

**UNIVERSIDADE METODISTA DE SÃO PAULO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA DA SAÚDE**

*THAIS VOLPIANO ARRUDA*

**EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) E  
*PETITGRAIN* (*Citrus aurantium* L.) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE  
ATIVIDADE MOTORA, DEPRESSÃO, ANSIEDADE E APRENDIZADO EM RATOS**

**SÃO BERNARDO DO CAMPO**

**2014**

*THAIS VOLPIANO ARRUDA*

**EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*) E  
*PETITGRAIN* (*Citrus aurantium* L.) EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE  
ATIVIDADE MOTORA, DEPRESSÃO, ANSIEDADE E APRENDIZADO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Psicologia da Saúde  
da Universidade Metodista de São Paulo.  
Mestrado em Psicologia da Saúde. Área  
de Concentração: Prevenção e  
Tratamento.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Pádua  
Serafim

**SÃO BERNARDO DO CAMPO**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ar69e	<p>Arruda, Thais Volpiano</p> <p>Efeitos dos óleos essenciais de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) e <i>petitgrain</i> (<i>Citrus aurantium</i> L.) em modelos comportamentais de atividade motora, depressão, ansiedade e aprendizado em ratos / Thais Volpiano Arruda. 2014. 77 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Psicologia da Saúde) --Faculdade da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, 2014. Orientação de: Antonio de Pádua Serafim.</p> <p>1. <i>Rosmarinus officinalis</i> 2. <i>Citrus aurantium</i> L. 3. Depressão 4. Ansiedade 5. Aprendizado 6. Atividade motora I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDD 157.9</p>
-------	---

A dissertação de mestrado sob o título: "**Efeitos dos Óleos Essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Petitgrain (*Citrus aurantium* L.) em Modelos Comportamentais de Atividade Motora, Depressão, Ansiedade e Aprendizado em Ratos**", elaborada por **Thais Volpiano Arruda** foi apresentada e aprovada em 11 de Setembro de 2014, perante banca examinadora composta por Prof. Dr. Antonio de Pádua Serafim (Presidente/UMESP), Profa. Dra. Maria Geralda Viana Heleno (Titular/UMESP) e Prof. Dr. Daniel Martins de Barros (Titular/USP).

---

**Prof. Dr. Antonio de Pádua Serafim**  
**Orientador e Presidente da Banca Examinadora**

---

**Profa. Dra. Maria Geralda Viana Heleno**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação**

**Programa:** Pós Graduação em Psicologia da Saúde

**Área de Concentração:** Psicologia da Saúde

**Linha de Pesquisa:** Prevenção e Tratamento

*Mãe e pai, com todo meu amor, dedico a vocês  
o início de minha nova jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Universo que conspira sempre a meu favor e me traz as melhores experiências para o meu contínuo crescimento pessoal e profissional.

À minha mãe e ao meu pai por sempre acreditarem no meu potencial, me apoiarem com todo seu amor nas decisões que tive que tomar ao longo do processo de criação deste trabalho e por serem minhas inspirações de sabedoria. À minha tia Nena por todas as suas orações.

Ao meu amigo Rafael por ter tido a paciência em me auxiliar na criação das figuras para que este trabalho ficasse não menos que incrível. Às minhas amigas Karine e Franciele por me escutarem nos momentos de dúvida e conseguirem, ainda assim, me fazer rir e enxergar novamente o caminho para seguir adiante.

Ao Prof. Dr. Isaltino Marcelo Conceição por me permitir ousar na criação deste trabalho com o tema que eu amo, por acreditar que eu seria capaz de fazer tudo o que me foi proposto e por me orientar durante este processo, meus sinceros agradecimentos. À Profa. Dra. Maria Geralda Viana Heleno por ter aberto as portas para que eu pudesse explorar um novo mundo, o da Psicologia da Saúde. Ao Prof. Dr. Renato Teodoro Ramos por me acolher nos meus primeiros passos na construção deste trabalho. À Profa. Dra. Marília Martins Vizzotto e Prof. Dr. Manuel Morgado Rezende por suas palavras de sabedoria e inspiração. À Profa. Dra. Adriana Regina Rubio por ter me apresentado a área comportamental e permitido que eu fluísse através dela e, ao Prof. Dr. Daniel Martins de Barros pelas novas ideias, agradeço a todos vocês de coração, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Antonio de Pádua Serafim, por assumir junto comigo o leme deste grande navio, por içar junto comigo suas velas, por observar a bússola e me guiar pela segunda estrela à direita e então me permitir seguir direto até o amanhecer, por ser corajoso e enfrentar junto comigo este novo mundo, por acreditar que eu encontraria "terra à vista", enfim, por me orientar e me permitir ser audaciosa neste caminho que escolhi, à você eu dedico minha sincera gratidão.

Agradeço aos animais que foram utilizados neste trabalho e que permitiram, através de suas vidas, o descobrimento dos resultados aqui apresentados, com todo meu amor e respeito, muito obrigada.

E a mim mesma, por ousar seguir adiante nos momentos difíceis, por ter consciência de onde buscar forças e por sempre acreditar em meu poder pessoal, muito obrigada.

*Toi, qui crois que la terre est ronde  
Tu ne te doutes pas une seconde  
Que ton histoire, pourrait changer*

*Si tu ne veux plus rester dans l'ombre  
Avant qu'un beau jour ne fonde  
Tous tes espoirs, que tu te sentes un peu  
partout étranger*

*Viens, il existe un nouveau monde  
Où la lune est toujours blonde  
Et les étoiles restent allumées*

*Ne crois pas tout ce qu'on raconte  
Ce qu'on peut lire dans les comtes  
Si tu veux voir la liberté*

*Prends entre tes mains ton destin  
Mets les voiles dès ce matin  
Pour la planète où tu veux vivre*

*Prends le large rien ne te retient  
C'est ta vie elle t'appartient  
Si tu veux être un homme libre*

*Viens, tu verras la route est longue  
Parfois le ciel devient sombre  
Mais les nuages sont encore loin*

*Même si de fatigue tu tombes  
Dans ta course vagabonde  
Aie le courage de continuer ton chemin*

*Dis toi que rien n'est écrit  
L'avenir se construit  
Il n'y a que toi pour savoir quelles sont  
vraiment tes envies  
Il n'y a que toi pour savoir quel sens donner  
à ta vie*

*Prends entre tes mains ton destin  
Mets les voiles dès ce matin  
Pour la planète où tu veux vivre*

*Prends le large rien ne te retient  
C'est ta vie elle t'appartient  
Si tu veux être un homme libre*

*Rien qu'un homme enfin libre, enfin libre,  
enfin libre*

*Un homme libre - Planète au Trésor  
Disney*

Você que acredita que a Terra é redonda  
Você não duvida por um segundo  
Que a sua história, poderia mudar

Se você não quer mais ficar na sombra  
Antes que um belo dia derreta  
Todas as suas esperanças, que você se sinta  
um pouco por todo lado estrangeiro

Venha, existe um novo mundo  
Onde a lua é sempre loira  
E as estrelas permanecem iluminadas

Não acredite em tudo que contam  
Naquilo que podemos ler nos contos  
Se você quiser ver, a liberdade

Tome seu destino em suas mãos  
Ice as velas logo pela manhã  
Por um planeta onde você quer viver

Caia no mundo, nada te retém  
É a sua vida, ela te pertence  
Se você quiser ser um homem livre

Venha, você verá, o caminho é longo  
Às vezes o céu escurece  
Mas as nuvens ainda estão longe

Mesmo que a fadiga te derrube  
Em seu caminho vagabundo  
Tenha coragem de continuar o seu caminho

Diga a você mesmo que nada está escrito  
O futuro se constrói  
Não existe ninguém além de você para saber  
quais são, verdadeiramente, os seus desejos  
Não existe ninguém além de você para saber  
qual direção dar à sua vida

Tome seu destino em suas mãos  
Ice as velas logo pela manhã  
Por um planeta onde você quer viver

Caia no mundo, nada te retém  
É a sua vida, ela te pertence  
Se você quiser ser um homem livre

Nada além de um homem enfim livre, enfim  
livre, enfim livre

Um homem livre - Planeta do Tesouro  
Disney  
Tradução livre pela autora desta dissertação.

## RESUMO

Apesar de várias evidências do potencial terapêutico dos óleos essenciais em diversas patologias, inclusive em transtornos mentais, os estudos científicos que comprovam esse potencial ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar de forma sistemática os efeitos dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *petitgrain* (*Citrus aurantium* L.) em modelos animais com ratos nos seguintes parâmetros: atividade motora, depressão, ansiedade e aprendizado. Método: foram utilizados 297 ratos em todo o estudo, sendo: 54 no piloto 1; 66 no piloto 2; 36 no campo aberto; 36 na esQUIVA discriminativa; 36 no teste de enterrar esferas; 33 na nataÇÃO forçada e 36 no experimento de aprendizagem. Os principais resultados revelaram que: ratos tratados com 100mg/kg (i.p.) de óleo essencial de alecrim não apresentaram diferença na atividade motora avaliada em campo aberto ( $p=0.213$  teste de Mann-Whitney), tampouco na aprendizagem da resposta de pressão à barra em caixa de Skinner ( $p=0.098$  teste de Mann-Whitney), comparados aos ratos controles que receberam salina 0,9% (1 mL/kg), porém esse mesmo tratamento foi efetivo em modelos de depressão ( $p=0.006$  teste de Mann-Whitney) e ansiedade (teste de esconder esferas -  $p=0.003$  ANOVA). No que diz respeito ao óleo essencial de *petitgrain* administrado em ratos na dose de 30mg/kg (i.p.), não observou-se diferença na atividade motora ( $p=0.795$  teste de Mann-Whitney), contudo obteve-se efeito ansiolítico (teste de esconder esferas -  $p=0.028$  ANOVA) e antidepressivo ( $p=0.001$  teste de Mann-Whitney) em relação ao controle. Ademais, o óleo de *petitgrain* proporcionou uma melhora na aprendizagem ( $p=0.002$  teste de Mann-Whitney) se comparado com os animais do grupo controle e os animais tratados com alecrim. Dessa forma podemos concluir que ambos os óleos estudados (alecrim e *petitgrain*) apresentaram atividades ansiolítica e antidepressiva nos testes realizados e apenas o óleo de *petitgrain* produziu efeitos na aprendizagem dos animais.

Palavras-chave: óleos essenciais, *Rosmarinus officinalis*, *Citrus aurantium* L., depressão, ansiedade, aprendizado, atividade motora.

## ABSTRACT

Despite the ample evidence of the therapeutic potential of the essential oils in various diseases, including mental disorders, scientific studies that prove this potential remain still scarce. Thus, our objective was to evaluate systematically the effects of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and *petitgrain* (*Citrus aurantium* L.) in animal models with rats the following parameters: motor activity, depression, anxiety and learning. Method: 297 rats were used throughout the study, as follows: 54 in the first pilot; 66 in the second pilot; 36 in the open field; 36 in discriminative avoidance; 36 balls in burying test; 33 in the forced swimming and 36 in the learning experiment. The main results show that: rats treated with 100mg/kg (i.p.) of rosemary essential oil showed no difference in motor activity evaluated in the open field test ( $p = 0.213$  Mann-Whitney), either on learning in the Skinner box ( $p=0.098$  Mann-Whitney test), compared to control group that received saline 0.9% (1mL/kg), even though this treatment was effective in models of depression ( $p=0.006$  Mann Whitney) and anxiety (test hide spheres -  $p=0.003$  ANOVA). With respect to the essential oil of *petitgrain* administered to rats at a dose of 30mg/kg (i.p.), there was no difference in motor activity ( $p=0.795$  Mann-Whitney test), however it was obtained anxiolytic (marble-burying test -  $p=0.028$  ANOVA) and antidepressant effect ( $p=0.001$  Mann-Whitney) compared to the control. Moreover, *petitgrain* oil provided an improvement in learning ( $p=0.002$  Mann-Whitney) compared to both the control group and the animals treated with rosemary. Thus we can conclude that both studied oils (rosemary and *petitgrain*) acted as anxiolytic and antidepressant agents in the performed tests and, in addition, only *petitgrain* oil also produced effect on the learning task.

Keywords: essential oils, *Rosmarinus officinalis*, *Citrus aurantium* L., depression, anxiety, learning, motor activity.

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1. HISTÓRIA DOS ÓLEOS AROMÁTICOS .....	1
2. ÓLEOS ESSENCIAIS: VISÃO GERAL .....	2
2.1. AROMATERAPIA .....	2
2.2. ESTRUTURA QUÍMICA .....	3
2.2.1. COMPOSTOS TERPÊNICOS .....	4
2.2.2. DERIVADOS DE FENILPROPANO .....	4
2.3. FORMAS DE APLICAÇÃO .....	5
2.4. AÇÕES E POTENCIAL TERAPÊUTICO .....	6
2.4.1. AÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	6
3. DEFINIÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	9
4. ÓLEOS DE ALECRIM E <i>PETITGRAIN</i> .....	9
4.1. ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM ( <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> ) .....	10
4.1.1. AÇÕES GERAIS .....	10
4.1.2. AÇÕES SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	11
4.2. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>PETITGRAIN</i> ( <i>CITRUS AURANTIUM L.</i> ) .....	11
4.2.1. AÇÕES GERAIS .....	12
4.2.2. AÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
5. OBJETIVO GERAL .....	14
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>MÉTODO</b> .....	<b>15</b>
6. SUJEITOS .....	15
7. CUIDADOS ÉTICOS .....	15
8. EUTANÁSIA .....	15
9. LOCAL DA PESQUISA .....	16
10. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
11. PROCEDIMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DOS ÓLEOS .....	16
12. MODELOS ANIMAIS .....	17
12.1. CAMPO ABERTO - ANÁLISE DA ATIVIDADE MOTORA .....	17
12.2. ESQUIVA DISCRIMINATIVA EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....	18
12.3. EXPERIMENTO DE ENTERRAR ESFERAS .....	20
12.4. NATAÇÃO FORÇADA .....	21
12.5. EXPERIMENTO DE APRENDIZAGEM .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>57</b>

## INTRODUÇÃO

### 1. História dos Óleos Aromáticos

O conhecimento do uso de plantas na antiguidade se fez através de tentativas de acerto e erro pelos ancestrais da civilização humana. Com o passar do tempo, algumas ervas começaram a ser utilizadas na culinária, outras eram queimadas e oferecidas em rituais à Mãe Terra e aos Deuses além de serem utilizadas para fins medicinais.

Durante o período neolítico (4000 a.C.) o homem extraía óleos vegetais de plantas como: olivas, mamonas e gergelim. Da combinação de óleos extraídos de plantas fragrantas originou-se a pomada neolítica (CORAZZA, 2002).

Uma civilização que utilizava muito dos conhecimentos sobre as essências aromáticas eram os egípcios que as aplicavam em banhos com unguentos e unções alquímicas em seus processos de enfaixamento e mumificação. Ao longo de 1500 anos após a oitava dinastia, os egípcios aperfeiçoaram seus conhecimentos das propriedades medicinais dos óleos aromáticos e de suas perfumarias, além de aprimorarem a elaboração dos unguentos e dos óleos. Entretanto, ainda não sabiam distinguir o óleo aromático medicinal dos perfumes e muitas vezes o óleo servia para ambos os propósitos. Em 1922, quando a tumba de Tutankamon foi aberta, vários vasos e potes de perfumes foram descobertos, alguns contendo unguentos solidificados. Acredita-se que estes unguentos eram de difícil obtenção e por isso eram usados apenas pelas famílias reais e sumos sacerdotes (TISSERAND, 1985).

Os sacerdotes pioneiros na utilização dos óleos essenciais foram os primeiros a usar a aromaterapia nas antigas civilizações. Quando os óleos aromáticos para fins medicinais se tornaram mais conhecidos, passaram a ser empregados pelos médicos da época. Na Babilônia o óleo essencial mais utilizado pelos médicos era o cedro o qual fazia parte da rotina de cuidados com a saúde (CORAZZA, 2002).

Os gregos aplicaram os conhecimentos adquiridos pelos egípcios sobre as propriedades dos óleos aromáticos em sua perfumaria e também na cura de ferimentos. O médico Marestheus ficou convencido de que certas plantas aromáticas possuíam características estimulantes ou sedativas e mencionou que o óleo de rosa continha propriedade refrescante e revigorante para a fadiga mental. Por outro lado, comentou que o óleo de lírio quando utilizado em quantidade significativa, causava uma letargia nas funções cerebrais (TISSERAND, 1985).

No final do século X, um médico árabe conhecido como Avicenna, recebeu os créditos pela criação do método de destilação dos óleos aromáticos. O mesmo realizou seu

experimento de destilação com a rosa (*Rosa centifolia*), obtendo a fragrância denominada “água de rosas”, a qual se propagou por toda a Europa na época das Cruzadas (TISSERAND, 1985).

Durante o século XVI, Paracelso pesquisava um componente de plantas que conseguisse produzir a cura, o qual era considerado como “a alma da planta”, sendo denominada de quintessência. Posteriormente os alquimistas passaram a chamar de essência o óleo volátil presente nas plantas. Entretanto, ao perceberem que a composição química do óleo extraído da planta era diferente daquela que estava dentro da mesma, viu-se a necessidade de diferenciá-los, deixando o termo essência ao óleo ainda presente na planta e óleo essencial após sua extração (SILVA, 1998).

Na cidade de Grasse (sul da França), século XIX, a indústria de perfumes confeccionava suas fragrâncias quase inteiramente de essências naturais. Com o crescimento da indústria, algumas companhias passaram a pesquisar novas aplicações para o uso das essências, entre elas estavam as pesquisas de Gattefossé. René Maurice Gattefossé foi um químico interessado em pesquisar a utilização cosmética dos óleos essenciais (TISSERAND, 1985). Ao longo de seu trabalho, ocorreram dois fatos principais que ampliaram seu interesse quanto aos óleos essenciais. Primeiramente, ele percebeu que a ação antisséptica dos óleos era superior àquela dos antissépticos químicos utilizados na época e em segundo lugar, Gattefossé descobriu a eficácia do óleo essencial de lavanda puro no tratamento de queimaduras. Essa descoberta ocorreu acidentalmente em seu laboratório, quando, numa explosão, queimou uma de suas mãos e imediatamente mergulhou-a no óleo essencial de lavanda puro, ficando surpreso ao perceber que a queimadura curou-se rapidamente, sem apresentar sinais de infecção e sem deixar nenhuma cicatriz (TISSERAND, 1985).

## **2. Óleos Essenciais: visão geral**

### **2.1. Aromaterapia**

Aparentemente o termo “Aromaterapia” foi empregado pela primeira vez por Gattefossé em um de seus artigos, no qual defendia a ideia de que as substâncias naturais deveriam ser utilizadas preservando sua fórmula completa e inalterada, uma vez que seus próprios experimentos pareciam revelar que alguns componentes dos óleos quando utilizados individualmente não eram tão efetivos quanto a fórmula completa da essência (TISSERAND, 1985).

