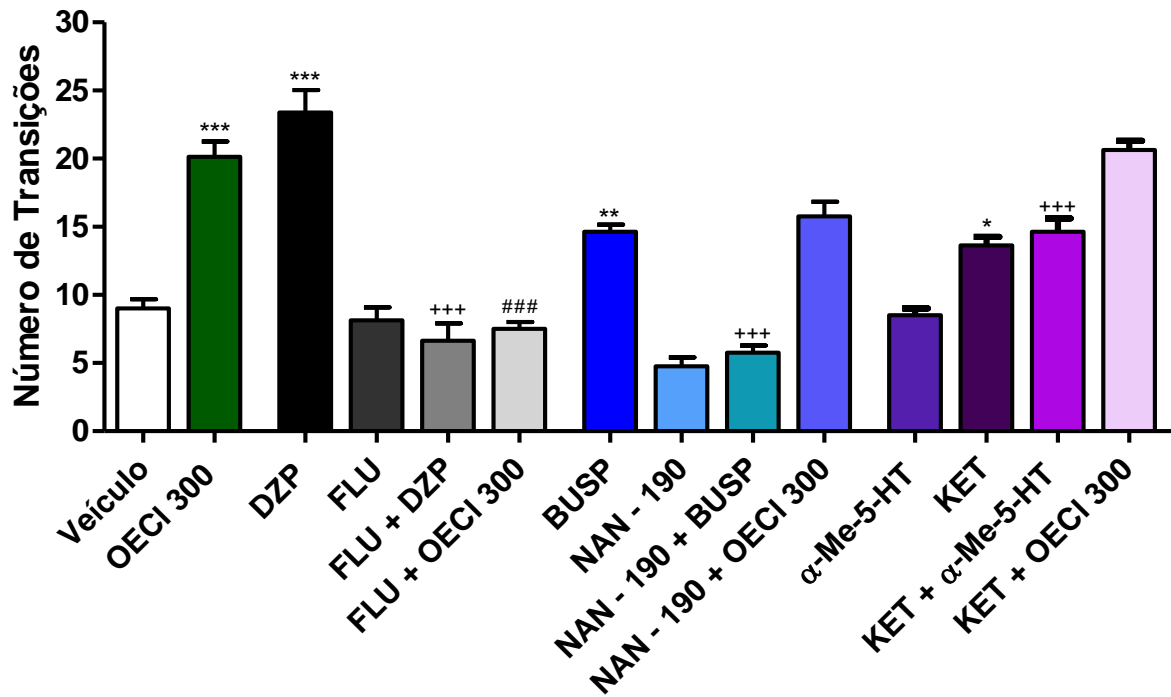
Os animais tratados com diazepam (1,5 mg/kg), ou buspirona (10 mg/kg), ou ketanserina (0,5 mg/kg) apresentaram maior atividade exploratória ao aumentar significativamente o número de transições entre os compartimentos claro e escuro de $9,0 \pm 0,68$ (grupo veículo) para $23,38 \pm 1,65$ ($p < 0,001$), $14,63 \pm 0,53$ ($p < 0,01$) e $13,63 \pm 0,62$ ($p < 0,05$), respectivamente (**Gráfico 6**).

A administração dos antagonistas flumazenil, NAN-190 e ketanserina seguida da administração dos agonistas diazepam, buspirona e α -Metilserotonina, foi capaz de reverter significativamente o registro das transições entre as câmaras; ao passo que ao administrar OECl como agonista, apenas o flumazenil foi capaz de reverter significativamente ($p < 0,001$) esse parâmetro (**Gráfico 6**).

O **Gráfico 7A** mostra que os animais submetidos ao tratamento com os ansiolíticos diazepam (1,5 mg/kg), buspirona (10 mg/kg) e ketanserina (0,5 mg/kg) tiveram maior porcentagem de tempo na área clara: $72,96 \pm 2,06\%$; $42,13 \pm 2,41\%$ e $40,1 \pm 4,39\%$, em comparação ao grupo veículo ($27,21 \pm 1,29\%$). Consequentemente, esses fármacos reduziram a porcentagem de tempo na área escura: $22,84 \pm 1,93\%$; $46,45 \pm 3,18$ e $46,43 \pm 4,52$, respectivamente, comparados ao mesmo grupo controle ($64,43 \pm 2,37\%$) – **Gráfico 7B**.

Ambas as análises percentuais de tempo, para os agonistas das vias estudadas, foram revertidas a partir dos pré-tratamentos com os respectivos antagonistas. Apenas o antagonista flumazenil reverteu significativamente o aumento desses parâmetros induzidos pelo OECl (300 mg/kg) – **Gráficos 7A e 7B**.

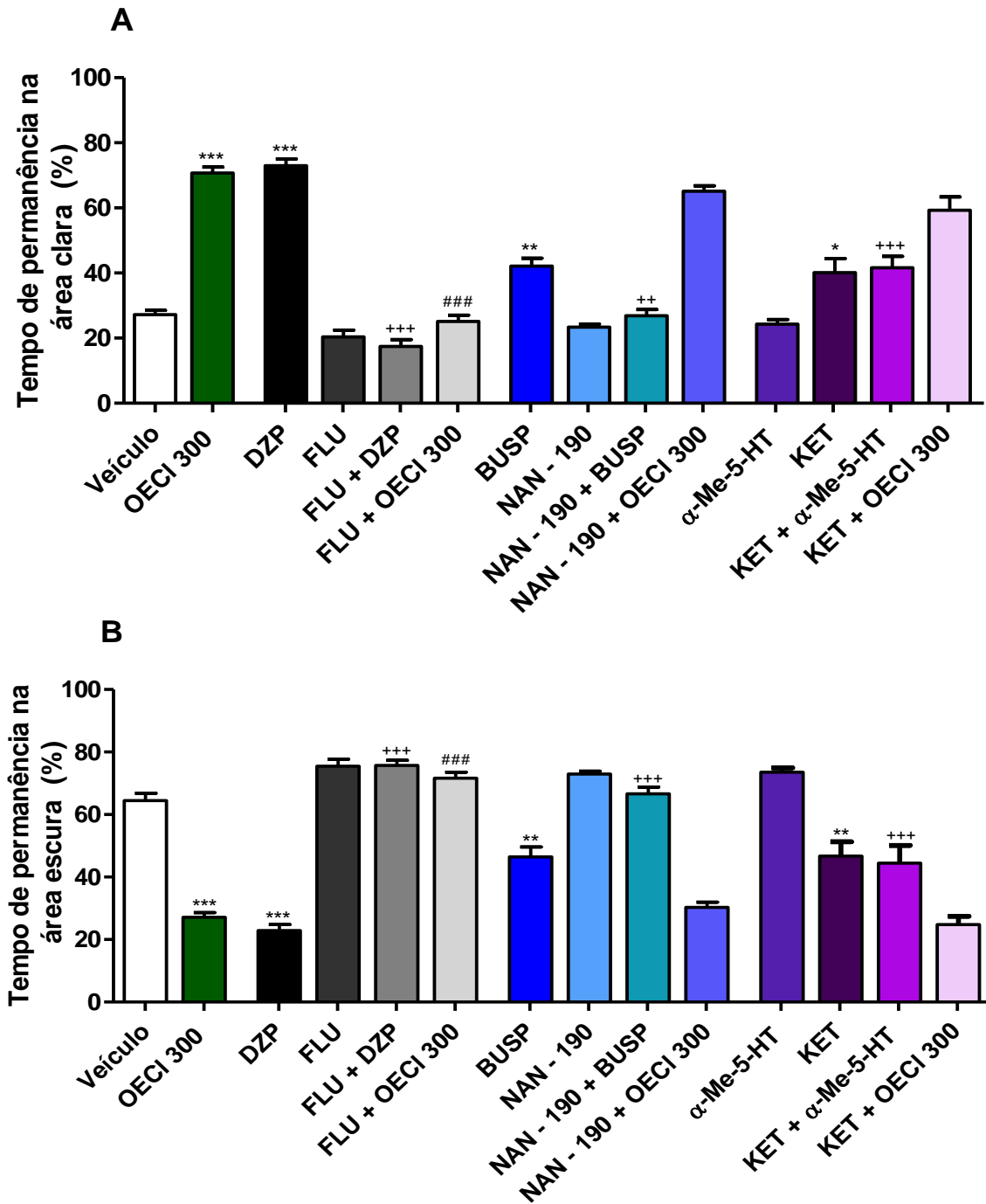
Gráfico 6 - Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA_A, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} no número de transições entre os compartimentos do teste da caixa claro-escuro.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: Veículo (10 mg/kg, v.o.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (300 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); FLU: Flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.); BUSP: Buspirona (10 mg/kg, i.p.); α-Me-5-HT: α-Metilserotonina (1 mg/kg, i.p.); KET: Ketanserina (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m., respectivamente (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparados ao grupo veículo; +++ $p < 0,001$, quando comparados com o respectivo agonista; ### $p < 0,001$, quando comparados ao grupo tratado com OECl 300, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Gráfico 7 - Efeito do tratamento em camundongos com OECl frente a antagonistas dos receptores GABA_A, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} na porcentagem de tempo de permanência nas áreas clara e escura do teste da caixa claro-escuro.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – Porcentagem de tempo de permanência na área clara (%TPAC); **B** – Porcentagem de tempo de permanência na área escura (%TPAE). Veículo (10 mg/kg, v.o.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (300 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); FLU: Flumazenil (2,0 mg/kg, i.p.); BUSP: Buspirona (10 mg/kg, i.p.); α -Me-5-HT: α -Metilserotonina (1 mg/kg, i.p.); KET: Ketanserina (0,5 mg/kg, i.p.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001, comparados ao grupo veículo; +++ p < 0,001, quando comparados com o respectivo agonista; ### p < 0,001, quando comparados ao grupo tratado com OECl 300, usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.4 OECl não altera a performance motora de camundongos

4.4.1 Teste da barra giratória

O teste da barra giratória foi realizado para mensurar quaisquer prejuízos na coordenação motora dos camundongos após tratamento agudo com diazepam ou OECl. Os resultados, apresentados na **Tabela 1**, demonstram que o tratamento com OECl (em todas as doses) não alterou o número de quedas da barra giratória, enquanto que o tratamento i.p. com diazepam aumentou significativamente ($p < 0,001$ vs grupo veículo) o número de quedas, como esperado. Além disso, o tratamento com o BDZ reduziu significativamente a latência à queda ($p < 0,001$ vs grupo veículo), em segundos, ao contrário do que foi visto com o grupo tratado com OECl.

Tabela 1 – Efeito do OECl na coordenação motora de camundongos no teste da barra giratória.

| Tratamentos | Número de quedas | Latência à queda (s) |
|----------------|------------------|----------------------|
| Veículo | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |
| DZP 1,5 mg/kg | 34,0 ± 2,9*** | 1,3 ± 0,1*** |
| OECl 30 mg/kg | 0,3 ± 0,3 | 218,3 ± 21,7 |
| OECl 100 mg/kg | 0,1 ± 0,1 | 217,2 ± 22,8 |
| OECl 300 mg/kg | 0,0 ± 0,0 | 240,0 ± 0,0 |

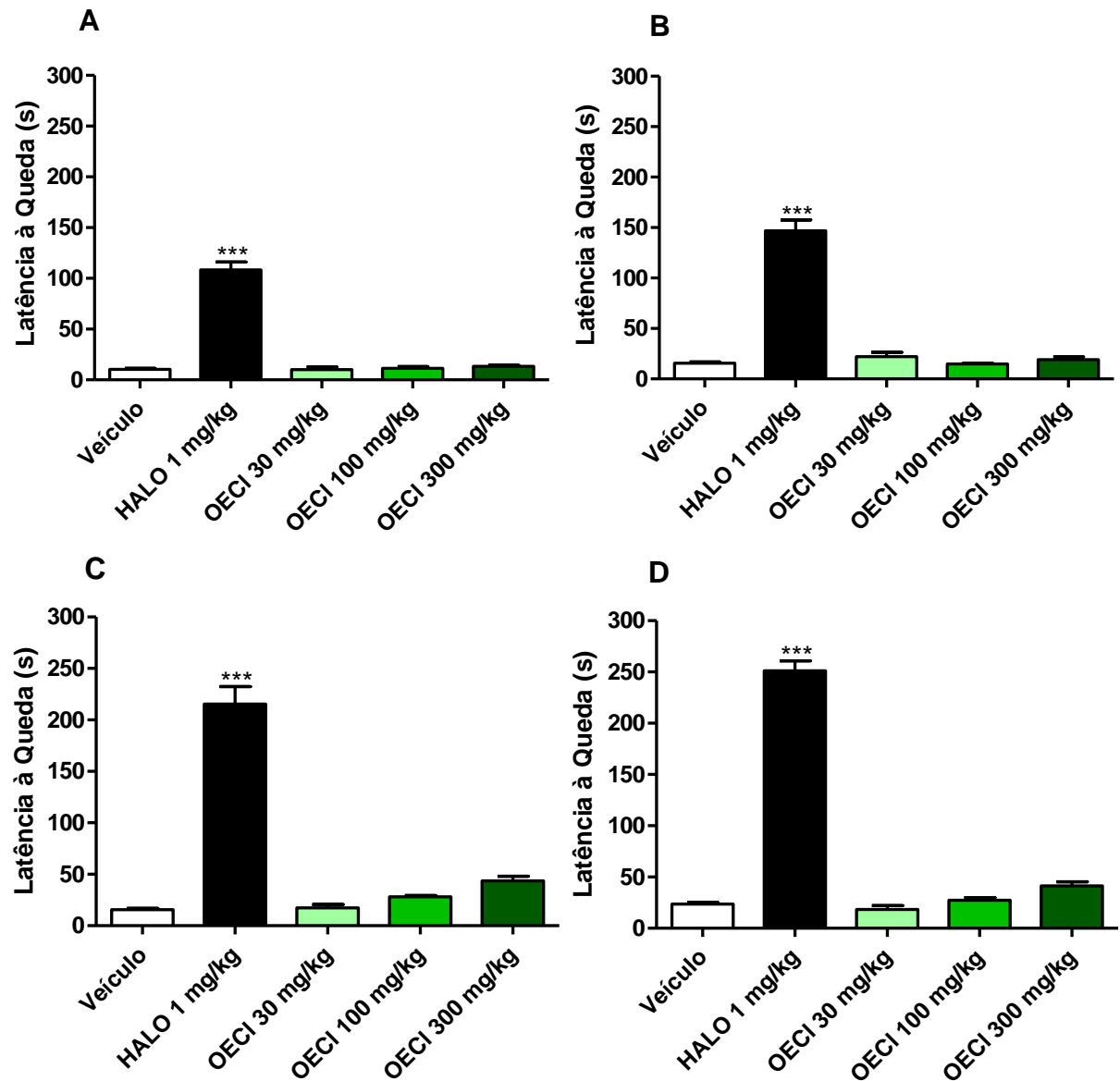
Fonte: Autor, 2015.

Notas: Veículo (10 mg/kg, v.o.); DZP: Diazepam (1,5 mg/kg, i.p.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). As colunas representam a média ± e.p.m. (n = 8). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.4.2 Teste de catalepsia

O **Gráfico 8** mostra o efeito do tratamento com OECl sobre a latência à queda registrada em diferentes tempos no teste de catalepsia. A administração do OECl não foi capaz de induzir um comportamento cataléptico em todos os tempos testados, ao passo que o haloperidol (1 mg/kg, i.p.) exibiu um efeito cataléptico estatisticamente significativo ($p < 0,001$ vs grupo veículo) nos animais, aumentando o tempo (em segundos) em que permaneciam sobre a barra fixa, em todos os tempos do teste (30, 60, 120 e 180 minutos), progressivamente crescente, quando comparado ao grupo veículo, visto sua ação antagônica em receptores dopaminérgicos D2.