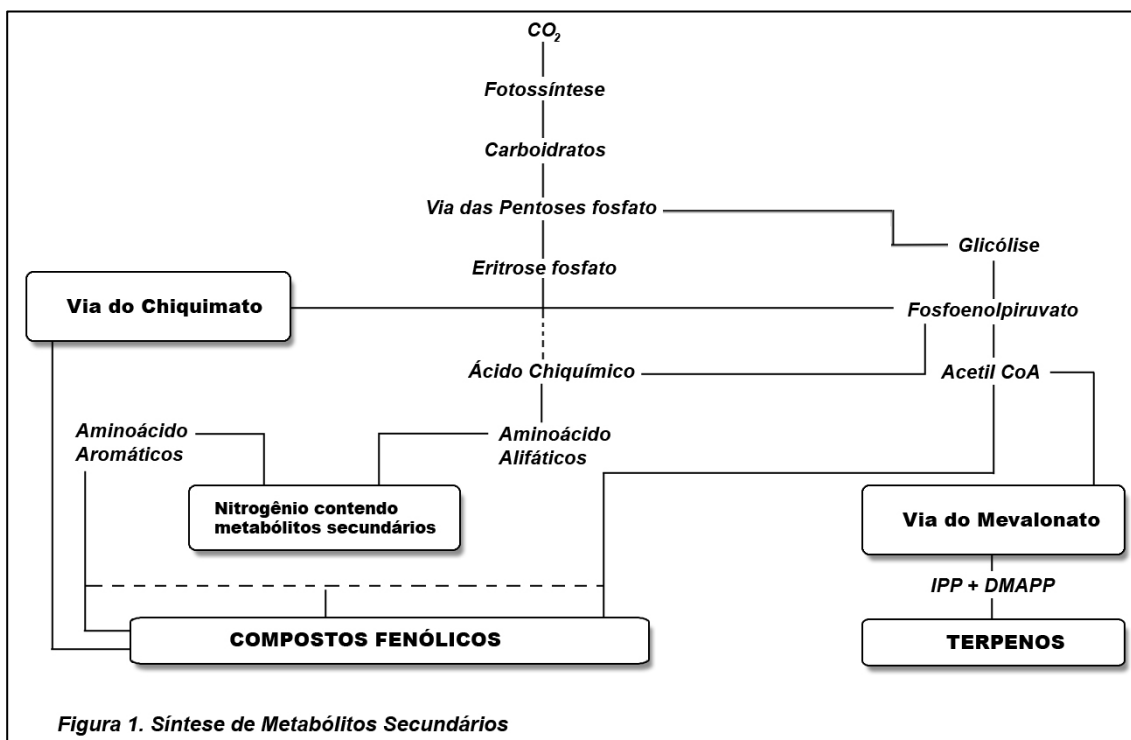
O conceito de Aromaterapia, segundo o entendimento de Gattefossé, é um tratamento por meio dos óleos essenciais. Estes óleos aromáticos são extraídos pelo método de destilação

das folhas, flores e cascas das plantas, sendo seus efeitos terapêuticos (sejam eles físicos ou psíquicos), resultados dos princípios ativos existentes nesses óleos voláteis (SILVA, 1998).

## 2.2. Estrutura química

A reação de fotossíntese realizada pelas plantas é um processo denominado de metabolismo primário, ou seja, a planta não sobreviveria em seu ambiente sem a fotossíntese e, como consequência, sem a formação de seus produtos finais. Os outros compostos produzidos que não estejam relacionados com o processo de fotossíntese são chamados de metabólitos secundários, como por exemplo: alcaloides, glicosídeos, saponinas, taninos, terpenos entre outros (PRICE S.; PRICE L., 2007).

Desta maneira, sabe-se que os óleos essenciais derivam do metabolismo secundário das plantas. Sua estrutura química é composta principalmente por átomos de carbono, de hidrogênio e oxigênio (SILVA, 1998). Assim, é possível direcionar os óleos essenciais a duas categorias principais, sendo elas: (1) terpenos e seus derivados; e (2) derivados de fenilpropano, sendo que o primeiro é produto da via do mevalonato e o segundo da via do chiquimato (ver Figura 1 abaixo) (LAVABRE, 2005; PRICE S.; PRICE L., 2007).



Fonte: Price, S. e Price, L. (2007).

### **2.2.1. Compostos Terpênicos**

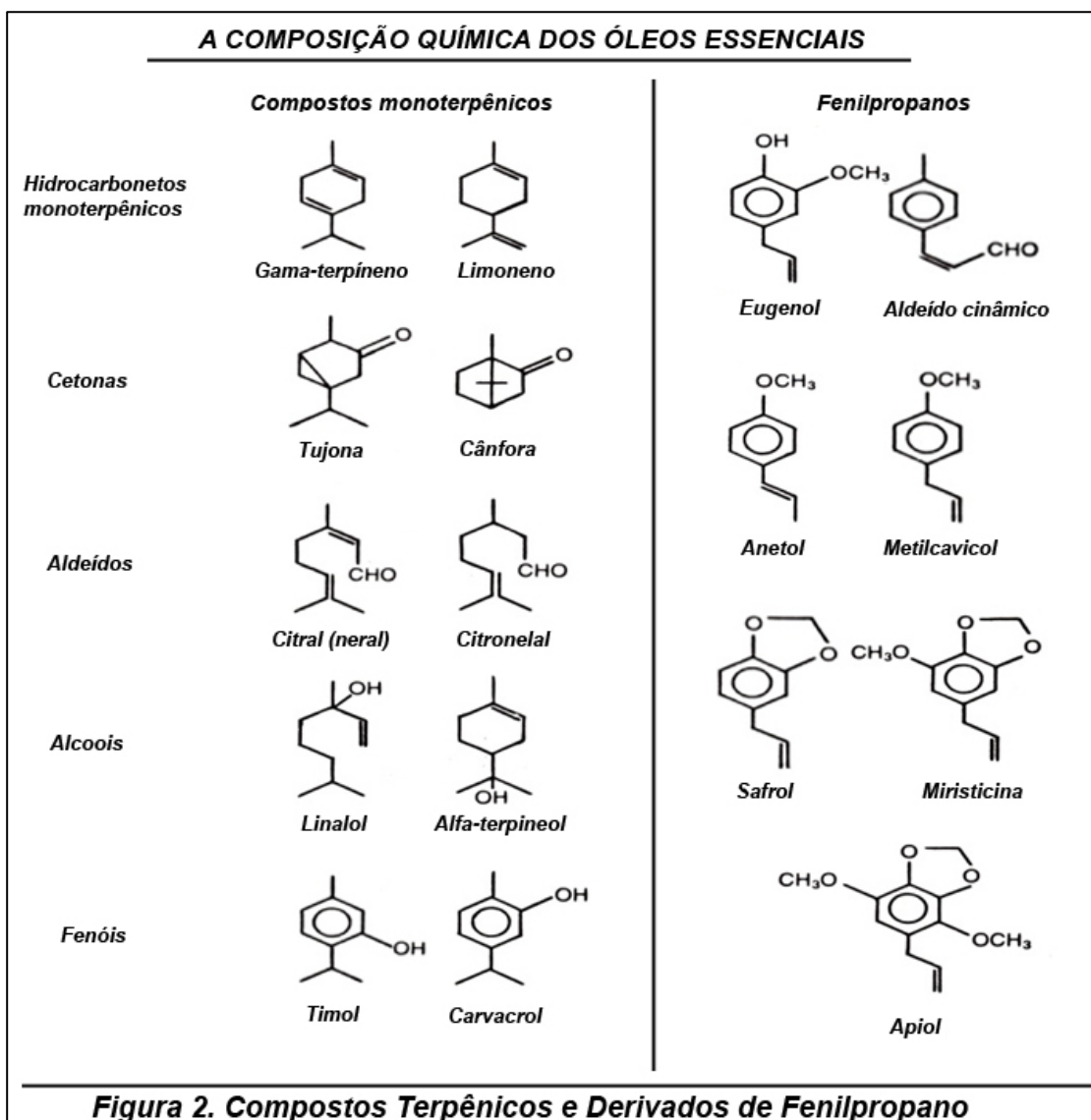
Os compostos terpênicos são considerados hidrocarbonetos por apresentarem apenas átomos de carbono e hidrogênio em sua estrutura química. Os terpenos possuem um núcleo principal de isopreno, uma cadeia de cinco átomos de carbono. Os sesquiterpenos são outras importantes moléculas que apresentam o isopreno como núcleo principal e derivam da mesma via de biossíntese dos terpenos (SILVA, 1998; LAVABRE, 2005; PRICE S.; PRICE L., 2007).

Conforme há o agrupamento das moléculas de isopreno, o composto químico formado possui diferentes estruturas e nomenclaturas. Os monoterpenos são formados por duas moléculas de isoprenos, ou seja, possuem dez átomos de carbono e são comumente encontrados nos óleos essenciais, enquanto que os sesquiterpenos são constituídos por três unidades de isopreno (tendo quinze átomos de carbono) e os diterpenos compostos por quatro isoprenos (possuindo vinte átomos de carbono). Moléculas superiores aos diterpenos não são encontradas nos óleos essenciais, pois seu peso molecular excede o limite alcançado pelo processo de destilação. Além disso, os hidrocarbonetos possuem junto à sua estrutura um grupamento funcional, que contribui para definir as propriedades de seus óleos essenciais (PRICE S.; PRICE L., 2007).

### **2.2.2. Derivados de Fenilpropano**

Os derivados de fenilpropano são formados pela via do chiquimato e contém em sua estrutura uma cadeia lateral com três átomos de carbono ligados a um anel fenílico, formando uma molécula com nove átomos de carbono (SILVA, 1998; PRICE S.; PRICE L., 2007).

As moléculas de fenilpropano também se modificam com a interação dos grupamentos funcionais, proporcionando algumas alterações em suas propriedades (LAVABRE, 2005). Dentre os compostos químicos podemos citar: eugenol (encontrado no cravo e na canela) cujas propriedades envolvem ação antisséptica, fungicida e anestésica; anetol (presente no anis, manjerição e salsa) que possui propriedades estimulantes das secreções gástricas e salivares, entre outros (ver Figura 2 abaixo) (SILVA, 1998).



**Figura 2. Compostos Terpênicos e Derivados de Fenilpropano**

Fonte: Lavabre (2005).

### 2.3. Formas de aplicação

Os métodos mais conhecidos para aplicação dos óleos essenciais são as massagens e os banhos aromáticos (TISSERAND, 1985; SILVA, 1998; LAVABRE, 2005).

Além da massagem e do banho aromático, existem outras maneiras de aplicação dos óleos essenciais, como por exemplo, a aromatização ambiental, para a qual se utiliza um aromatizador elétrico ou um rechô que, ao serem aquecidos, volatilizam os óleos essenciais pelo ambiente. Há ainda o método de inalação, que pode ser seca, pingando o óleo essencial num lenço e em seguida direcionando o lenço ao nariz sem encostá-lo, ou úmida quando se pinga o óleo em água quente e inala-se o vapor (SILVA, 1998).

## 2.4. Ações e Potencial terapêutico

Os óleos essenciais possuem um grande potencial terapêutico. Várias são as propriedades dos óleos essenciais já estudadas. Dentre elas podemos citar: a) ação renal, onde o óleo de junípero estimula filtração glomerular e aumenta a excreção de sódio e potássio (TISSERAND, 1985), bem como atua como protetor renal ao reverter completamente a diminuição do *clearance* de linulina causada por uma droga que evita a rejeição de tecidos transplantados (BUTANI *et al.*, 2003); b) ação sobre o trato digestório, sendo que a hortelã-pimenta e o cardamomo estimulam a secreção salivar e gástrica, além de possuírem ações carminativa (facilita a liberação de gases do estômago e do intestino), antiespasmódica e digestiva (TISSERAND, 1985; LENT, 2008); c) ações endócrinas: os óleos essenciais de gerânio, alecrim e sálvia são considerados estimulantes do córtex da adrenal (SILVA, 1998), enquanto o óleo de hortelã atua como estimulante da glândula hipófise (GATTEFOSSÉ, 1928 *apud* TISSERAND, 1985); d) ações antimicrobianas: Azerêdo *et al.* (2012) pesquisaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim contra uma bactéria gram-negativa (*Aeromonas hydrophila*) e constataram que o óleo aumentou a liberação de material citoplasmático, bem como alterou a morfologia da bactéria inibindo sua viabilidade; e) ações anti-inflamatórias: o óleo de *tea tree* (*Melaleuca alternifolia*) apresenta atividade anti-inflamatória em testes com camundongos, nos quais seus componentes químicos (terpineno-4-ol e  $\alpha$ -terpineol) regularam o edema associado com uma resposta de hipersensibilidade de contato (BRAND *et al.*, 2002).

Além das ações citadas os óleos essenciais podem ser destacados por sua ação no sistema nervoso central. Os óleos essenciais podem tanto estimular como deprimir a atividade neuronal. Nesse sentido, os óleos considerados estimulantes têm potencial terapêutico para atuar em transtornos de depressão, na fadiga, em distúrbios de memória, entre outros (TISSERAND, 1985). Por outro lado óleos depressores da atividade cerebral podem auxiliar no combate à insônia e estados de ansiedade como nervosismo e histeria (TISSERAND, 1985).

### 2.4.1. Ações no Sistema Nervoso Central

As ações dos óleos essenciais foram testadas em diversos modelos animais de psicopatologias, tais como depressão, ansiedade, memória, atividade motora, entre outros.

Seol *et al.* (2010), utilizaram os óleos de camomila, sálvia, alecrim e lavanda no teste de natação forçada em ratos (modelo de depressão em animais - PORSOLT *et al.*, 1977a). Todos os óleos injetados intraperitonealmente reduziram o tempo em que os animais

permaneceram imóveis na natação forçada, quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma ação antidepressiva dessas substâncias. No caso do óleo de sálvia (*Salvia sclarea*), a ação antidepressiva foi bloqueada pela administração prévia de SCH-23390 (antagonista seletivo do receptor dopaminérgico - D1) ou a haloperidol (antagonista dos receptores dopaminérgicos - D2, D3 e D4).

No mesmo sentido, em uma pesquisa realizada com roedores, Bradley *et al.* (2007) testaram os efeitos da exposição do óleo de lavanda de duas maneiras: durante 24 horas e de forma repetida (exposição durante 2 semanas) no labirinto em cruz elevado (modelo de ansiedade em animais - PELLOW *et al.* 1985). Constataram que a exposição por 24 horas mostrou um efeito ansiolítico leve, enquanto que a exposição durante 2 semanas foi mais eficaz, apresentando um aumento no número de entradas e de mergulhos realizados no braço aberto, e ao compararem com o diazepam, concluíram que a exposição crônica do óleo essencial de lavanda teve efeito similar à administração repetida do diazepam (uma droga ansiolítica clássica - STERNBACH, 1979). Reforçando as propriedades ansiolíticas dos óleos essenciais, Almeida *et al.* (2004), utilizaram o óleo essencial de rosa, também no labirinto em cruz elevado, e verificaram que o mesmo possuía ação ansiolítica similar ao diazepam.

Com relação aos óleos cítricos, Ceccarelli *et al.* (2004) realizaram um estudo em que expuseram ratos de ambos os sexos ao óleo essencial de limão por 12 dias dentro da gaiola moradia. Após a exposição realizaram testes de ansiedade e dor. Esses autores observaram que os animais permaneceram menos tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicando atividade ansiogênica dessa substância. Além disso, uma ação antinociceptiva apenas nas fêmeas também foi encontrada. Os autores acreditam que o hipotálamo é o principal centro de atuação do óleo essencial de limão, quando utilizado por inalação, tendo em vista a conhecida relação funcional entre o sistema olfatório e os núcleos hipotalâmicos.

Por outro lado, em outro estudo, Komiya, Takeuchi e Harada (2006) utilizaram os óleos de lavanda, rosa e limão nos modelos de depressão (natação forçada), atividade motora (campo aberto) e ansiedade (labirinto em cruz elevado) em camundongos. O óleo de limão foi administrado por inalação, durante 90 min antes da realização dos testes, foi efetivo nos três modelos, promovendo diminuição no tempo de imobilidade na natação forçada; significativa redução na atividade locomotora no campo aberto e um aumento no número de entradas e no tempo de permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Esses dados são sugestivos de uma ação antidepressiva, depressora de atividade motora e ansiolítica dessa substância. Aprofundando as investigações, esses mesmos autores sugerem que seus efeitos

foram resultantes de uma interferência com a liberação de diferentes neurotransmissores: serotonina, dopamina e ácido gama-aminobutírico (GABA).

Comparando os dados de Komiya, Takeuchi e Harada (2006) com os resultados obtidos por Ceccarelli *et al.* (2004), podemos supor que o tempo de exposição aos óleos essenciais é um fator importante a ser considerado, podendo inclusive levar a resultados opostos.

Ainda com relação aos óleos cítricos, Pultrini, Galindo e Costa (2006) utilizaram o óleo de laranja (*Citrus aurantium* L.) nas doses de 500mg/kg e 1000mg/kg em dois modelos para estudo de ansiedade: 1) teste claro/escuro (*light-dark box*) que consiste em analisar o comportamento aversivo e inato do rato a um estímulo luminoso; 2) teste de esconder esferas (*marble-burying*) que consiste em colocar os ratos em uma caixa com discos de vidro posicionados sobre sua cama de serragem e verificar seu comportamento de enterrar os discos. A ação de ambas as doses do óleo de laranja foi comparável àquela do diazepam no teste do claro/escuro e foram superiores aos efeitos dele no teste de esconder esferas.

Pesquisas com humanos também são realizadas. Assim podemos citar o trabalho de Lehrner *et al.* (2005) que realizaram uma pesquisa em um consultório odontológico, onde colocaram os óleos essenciais de lavanda e de laranja (em ambientes separados e em momentos distintos) num aromatizador e constataram através de questionários (*State-Trait Anxiety Inventory* (STAI) que avalia ansiedade traço e estado; *Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen* (MDBF) que avalia o humor atual, o estado de alerta e a calma), que os pacientes expostos tanto ao óleo de lavanda quanto ao de laranja estavam menos ansiosos para a consulta, além de demonstrarem um nível maior de tranquilidade quando comparados aos do grupo controle, sugerindo que as ações ansiolíticas observadas em modelos animais têm correspondência também em humanos.

Em outro estudo envolvendo humanos, verificou-se a atividade de óleos essenciais de sálvia de diferentes espécies em processos cognitivos de memória e concluiu-se que o grupo de voluntários submetidos à essência do óleo de sálvia da espécie *Salvia officinalis* teve um melhor desempenho nos testes de memória quando comparado ao grupo controle (MOSS *et al.*, 2010). Resultado semelhante já havia sido obtido para o alecrim e lavanda, sendo o primeiro superior em melhorar o desempenho na qualidade da memória (MOSS *et al.*, 2003). Além disso, o mesmo grupo de pesquisa sugere que os efeitos observados em diferentes estudos devem resultar de uma combinação de diversos fatores, tais como farmacológicos, cognitivos e emocionais, chamando a atenção para a necessidade de uma investigação sistemática dessas substâncias (MOSS *et al.* 2008).