Gráfico 8 – Efeito do OECl sobre a performance motora de camundongos submetidos ao teste de catalepsia.



Fonte: Autor, 2015.

Notas: **A** – 30 minutos após os tratamentos; **B** – 60 minutos após os tratamentos; **C** – 120 minutos após os tratamentos; **D** – 180 minutos após os tratamentos. Veículo (10 mg/kg, v.o.); HALO: Haloperidol (1,0 mg/kg, i.p.); OECl: Óleo essencial de *Citrus limon* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.). As colunas e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente (n = 8). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

A ansiedade é uma emoção essencial no âmbito afetivo e em alguns casos considerada como propulsora de desempenho; porém, em outros, este sentimento se torna excessivo e prejudicial, caracterizando um transtorno psíquico. A farmacoterapia dos transtornos de ansiedade está associada a efeitos colaterais que comprometem as atividades diárias ou necessita de semanas para se tornar clinicamente efetiva (BALDESSARINI, 2005; CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005).

Partindo do princípio de que a ansiedade em humanos possui as mesmas bases filogenéticas de reação de medo e defesa apresentada por roedores, é possível, nesta perspectiva evolucionista, mensurar o comportamento ansiolítico em modelos animais de experimentação, assim como o estudo dos demais comportamentos interrelacionados, a fim de se obter alternativas no tratamento deste distúrbio (GRAEFF, 2005; ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; VITAL, 2006).

O uso de modelos animais é a base da pesquisa pré-clínica na psicofarmacologia dos transtornos psiquiátricos e são empregados tanto no estudo de determinado efeito como na triagem para obtenção de novos protótipos de fármacos e dos mecanismos envolvidos (FILE, 1992; GREEN; HODGES, 1991).

O advento da utilização dos testes *in vivo* comportamentais acompanhada à ascensão da pesquisa com plantas medicinais estimulou os cientistas à procura por substâncias de origem natural que exercessem atividade ansiolítica com menores efeitos adversos e com resposta clínica efetiva em curto prazo.

Embora o crescente interesse em se avaliar a atividade biológica de diferentes plantas medicinais, objetivando avaliar um perfil de atividade no SNC e explicar os mecanismos de ação, o estudo com óleos essenciais e extratos de espécies vegetais da família Rutaceae é recente, e talvez por isso, ainda escasso, entretanto há estudos que demonstram a atividade ansiolítica do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Citrus*, como: *C. aurantium* (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002; MORRONE et al., 2007; SAIYUDTHONG; MARSDE, 2010), *C. latifolia* e *C. reticulata* (GARGANO, 2007).

Nesse contexto, o presente estudo investigou o mecanismo de ação ansiolítico e o efeito hipnótico-sedativo do óleo essencial de *Citrus limon*, assim como avaliou seus efeitos sobre o aparelho locomotor.

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (dados não publicados), foi realizado teste geral de atividade farmacológica, considerado primeiro passo na pesquisa

sobre a atividade farmacológica de alguma substância, seja de origem natural ou sintética. Este teste se baseia na observação de vários sinais ou alterações comportamentais, em relação aos controles, que possam indicar alguma atividade no SNC ou possível toxicidade, além de alterações relacionadas aos sistemas periféricos que possam auxiliar na escolha de doses mais adequadas para os demais testes biológicos *in vivo* (CARLINI, 1972; MATTEI; FRANCA, 2006).

Os efeitos observados com o OECl no teste geral foram sugestivos de atividade depressora central, pois após o tratamento oral, os animais apresentaram letargia e redução na movimentação espontânea. Além disso, quando submetidos ao teste do campo aberto os animais reduziram o número de comportamentos ansiogênicos de *rearing* e *grooming*, e do número de bolos fecais, similarmente ao registrado com o tratamento com o fármaco padrão diazepam, sugerindo efeito psicoléptico. Devido à ausência de óbitos e de sinais de toxicidade durante a quinzena de observação, procedeu-se à avaliação da atividade ansiolítica e sua provável ação e confirmação do efeito hipnótico-sedativo (preditivo da letargia).

O efeito hipnótico-sedativo de plantas medicinais é descrito desde a antiguidade quando se relatam os efeitos da morfina, sendo consagrado Morfeu (figura mitológica grega) como “Deus do sono” (JUFE, 2007). Para o estudo de substâncias com esta propriedade, o modelo do sono induzido por barbitúricos é o modelo animal mais utilizado para esse propósito.

Fujimori e Cobb (1995) propuseram que o aumento da hipnose barbitúrica é um bom indicador de atividade depressora do SNC, como por exemplo o pentobarbital que, ao ser administrado com outro agente com propriedades depressoras, promove diminuição da latência e também aumento do tempo total do sono dos animais durante o experimento (WILLIANSO; OKPAKO; EVANS, 1996).

O pentobarbital é um fármaco hipnótico-sedativo que atua como agonista dos receptores GABA_A aumentando, diretamente e independente do GABA, o tempo de abertura destes receptores, resultando no maior influxo de íons Cl⁻, com consequente hiperpolarização celular e inibição da transmissão nervosa. A transmissão GABAérgica intensificada pelos barbitúricos no tronco encefálico causa sedação, amnésia e perda da consciência (FORMAN et al., 2009).

Portanto, realizou-se o teste da potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital, visto que já está bem estabelecido que essa potencialização do tempo de sono nos animais é atribuída a uma ação central nos mecanismos de neurotransmissores envolvidos

com a regulação do sono ou à inibição metabólica do barbitúrico pela substância-teste (KAUL; KULKAMI, 1978).

Na literatura já está bem estabelecido também que os BDZs (como o Diazepam) atuam como ansiolíticos em baixas doses e que induzem efeitos de sedação e miorelaxantes em doses mais elevadas (NOVAS et al., 1988). Por isso, para o teste de potencialização do sono utilizamos doses maiores de Diazepam (associado com o barbitúrico pentobarbital como controle positivo), justificando o fato de não ser a mesma dose para os testes ansiolíticos.

Nossos resultados mostraram que o OECl na dose de 300 mg/kg, v.o. promoveu a diminuição da latência ao sono, representada pela rápida perda dos reflexos posturais, e aumentou o tempo total de sono, os quais confirmam a atividade hipnótico-sedativa, o que possivelmente explica a letargia já detectada através do teste geral e na redução da atividade exploratória no teste do campo aberto. Outra abordagem que pode ser feita é de que o OECl possa estar alterando de alguma forma as neurotransmissões envolvidas na modulação do sono.

No processo de regulação do sono, anatomicamente três subdivisões hipotalâmicas são importantes no ciclo sono-vigília: o hipotálamo anterior (onde existem os núcleos GABAérgicos e núcleos supraquiasmáticos); o hipotálamo posterior (com o núcleo túberomamilar histaminérgico); e o hipotálamo lateral (onde encontram-se os sistemas das orexinas). Durante o ciclo circadiano, o sistema GABAérgico inibitório do núcleo pré-óptico ventro-lateral do hipotálamo anterior é responsável pelo início e manutenção do sono, enquanto que os núcleos aminérgicos (ricos em serotonina), histaminérgicos e orexinérgicos e colinérgicos do prosencéfalo basal apresentam-se ativos durante a vigília, inibindo o núcleo pré-óptico (NITZ; SIEGEL, 1997; SAPER; CHOU; SCAMMELL, 2001).

Substâncias com atividade GABAérgica, como por exemplo os BDZs, em doses mais elevadas do que aquelas utilizadas no tratamento da ansiedade, promovem hipnose por atuarem no sítio de ligação do receptor GABA_A, o que resulta em maior afinidade do GABA pelo receptor. De fato, um dos efeitos colaterais desta classe de fármacos é a hipnose, visto este sistema de neurotransmissão estar envolvido na gênese da ansiedade (BATESON, 2006). Nossos resultados corroboram essa hipótese pelo menos em parte, uma vez que o OECl mostrou-se ansiolítico e hipnótico, na maior dose, nos experimentos utilizados.

Após a confirmação da atividade hipnótico-sedativa, procedeu-se à avaliação da atividade ansiolítica. A maioria dos modelos experimentais para avaliar o comportamento de ansiedade utilizando animais baseia-se em situações conflitantes, como colocá-los em um ambiente estranho (“estressante”) ou frente a um predador, o que pode gerar algumas

alterações comportamentais, acompanhadas de alterações fisiológicas. Assim, o que se reproduz nos animais é um estado semelhante à ansiedade no homem, medida através de sinais exteriores, tais como aversão a ambientes desprotegidos e iluminados e atividade exploratória reduzida (BLANCHARD et al., 1993).

O uso de resultados com apenas um modelo animal para prever o potencial ansiolítico de uma determinada substância em humanos provavelmente levaria a conclusões equivocadas. A melhor estratégia é a utilização de pelo menos dois modelos animais para avaliar esta possível atividade (DOURISH et al., 1995; DO-REGO, et al., 2006), sendo assim, foram utilizados os testes do labirinto em cruz elevado e da caixa claro-escuro para validar a hipótese de que o OECl possui um efeito ansiolítico.

O labirinto em cruz elevado é considerado um modelo etiológicamente válido, uma vez que usa um estímulo natural – medo de um espaço novo aberto e medo do equilíbrio numa plataforma suspensa e relativamente estreita – que pode induzir ansiedade em humanos (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995; GRUNDMANN et al., 2007). Baseia-se no fato de que os roedores evitam se expor às áreas abertas no labirinto, as quais se supõem serem mais aversivas, mostrando uma preferência pelas áreas fechadas protegidas por paredes (WEISS et al., 1998; CHEN et al., 2006). Geralmente, os camundongos quando retirados de suas gaiolas apresentam um padrão de comportamento caracterizado por evitar os braços abertos com uma preferência consistente para os braços fechados. O perfil de preferência pela ordem é: fechado > centro > aberto, indicativo de uma propensão para seções relativamente protegidas do labirinto. Esta tendência é suprimida por fármacos ansiolíticos e potencializada por agentes ansiogênicos (BOURIN et al., 2007). A frequência e o tempo de permanência nos braços abertos são os maiores índices de redução da ansiedade no modelo do labirinto em cruz elevado, uma vez que a área aberta representa extrema aversão aos roedores (PELLOW; FILE, 1986).

As doses de 100 e 300 mg/kg de OECl aumentaram o número de entradas e a porcentagem de tempo nos braços abertos, sugerindo que o tratamento oral nestas doses apresentam efeito ansiolítico estatisticamente significativo comparável à exercida pelo Diazepam.

Estes resultados corroboram os estudos anteriores de outros autores que avaliaram o efeito ansiolítico de algumas espécies do gênero *Citrus*. Faturi et al. (2010) e Leite et al. (2008) realizaram estudos com óleo essencial de *C. sinensis* e *C. aurantium*, respectivamente, objetivando avaliar atividade ansiolítica no LCE por via inalatória – uma via alternativa e mais cômoda em relação aos tratamentos oral e intraperitoneal. A inalação de *C. sinensis* nas

duas maiores doses testadas revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao veículo quanto ao número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos. Já a inalação de *C. arantium*, nas três concentrações testadas, não foram observadas alterações estatísticas significativas em nenhum dos parâmetros analisados (os mesmos do presente estudo).

Vieira et al. (2011) avaliaram três diferentes doses de extrato metanólico das folhas de *C. limon*, v.o., concluindo que no LCE apenas a maior delas não alterou nenhum dos parâmetros avaliados (idênticos ao do presente estudo), ao contrário das outras duas, as quais induziram diferenças estatísticas significativas.

Para complementar os possíveis efeitos ansiolíticos do OECl, o teste da caixa claro-escuro foi realizado. Este teste baseia-se na aversão dos roedores por áreas iluminadas e em seu comportamento exploratório espontâneo em resposta a um ambiente novo e iluminado (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). Após tratamento com fármacos ansiolíticos (BDZs), a aversão aparente de permanecer ou se mudar para a área iluminada é removida. Desde então, este modelo tem sido amplamente utilizado como um teste válido para avaliar atividade ansiolítica em roedores (COSTALL et al., 1989).

Os resultados do presente estudo indicam que o OECl reduziu a aversão pelo ambiente iluminado, uma vez que aumentou o número de transições entre os compartimentos claro e escuro, além de aumentar a porcentagem de tempo na área clara, corroborando o efeito ansiolítico visto no teste do labirinto em cruz elevado, semelhante ao observado com os animais tratados com diazepam.

O óleo essencial de *Citrus latifolia* (GARGANO, 2007) é capaz de produzir um aumento no tempo de permanência na área clara, enquanto que o de *C. aurantium* é capaz de aumentar tanto este parâmetro quanto o número de transições entre as câmaras da caixa (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). Segundo Faturi et al. (2010), o óleo essencial de *C. sinensis* também aumenta o tempo na área clara, porém neste estudo não foi avaliado o número de transições entre os compartimentos.

O conjunto dos resultados mostra que o tratamento com OECl apresenta efeito ansiolítico sem comprometimento motor característico do efeito sedativo. Avançando no estudo, investigou-se as possíveis vias pelas quais o óleo poderia modular sua atividade.

Indubitavelmente, o sistema GABAérgico está envolvido na neuroquímica da ansiedade. Os BDZs são ansiolíticos que atuam como agonistas do receptor GABA_A aumentando a afinidade do neurotransmissor GABA com o receptor, favorecendo então a neurotransmissão inibitória central (KIM; GORMAN, 2005). Estudos com antagonistas dos

receptores GABAérgicos, como o flumazenil, bloqueiam o sítio de ligação dos BDZs no receptor GABA revertendo, por exemplo, o efeito ansiolítico do diazepam (KIM; GORMAN, 2005).

Várias pesquisas têm envolvido predominantemente os ligantes de receptores GABA_A e 5-HT_{1A} como prováveis sítios de ação de fármacos ansiolíticos em animais submetidos a modelos de ansiedade. Estudos neuroquímicos indicam que a buspirona, primeiro ansiolítico seletivo de ação serotoninérgica introduzido na clínica médica (NINAN et al., 1998), atua preferencialmente em nível dos auto-receptores 5-HT_{1A} nos núcleos da rafe (HOYER; MARTIN, 1997). A ativação desses auto-receptores pré-sinápticos diminui a quantidade de serotonina em nível pós-sináptico (provavelmente na amígdala e hipocampo). Desta forma, a ação ansiogênica da serotonina parece ser minimizada sob o efeito desses fármacos.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm apontado um importante papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na fisiopatogênese da ansiedade. Evidências experimentais e clínicas indicam que a administração de antagonistas de receptores 5-HT_{2A/C} exibem propriedades ansiolíticas, uma vez que diminuem a ligação da serotonina a esses receptores após administração prolongada, sugerindo um *down regulation* desses receptores, justificando a ação farmacológica ocorrer em torno de quatro semanas, reduzindo o quadro de ansiedade (DEAKIN, 1998; MILLAN, 2004).

Diante desses efeitos supostamente mediados pelo bloqueio destes receptores, estes têm sido alvo de estudo para novas estratégias de tratamento dos distúrbios de ansiedade, não só pelo efeito benéfico, mas também por não induzirem efeitos indesejáveis comuns em tratamentos com ansiolíticos.