### 3. Definição dos Transtornos de Ansiedade e Depressão

Os transtornos de ansiedade e depressão podem ser conceituados de algumas maneiras diferentes através das diversas áreas da saúde como, por exemplo, através da farmacologia em que a hipótese mais aceita dos transtornos de ansiedade baseia-se no envolvimento dos neurotransmissores serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), o glutamato e o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA) (MARAZZITI et al., 2014) e, com relação aos transtornos depressivos, a hipótese mais aceita a respeito de seu mecanismo biológico é a teoria da deficiência de monoaminas, hipotetizando que os sintomas depressivos são decorrentes de níveis reduzidos de 5-HT e NA (HAMON; BLIER, 2013).

Outra maneira de se conceituar os transtornos de ansiedade e depressão é por meio da psiquiatria através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR) que discerne os diversos tipos de ansiedade e depressão de acordo com características psico-sociais e sintomas físicos observados em pacientes com os transtornos citados. Um exemplo de transtorno de ansiedade similar àquele provocado pelos modelos animais do presente estudo, seria a fobia específica que é conceituada como um medo acentuado e persistente de situações ou objetos claramente discerníveis e, quando o indivíduo é exposto ao estímulo fóbico, o mesmo apresenta uma resposta imediata de ansiedade (MANUAL, 2008). Com relação ao transtorno depressivo, pode-se citar o transtorno depressivo maior que é caracterizado por um ou mais episódios depressivos maiores, nos quais o indivíduo possui, essencialmente, um humor depressivo, perda do prazer pelas atividades que realiza ou ainda perda de interesse por um período mínimo de duas semanas, ainda, estes episódios podem estar acompanhados de alterações no apetite ou peso, diminuição da energia, dificuldades para pensar, entre outros (MANUAL, 2008).

### 4. Óleos de Alecrim e *Petitgrain*

Dentre os óleos essenciais podemos destacar os óleos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *petitgrain* (folhas de *Citrus aurantium* L.). Além de serem muito populares, devido ao seu preço, e de serem acessíveis à população em geral, esses óleos vêm sendo objetos de vários estudos farmacológicos buscando a comprovação científica de seus potenciais terapêuticos.

#### 4.1. Óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O alecrim é uma planta semiarbustiva podendo atingir até dois metros de altura. Ele é natural da região mediterrânea, sendo facilmente encontrado próximo aos litorais (CORAZZA, 2002). Na medicina popular o alecrim é utilizado pelos seus efeitos analgésicos, contra a constipação, entre outros. Sua folha é utilizada na culinária como condimento (STASI *et al.*, 2002) e é o elemento necessário para a extração do óleo essencial (SILVA, 1998).

##### 4.1.1. Ações gerais

Um dos efeitos mais comumente observados com o óleo de alecrim é sua ação antimicrobiana. O óleo essencial e dois de seus compostos ( $\alpha$ -pineno e 1,8-cineol) foram pesquisados por Jiang *et al.* (2011) em cepas bacterianas gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), gram-negativas (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) e células fúngicas (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*) através do teste de concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). Em seus resultados, o óleo se mostrou mais eficaz na ação antimicrobiana do que seus componentes  $\alpha$ -pineno e 1,8-cineol quando utilizados sozinhos. Os autores explicam que, provavelmente, pelo fato do óleo possuir uma mistura de componentes químicos, seus efeitos podem estar relacionados à sinergia entre os mesmos. Azerêdo *et al.* (2012) também pesquisaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim contra uma bactéria gram-negativa (*Aeromonas hydrophila*) e constataram, através da análise do consumo de glicose e observação por microscopia eletrônica que o óleo aumentou a liberação de material citoplasmático, alterou a morfologia da bactéria e reduziu seu consumo de glicose, inibindo assim sua viabilidade. Outros estudos também demonstram atividade semelhante (IRKIN; ABAY; AYDIN, 2011; ZAOUALI; BOUZAINÉ; BOUSSAÏD, 2010).

Além do efeito antimicrobiano, o óleo também apresenta ação anti-inflamatória e antinociceptiva, como é demonstrado no trabalho de Takaki *et al.* (2008). Nesse estudo observou-se que o óleo essencial de alecrim administrado por via oral em várias doses (250, 500 e 750mg/kg) exibiu uma atividade anti-inflamatória e antinociceptiva periférica. Resultados semelhantes foram obtidos por Melo *et al.* (2011) em relação ao efeito anti-inflamatório, relacionando essa ação a uma atividade inibitória da migração leucocitária. Ademais Mengoni *et al.* (2011) sugerem, através de seus estudos, que os componentes mais abundantes presentes no extrato de alecrim (ácido carnósico e carnosol) podem ser úteis como

anti-inflamatórios, apresentando menos efeitos colaterais do que os medicamentos de uso comum. Por outro lado a ação sobre os mecanismos de nocicepção parecem ser derivados da atuação dessa substância como agonista em receptores adrenérgicos dos tipos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (SAGORCHEV; LUKANOV; BEER, 2010).

#### **4.1.2. Ações sobre o sistema nervoso central**

Vários estudos têm apontado para o potencial terapêutico das preparações de alecrim em tratar transtornos de humor e memória.

No que diz respeito à depressão, além do trabalho de Seol *et al.* (2010), citado anteriormente, um estudo conduzido em camundongos mostrou que o extrato hidroalcoólico de alecrim (em doses variando de 1 a 300 mg/kg administrado por via oral, de forma aguda ou repetida) foi efetivo em dois modelos de depressão, o de natação forçada e o de suspensão pela cauda (MACHADO *et al.*, 2009). Em humanos, Sanders *et al.* (2002) demonstraram que o óleo essencial de alecrim (bem como o de lavanda) promoveu mudanças assimétricas no eletroencefalograma de adultos e crianças, mudanças essas compatíveis com estados positivos de humor, sugerindo um potencial antidepressivo dessas substâncias.

No que diz respeito à ansiedade, McCaffrey, Thomas e Kinzelman (2009) demonstraram que tanto o óleo essencial de alecrim como o de lavanda reduziram os níveis de ansiedade em estudantes de enfermagem, reduzindo os escores de ansiedade, a pulsação e também a percepção de ansiedade dos sujeitos.

Também em estudos envolvendo memória foram encontrados benefícios da utilização de preparações de alecrim. Nesse sentido, Pengelly *et al.* (2012) observaram que a administração de pó de folhas secas de alecrim melhorou a memória de idosos em um teste de cognição. Uma vez que esse efeito positivo foi observado em doses próximas daquelas que podem ser utilizadas na culinária esses autores ressaltam a importância de estudos mais aprofundados a respeito dessa possível aplicação terapêutica. Resultados semelhantes sobre a memória foram obtidos por Moss *et al.* (2003), conforme citado anteriormente.

#### **4.2. Óleo essencial de *Petitgrain* (*Citrus aurantium* L.)**

O óleo de *petitgrain* é extraído das folhas de laranja azeda através do método de destilação. Sua árvore é comumente encontrada na Espanha, África do Norte, Estados Unidos e nas Américas Centrais e do Sul (LAVABRE, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre este óleo, uma vez que seu conhecimento na literatura ainda é muito escasso, tendo mais estudos sobre a casca da laranja do que sobre suas folhas.

#### 4.2.1. Ações gerais

A ação antimicrobiana de vários óleos essenciais de laranja (sendo o *C. aurantium* um deles) foi avaliada em um estudo realizado por Belletti *et al.* (2004), contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* isolada de refrigerante estragado. Os autores verificaram que a melhor ação antimicrobiana contra *S. cerevisiae* se fez no óleo essencial de citron. Por outro lado, Fisher e Phillips (2006), ao realizarem um estudo pesquisando a ação antimicrobiana dos óleos de *C. sinensis* e *C. bergamia* contra algumas bactérias (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) verificaram que o óleo de *C. bergamia* foi o que melhor apresentou ação inibitória dessas bactérias, sendo que as gram-positivas foram mais suscetíveis que as gram-negativas. Esses autores concluíram que o óleo de *C. bergamia* poderia ser utilizado no combate aos agentes causadores comuns de intoxicação alimentar.

O efeito do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. também foi testado em modelo de úlcera gástrica de camundongos (MORAES *et al.*, 2009). O óleo na concentração de 250mg/kg proporcionou uma significativa proteção gástrica contra agentes agressores como os anti-inflamatórios não-esteroidais e contra o etanol, sugerindo que um aumento na produção de muco poderia ser responsável por essa proteção.

#### 4.2.2. Ações no Sistema Nervoso Central

Freitas e Costa (2002) avaliaram a atividade ansiolítica e sedativa do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. (500 ou 1000mg/kg) e do extrato hidroetanólico (1000mg/kg) de suas folhas nos modelos de labirinto em cruz elevado, campo aberto e sono induzido por pentobarbital. Seus principais resultados indicaram que o óleo essencial aumentou o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (atividade ansiolítica), enquanto que o extrato não apresentou diferença quando comparado ao grupo controle. Com relação ao teste de sono induzido por pentobarbital, tanto o óleo como o extrato nas concentrações de 1000mg/kg aumentaram o tempo de sono induzido pelo barbitúrico (potencial ansiolítico, sedativo e hipnótico).

No mesmo sentido, Saiyudthong e Marsden (2011) demonstraram que o óleo essencial de bergamota (*Citrus aurantium* subsp. *bergamia*) se mostrou efetivo em dois modelos de ansiedade (labirinto em cruz elevado e prancha vazada – *hole board*). Além disso, esses mesmos autores verificaram que o óleo essencial de bergamota também conseguiu reduzir os níveis plasmáticos de corticosterona (um indicador de estresse). Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Pultrini, Galindo e Costa (2006) já citado

anteriormente, além de outros estudos realizados com diferentes tipos de Citrus (*C. sinensis*, *C. paradisi*) que também relataram a atividade ansiolítica do óleo essencial e extratos da folha (FATURI *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2010).

A depressão é um possível alvo de tratamento pelo óleo de *petitgrain*. Apesar de não haver trabalhos específicos sobre as ações do mesmo, vários óleos cítricos têm sido implicados com melhoras em sintomas de depressão, tanto em humanos como em modelos animais. Assim, Komori *et al.* (1995) relataram que odores de limão mostraram potencial antidepressivo no teste de natação forçada, sendo um efeito específico não exibido por nenhum outro odor testado (jasmim, ylang-ylang, cravo, sândalo, hortelã-pimenta, lavanda, rosa, cânfora e pinho). Na mesma linha, a nobiletina, um alcaloide encontrado em frutas cítricas exibiu atividade antidepressiva nos modelos de natação forçada e suspensão pela cauda (YI *et al.* 2011).

A nobiletina também melhora o déficit de memória que camundongos transgênicos (APP-SL 7-5 Tg camundongo), apresentam em modelos de Alzheimer (ONOZUKA *et al.*, 2008). De fato, os óleos essenciais cítricos parecem ter ação antioxidante. Tundis *et al.* (2012) realizaram um estudo comparativo entre os óleos extraídos da casca de *Citrus aurantium* L., *C. aurantifolia* Swingle e *C. bergamia* Risso & Poit em sua capacidade antioxidante e atividade inibitória da acetilcolinesterase. Através de análises de cromatografia gasosa/espectrometria de massa, teste antioxidante realizado com 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), captura do radical livre (ABTS), branqueamento por  $\beta$ -caroteno e o método de espectrofotometria (LOIZZO *et al.*, 2009 *apud* TUNDIS *et al.*, 2012) obtiveram como principais resultados que o óleo de *C. bergamia* apresentou melhor ação antioxidante no teste do  $\beta$ -caroteno enquanto que os óleos de *C. aurantium* L. e *C. aurantifolia* Swingle exerceram melhor atividade inibitória na acetilcolinesterase, concluindo que estes óleos poderiam ser interessantes no auxílio de tratamentos de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, na doença de Alzheimer.

Apesar do grande potencial terapêutico, a utilização de óleos essenciais para tratamento de diferentes patologias ainda permanece no campo do empirismo, sendo restrito a terapias alternativas. Nesse sentido, o conhecimento científico disponível a respeito de sua efetividade é ainda muito pequeno mas, mesmo esses poucos dados já fornecem evidências que justificam o aprofundamento da investigação de suas propriedades, principalmente no que se refere a transtornos mentais. Desta maneira, acredita-se ser extremamente interessante a busca de mais evidências para se identificar em quais patologias essas substâncias poderiam, potencialmente, ser utilizadas terapêuticamente, pelo menos como adjuvantes às medidas

terapêuticas habituais. Uma investigação sistemática na tentativa de se estabelecer a melhor via de administração, tempo e doses de tratamento e a forma de oferecimento também poderia contribuir sobremaneira para nosso conhecimento sobre o potencial terapêutico dessas substâncias. A utilização de modelos animais se justifica não apenas pela facilidade de realização das diversas manipulações desejadas, mas também pela ausência do efeito placebo quando os experimentos são realizados em animais, além do melhor controle de variáveis interferentes.

## OBJETIVOS

### 5. Objetivo Geral

Investigar e comparar os efeitos dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *petitgrain* (*Citrus aurantium* L.) em modelos comportamentais de atividade motora, depressão, ansiedade e aprendizado em ratos.

#### 5.1. Objetivos Específicos

- ✓ Campo aberto: Analisar a atividade motora dos animais através dos parâmetros de locomoção (central, periférica e total) e de duração de imobilidade, bem como, com os dados obtidos analisar a possibilidade de resultados falso-positivos nos demais experimentos;
- ✓ Esquiva Discriminativa: Analisar os níveis de ansiedade apresentados pelos animais por meio da comparação dos tempos de permanência nos braços fechados aversivo e não-aversivo na sessão de teste e por meio da comparação do tempo de permanência nos braços abertos do aparelho;
- ✓ Enterrar Esferas: Analisar os níveis de ansiedade por meio da comparação da quantidade de esferas enterradas pelos animais dos três grupos experimentais;
- ✓ Natação forçada: Analisar os níveis de depressão através da comparação do tempo total de imobilidade apresentado pelos animais dos grupos experimentais na sessão de teste.
- ✓ Aprendizagem: Analisar a aprendizagem de um novo comportamento por meio da comparação do tempo total de duração das etapas de treino ao bebedouro e modelagem em todos os grupos experimentais, bem como, também avaliar a necessidade ou não de mais de uma sessão experimental para o aprendizado do comportamento de pressão a barra.

## **MÉTODO**

### **6. Sujeitos**

Foram utilizados em todo estudo 297 ratos albinos, ingênuos, de Linhagem Wistar, com 3 meses de idade no início dos experimentos organizados em grupo experimental e controle conforme detalhamento abaixo. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Saúde da Universidade Metodista de São Paulo, com temperatura de  $(24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$  e umidade (45%) controladas e com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e em condições de alimentação “ad Libitum”.

#### **Óleos essenciais (Alecrim e *Petitgrain*):**

- Campo Aberto: Grupo experimental (n=12), Controle (n=12);
- Esquiva Discriminativa: Grupo experimental (n=12), Controle (n=12);
- Enterrar Esferas: Grupo experimental (n=12), Controle (n=12);
- Natação Forçada: Grupo experimental (n=11), Controle (n=11);
- Aprendizagem: Grupo experimental (n=12), Controle (n=12);

### **7. Cuidados Éticos**

Todos os procedimentos foram submetidos à Comissão de Ética para o Uso de Animais, CEUA-Metodista, e iniciaram após sua aprovação, protocolo n° 100/2012.

Os animais foram cuidadosamente acompanhados durante todo o período de experimentação para que a saúde e integridade física dos mesmos fossem preservadas. O biotério possui técnicos que, além da aluna e docentes envolvidos no projeto, permaneceram em tempo integral no cuidado ambiental e alimentar dos animais utilizados na pesquisa. As gaiolas viveiro foram higienizadas a cada dois dias para o controle de doenças e manutenção do bem-estar dos animais.

### **8. Eutanásia**

Após a realização do projeto os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e este procedimento seguiu as orientações do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA-Metodista).

## 9. Local da Pesquisa

Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisas Biológicas e de Análise Experimental do Comportamento da Faculdade da Saúde da UMESP.

## 10. Análise Estatística

As análises dos dados foram realizadas no programa de estatística SPSS v.20 para Macintosh. Foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk em todos os dados e, após sua realização, os dados que se apresentaram como não-normais foram analisados através de testes não-paramétricos e os que se mostraram como normais foram analisados através de testes paramétricos.

Assim, com relação a análise não paramétrica, utilizou-se o teste de Mann-Whitney nas amostras independentes para comparações entre dois grupos; para amostras pareadas foi utilizado o teste Wilcoxon pareado e o teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar a relação na quantidade animais que aprenderam ou não no experimento de aprendizagem. Referente a análise paramétrica, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Scheffe na análise de amostras independentes para comparações de mais de três grupos.

## 11. Procedimento de Administração dos Óleos

Foram realizados dois pilotos, o primeiro visava determinar a melhor via de administração dos óleos essenciais e, para isto, foram utilizados 54 animais, distribuídos em três grupos: controle (n=6, em cada via de administração), alecrim (n=6, em cada via de administração) e *petitgrain* (n=6, em cada via de administração). As seguintes vias foram testadas para os dois óleos essenciais, sendo as doses utilizadas em cada via idênticas para as duas substâncias, como segue:

- ✓ Via Oral (por gavagem no volume de 2 mL/kg) na dose: 500 mg/kg;
- ✓ Via Intraperitoneal (no volume de 1 mL/kg) na dose: 250 mg/kg;
- ✓ Via Inalatória através de algodão embebido com solução 15% (óleo essencial/óleo mineral) inserido na gaiola moradia.

Todas as administrações foram realizadas 30 minutos antes dos experimentos. Os animais foram testados no campo aberto e os procedimentos para este teste foram descritos abaixo. Como grupo controle foram utilizados animais tratados da mesma forma, pelas

mesmas vias e com igual volume, porém ao invés da administração dos óleos essenciais foi aplicado o veículo (solução de Tween 80 a 1% em salina 0,9% v/v).

No segundo piloto, foram testadas cinco diferentes doses (10mg/kg; 30mg/kg; 100mg/kg; 300mg/kg e 450mg/kg) das duas diferentes substâncias, com o intuito de se estabelecer a melhor dose a ser utilizada em todos os experimentos. A administração foi realizada 30 minutos antes dos experimentos e os animais foram testados, novamente, no campo aberto. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento pela via escolhida e igual volume de veículo (solução de Tween 80 a 1% em salina 0,9% v/v) totalizando 66 animais para este segundo piloto.