Em nossas experiências, o pré-tratamento dos animais com ketanserina (0,5 mg/kg, i.p.) não reverteu o efeito ansiolítico do OECl (300 mg/kg, v.o.) observado no labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. O mesmo foi constatado com o tratamento i.p. com NAN-190 (0,5 mg/kg) que também não reverteu os parâmetros analisados nestes testes pós-administração do OECl, sugerindo ausência do envolvimento dos receptores serotoninérgicos pré-sinápticos 5-HT_{1A} e pós-sinápticos 5-HT_{2A/C} no mecanismo de ação ansiolítico desenvolvido pelo óleo essencial de limão siciliano.

Já o pré-tratamento com flumazenil reverteu não apenas o efeito ansiolítico do diazepam, mas também do OECl, sugerindo que o OECl é capaz de reduzir a ansiedade dos animais nos modelos experimentais utilizados por meio de um mecanismo de ação semelhante ao dos BDZs sobre o receptor GABA_A, ou ainda por um aumento da neurotransmissão GABAérgica seja estimulando a síntese/ liberação, ou inibindo a degradação do GABA.

Dentre as espécies da família Rutaceae, foram estudados os mecanismos de ação ansiolítico do óleo essencial de algumas espécies como: *C. aurantium* subsp. *bergamia* e *Spiranthera odoratissima*. Estes estudos sugerem que o óleo essencial de *C. aurantium* subsp. *bergamia* está envolvido com algum componente noradrenérgico na redução do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal visto através da redução nos níveis de corticosterona (SAIYUDTHONG; MARSDEN, 2010). Enquanto que o efeito ansiolítico da *S. odoratissima* parece estar relacionado ao sistema serotoninérgico, provavelmente mediado por receptores 5-HT_{1A}, uma vez que o NAN-190 foi capaz de reverter os efeitos da buspirona bem como do óleo essencial estudado (GALDINO et al., 2010).

Os resultados sugerem uma possível modulação da atividade ansiolítica do OECl no sítio de ligação dos BDZs no receptor GABA_A. No entanto, agonistas destes receptores exibem efeitos colaterais, incluindo o relaxamento muscular, o que compromete o desempenho de pacientes que fazem tratamento com estes fármacos.

Por isso, realizou-se o teste da barra giratória, a fim de avaliar o efeito de relaxamento muscular ou de incoordenação motora e averiguar o possível efeito do OECl sobre o sistema locomotor. No modelo utilizado, quanto maior o prejuízo sobre a musculatura, menor será a latência à primeira queda, visto que o animal não conseguirá se equilibrar e manter-se deambulante sobre a barra giratória e maior será o número de quedas do aparelho (CARLINI; BURGOS, 1979). Trata-se de um método não-específico, sendo utilizado para descartar a possibilidade de resultados falso-positivos, uma vez que avalia a integridade do sistema motor, permitindo detectar o déficit psicomotor, incluindo ataxia ou relaxamento muscular, efeitos característicos de uma neurotoxicidade (MATTEI; FRANÇA, 2006; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006), típicos de agentes farmacológicos com ação neuroléptica. Os animais tratados com OECl não apresentaram alterações significativas na latência e no número de quedas quando comparados ao grupo tratado com o veículo, não interferindo na resposta motora dos animais, descartando, assim, a possibilidade de um efeito miorrelaxante ou neurotóxico.

Essa ausência de efeito sobre a coordenação motora neste teste foi também observado quando roedores foram tratados com extratos de outras espécies da família Rutaceae, por exemplo: óleos essenciais de *C. latifolia*, *C. reticulata* e *C. aurantium*, e o extrato hidroalcoólico das folhas de *Casimiroa edulis* (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002; MORA et al., 2005; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006; GARGANO, 2007).

Após a observação de que o OECl não altera a atividade motora de camundongos, realizamos o teste de catalepsia para confirmar tal efeito. A catalepsia em roedores induzida

pela administração de fármacos é um modelo experimental válido para avaliar efeitos extrapiramidais, ocasionada pelo bloqueio em receptores dopaminérgicos do tipo D2 em neurônios pós-sinápticos na região nigroestriatal, considerado um indicador útil na busca por substâncias potencialmente ativas nessa localização cerebral que possam resultar em efeitos adversos comprometedores sobre a musculatura esquelética.

A administração oral do OECl não induziu comportamento cataléptico nos animais, diferentemente do que foi observado com aqueles que receberam Haloperidol (1 mg/kg, i.p.), no qual apresentaram comprometimento motor progressivamente crescente (de 30 a 180 minutos pós-tratamento).

Nossos resultados diferem do estudo realizado por Alfieri et al. (2008), onde o tratamento oral com *C. paradisi* prolongou o tempo de catalepsia dos camundongos. Tamilselvam et al. (2013) avaliaram o efeito da hesperidina, uma flavona presente em espécies como *C. unshiu*, *C. aurantium* e *C. sinensis*, e constataram que esse metabólito também induziu efeito cataléptico nos animais.

Diante dos resultados, é possível afirmar que o OECl promove um efeito ansiolítico e hipnótico-sedativo na dose de 300 mg/kg, v.o., sem causar déficit na coordenação motora, e que este efeito envolve a interação do óleo no sistema GABAérgico.

Até o momento, no entanto, não se pode afirmar qual(is) constituinte(s) do OECl, ou metabólito, é(são) responsável(is) pelo efeito, e nem se esta atividade é decorrente de uma ativação direta de receptores ou decorre de um efeito indireto sobre o aumento dos níveis do neurotransmissor GABA, quer seja aumentando sua síntese e/ou liberação ou diminuindo sua degradação. Maiores estudos serão necessários no sentido de elucidar o entendimento a respeito da neuromodulação desses efeitos.

6 CONCLUSÕES

No estudo da investigação do efeito hipnótico-sedativo e dos possíveis mecanismos de ação ansiolítico do óleo essencial das cascas do fruto de *Citrus limon* em camundongos, pode-se concluir que:

- O tratamento com OECl, na dose de 300 mg/kg, v.o., apresenta efeito hipnótico-sedativo em camundongos, semelhante ao observado com o tratamento com fármaco padrão utilizado;
- O efeito ansiolítico exercido pelo OECl parece estar envolvido com o sítio de ligação dos BDZs em receptores do tipo GABA_A ou com um possível aumento da neurotransmissão GABAérgica;
- A ação ansiolítica do OECl provavelmente não envolve receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C};
- O tratamento com OECl possivelmente não envolve antagonismo competitivo de receptores dopaminérgicos, uma vez que nos testes avaliados o óleo em nenhuma dose testada foi capaz de alterar a performance motora dos camundongos.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, G.; MENDONZA, L. C.; TORRES, F.; VARGAS, S. S.; WENNINGER, C. C. Variación del tiempo de catalepsia inducida por haloperidol em ratones debido a la administración de *C. paradiisi*. **Med actual**, v. 9, p. 4-7, 2008.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C; FATURI, C. B.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 361-364, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DMS-IV-R**. 4. ed. Washington, D.C. American Psychiatric Association: 2002.
- ANDRADE, L. H.; WANG, Y. P.; ANDREONI, S.; SILVEIRA, C. M.; ALEXANDRINO-SILVA, C.; SIU, E. R.; NISHIMURA, R.; ANTHONY, J. C.; GATTAZ, W. F.; KESSLER, R. C.; VIANA, M. C. Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **Plos One**, v. 7. n. 2, 2012.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M. A. B. F. **Modelos animais em psicofarmacologia**. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. p. 53. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ASCHOFF, J. Circadian rhythms: general features and endocrinological aspects. In: KRIEGGER, D.T. (Org.). **Endocrine rhythms**, p. 1-29. Nova York: Raven Press, 1979.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BAKKER, A; VAN-BALKOM, A. J. L.; SPINHOVEN, P. SSRIs vs. TCAs in the treatment of panic disorder: a meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 106, p. 163-167, 2002.
- BALDESSARINI, R. J. **Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos: Depressão e distúrbios de ansiedade**. In: HARMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E. (Eds.) Goodman & Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics. p. 338. 10 ed. New York: McGraw Hill, 2005.
- BARKER, M. J.; GREENWOOD, K. M.; JACKSON, M. Cognitive effects of longterm benzodiazepine use: a meta-analysis. **Central Nervous System Drugs**, v. 18, p. 37-48, 2004.
- BATESON, A. N. Further potential of the GABA receptor in the treatment of insomnia. **Sleep Medicine**, v. 7, p. 3-9, 2006.
- BELZUNG, C; LE PAPE, G. Comparison of Different Behavioral Test Situations Used in Psychopharmacology for Measurement of Anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 56, p. 623-628, 1994.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DELRIO, J. A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BENUTE, G. R. G.; NOMURA, R. M. Y.; PEREIRA, P. P.; LUCIA, M. C. S.; ZUGAIB, M. Spontaneous and induced abortion: anxiety, depression and guilty. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 322-327, 2009.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 155-165, 1993.

BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of *Citrus* peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.

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

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567-574, 2007.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. A. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, p.93-100, 2010.

BRITO, T. M. **Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no *Carassius auratus* (peixe dourado)**. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área Psicobiologia) – Universidade de São Paulo de Riberão Preto, Riberão Preto, 2011.

BURDA, S; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BUYSSE, D. J.; ANGST, J.; GAMMA, A.; AJDACIC, J.; EICH, D.; ROSSLER, W. Prevalence, course, and comorbidity of insomnia and depression in young adults. **Sleep**, v. 31, p. 473-480, 2008.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKY, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of the America Nutraceutical Association**, v. 7, p. 2431-2439, 2004.

CACERES, A.; GIRON, L.M.; ALVARADO, S. R.; TORRES, M. F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 223-237, 1987.

CAMPÊLO, L.M.L.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.V. Evaluation of central nervous system effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 668-673, 2011.

CARLINI, E. A. Farmacologia sem aparelhagem. São Paulo: Savier: 1972.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CARLINI E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARVALHO-FREITAS, M.I.R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1629-1633, 2002.

CHARNEY, D. S.; MIHIC, S. J. HARRIS, R. A. **Hipnóticos e sedativos**. In: HARMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E. (Eds.) Goodman & Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics. p. 338. 10 ed. New York: McGraw Hill, 2005.

CHATTERGEE, I.B.; MUKHOPADHYAY, C.K.; GHOSH, M.K. Vitamin C: A potential savior against free radical-induced oxidative damage. **Current Science**, v. 69, p. 747-751, 1995.

CHEN, S. W.; WANE, W. J.; LI, W. J.; WANG, R.; LI, Y. L.; HUANG, Y. N.; LIANG, X. Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 339-344, 2006.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, p. 777-785, 1989.

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

CROWEL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 775-778, 1999.

CRUZ, A. P. M.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 13, p. 269-278, 1997.

CUTIN, S.; ROCHA, D. L. B.; PICON, P.; BLAYA, C. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In: CATALDO-NETO, A.; GAUER, G. J. C.; FURTADO, N. R. **Psiquiatria para estudantes de medicina**. Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, p. 414, 2003.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 33-36, 1995.

- DEAKIN, J. F. 5-HT₂ receptors, depression and anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 29, p. 819-820, 1998.
- DE FEO, V.; AQUINO, R.; MENGHINI, A.; RAMUNDO, E.; SENATORE, F. Traditional phytotherapy in the Peninsula Sorrentina, Campania, Southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 113-125, 1992.
- DE SOUSA, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; QUITANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M.; ALMEIDA, R. N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.
- DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; DE ALEMIDA, R. N.; LEITE, J. R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α - β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007a.
- DE SOUSA, D. P.; QUINTANS, J. L.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007b.
- DO-REGO, J. C.; VIANA, A. F.; LE-MAITRE, E.; DENIEL, A.; RATES, S. M.; LEROUX-NICOLLET, I.; COSTENTIN, J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. **Behavioural Brain Research**, v. 169, p. 282-288, 2006.
- DOURISH, C. T.; GREWAL, S. S.; SHEPHERD, J. K.; STANHOPE, K. J.; BILL, D. J.; FLETCHER, A. Benefits of ethological analysis of behaviour. **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 16, p. 260, 1995.
- DUARTE, F. S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; LIMA, T. C. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 86, p. 150-161, 2007.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T. S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- ERNST, E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, p. 205-208, 2006.
- EZZAT, S.M. *In vitro* inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 757-759, 2001.
- 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, p. 605-609, 2010.
- FERNÁNDEZ-SAN-MARTÍN, M. I.; MASA-FONT, R.; PALACIOS-SOLER, L.; SANCHO-GÓMEZ, P.; CALBÓ-CALDENTEY, C.; FLORES-MATEO, G. Effectiveness of Valerian on insomnia: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Sleep Medicine**, v. 11, n. 6, p. 505-511, 2010.

FILE, S. E. **Behavioural detection of anxiolytic action.** In: ELLIOT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (Eds). *Experimental approaches to anxiety and depression.* p. 25. Wiley: Chichester, 1992.

FLAISHON, R.; WEINBROUM, A. A.; VEENMAN, L.; LESCHINER, S.; RUDICK, V.; GAVISH, M. Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam. **Anesthesia and Analgesia**, v. 97, p. 1046-1052, 2003.

FLEMING, L.; GILLESPIE, S.; ESPIE, C. The development and impact of insomnia on cancer survivors: a qualitative analysis. **Psycho-Oncology**, v. 19, p. 991-996, 2010.

FORMAN, S. A.; CHOU, J.; STRICHARTZ, G. R.; LO, E. H. **Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica.** In: GOLAN, D.E. *Princípios de Farmacologia – A base fisiopatológica da farmacoterapia.* 2. ed. Nova Guanabara, 2009.

FOSTER, H.B; NIKLAS, S.; LUTZ, S. Antispasmodic effects of some medicinal plants. **Planta Médica**, v. 40 p. 309-319, 1980.

FUJIMORI, H.; COBB, D. Potentiation of barbital hypnosis as na evaluation method for central nervous system depressant. **Psychopharmacology**, v. 7, p. 374-377, 1995.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; SOUSA, F. B.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 455-462, 2010.

GARGANO, A. C. **Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial das cascas do fruto de espécies do gênero *Citrus*.** 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

GASPAR, S.; MORENO, C.; MENNA-BARRETO, L. Os plantões médicos, o sono e a ritmicidade biológica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, p. 239-245, 1998.

GOICHOT, B.; WEIBEL, L.; CHAPOTOT, F.; GRONFIER, C.; PIQUARD, F.; BRANDERNBERGER, G. Effect of the shift of the sleep/wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. **American Journal of Physiology**, v. 275, n. 2, E243-248, 1998.

GONÇALVES, D. M.; KAPCZINSKI, F. Prevalência de transtornos mentais em indivíduos de uma unidade de referência para Programa Saúde da Família em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2043-2053, 2008.

GRAEFF, F. G. **Medicamentos Ansiolíticos.** In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia.* p. 101. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRAEFF, F. G. **Medicamentos ansiolíticos.** In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia.* p. 123. São Paulo: Atheneu, 2005.

- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 129-141, 1996.
- GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. **Transtornos da Ansiedade**. p. 434. São Paulo: Atheneu, 2004.
- GRAEFF, F. G.; SHOENFELD, R. I. Tryptamine mechanisms in punished and non punished behavior. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 173, p. 277-283, 1970.
- GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Nature's own pharmacy: the diabetes perspective. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 56, p. 507-517, 1997.
- GREEN, S.; HODGES, H. **Animal models of anxiety**. In: WILLNER, P. (Ed.) Behavioural models in Psychopharmacology. p. 21. CUP: Cambridge, 1991.
- GREENBERG, P. E.; KESSLER, R. C.; BIRNBAUM, H. G.; LEONG, S. A.; LOWE, S.W.; BERGLUND, P. A.; COREY- LISLE, P. K. The Economic Burden of Depression in the United States: How Did It Change Between 1990 and 2000? **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 64, p. 1465-1475, 2003.
- GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 667-687, 2013.
- GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA J. I.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 406-411, 2007.
- HANDLEY, S.; McBLANE, J. W. 5-HT drugs in models of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 112, p. 13-20, 1993.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HATA, T.; SARAGUCHI, I.; MORI, M.; IKEDA, N. Induction of apoptosis by *Citrus paradise* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. **In vivo**, v. 17, p. 553-559, 2003.
- HINDI, F.; DEW, M. A.; ALBERT, S. M.; LOTRICH, F. E.; REYNOLDS, C. F. Preventing depression in later life: state of the art and science circa 2011. **Psychiatric Clinics of North American**, v. 34, p. 67-78, 2011.
- HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, p. 673-751, 1996.
- HOYER, D.; MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature towards a harmonization with the human genome. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 419-428, 1997.

HUH, J.; GOEBERT, D; TAKESHITA, J; LU, BY; KANG, M. Treatment of Generalized Anxiety Disorder: A Comprehensive Review of the Literature for Psychopharmacologic Alternatives to Newer Antidepressants and Benzodiazepines. **Prim Care Companion Central Nervous System Disord**, v. 13, p. 1-19, 2011.

HYUN, K.D.; JEONG, S.M.; AH, B.E; JOO, H.M. Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 356-358, 2000.

INSTITUTO HORUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Disponível em <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/citrus_limon.html>. Acesso em: 06 de setembro de 2014).

JUFE, G. F. New hypnotics: perspectives from sleep physiology. **Vertex**, v. 18, p. 294-299, 2007.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. **Comprehensive textbook of psychiatry**. New York: Lippincot Williams and Wilkins, 2005.

KAUL, P. N.; KULKAMI, S. K. New drug metabolism inhibitor of marine origin. **Journal of Pharmacology Sciences**, v. 67, p. 1293-1296, 1978.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v. 4, p. 335-347, 2005.

KOHNO, H., TAIMA, M.; SUMIDA, T.; YOSHIRO, A.; OGAWA, H.; TANAKA, T. Inhibitory effect of mandarin juice rich in β -cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. **Cancer letters**, v. 174, p. 141-150, 2004.

KORPI, E. R.; GRUNDER, G.; HARTMUT, L. Drug interactions at GABA_A receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67, p. 113-159, 2002.

KRALIC, J. E.; O'BUCKLEY, T. K.; KHISTI, R. T.; HODGE, C. W.; HOMANICS, G. E.; MORROW, A. L. GABA_A receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 685-694, 2002.

KUSTER, R.M; ROCHA, L.M. **Cumarinas, cromonas e xantonas**. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2003.

LACERDA, G.F.M.L. **Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-graduação em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

LIMÃO. Disponível em: <<http://www.botanic.jp/plants-ra/lemon.htm>>. Acesso em 6 de setembro de 2014.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. **Testes gerais para confirmar a ação central: modelos animais em psicofarmacologia.** In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: Fundamentos práticos. p. 138. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MCNAMARA, J.O. **Neurotransmissão.** In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas e da Terapêutica. MacGraw Hill, 12 ed., p. 588, 2012.

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-675, 2000.

MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 371-384, 2004.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSWA, T. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 45, p. 4619 - 4623, 1997.

MONAGEMI, R.; SHAHRBANOO, O.; HAERI-ROOHANI, A.; GHANNADI, A.; JAFARIAN, A. Cytotoxic effects oils of some Iranian *Citrus* peels Iranian. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 183-187, 2010.

MONK, T. H.; BUYSSE, D. J.; BIBLY, B. D.; KENNEDY, K. S.; WILBRICH, L. M. Sleep and circadian rhythms in four orbiting astronauts. **Journal of Biological Rhythms**, v. 13, p. 188-201, 1998.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploration behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-60, 1955.

MOORE-EDE, M. C.; RICHARDSON, G. S. Medical implications of shift work. **Annual Review of Medicine**, v. 36, p. 607-617, 1985.

MORA, S.; DIAZ-VELIZ, G.; LUNGENSTRASS, H.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; COTO-MORALES, T.; POLETTI, C.; DE-LIMA, T. C. M.; HERRERA-RUIZ, M.; TORTORIELLO, J. Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 191-197, 2005.

MORRONE, L. A.; ROMBOLA, L.; PELLE, C.; CORASANITI, M. T.; ZAPPETTINI, S.; PAUDICE, P.; BONANNO, G.; BAGETTA, G. The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. **Pharmacology Research**, v. 55, p. 255-262, 2007.

MULLER, M. R.; GUIMARÃES, S. S. Impacto dos transtornos do sono sobre o funcionamento diário e a qualidade de vida. **Estudos de Psicologia**, v. 24, p. 519-528, 2007.

MULUMO, S. C. C.; MENEZES, G. B.; VIGNE, P.; FONTENELLE, L. F. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, p. 92-100, 2012.

NAVARRO, D. M. A. F.; NAVARRO, M. Hidrogenação de compostos orgânicos utilizando método eletroquímico para geração de hidrogênio *in situ*: hidrogenação eletrocatalítica. **Química Nova**, v. 27, p. 301-307, 2004.

NINAN, P. T.; COLE, J. O.; YONKERS, K. A. **Nonbenzodiazepine anxiolytics**. In: SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. (Eds.) "Psychopharmacology". p. 287. Washington: American Psychiatry Press, 1998.

NITZ, D.; SIEGEL, J. M. GABA release in the locus ceruleus as a function of sleep/wake state. **Neuroscience**, v. 78, p. 795-801, 1997.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 30, p. 331-336, 1988.

ORTENCIO, B. **Medicina Popular do Centro-Oeste**. 2. ed. Brasília: Thesaurus, 1997.
PEARSON, N. J.; JOHNSON, L. L.; NAHIN, R. L. Insomnia, trouble sleeping, and complementary and alternative medicine: Analysis of the 2002 national health interview survey data. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, p. 1775-1782, 2006.

PERSON, N. J.; JOHNSON, L. L.; NAHIN, R. L. Insomnia, trouble sleeping, and complementary and alternative medicine: Analysis of the 2002 national health interview survey data. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 16, p. 1775-1782, 2006.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 24, p. 525-529, 1986.

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

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss in mice. **Advance Access Publication**, v. 5, p. 181-186, 2007.

RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, p. 33-57, 1998.

RAPISARDA, P.; FANELLA, F.; MACCARONE, E. Reliability of Analytical Methods for Determining Anthocyanins in Blood Orange Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2249-2252, 2000.

RIBEIRO, C. A. S. **Bateria sequencial de procedimentos para avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongo**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Basilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

ROSEKIND, M. R.; GREGORY, K. B. Insomnia risks and costs: health, safety, and quality of life. **The American Journal of Managed Care**, v. 16, p. 617-626, 2010.

SADOCK, B. J. Inevitable suicide: a new paradigm in psychiatry. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 18, p. 221-224, 2009.

SAIYUDTHONG, S.; MARSDEN, C. A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 858-862, 2010.

SANBERG, P. R.; BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M.; NORMAN, A. B. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 5, p. 748-759, 1988.

SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; SCAMMELL, T. E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. **Trends in Neurosciences**, v. 24, p. 726-731, 2001.

SARRAIS, F.; MANGLANO, P. C. El insomnio. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 30, n. 1, p. 121-134, 2007.

SAVARD, J.; MORIN, C. M. In the context of cancer: a review of a neglected problem. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 895-908, 2001.

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

SECCHI, P.; VIRTUOSO, S. O efeito da Valeriana no tratamento da insônia. **Visão Acadêmica**, v. 13, n.1, p. 85-107, 2012.

STAHL, M. S. **Psicofarmacologia: Base Neurocientífica e Aplicações Práticas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

STEIN, L.; WISE, C. D.; BERGER, B. D. **Antianxiety actions of benzodiazepines: Decrease in activity of serotonin neurones in the punishment systems**. In: GRATINI, S.; MUSSINI, E.; RANDELL, L.O. Benzodiazepines. New York: Raven Press, p. 299. 1973.