Com a escolha da via intraperitoneal e a melhor dose para cada óleo essencial, estabelecidas nos pilotos, os grupos experimentais foram tratados como segue:

- ✓ Controle – solução de Tween 80 a 1% em salina 0,9% v/v;
- ✓ Alecrim – 100mg/kg;
- ✓ Petitgrain – 30mg/kg.

## 12. Modelos animais

O desenvolvimento de modelos animais foi estimulado por diversas razões, como: a) pela necessidade prática de selecionar novas drogas com potencial terapêutico; b) aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas psicopatologias; c) estudar princípios da aprendizagem, entre outros (GRAEFF *et al.*, 1999; NESTLER; HYMAN, 2010). Todavia, estes modelos necessitam ser validados através de alguns critérios além do uso da resposta farmacológica, como por exemplo, o critério de analogia, nos quais as condições experimentais e os comportamentos observados no teste são similares aos sintomas e manifestações clínicas; ou ainda, pelo critério de homologia onde é necessário que os processos psicobiológicos responsáveis pelos sintomas da patologia estejam presentes no modelo utilizado (GRAEFF *et al.*, 1999).

### 12.1. Campo aberto - análise da atividade motora

Os pilotos 1 e 2 foram realizados com n=6 animais em cada grupo experimental, enquanto que, no experimento de campo aberto realizado após os pilotos, utilizou-se n=12 animais em cada grupo (controle, alecrim e *petitgrain*).

Foram avaliadas as atividades gerais dos animais por meio de observação direta em um campo aberto, que consiste em uma arena circular de madeira com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, forrada com fórmica branca. O fundo desta arena é dividido por meio de 3

círculos concêntricos em três porções, que por sua vez, são subdivididas através de segmentos de retas, perfazendo um total de 19 partes aproximadamente iguais.

Foi realizada apenas uma sessão experimental, sendo que, cada animal dos grupos alecrim e *petitgrain* receberam os óleos essenciais, 30 min antes de serem colocados no campo aberto.

No dia do experimento cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto, sendo observado por um período de 5 minutos. Os animais dos grupos controle e experimentais foram observados intercaladamente. Entre as observações de cada animal, o campo aberto foi limpo com uma solução de água-álcool 5%. Ao término da sessão os animais foram eutanasiados.

Do repertório comportamental de um rato colocado em um campo aberto os parâmetros indicativos de sua ATG registrados foram: frequências de locomoção, levantar, limpeza, durações de imobilidade e defecação.

Cada unidade de locomoção corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena; cada unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores as paredes do campo aberto. O parâmetro limpeza corresponde ao tempo que o animal gasta em qualquer tipo de atividade de limpeza corporal, seja ela realizada com as patas ou com a boca. O parâmetro comportamental “duração de imobilidade” é considerado como o período de tempo, em segundos, durante o qual o animal não apresenta atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco e membros. O parâmetro de defecação corresponde a quantidade de fezes presentes no campo aberto ao final dos 5 min de experimento.

O registro dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador digital, computando-se o total dos mesmos em 5 minutos de observação; neste mesmo tempo, foram cronometradas as durações de imobilidade. Os níveis de atividade motora foram avaliados por meio da comparação total das unidades de locomoção (central, periférica e total), bem como, por meio do tempo total da duração de imobilidade apresentada pelos animais dos grupos experimentais. Após o término do experimento os animais foram eutanasiados.

## **12.2. Esquiva Discriminativa em Labirinto em Cruz Elevado**

Com relação aos modelos de ansiedade, o mais utilizado é o labirinto em cruz elevado proposto por Pellow *et al.* (1985). Este modelo é sustentado de maneira

comportamental, sendo que os animais demonstram sinais de ansiedade ao entrarem menos e permanecerem menos tempo nos braços abertos do aparelho quando comparado aos braços fechados. Fisiologicamente os autores relataram um aumento significativo na concentração de corticosterona no plasma do animal ao ser confinado no braço aberto e também de maneira farmacológica, observa-se que os fármacos ansiolíticos ao serem administrados nos animais aumentam a porcentagem que os mesmos entraram e permaneceram nos braços abertos do aparelho (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986).

Recentemente, Frussa-Filho *et al.* (2010) validaram um novo modelo denominado esquiva discriminativa em labirinto em cruz elevado, neste modelo um dos braços fechados se torna o braço aversivo contendo uma lâmpada e um ruído produzido por um secador de cabelo. Nesse novo modelo é possível avaliar a aprendizagem, memória, ansiedade e atividade locomotora. Assim, a aprendizagem é analisada pela redução na exploração do braço aversivo ao longo da sessão de treino; a memória pode ser avaliada através da re-exposição do animal no aparelho numa segunda sessão (teste) onde os estímulos aversivos (luz e ruído) não se fazem presentes; a ansiedade é avaliada da mesma maneira que no experimento do labirinto em cruz elevado citado anteriormente e a atividade locomotora é analisada pelo número total de entradas nos braços do aparelho. Ademais, o mesmo grupo de pesquisadores realizaram diversos testes farmacológicos para apoiar na validação deste modelo (PATTI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 1997; SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000; SILVA *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2006).

Utilizou-se neste experimento 12 animais em cada grupo experimental. Nesse modelo de ansiedade, os ratos são condicionados a escolher entre dois braços fechados (um aversivo e um não-aversivo) ao mesmo tempo em que evitam a exposição aos braços abertos de um labirinto em cruz elevado (SILVA *et al.*, 1997; 1999; 2002; CLARO *et al.*, 1999; SILVA; FRUSSA-FILHO *et al.*, 2010).

Para cada animal foram realizados duas sessões, uma de treino e uma de teste. Os animais receberam o óleo essencial apenas na sessão de teste, 30 min antes de serem inseridos no aparelho. Os mesmos foram colocados individual e intercaladamente no centro de um labirinto em cruz elevado modificado, contendo dois braços abertos (50 x 10 cm) opostos a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), um dos quais com uma lâmpada incandescente de 100 watts e um ruído de 80 dB produzido por um secador de cabelo (braço fechado aversivo).

Durante a sessão de treino, com duração de 10 minutos, cada vez que o rato entrava no braço fechado contendo a lâmpada, o mesmo recebia estimulação aversiva até que deixasse

o braço (quando os estímulos cessaram), não recebendo tal estimulação no outro braço fechado (braço fechado não-aversivo).

Na sessão de teste, com duração de 3 minutos, cada animal foi novamente colocado no centro do aparelho, mas sem receber qualquer estimulação aversiva, embora a lâmpada (desligada) continuasse presente sobre o braço fechado aversivo. Em ambas as sessões experimentais (treino e teste), foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência em cada um dos braços do aparelho (braço fechado aversivo, braço fechado não-aversivo e braços abertos). Entre as exposições de cada animal, o aparelho foi limpo com uma solução água-álcool 5%.

O aprendizado foi avaliado por meio da comparação minuto a minuto das porcentagens de tempo gasto no braço aversivo na sessão de treino. Os níveis de ansiedade foram avaliados por meio da comparação dos tempos de permanência nos braços fechados aversivo e não-aversivo na sessão de teste e por meio da comparação do tempo de permanência nos braços abertos do aparelho. Após o término do experimento os animais foram eutanasiados.

### **12.3. Experimento de Enterrar Esferas**

Outro modelo de ansiedade utilizado neste estudo é o teste de enterrar esferas. Neste modelo os animais são colocados numa caixa moradia em que são expostos a discos refletores espaçados uns dos outros e dispostos por cima da maravalha. Sabe-se que neste teste, as esferas refletoras as quais os animais são expostos, representam um objeto aversivo para o mesmo, tendo em vista que, um estímulo aversivo produz no organismo respostas adversas, tais como, fugir ou se esquivar deste estímulo. A inibição deste comportamento de enterrar esferas pode ser um modelo de correlação para detecção de drogas ansiolíticas ao em vez de ser um modelo isomórfico de ansiedade (NJUNG'E; HANDLEY, 1991), ou ainda, pode ser considerado um modelo de transtorno obsessivo-compulsivo, uma vez que o comportamento é repetitivo e persiste com pouca variação mesmo em várias exposições (NJUNG'E; HANDLEY, 1991; THOMAS *et al.*, 2009) além de que, alguns fármacos relacionados ao transtorno obsessivo-compulsivo, como a clomipramina e os inibidores seletivos de serotonina diminuem a quantidade de esferas escondidas (ICHIMARU; EGAWA; SAWA, 1995).

Utilizou-se neste experimento 12 animais em cada grupo experimental. Os animais foram colocados em gaiolas moradia as quais foram forradas com uma camada de 5 cm de serragem e sobre a mesma foram distribuídas aleatoriamente 20 esferas de vidro possuindo

1,5 cm de diâmetro. Os ratos foram colocados nas caixas durante 30 minutos e após esse tempo, foram registradas quantas esferas de vidro os mesmos esconderam. As esferas foram consideradas enterradas apenas quando estavam completamente cobertas pela serragem (PULTRINI *et al.*, 2006). Os níveis de ansiedade foram avaliados por meio da comparação da quantidade de esferas enterradas pelos animais dos três grupos experimentais.

Foi realizada uma única sessão experimental, 30 min após a injeção dos óleos essenciais ou solução salina e após o término do experimento os animais foram eutanasiados.

#### **12.4. Natação forçada**

Um modelo comumente utilizado para estudar a depressão é o de natação forçada proposta por Porsolt *et al.* (1977a, 1977b). Este modelo sustenta-se no pressuposto de que, um estado de depressão (visualizado através do aumento da imobilidade) pode ser induzido em ratos ao forçá-los a nadar em uma situação na qual não há escapatória e que seu comportamento de permanecer imóvel pode refletir um estado de humor reduzido no mesmo. Ainda, esta hipótese sustenta-se ao ser observado que o uso de drogas antidepressivas reduzem a imobilidade (PORSOLT *et al.*, 1977a, 1977b, 1978, 1979; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997). Assim, é possível visualizar neste modelo que o critério de sua consolidação se fez através da farmacologia.

Utilizou-se neste experimento 11 animais em cada grupo experimental. Os ratos foram colocados em um cilindro de PVC (21x 46cm) preenchido de água (22-25°C) a uma profundidade de 30 cm, a qual evita que os mesmos toquem no fundo do cilindro (levando a valores de linha de base menor e respostas aumentadas a antidepressivos serotoninérgicos e noradrenérgicos) (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995; DETKE; LUCKI, 1996). Os animais passaram por duas sessões: uma de treino e outra de teste. Os mesmos receberam o óleo essencial apenas na sessão de teste.

Na sessão de treino, os ratos foram colocados no cilindro durante 15 minutos e após 24 horas foram novamente inseridos no cilindro para a sessão de teste, que durou 6 minutos, onde seus comportamentos foram observados. Após o término da sessão de teste os animais foram eutanasiados.

Do repertório comportamental do animal, foi analisado a duração de imobilidade, a mesma é verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água. O registro deste parâmetro foi realizado minuto a minuto, onde foram cronometradas as durações de imobilidade do animal.

Os níveis de depressão foram avaliados por meio da comparação do tempo total de imobilidade apresentado pelos animais dos grupos experimentais e controle na sessão de teste.

### **12.5. Experimento de Aprendizagem**

O modelo de aprendizagem refere-se ao condicionamento operante proposto por Burrhus Frederic Skinner no qual, classifica-se como operante aquele comportamento que produz consequências (modificações no ambiente) e é afetado por elas, tais consequências vão influenciar nas ocorrências futuras dos comportamentos (MOREIRA; MEDEIROS, 2007). Assim o procedimento utilizado consiste em sequenciar algumas respostas e não reforçar outras. Seu critério de reforçamento é alterado gradualmente, de tal forma que ele incida sobre respostas que se aproximem da desejada (MATOS; TOMANARI, 2002). No condicionamento operante descrito por Skinner, dizer que as consequências do comportamento chegam a afetá-los é o mesmo que dizer que as consequências determinarão, em algum grau, se os comportamentos que as produziram ocorrerão ou não outra vez, ou se ocorrerão com maior ou menor frequência (MOREIRA; MEDEIROS, 2007). As condições para o estabelecimento desse condicionamento são essencialmente: (1) o alimento ou água serve, inicialmente, de engodo para que o rato comprima a alavanca; (2) as respostas corretas que consistem em apertar a alavanca, são reforçadas pela obtenção de algumas porções de comida ou uma gota d'água, enquanto as incorretas, não são recompensadas; (3) algumas repetições são necessárias para que a habilidade se estabeleça (GAGNÉ, 1974). Em outras palavras, uma necessidade (estímulo) leva a uma atividade (resposta) que a satisfaz e aquilo que satisfaz ou reduz a necessidade serve como reforço da resposta, levando ao comportamento exigido.

Utilizou-se neste experimento 12 animais em cada grupo experimental. O equipamento utilizado foi um modelo da caixa de condicionamento operante criada por Skinner, que consiste em uma câmara onde foram colocados os animais. Esta possui um mecanismo eletrônico com três posições: automático, manual e desligada. A liberação das gotas d'água (reforço) foi feita manualmente ou de maneira automática pelo animal ao pressionar uma alavanca (barra) situada dentro da caixa. Em seguida, uma concha desceu até um reservatório com água (cuba) e voltou para dentro da caixa preenchida com uma gota d'água. Uma caixa de condicionamento operante padrão tem as dimensões aproximadas de 25,0 cm x 20,0 cm x 20,0 cm.

Foram realizadas no mínimo uma sessão e no máximo três sessões experimentais. A necessidade da segunda e da terceira sessão experimental ocorreu caso o animal não tenha

aprendido o comportamento de pressionar a barra na primeira e, respectivamente, na segunda sessão. Os animais receberam o óleo essencial através da via intraperitoneal na primeira sessão experimental 30 minutos antes de iniciar a mesma e caso houvesse a segunda ou terceira sessões, estes receberiam novamente o óleo essencial.

Os ratos foram mantidos em privação de água por 24 horas na primeira sessão experimental e 24 horas na segunda e terceira sessão experimental e em condições de alimentação “ad Libitum”. Este procedimento serve para que a água seja utilizada como reforço durante o processo de aprendizagem.

A sessão de aprendizagem da resposta de pressão a barra foi composta pelos procedimentos de levantamento do nível operante, treino ao bebedouro, modelagem da resposta de pressão a barra (RPB) e CRF.

O levantamento do nível operante teve duração de 5 minutos e o objetivo foi de levantar a frequência dos comportamentos de exploração do sujeito, além da resposta de pressão à barra. O procedimento consiste em colocar água na cuba, colocar o animal na câmara e observá-lo, sem executar nenhum tipo de manipulação.

O treino ao bebedouro consistiu em liberar água para comportamentos de aproximação do bebedouro. O objetivo foi fazer com que o animal se aproximasse do bebedouro quando ouvisse o “clique” e eliminasse quaisquer efeitos emocionais produzidos pelo “clique”, bem como, associasse este som com o comportamento de beber.

Na modelagem o animal recebeu o reforço manualmente a cada resposta de aproximação da resposta de pressão à barra que o mesmo emitisse, tais como cheirar a concha ou cheirar a barra. O critério utilizado foi o de contar 10 respostas e encerrar após ter sido estabelecida a resposta de pressão à barra. Caso dentro de 60 minutos de sessão esse critério não tivesse sido alcançado, a sessão foi encerrada e repetida na sessão seguinte que ocorreu no dia posterior. Quando a resposta de pressão à barra passou a ocorrer, a chave foi colocada na posição automática. Assim, o objetivo da sessão foi estabelecer o comportamento de pressão à barra.

Estabelecida a modelagem iniciou-se o reforçamento contínuo (CRF) para fortalecer o comportamento de pressão à barra. A caixa foi ligada no automático para que cada resposta de pressão à barra fosse seguida por um reforço. Esta sessão teve duração de 5 minutos. A aprendizagem de um novo comportamento foi avaliada por meio da comparação do tempo total de duração das etapas de treino ao bebedouro e modelagem em todos os grupos experimentais, além disso, também foi avaliada a necessidade ou não de mais de uma sessão

experimental para o aprendizado do comportamento de pressão a barra. Após o término das sessões experimentais os animais foram eutanasiados.

## RESULTADOS

A seção de resultados foi construída para apresentar os dados referentes aos objetivos específicos: avaliar as possíveis modificações comportamentais promovidas por óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *petitgrain* (*Citrus aurantium* L.) em modelos de atividade motora (campo aberto), ansiedade (esquiva inibitória e teste de esconder esferas), depressão (natação forçada) e aprendizagem (caixa de condicionamento operante – Skinner).

Para isto, no primeiro piloto cujo objetivo era determinar a melhor via de administração para os óleos essenciais, definiu-se que a via intraperitoneal era a melhor via para ser realizada a administração das substâncias, enquanto que, no segundo piloto cujo objetivo era determinar a melhor dose a ser administrada para cada óleo essencial, definiu-se a dose de 100mg/kg para o óleo de alecrim e 30mg/kg para o óleo de *petitgrain* (os resultados obtidos nos pilotos 1 e 2 encontram-se anexo).

Os dados apresentados a seguir são referentes ao experimento do campo aberto realizado após os dois pilotos. Retomando, seu objetivo era analisar a atividade motora geral.

A Figura 3 ilustra a mediana dos dados de locomoção central, periférica e total entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento do campo aberto.

O gráfico A da Figura 3 ilustra os dados referentes a locomoção central, nesta figura é possível visualizar que os valores de locomoção apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 3 ilustra os dados referentes a locomoção periférica, nesta figura é possível observar que os valores de locomoção apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico C da Figura 3 ilustra os dados referentes a locomoção total, nesta figura é possível observar que os valores de locomoção apresentados pelos animais do grupo alecrim e do grupo *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Desta maneira, com relação aos dados de locomoção central, periférica e total apresentadas na Figura 3, foi possível notar que a administração dos óleos essenciais não apresentou diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros de locomoção

quando comparados ao grupo controle. Outros parâmetros analisados no experimento de campo aberto se referem aos comportamentos de levantar e de limpeza dos animais e os mesmos estão representados na figura seguinte.