TAMILSELVAM, K.; NATARAJ, J.; JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T.; ESSA, M. M. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperidin against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced experimental Parkinson's disease in mice. **Internacional Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 3, p. 294-302, 2013.

TARIQ, S. H.; PULISETTY, S. Pharmacotherapy for insomnia. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 24, n. 1, p. 93-105, 2008.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M. L.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D. D.; GIAMMANCO, M. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, p. 466-479, 2007.

VAZQUEZ, F. M.; SUAREZ, M. A.; PEREZ, A. Medicinal plants used in the Barros area, Badajoz Province (Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 81-85, 1997.

VEKIARI, S. A.; PROTOPAPADAKIS, E. E.; PAPADOPULOU, P.; PAPANICOLAOU, D.; PANOU, C.; VAMVAKIAS, M. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a *Cretan lemon* variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 147-153, 2002.

VIERA, F.C.R.; CARDOSO, K.M.F.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. **Estudo da atividade ansiolítica do extrato etanólico das folhas de *Citrus limon***. 2011. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0434-2.pdf>>. Acesso em 22 de setembro de 2014.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 265-271, 1998.

WILLIANSO, E.; OKPAKI, D.; EVANS, F. J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. **Pharmacological Methods in Phytotherapy Research**, v. 1, 1996.

WITTCHEN, H. U.; JACOBI, F.; REHM, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JONSSON, B.; OLESEN, J.; ALLGULANDER, C.; ALONSO, J.; FARAVELLI, C.; FRATIGLIONI, L.; JENNUM, P.; LIEB, R.; MAERCKER, A.; VAN-OS, J.; PREISIG, M.; SALVADOR-CARULLA, L.; SIMON, R.; STEINHAUSEN, H.C.. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 655-679, 2011.

WONG, D. T.; PERRY, K. W.; BYMASTER, F.P. The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 764-774, 2005.

APÊNDICE A – Ficha de avaliação do 1º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.

CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS

SUBSTANCIA TESTADA: Condicionam (1º dia)
 DATA: _____ OBS: _____ METODOLOGIA: _____

| Grupo/animal | Tempo 1 | Tempo 2 | Tempo 3 | Tempo 4 | Tempo 5 | Tempo 6 | Tempo 7 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| I-1 | 100" | 240" | 240" | | | | |
| I-2 * | 140" | 36" | 98" | 240" | 64" | 240" | |
| I-3 | 59" | 240" | 240" | | | | |
| I-4 | 240" | 25" | 195" | 240" | | | |
| I-5 | 73" | 240" | 240" | | | | |
| I-6 | 85" | 240" | 163" | 240" | | | |
| I-7 * | 53" | 76" | 180" | 28" | 83" | 183" | 240" |
| I-8 | 74" | 99" | 240" | 240" | | | |
| I-9 | | | | | | | |
| I-1 | 38" | 99" | 240" | 240" | | | |
| I-2 | 45" | 70" | 240" | 240" | | | |
| I-3 | 38" | 92" | 240" | 180" | 240" | | |
| I-4 | 49" | 240" | 240" | | | | |
| I-5 | 58" | 240" | 240" | | | | |
| I-6 | 40" | 160" | 240" | 128" | 240" | | |
| I-7 | 240" | 152" | 105" | 144" | 240" | | |
| I-8 | 96" | 73" | 240" | 240" | | | |
| I-9 | | | | | | | |
| II-1 | 240" | 240" | | | | | |
| II-2 | 240" | 234" | 240" | | | | |
| II-3 | 41" | 240" | 240" | | | | |
| II-4 | 92" | 142" | 240" | 240" | | | |
| II-5 | 144" | 240" | 240" | | | | |
| II-6 | 44" | 240" | 240" | | | | |
| II-7 | 240" | 240" | | | | | |
| II-8 | 240" | 240" | | | | | |
| II-9 | | | | | | | |
| III-1 | 240" | 240" | | | | | |
| III-2 | 58" | 240" | 240" | | | | |
| III-3 | 140" | 240" | | | | | |
| III-4 | 199" | 70" | 240" | 209" | 240" | | |
| III-5 | 46" | 53" | 240" | 240" | | | |
| III-6 * | 62" | 102" | 36" | 140" | 98" | 292" | 358" |
| III-7 | 42" | 240" | 240" | | | | |
| III-8 | 59" | 240" | 240" | | | | |
| III-9 | 28" | 113" | 240" | 240" | | | |
| IV-1 | 140" | 240" | 240" | | | | |
| IV-2 | 16" | 240" | 240" | | | | |
| IV-3 | 240" | 50" | 240" | | | | |
| IV-4 | 164" | 240" | 240" | | | | |

APÊNDICE B – Ficha de avaliação do 2º dia de treino dos camundongos no teste da barra giratória.

Condicionamento

CONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS

SUBSTANCIA TESTADA: Obs^a METODOLOGIA: _____

DATA: _____

| Grupo/animal | Tempo 1 | Tempo 2 | Tempo 3 | Tempo 4 | Tempo 5 | Tempo 6 | Tempo 7 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| I-1 | 240" | 240" | | | | | |
| I-2 | 100" | 224" | 240" | 240" | | | |
| I-3 | 240" | 240" | | | | | |
| I-4 | 240" | 240" | | | | | |
| I-5 | 240" | 240" | | | | | |
| I-6 | 240" | 240" | | | | | |
| I-7 | 240" | 240" | | | | | |
| I-8 | 73" | 240" | 240" | | | | |
| I-9 | 240" | 240" | | | | | |
| I-10 | 240" | 240" | | | | | |
| I-11 | 240" | 240" | | | | | |
| I-12 | 240" | 240" | | | | | |
| I-13 | 240" | 72" | 240" | | | | |
| I-14 | 240" | 240" | | | | | |
| I-15 | 240" | 240" | | | | | |
| I-16 | 240" | 240" | | | | | |
| I-17 | 240" | 240" | | | | | |
| I-18 | 240" | 240" | | | | | |
| II-1 | 240" | 240" | | | | | |
| II-2 | 240" | 40" | 240" | | | | |
| II-3 | 240" | 240" | | | | | |
| II-4 | 199" | 240" | 108" | 240" | | | |
| II-5 | 240" | 240" | | | | | |
| II-6 | 240" | 240" | | | | | |
| II-7 | 240" | 240" | | | | | |
| II-8 | 30" | 240" | 240" | | | | |
| III-1 | 92" | 240" | 240" | | | | |
| III-2 | 89" | 40" | 42" | 240" | 240" | | |
| III-3 | 240" | 240" | | | | | |
| III-4 | 130" | 240" | 240" | | | | |
| III-5 | 240" | 240" | | | | | |
| III-6 | 240" | 48" | 240" | | | | |
| III-7 | 240" | 240" | | | | | |
| III-8 | 240" | 240" | | | | | |
| III-9 | 122" | 240" | 240" | | | | |
| IV-1 | 240" | 240" | | | | | |
| IV-2 | 240" | 240" | | | | | |
| IV-3 | 240" | 240" | | | | | |

ANEXO – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto n. 055/2013

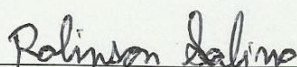
TÍTULO: Investigação da atividade hipnótico-sedativa e do mecanismo de ação ansiolítico do óleo essencial de *Citrus limon* (L.) Burm. F. em camundongos

RESPONSÁVEL: Magna Suzana Alexandre Moreira

OBJETIVO: Investigar a atividade hipnótico-sedativa e o mecanismo de ação ansiolítico do óleo essencial das cascas do fruto de *C. limon*, contribuindo, assim, para a pesquisa de produtos naturais de uso popular.

SITUAÇÃO: Aprovado

Maceió, 30 de setembro de 2013.



Robinson Sabino da Silva

Coordenador da CEUA/UFAL

Robinson Sabino da Silva
Coordenador da CEUA-UFAL
Comissão de Ética no Uso de Animais