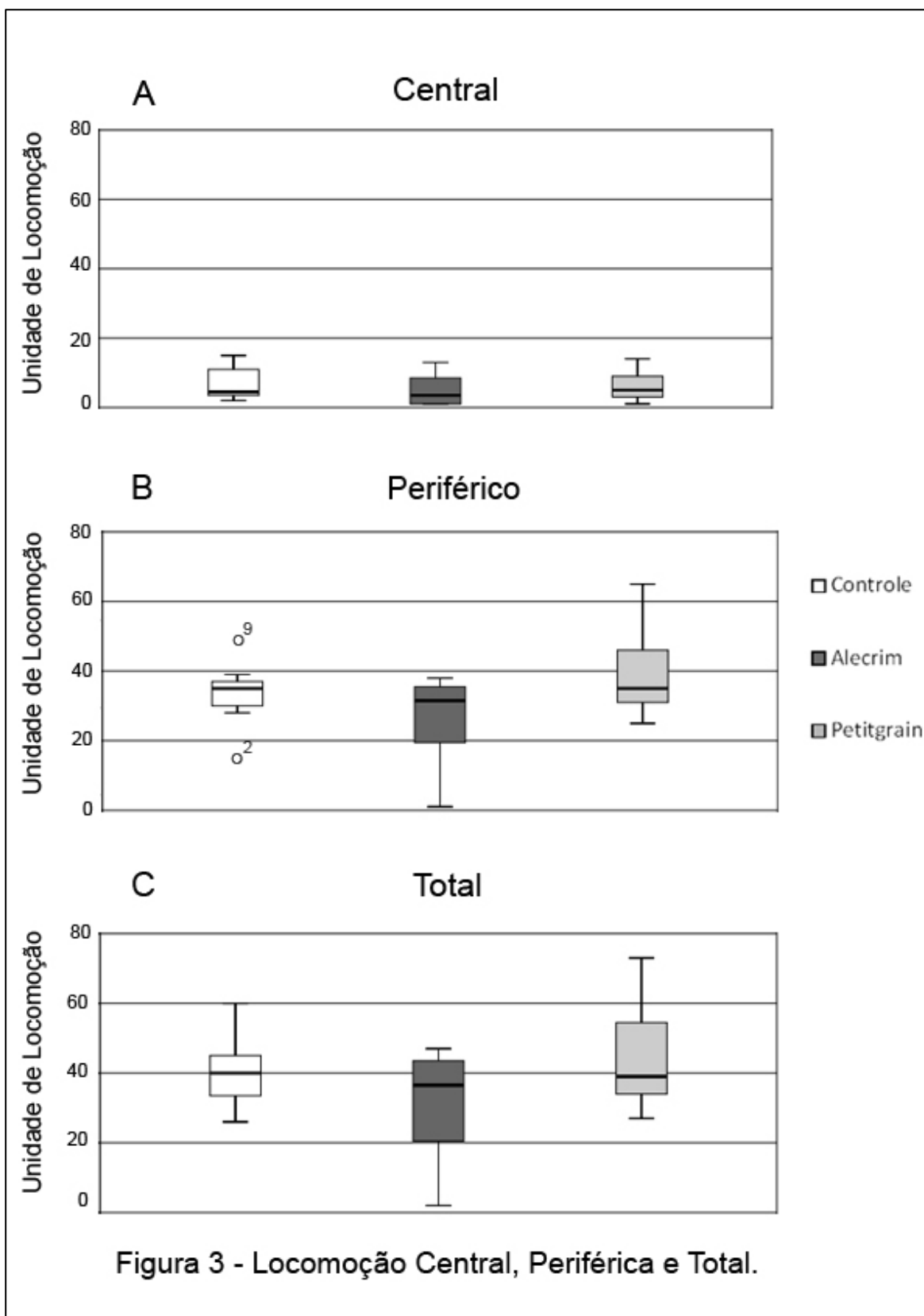


FIGURA 3 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares são os valores discrepantes das unidades de locomoção central (A), periférica (B) e total (C) de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12). Análise estatística realizada em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Figura 4 ilustra a mediana dos dados de levantar e de limpeza entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento do campo aberto.

O gráfico A da Figura 4 ilustra os dados referentes ao comportamento de levantar, nesta figura é possível visualizar que apenas os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim, quando comparados ao grupo controle, se mostraram estatisticamente significativos ( $p < 0.001$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 4 ilustra os dados referentes ao comportamento de limpeza, nesta figura é possível notar que os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Portanto, com relação aos dados apresentados pela Figura 4, foi possível visualizar que, a administração do óleo de alecrim, no parâmetro de levantar, demonstrou diferença estatística significativa, enquanto que, no parâmetro de limpeza, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Outros parâmetros analisados no experimento de campo aberto se referem a duração de imobilidade e defecação dos animais e os mesmos estão representados na figura seguinte.

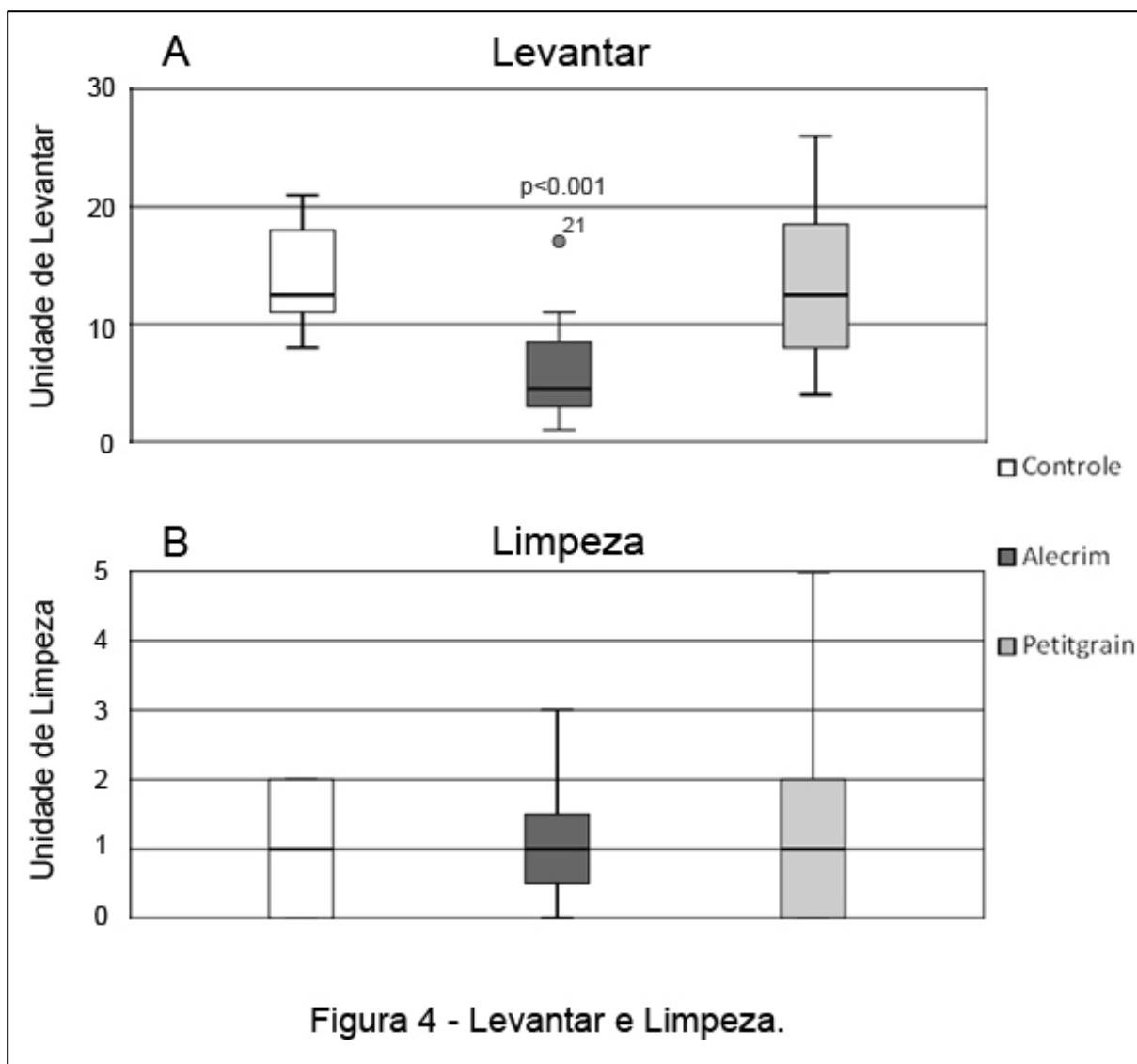


FIGURA 4 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre os comportamentos de levantar e de limpeza de ratos em campo aberto. Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares são os valores discrepantes das unidades de levantar (A) e de limpeza (B) de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12).  $p < 0.001$  indica diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Figura 5 ilustra a mediana dos dados de duração de imobilidade e de defecação entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento do campo aberto.

O gráfico A da Figura 5 ilustra os dados referentes a duração de imobilidade, nesta figura é possível visualizar que os valores de imobilidade apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais, quando comparados ao grupo controle, não se mostraram estatisticamente significativos ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 5 ilustra os dados referentes a defecação, nesta figura é possível visualizar que somente os valores de defecação apresentados pelos animais do grupo alecrim,

demonstraram diferença estatística significativa quando comparados com o grupo controle ( $p < 0.01$  teste de Mann-Whitney).

Desta maneira, com relação aos dados apresentados na Figura 5, foi possível visualizar que, não houve diferença estatística significativa na duração de imobilidade dos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, contudo, houve diferença estatística significativa quanto a defecação dos animais do grupo alecrim.

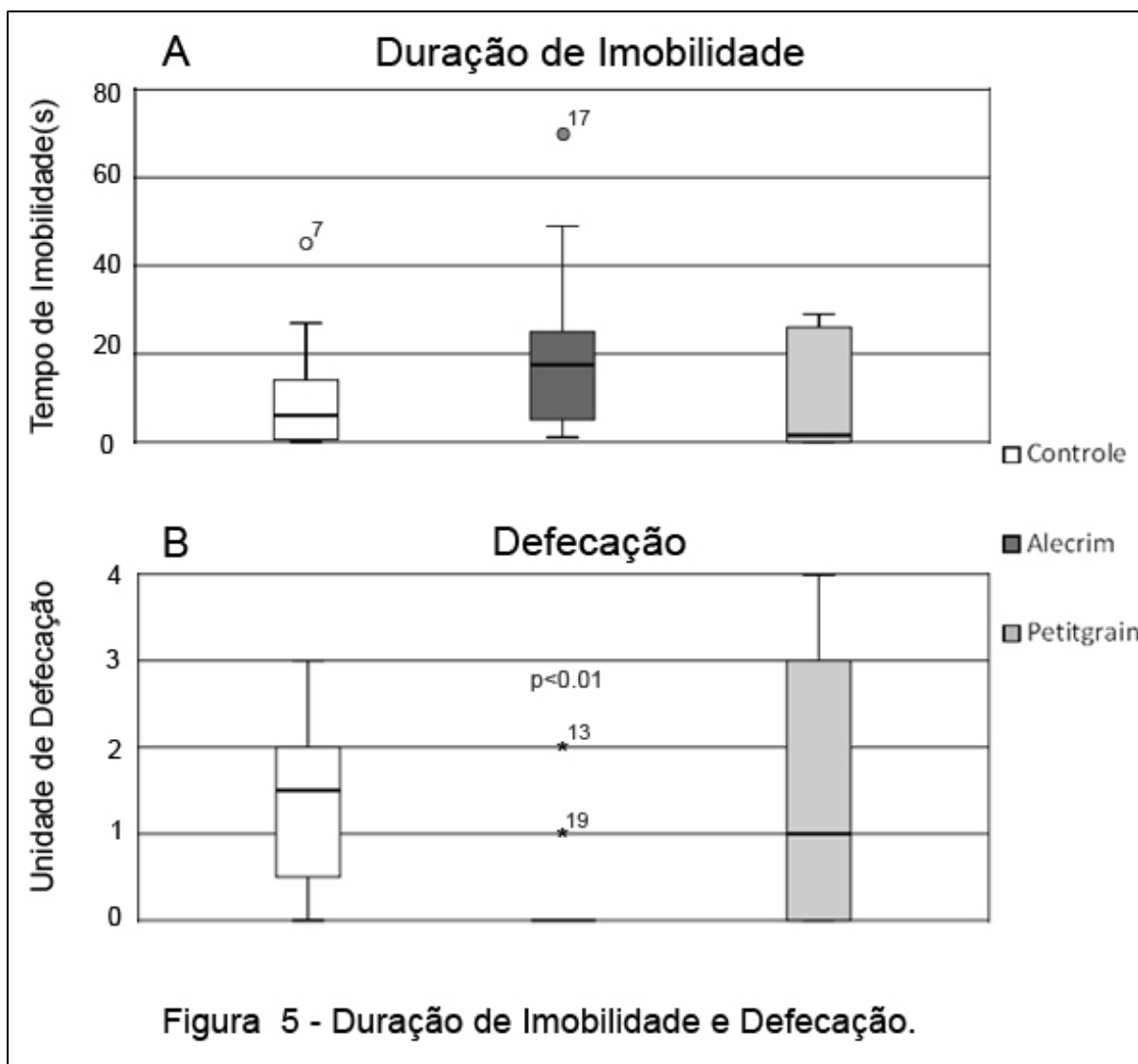


FIGURA 5 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a duração de imobilidade e defecação de ratos em campo aberto. Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares e os asteriscos são os valores discrepantes das unidades de duração de imobilidade (A) e de limpeza (B) de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12).  $p < 0.01$  indica diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do experimento de campo aberto que era analisar a atividade motora do animal, observou-se que os grupos de óleos essenciais, não

afetaram a locomoção, a limpeza e a duração de imobilidade dos animais, contudo, o óleo de alecrim demonstrou efeitos ao reduzir os valores dos parâmetros de levantar e de defecar dos animais.

Os dados apresentados a seguir são referentes ao experimento da esQUIVA discriminativa cujo objetivo era analisar a ansiedade.

A Figura 6 ilustra a porcentagem do tempo em segundos da sessão de treino (com duração de 10 minutos) no braço aversivo do aparelho. Nesta sessão os grupos não receberam os óleos essenciais (alecrim e *petitgrain*) e salina (controle) e, conforme mostram os dados, todos os grupos apresentaram uma frequente redução na porcentagem do tempo no braço aversivo do aparelho. Além disso, os valores de porcentagem de tempo apresentados pelos animais do grupo alecrim se mostraram estatisticamente significativos apenas no primeiro minuto quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney), enquanto que os valores apresentados pelos animais do grupo *petitgrain* não se mostraram estatisticamente significativos em nenhum momento ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney) e, a partir disto, foi considerado que todos os animais dos grupos (controle, alecrim e *petitgrain*) aprenderam a evitar o braço aversivo do aparelho.

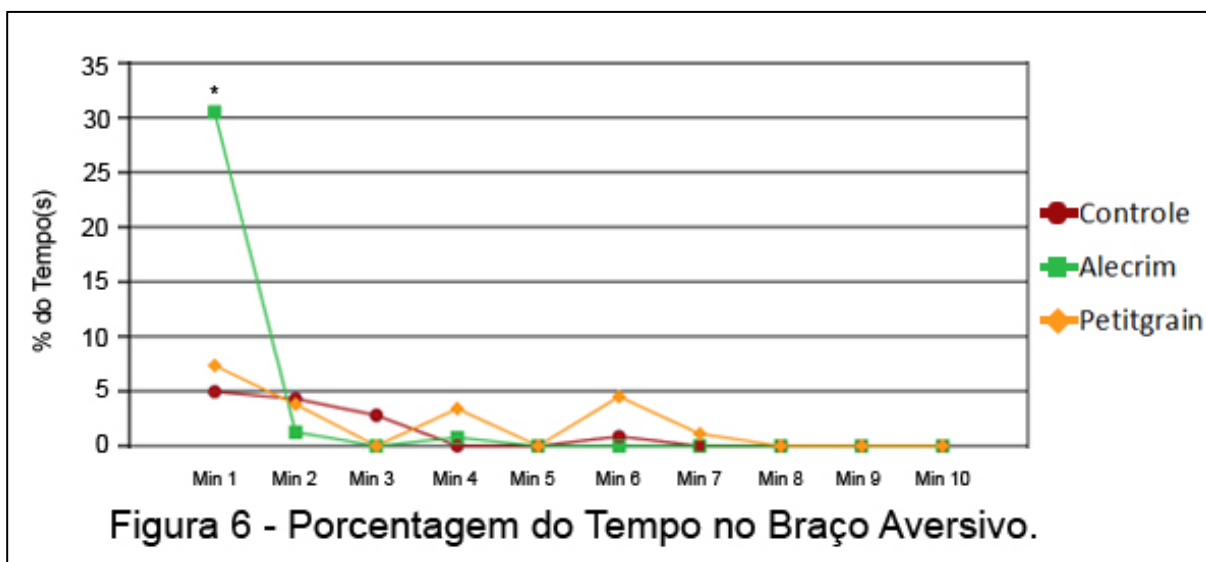


FIGURA 6 – Porcentagem do tempo de permanência no braço aversivo em esQUIVA discriminativa na sessão de treino na ausência da administração dos óleos essenciais. Na figura estão representadas as porcentagens do tempo de permanência no braço aversivo em segundos de animais que não receberam solução salina (controle), óleo essencial de alecrim (alecrim) ou óleo essencial de *petitgrain* (*petitgrain*) ( $n=12$ ). \* indica  $p < 0.05$  significativamente diferente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Figura 7 ilustra a mediana em segundos dos dados do tempo de permanência no braço aberto e braços aversivo e não aversivo do aparelho entre os grupos controle, alecrim e

*petitgrain* no experimento da esquiwa discriminativa durante a sessão de teste (com duração de 3 minutos).

O gráfico A da Figura 7 ilustra os dados referentes ao tempo de permanência no braço aberto, nesta figura é possível visualizar que os valores de permanência no braço aberto apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 7 ilustra os dados referentes ao tempo de permanência nos braços não aversivo e aversivo do aparelho, nesta figura é possível notar que os valores exibidos pelos animais do grupo controle se mostraram estatisticamente significativos ( $p < 0.05$  teste de Wilcoxon pareado), enquanto que os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Wilcoxon pareado).

Portanto, com relação aos dados ilustrados na Figura 7, foi possível visualizar que nenhum dos grupos de óleos essenciais apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle referente ao tempo de permanência no braço aberto do aparelho. Com relação a comparação dos braços não aversivo e aversivo, apenas o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa.

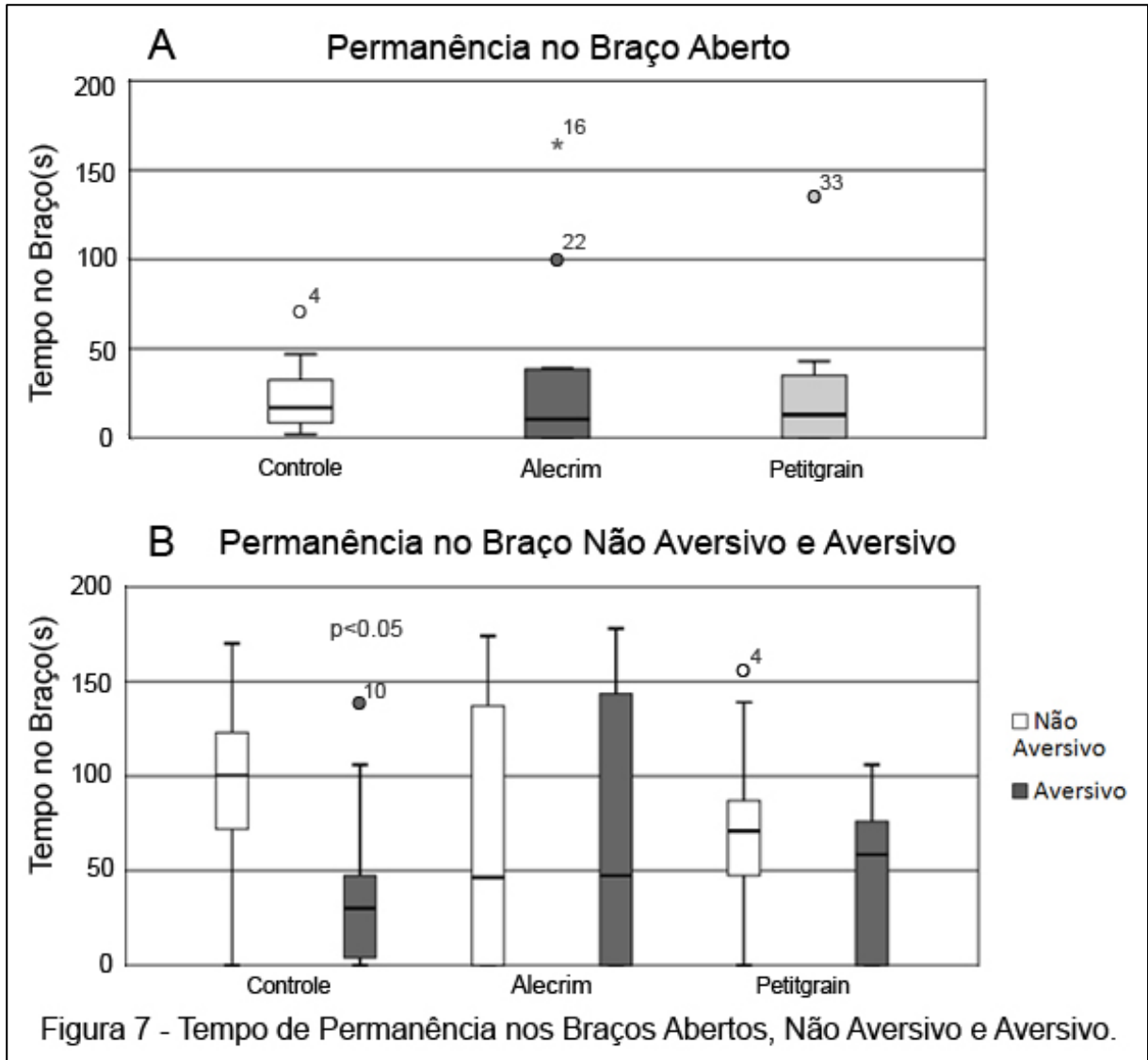


FIGURA 7 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre o tempo de permanência nos braços abertos, não aversivo e aversivo de ratos em esQUIVA discriminativa na sessão de teste. Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares e os asteriscos são os valores discrepantes das unidades do tempo de permanência nos braços aberto (A) e não aversivo e aversivo (B) do aparelho, de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12). (A) - Análise estatística realizada em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). (B) -  $p < 0.05$  indica diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Wilcoxon pareado). Fonte: Próprio autor.

A Figura 8 ilustra a mediana dos dados de mergulho nas sessões de treino (ausência dos óleos essenciais) e teste (com a administração dos óleos) entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento da esQUIVA discriminativa.

O gráfico A da Figura 8 ilustra os dados referentes ao mergulho na sessão de treino (com duração de 10 minutos), nesta figura é possível visualizar que os valores de mergulho apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 8 ilustra os dados referentes ao mergulho na sessão de teste (com duração de 3 minutos), nesta figura é possível notar que somente os valores exibidos pelos animais do grupo alecrim, quando comparado com o grupo controle, demonstraram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney)

Desta maneira, com relação aos dados ilustrados na Figura 8, foi possível visualizar que na sessão de teste, na qual houve a administração dos óleos essenciais, apenas o grupo alecrim demonstrou diferença estatística significativa.

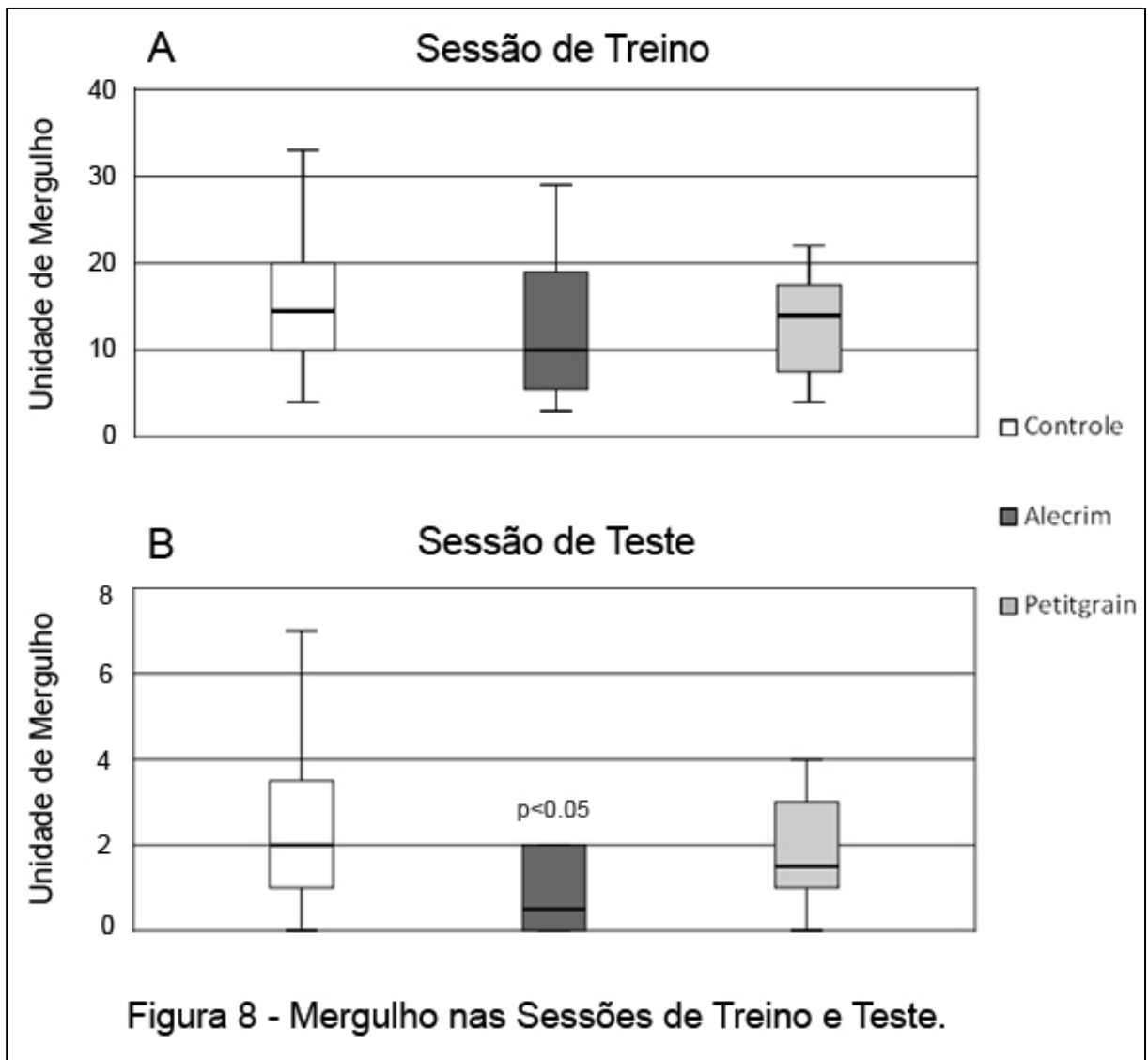


FIGURA 8 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre o mergulho de ratos em esQUIVA discriminativa nas sessões de treino (ausência dos óleos essenciais) e teste (com a administração das substâncias). Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 do mergulho na sessão de treino (A) e na sessão de teste (B) do aparelho, de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12).  $p < 0.05$  diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do experimento da esQUIVA discriminativa que era analisar a ansiedade, observou-se que na sessão de treino não houve diferença entre os grupos tanto na porcentagem de permanência no braço aversivo como no parâmetro de mergulho e, através dos dados da Figura 6 foi possível notar que todos os animais dos grupos controle, alecrim e *petitgrain* aprenderam a evitar o braço aversivo. Na sessão de teste, as substâncias foram aplicadas e ao compará-las de maneira geral, nota-se que os óleos essenciais não apresentaram efeitos estatisticamente significativos nos animais com relação ao tempo de permanência nos braços abertos, não aversivo e aversivo, à medida que apenas os animais do grupo controle apresentaram diferença estatística significativa na comparação dos braços não aversivo com o aversivo. Com relação ao parâmetro de mergulho, o óleo essencial de alecrim produziu o efeito de reduzir significativamente os valores deste comportamento nos animais.

Os dados apresentados a seguir são referentes ao experimento de enterrar esferas cujo objetivo era analisar a ansiedade apresentada pelo número de esferas escondidas pelos animais de cada grupo experimental.

A Figura 9 ilustra a média±erro padrão do número de esferas enterradas entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento de enterrar esferas. Nota-se que ambos os valores de esferas enterradas pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados com o grupo controle, se mostraram estatisticamente significativos ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente, ANOVA seguida do teste de Scheffe).

Desta forma, com relação aos dados apresentados pela Figura 9, foi possível observar que os animais de ambos os grupos de óleos essenciais apresentaram diferença estatística significativa ao enterrar menos esferas que o grupo controle.

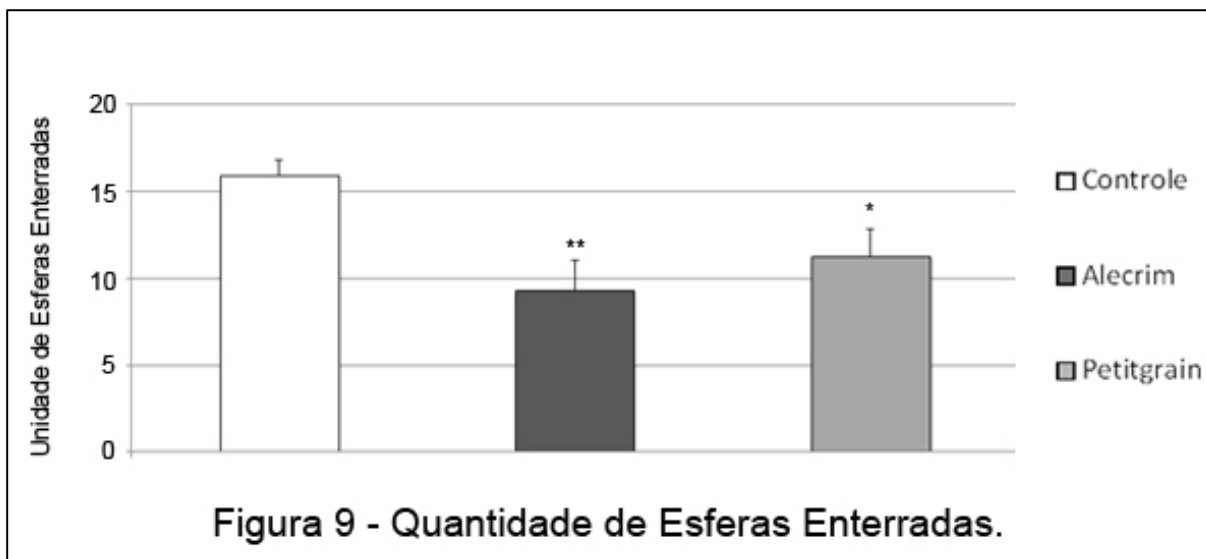


FIGURA 9 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a quantidade de esferas enterradas por ratos no experimento de enterrar esferas. As barras representam a média±erro padrão da média de esferas enterradas de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12). \* e \*\* indicam  $p<0.05$  e  $p<0.01$ , respectivamente, em relação ao grupo controle (ANOVA, seguida pelo teste de Scheffe). Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados apresentados e retomando o objetivo do experimento de enterrar esferas que era analisar a ansiedade apresentada pelo número de esferas escondidas pelos animais de cada grupo experimental, foi possível observar que ambos os óleos essenciais (alecrim e *petitgrain*) produziram efeitos nos animais, uma vez que os mesmos enterraram menos esferas quando comparados aos animais do grupo controle, o que sugere uma ação ansiolítica dessas substâncias.

Os dados apresentados a seguir são referentes ao experimento de natação forçada cujo objetivo era analisar a depressão através do tempo de imobilidade apresentado pelos grupos controle, alecrim e *petitgrain* durante a sessão de teste (com duração de 6 minutos).

A Figura 10 ilustra a mediana em segundos dos dados de duração de imobilidade nas sessões de treino (ausência dos óleos essenciais e solução salina) e teste (com a administração das substâncias) entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* no experimento da natação forçada.

O gráfico A da Figura 10 ilustra os dados referentes a duração de imobilidade na sessão de treino (com duração de 15 minutos), nesta figura é possível visualizar que os valores de imobilidade apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados com o grupo controle, não se mostraram estatisticamente significativos ( $p>0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 10 ilustra os dados referentes a duração de imobilidade na sessão de teste (com duração de 6 minutos), nesta figura é possível notar que os valores de

imobilidade exibidos pelos animais do grupo alecrim e do grupo *petitgrain*, foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Assim, com relação aos dados apresentados pela Figura 10, foi possível observar que na sessão de treino não houve diferença estatística significativa e, isto já era esperado, uma vez que as substâncias não foram administradas nesta sessão, enquanto que, na sessão de teste, ambos os óleos essenciais produziram efeitos estatisticamente significativos, fazendo com que os animais permanecessem menos tempo imóveis, sugerindo uma ação antidepressiva destes óleos.

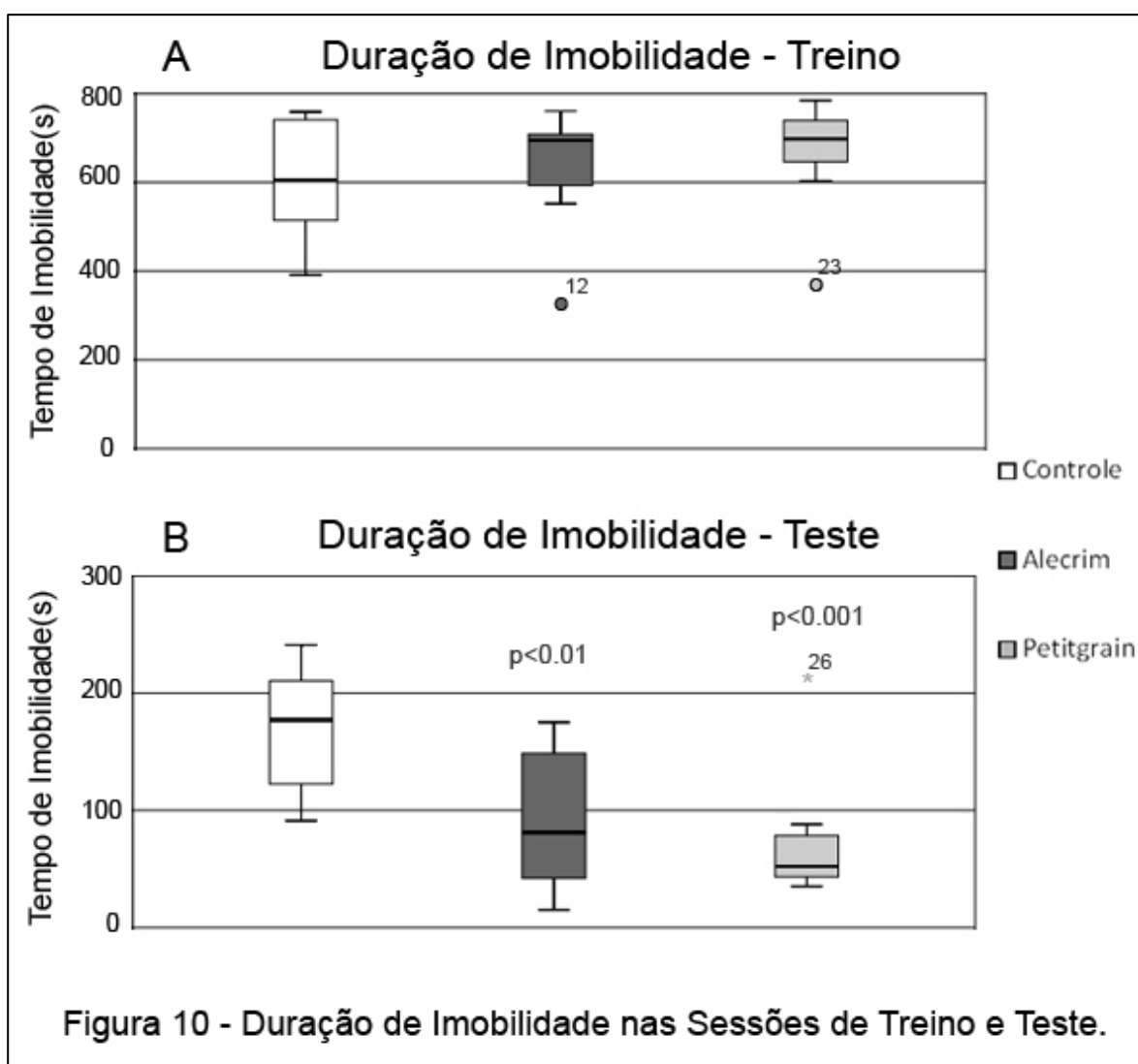


FIGURA 10 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a duração de imobilidade de ratos na natação forçada nas sessões de treino (ausência dos óleos essenciais) e teste (com a administração das substâncias). Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares e os asteriscos são os valores discrepantes de duração de imobilidade na sessão de treino (A) e na sessão de teste (B) de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=11).  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$  indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do experimento de natação forçada que era analisar a depressão, observou-se que na sessão de treino não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Na sessão de teste, as substâncias foram aplicadas e ao comparar os grupos de maneira geral, os óleos essenciais promoveram efeitos nos animais ao reduzir os valores de imobilidade quando comparados ao grupo controle.

Os dados apresentados a seguir são referentes ao experimento de aprendizagem/condicionamento operante cujo objetivo era analisar a aprendizagem de um novo comportamento (resposta de pressão a barra) e o tempo em que os animais demorariam para aprender este novo comportamento.

A sessão de aprendizagem teve duração de 60 minutos e foi realizada em três etapas, na primeira o animal foi apenas observado e seus comportamentos de exploração, limpeza, levantar, lambar (o bebedouro), tocar a barra, pressionar a barra e outros (fezes ou urina) foram anotados a cada minuto ao longo de 5 minutos. A segunda etapa consistiu em treinar o animal a associar o som do bebedouro com a liberação de água e ao mesmo tempo iniciou-se a modelagem de sua resposta de pressão a barra. A terceira etapa ocorreu após o animal ter aprendido o comportamento de pressão a barra e esta consistiu em anotar a quantidade de respostas de pressão a barra que o mesmo emitiu a cada minuto ao longo dos 5 minutos finais da sessão. Assim, optou-se por retirar os 5 minutos iniciais e finais ao realizar a análise dos dados, uma vez que a duração da segunda etapa define o tempo que o animal levou para aprender o novo comportamento.

Desta maneira, a Figura 11 ilustra a mediana em segundos referente ao tempo em que os grupos controle, alecrim e *petitgrain* aprenderam o comportamento de pressão a barra.

O gráfico A da Figura 11 ilustra o 1° dia de experimento, nesta figura é possível visualizar que somente os valores de tempo de modelagem exibidos pelos animais do grupo *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, demonstraram diferença estatística significativa ( $p < 0.01$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico B da Figura 11 ilustra os dados referentes ao 2° dia de experimento, nesta figura é possível observar que, novamente, apenas os valores de tempo de modelagem exibidos pelos animais do grupo *petitgrain* demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney).

O gráfico C da Figura 11 ilustra os dados referentes ao 3° dia de experimento, nesta figura é possível notar que não houve diferença estatística significativa nos valores de tempo

de modelagem dos animais dos grupos de óleos essenciais quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Desta maneira, com relação aos dados apresentados na Figura 11, foi possível observar que o óleo essencial de *petitgrain* produziu efeitos redutores no tempo de modelagem dos animais no primeiro e segundo dia de experimento, demonstrando que os mesmos necessitaram de menos tempo para aprender o comportamento de pressão a barra quando comparados ao grupo controle.

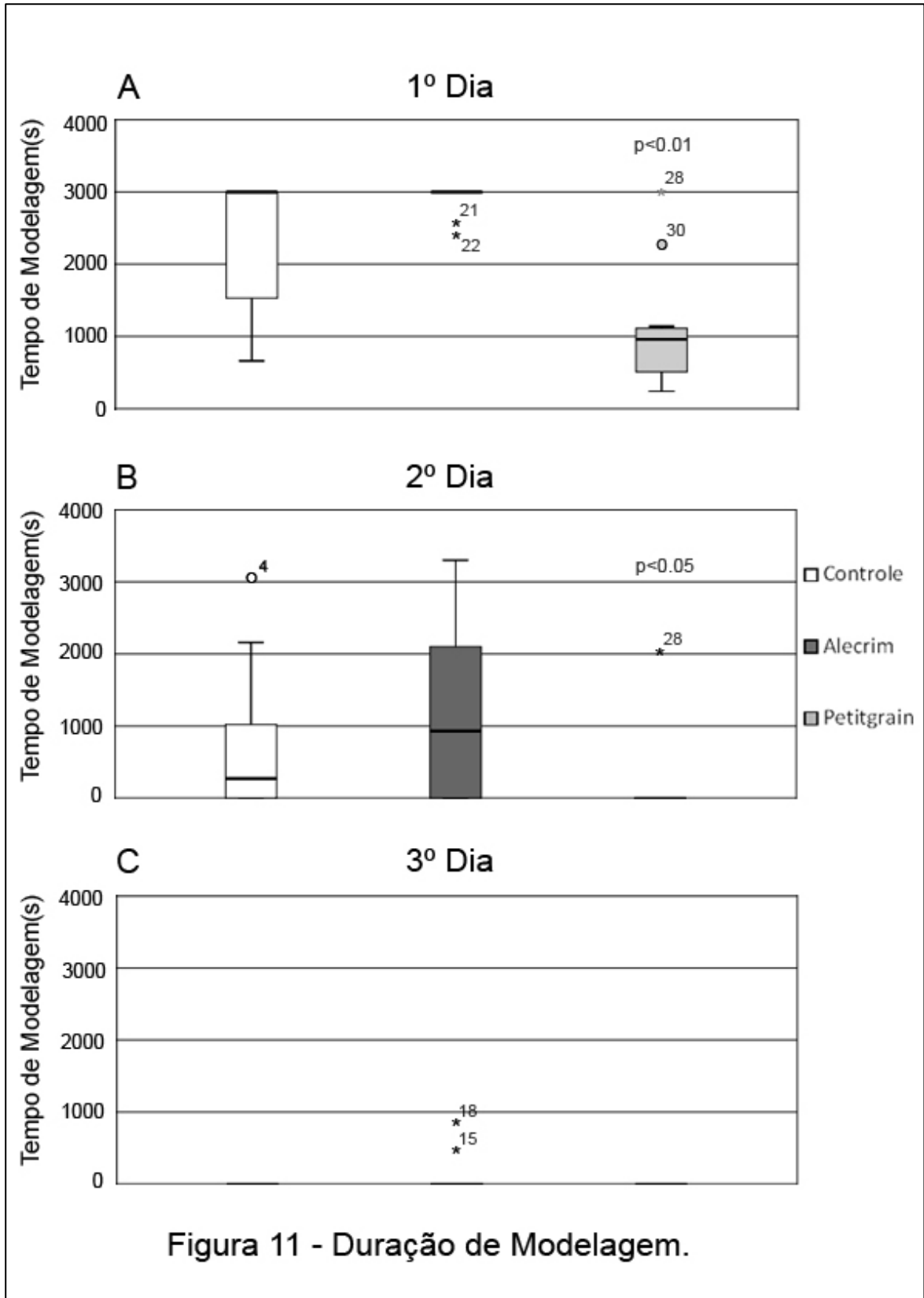


FIGURA 11 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre o tempo de modelagem de ratos no experimento de aprendizagem/condicionamento operante. Na figura estão representados os valores da mediana, os quartis Q1, Q3 e os pontos circulares e os asteriscos são os valores discrepantes do tempo em segundos de modelagem de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12). p<0.05 e p<0.01 diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Figura 12 ilustra os dados em segundos referente ao tempo que cada animal dos grupos experimentais aprenderam o comportamento de pressão a barra e a quantidade de animal que precisou de outras sessões de modelagem para aprender este novo comportamento. Assim, a figura foi dividida em três períodos, o 1º dia, o 2º dia e o 3º dia experimental.

No 1º dia é possível observar que todos os animais dos grupos controle, alecrim e *petitgrain* passaram pela sessão de modelagem. Com relação ao 2º dia, nota-se que a quantidade de animais reduziu, sendo que apenas 7 de 12 animais do grupo controle, 8 de 12 animais do grupo alecrim e 1 de 12 animais do grupo *petitgrain* precisaram de uma segunda sessão de modelagem. Quanto ao 3º dia, nota-se que apenas 2 animais do grupo alecrim realizaram a sessão. Ao verificar se havia alguma relação entre os grupos experimentais com a quantidade de animais que aprenderam o novo comportamento, observou-se que os animais do grupo *petitgrain* demonstraram esta relação ( $p < 0.01$  no teste de Qui-quadrado).

Assim, com relação aos dados apresentados pela Figura 12, foi possível notar que os animais do grupo *petitgrain* demonstraram maior rapidez em aprender o novo comportamento quando comparados aos do grupo controle, enquanto que os animais do grupo alecrim demonstraram o efeito contrário, onde os mesmos demoraram mais tempo para conseguir aprender o comportamento de pressão a barra.

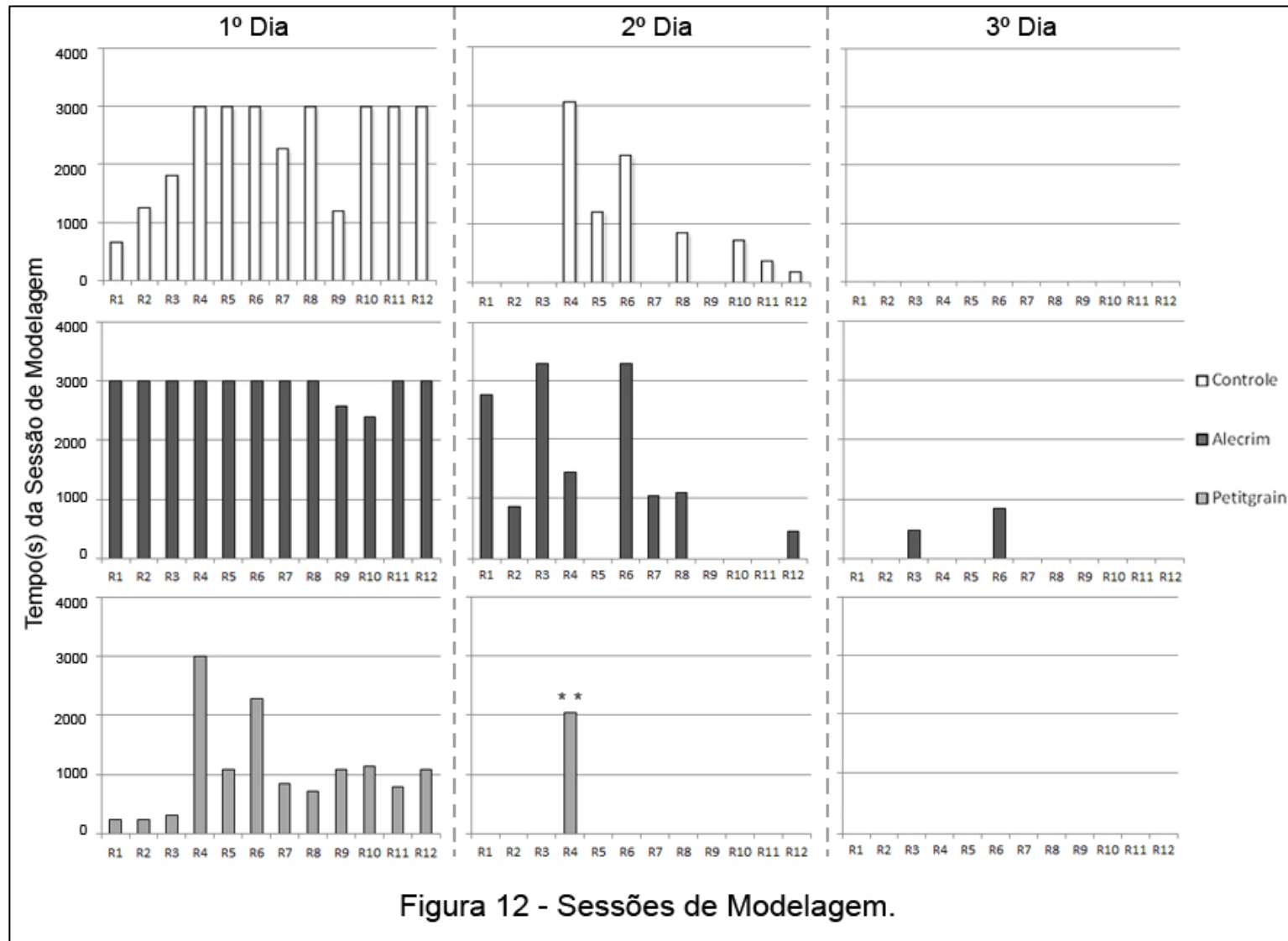


FIGURA 12 – Efeitos da administração de óleos essenciais sobre o tempo da aprendizagem por meio da modelagem de ratos e a quantidade de animais que necessitou de outras sessões de modelagem no experimento de aprendizagem/condicionamento operante. As barras representam os dados do tempo em segundos de modelagem de animais que receberam solução salina (controle), 100 mg/kg de alecrim (alecrim) ou 30mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal (n=12). \*\* indica  $p < 0.01$ , em relação ao grupo controle (Qui-quadrado).

## DISCUSSÃO

Apesar do potencial terapêutico, a utilização de óleos essenciais no tratamento de diferentes patologias ainda permanece no campo do empirismo, sendo restrito a terapias alternativas ou complementares a outros tratamentos realizados. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar e comparar os efeitos dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e *petitgrain* (*Citrus aurantium* L.) em modelos comportamentais de atividade motora, depressão, ansiedade e aprendizado em ratos.

Na literatura sobre os óleos essenciais foi observado que, tanto as doses utilizadas quanto a via de administração são diversificadas, sendo que alguns autores optam pela via inalatória (FATURI, 2010; SAIYUDTHONG; MARSDEN, 2011), outros pela via oral (GUPTA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011; TAKAKI *et al.*, 2008), pela via intraperitoneal (SEOL *et al.*, 2010; MENGONI *et al.*, 2011; TAKAKI *et al.*, 2008) e há ainda os que optam pelo uso tópico dos óleos essenciais (ABU-AL-BASAL, 2010; MENGONI *et al.*, 2011), ministrados em diferentes doses. Diante dos diversos procedimentos na administração dos óleos em pesquisas, optou-se pela realização de estudos pilotos, a fim de estabelecer a melhor via de administração dos óleos essenciais e, posteriormente, estabelecer a melhor dose a ser utilizada para cada um dos óleos.

Assim, conforme ilustram os dados do Piloto 1 (em anexo), os animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, que foram administrados pela via intraperitoneal, apresentaram valores reduzidos de locomoção (central, periférica e total) quando comparados ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo alecrim também apresentaram valores reduzidos no parâmetro de levantar e permanecer imóveis por mais tempo. Por outro lado, com relação às vias oral e inalatória, apenas os animais do grupo *petitgrain* demonstraram valores reduzidos nos parâmetros de locomoção periférica e duração de imobilidade, respectivamente. Desta maneira, devido a administração dos óleos pela via intraperitoneal apresentar efeitos significativos na maioria dos parâmetros analisados neste piloto, optou-se por prosseguir os experimentos com esta via; assim como fizeram Mengoni *et al.*, 2011; Takaki *et al.*, 2008 e Seol *et al.*, 2010. Sendo que, Mengoni *et al.* (2011) aplicaram o extrato de alecrim pela via intraperitoneal em camundongos para testar a atividade antiinflamatória desta substância. No mesmo sentido, Takaki *et al.* (2008) aplicaram gradativamente (pela via intraperitoneal) o óleo essencial de alecrim em camundongos para determinar a dose que seria letal em 50% dos animais (teste de LD<sub>50</sub>). Por outro lado, Seol *et al.* (2010),

administraram o óleo de alecrim pela via intraperitoneal no teste de natação forçada em ratos, tal qual, foi utilizado no presente estudo.

Ao analisar os dados do Piloto 2 (em anexo), foi possível observar que, referente ao óleo essencial de alecrim, a dose de 100mg/kg apresentou efeitos significativos na maioria dos parâmetros analisados, uma vez que, os animais que receberam esta dose, reduziram seus valores de locomoção (central, periférica e total), bem como, apresentaram valores de levantar inferiores e permaneceram imóveis por um período maior de tempo, quando comparados ao grupo controle. Com relação ao óleo essencial de *petitgrain*, os animais que receberam a dose de 300mg/kg apresentaram valores reduzidos apenas no parâmetro de locomoção total e os animais que receberam a dose de 450mg/kg apresentaram valores reduzidos apenas no parâmetro de defecação, enquanto que, os animais que receberam a dose de 30mg/kg permaneceram imóveis por mais tempo, quando comparados ao grupo controle. Em função dos dados observados no piloto 2, definiu-se que as doses utilizadas para os óleos de alecrim e *petitgrain* seriam 100mg/kg e 30mg/kg, respectivamente, assim como fizeram Martínez *et al.*, 2009 ao utilizar 100mg/kg do óleo essencial de alecrim na intenção de estudar seus efeitos nociceptivos e Machado *et al.*, 2009 e Gupta *et al.*, 2010 ao aplicarem 100mg/kg do extrato de alecrim em testes de depressão (como o teste de natação forçada e suspensão de cauda), e também em testes de ansiedade (como o teste de labirinto em cruz elevado). Ainda, Moraes *et al.* (2009) utilizaram a dose de 50mg/kg do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. no modelo de úlcera gástrica em camundongos.

Desta maneira, ficou definido que na fase experimental propriamente dita, seria utilizada a via intraperitoneal e as doses de 100mg/kg e 30mg/kg, respectivamente, para os óleos de alecrim e *petitgrain*.

Os resultados obtidos no experimento de campo aberto pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa na atividade locomotora dos animais, à qual consistia dos parâmetros de locomoção ( $p=0.213$  e  $p=0.795$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney) e duração de imobilidade ( $p=0.083$  e  $p=0.744$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney). O mesmo resultado, foi encontrado por Machado *et al.* (2009), que mostraram que as doses de 1, 10, 100 e 300mg/kg (administrados pela via oral) do extrato de alecrim não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de locomoção dos animais no experimento de campo aberto. Da mesma maneira, Freitas e Costa (2002), demonstraram que tanto o

óleo essencial de *Citrus aurantium* L. (nas doses de 500mg/kg e 1000mg/kg - administrado por via oral) quanto o seu extrato (nas doses de 1000mg/kg - administrado por via oral) não apresentaram alterações na atividade locomotora dos animais no experimento de campo aberto e ambos os autores, Machado *et al.* (2009) e Freitas e Costa (2002), sugerem que o extrato de alecrim e o óleo de *Citrus aurantium* L. não produziram efeitos psicoestimulantes na atividade locomotora dos animais.

Com relação ao experimento de enterrar esferas, foi possível observar que os animais de ambos os grupos de óleos essenciais (alecrim e *petitgrain*) demonstraram uma significativa redução ( $p=0.003$  e  $p=0.028$ , respectivamente, ANOVA) na quantidade de esferas enterradas, quando comparados ao grupo controle. No experimento de enterrar esferas, a luminosidade produzida pelas esferas leva o animal à tentativa de se livrar deste estímulo, enterrando-as. Ou seja, apresentando o comportamento de fuga e tendo como consequência a eliminação de um estímulo aversivo (CATANIA, 1999). Em quadros típicos de ansiedade é possível verificar em pacientes com este transtorno, uma alta frequência de comportamentos de fuga e esquiva, o que faz com que o paciente deixe de realizar várias atividades cotidianas em função da emissão de comportamentos de fuga e esquiva, pois a principal função deste tipo de comportamento é eliminar a aversividade de situações e ambientes considerados por ele como aversivos (CATANIA, 1999). No que diz respeito a ansiedade, entende-se que os transtornos de ansiedade caracterizam-se por uma variedade de alterações, como por exemplo, variações neuroendócrinas, nos neurotransmissores e inclusive neuroanatômicas, além disso, essas alterações podem resultar de experiências ambientais, bem como estarem relacionadas a predisposição genética do indivíduo (MARTIN *et al.*, 2009).

Estudos (BANDELOW *et al.*, 2013, 2014; BALDWIN *et al.*, 2014) têm mostrado que, em situação de tratamento (por exemplo, indivíduos diagnosticados com transtorno de ansiedade) o comportamento ansioso apresentado por esses indivíduos tem sido inibido por meio da administração de drogas de efeito ansiolítico. Desse modo, o comportamento de enterrar esferas usado neste modelo experimental (comportamento de fuga que tem como função a eliminação dos estímulos aversivos) poderia ser inibido (eliminado ou diminuir de frequência) através da administração de fármacos que auxiliassem na redução da ansiedade, como por exemplo, o Diazepam (NJUNG'E; HANDLEY, 1991).

Referente aos resultados obtidos no experimento de enterrar esferas, os animais do grupo alecrim, enterraram menos esferas quando comparados ao grupo controle. Isso nos leva a interpretar que esses animais estejam com níveis de ansiedade menores que os animais do grupo controle, indicando um possível efeito ansiolítico do óleo essencial de alecrim. Este efeito também foi observado no teste de esconder esferas realizado por Lima (2010), porém em uma dose maior (500mg/kg administrado pela via oral) àquela utilizada no presente estudo. No mesmo sentido, em um estudo realizado com humanos, McCaffrey, Thomas e Kinzelman (2009), mostraram que o óleo essencial de alecrim, quando administrado pela via inalatória, foi capaz de reduzir os níveis de ansiedade em estudantes de enfermagem, ao constatarem que os escores de ansiedade destes estudantes tinham reduzido, bem como, sua pulsação e percepção de ansiedade.

No que se refere aos resultados apresentados pelos animais do grupo *petitgrain* no experimento de enterrar esferas, foi possível observar que os animais deste grupo também enterraram menos esferas quando comparados ao grupo controle, sugerindo um efeito ansiolítico também deste óleo essencial. Dados de literatura também suportam este efeito, assim, Pultrini, Galindo e Costa (2006), também constataram o efeito ansiolítico do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. ao observarem uma redução do número de esferas enterradas pelos animais que receberam esta substância, mesmo em doses superiores (500mg/kg ou 1000mg/kg pela via oral) àquelas utilizadas no presente estudo. Do mesmo modo, o efeito ansiolítico do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. (na dose de 1000mg/kg pela via oral) também foi constatado no experimento de labirinto em cruz elevado, ao aumentar o tempo de permanência dos animais no braço aberto do aparelho (FREITAS; COSTA, 2002). De maneira geral, outros estudos obtiveram resultados que apontaram para efeitos ansiolíticos de diferentes óleos de Citrus (*C. sinensis* e *C. aurantium* subs. *bergamia*), e também ao utilizar o extrato de *C. paradisi* (FATURI *et al.*, 2010; SAIYUDTHONG; MARSDEN, 2011; GUPTA *et al.*, 2010). As ações ansiolíticas observadas em modelos animais parecem ter correspondência também em humanos, conforme demonstram Lehrner *et al.* (2005), ao constatarem que pacientes expostos ao odor de laranja em um consultório odontológico, demonstraram níveis de ansiedade reduzidos e maiores níveis de tranquilidade quando comparados aos do grupo controle. Uma vez que existem diversas evidências na literatura sobre a ação ansiolítica do óleo essencial de *Citrus aurantium* L., é possível cogitar a utilização deste óleo como um adjuvante no tratamento dos casos de transtornos de ansiedade.

A hipótese mais aceita acerca dos transtornos de ansiedade baseia-se no envolvimento dos neurotransmissores serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), o glutamato e o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA) (MARAZZITI *et al.*, 2014). Supõe-se que a atividade emocional elevada presente nas regiões cerebrais de pacientes com transtornos de ansiedade pode estar relacionada com a redução na inibição sinalizada pelo GABA ou por um aumento excitatório devido ao glutamato (MARTIN *et al.*, 2009). Além disso, o envolvimento de NA no transtorno de ansiedade, parece ser decorrente de uma complexa desregulação dos níveis plasmáticos de NA, bem como, estarem relacionados a sensibilidade alterada dos receptores pré e pós sinápticos (RESSLER; NEMEROFF, 2001), o mesmo parece estar relacionado com o envolvimento da 5-HT neste transtorno (RESSLER; NEMEROFF, 2000).

Embora, o presente estudo não tenha feito a medida objetiva dos neurotransmissores envolvidos nos transtornos de ansiedade, no que se refere aos óleos essenciais, Costa *et al.* (2013) pesquisaram o possível mecanismo do efeito ansiolítico do óleo essencial da casca de *Citrus aurantium* L. em camundongos. Os autores administraram o óleo juntamente com uma droga antagonista seletiva do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (denominada WAY 100635) em outro teste de ansiedade, no caso, o teste claro/escuro (*light-dark box*). Sabe-se que o receptor 5-HT<sub>1A</sub> atua como auto-receptor inibitório nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos e que drogas antagonistas se ligam nos receptores e bloqueiam a ligação de outras substâncias no mesmo receptor (GOODMAN; GILMAN, 2003). Desta forma, os resultados apresentados por Costa *et al.* (2013) mostraram que a droga WAY 100635 reverteu os efeitos ansiolíticos do óleo e, sugerem ainda que o mecanismo do efeito ansiolítico deste óleo essencial está relacionado a interação com os receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Assim sendo, é possível supor que os resultados ansiolíticos encontrados neste estudo, referente ao óleo essencial de *petitgrain*, podem estar relacionados a interação com o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, conforme apresentado por Costa *et al.* (2013).

Com relação ao experimento de esQUIVA discriminativa, na qual os ratos deveriam discriminar o braço aversivo do não aversivo, na sessão de teste, os resultados mostraram que os animais de ambos os grupos de óleos essenciais (alecrim e *petitgrain*) não discriminaram o braço aversivo do não aversivo, quando comparados ao grupo controle. Segundo Frussa-Filho *et al.* (2010), esta não diferenciação é um indicativo de comprometimento da memória, uma vez que, outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que a administração prévia de escopolamina (de maneira aguda

ou repetida) nos animais provocava um déficit na memória dos mesmos ao observar que os animais não discriminavam o braço aversivo do não aversivo (SILVA *et al.*, 1999). Assim, seria possível supor que esses óleos poderiam estar influenciando negativamente a memória dos animais, entretanto, Ozarowski *et al.* (2013) mostraram através do teste de esquiva passiva que o extrato de alecrim melhorou o déficit de memória de longo prazo induzida por escopolamina em ratos. No mesmo sentido, a melhora na memória observada em modelo animal parece ter correspondência também em humanos, conforme mostram Moss *et al.* (2003), ao analisarem o impacto olfativo do óleo essencial de alecrim sobre o desempenho cognitivo de voluntários saudáveis, e obterem como resultado a melhora no desempenho desses voluntários, no que concerne a qualidade da memória. De maneira semelhante a Moss *et al.* (2003), o estudo realizado por Pengelly *et al.* (2012) observou que a administração de pó de folhas secas de alecrim melhorou a memória de idosos em um teste de cognição. No que diz respeito ao óleo essencial de *petitgrain*, Wattanathorn *et al.* (s.d.) demonstraram que o óleo essencial de outra espécie de laranjeira (*Citrus sinensis*) melhorou a memória de voluntários em um teste de cognição. Desta forma, acreditamos que a não diferenciação entre os braços aversivo e não aversivo poderia ser resultante mais de aspectos relacionados a uma redução dos níveis de ansiedade dos animais (efeito claramente observado no teste de esconder esferas) do que prejuízo de memória. Nesse sentido, apesar de se lembrar do braço aversivo, esse efeito estaria reduzido em função das propriedades ansiolíticas dos óleos essenciais. Resultado semelhante é observado quando se utiliza drogas ansiolíticas em modelos de ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986; ICHIMARU; EGAWA; SAWA, 1995)

O teste de natação forçada em roedores é um reconhecido modelo de depressão em animais. No experimento de natação forçada, foi possível observar que os animais de ambos os grupos de óleos essenciais (alecrim e *petitgrain*) demonstraram uma significativa redução em seu tempo de imobilidade ( $p=0.006$  e  $p=0.001$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney), quando comparados ao grupo controle.

Assim, os animais do grupo alecrim, por permanecerem menos tempo imóveis quando comparados ao grupo controle, evidenciaram um possível efeito antidepressivo deste óleo essencial. Resultados semelhantes foram obtidos por, Seol *et al.* (2010), que também observaram que os animais que receberam o óleo de alecrim (nas doses de 5 e 10%, diluídos em óleo de amêndoa e administrados pela via intraperitoneal), permaneceram menos tempo imóveis no teste de natação forçada, sugerindo uma ação

antidepressiva desta substância. Ainda com relação a ação antidepressiva do óleo de alecrim, Machado *et al.* (2009) mostraram que o extrato de alecrim (em doses variando de 1 a 300 mg/kg administrado por via oral, de forma aguda ou repetida) foi efetivo em dois modelos de depressão, o de natação forçada e o de suspensão pela cauda. Além disso, em um estudo realizado com humanos, Sanders *et al.* (2002) demonstraram que o óleo essencial de alecrim promoveu mudanças assimétricas no eletroencefalograma de adultos e crianças, as quais são compatíveis com estados positivos de humor, sugerindo um potencial antidepressivo do óleo de alecrim.

No que diz respeito aos resultados apresentados pelo óleo essencial de *petitgrain* no experimento de natação forçada, foi possível observar que os animais deste grupo permaneceram menos tempo imóveis quando comparados ao grupo controle, sugerindo deste modo, um possível efeito antidepressivo deste óleo essencial. Estes dados estão de acordo com outro estudo que também obteve efeito antidepressivo no teste de natação forçada ao utilizar um óleo cítrico diferente (*Citrus limon*) daquele utilizado no presente estudo (KOMORI *et al.*, 1995).

A hipótese mais aceita a respeito do mecanismo biológico da depressão é a teoria da deficiência de monoaminas, hipotetizando que os sintomas depressivos são decorrentes de níveis reduzidos de 5-HT e NA (HAMON; BLIER, 2013).

No que concerne aos óleos essenciais, Machado *et al.* (2009) pesquisaram o possível mecanismo do efeito antidepressivo do óleo essencial de alecrim em camundongos. Os autores administraram as seguintes drogas: PCPA (inibidor da enzima triptofano hidroxilase), NAN-190 (antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>), ketanserina (antagonista do receptor 5-HT<sub>2A</sub>), 1(m-clorofenil)-biguanida (mCPBG - antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>), prazosina (antagonista do receptor adrenérgico  $\alpha_1$ ), antes da administração do extrato de alecrim. Desta forma, os resultados apresentados por Machado *et al.* (2009) mostraram que as drogas PCPA, NAN-190, ketanserina e prazosina bloquearam a atividade antidepressiva do extrato, enquanto o mCPBG atenuou o efeito antidepressivo do mesmo. Assim, os autores sugerem que o efeito antidepressivo do extrato de alecrim pode estar relacionado com a interação nos sistemas serotoninérgico envolvendo os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> e noradrenérgico com o receptor  $\alpha_1$ . Esses dados são interessantes e reforçam a ideia da participação da transmissão serotoninérgica nos efeitos dos óleos essenciais, tanto na depressão, como na ansiedade, o que seria de se esperar, uma vez que alterações na transmissão serotoninérgica e noradrenérgica compõem a base neurobiológica que

explicam o surgimento desses dois transtornos.

No que se refere ao experimento de aprendizagem, referente aos resultados apresentados pelos animais do grupo alecrim ( $p=0.098$  teste de Mann-Whitney), foi possível observar que os mesmos apresentaram comportamentos semelhantes aos animais do grupo controle, tanto em seu tempo de aprendizagem quanto na necessidade da realização de uma segunda sessão experimental para aprender o novo comportamento. Muitos eventos podem interferir no momento da aprendizagem de um novo comportamento, fatores emocionais, relacionados ou não a estados de ansiedade ou depressão (CATANIA, 1999). Apenas o tempo para o término da modelagem não evidenciam este aspecto qualitativo da aprendizagem dos animais. Neste sentido, um dado observado, porém não demonstrado nos resultados quantitativos, é o fato dos animais terem diferido em relação às suas reações diante do barulho produzido pelo bebedouro no momento do experimento que verificou a aprendizagem. Os animais do grupo alecrim mostraram reações consideradas emocionais durante o experimento: urinaram, defecaram e em muitos momentos tentaram se afastar da barra e do próprio bebedouro, virando as costas em relação ao mesmo. Tais respostas poderiam ser comparadas com situações nas quais seres humanos ou não humanos estão expostos a situações novas de aprendizagem e nesta ocasião apresentam ansiedade frente ao desconhecido (MATOS; TOMANARI, 2002). Em muitas ocasiões como estas, observa-se o enfrentamento à situação, ao evento aversivo, e o sucesso na aprendizagem. Para outros indivíduos, mais sensíveis aos estímulos aversivos, o enfrentamento é lento e em muitas ocasiões vê-se o abandono à situação. Os resultados do presente estudo, mostraram esta variabilidade comportamental apresentado pelos animais, embora um mesmo grupo esteja submetido à mesma dose e forma de administração de uma droga, os animais reagiram de forma diferenciada aos estímulos aversivos do próprio ambiente experimental (CATANIA, 1999). O resultado desta diferença comportamental pode ser observada na Figura 12, em que alguns animais do grupo alecrim (oito animais) precisaram de uma segunda sessão experimental, enquanto os outros quatro animais conseguiram aprender em apenas uma sessão o novo comportamento.

Outra hipótese relacionada com a modelagem, seria o critério utilizado para reforçar as respostas do animal, tendo em vista que, este critério altera-se gradualmente, de maneira que as respostas apresentadas se aproximem da RPB, enquanto que as anteriormente emitidas entrem em extinção, ou seja, não aconteçam mais em função da suspensão do reforço (MOREIRA; MEDEIROS, 2007); assim, supõe-se que ao exigir

novas respostas dos animais do grupo alecrim, os mesmos demoraram a emití-las e, conseqüentemente, as respostas anteriormente dadas tardaram a entrar em extinção. Frente ao exposto depreende-se que o óleo essencial de alecrim parece não atuar seja de forma positiva ou negativa no processo de aprendizagem de um novo comportamento destes animais.

Resultado oposto foi observado no grupo *petitgrain* ( $p=0.002$  teste de Mann-Whitney), em que os animais aprenderam rapidamente o novo comportamento de pressão à barra e, este efeito na aprendizagem pode estar relacionado ao efeito ansiolítico do óleo, uma vez que os animais deste grupo apresentaram menos reações indesejáveis quanto ao som do bebedouro (dado observado, porém não apresentado nos resultados quantitativos) e responderam mais prontamente ao procedimento de liberação de água durante a modelagem. Sendo que, na etapa de modelagem, os mesmos animais emitiram respostas que os levaram de maneira rápida ao comportamento de pressão à barra e, novamente, este fenômeno pode estar associado a um possível papel deste óleo na redução da ansiedade nos animais.

Ainda, tendo em vista que o presente estudo não utilizou uma metodologia que auxiliasse na compreensão do mecanismo de ação dos óleos essenciais, acreditamos ser importante a realização de mais estudos para se aprofundar nos conhecimentos deste mecanismo de ação no organismo, uma vez que, é possível que os efeitos dos óleos essenciais na aprendizagem tenham ocorrido através de mecanismos de ação diferentes, de modo que, o mecanismo realizado pelo óleo essencial de *petitgrain* tenha auxiliado de alguma maneira na aprendizagem dos animais que o receberam. Sugerimos também estudos comparativos, entre os efeitos dos óleos essenciais com os efeitos apresentados pelos fármacos ansiolíticos e/ou antidepressivos (como, Diazepam e Fluoxetina) que são utilizados no mercado, visando justamente comparar a eficácia dos óleos, bem como, analisar a hipótese de utilizar os óleos essenciais como adjuvantes destes fármacos.

## CONCLUSÃO

Tomando os nossos dados em conjunto, foi possível observar que os animais tratados com o óleo essencial de alecrim, em comparação com os controles, não apresentaram diferenças em sua atividade motora e em sua aprendizagem, mas, observamos um possível efeito antidepressivo e ansiolítico. A atividade motora dos animais tratados com o óleo essencial de *petitgrain*, não diferiu dos controles, contudo, à semelhança dos animais tratados com alecrim, foi observada uma atividade ansiolítica

e antidepressiva desse óleo. Por outro lado, no experimento de aprendizagem, os animais do grupo *petitgrain* aprenderam com mais facilidade que os controles.

## REFERÊNCIAS

- ABU-AL-BASAL, M. A. Healing potential of *rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 443-450, Sept. 2010.
- ALMEIDA, R. N. *et al.* Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 77, n. 2, p. 361-364, Feb. 2004.
- AZERÊDO, G. A. *et al.* The cytotoxic effect of essential oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 298-304, April 2012.
- BALDWIN, D. S. *et al.* Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: A revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 403-439, 2014.
- BANDELOW, B. *et al.* The diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 17, p. 300-310, 2013.
- \_\_\_\_\_. The Diagnosis of and treatment recommendations for anxiety disorders. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 111, p. 473-480, 2014.
- BELLETTI, N. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6932-6938, Nov. 2004.
- BRADLEY, B. F. *et al.* Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 517-525, May 2007.
- BRAND, C. *et al.* Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. **Inflammation Research**, v. 51, n. 5, p. 236-244, May 2002.
- BUTANI, L. *et al.* Amelioration of tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats using juniper oil. **Transplantation**, v. 76, n. 2, p.306-311, Jul. 2003.
- CARVALHO, R. C. *et al.* Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: dissociation between memory and motor impairments. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p.179-183, Nov. 2006.
- CATANIA, A. C. **Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição**. 4.ed. Porto

Alegre: Artmed, 1999.

CECCARELLI, I. *et al.* Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. **Brain Research**, v. 1001, n. 1/2, p. 78-86, Mar. 2004.

CLARO, F. T.; SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine-induced amnesia. **Physiology & Behavior**, v. 67, n. 4, p. 551-554, Oct. 1999.

CORAZZA, S. **Aromacologia**: uma ciência de muitos cheiros. 2. ed, São Paulo: Senac, 2002.

COSTA, C. A. R. A. *et al.* Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT<sub>1A</sub>-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 42, Feb. 2013.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66-72, Sept. 1995.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1/2, p. 43-46, 1996.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107-112, May 1997.

FATURI, C.B. *et al.* Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in wistar rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605-609, May 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, Dec. 2006.

FREITAS, M. I. R. C.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1629-1633, Dec. 2002.

FRUSSA-FILHO, R. *et al.* The plus-maze discriminative avoidance task: an ethical rodent model for concomitant evaluation of learning, memory, anxiety, motor activity and their interactions. **Animal models as ethical tools in biomedic research, 1st edn.** Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p. 364-381, 2010.

GAGNÉ, R. M. **Como se realiza a aprendizagem**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1974.

- GRAEFF, F. G. *et al.* **Neurobiologia das doenças mentais**. 5. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.
- GOODMAN e GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- GUPTA, V. *et al.* Anti-anxiety activity of *Citrus paradisi* var. *star ruby* extracts. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1655-1657, July/Sept. 2010.
- HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54-63, April 2013.
- ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT<sub>1A</sub>-receptor subtypes mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 65-70, Jan. 1995.
- IRKIN, R.; ABAY, S.; AYDIN, F. Inhibitory effects of some plant essential oils against *Arcobacter butzleri* and potential for Rosemary oil as a natural food preservative. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 291-296, Mar. 2011.
- JIANG, Y. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, July 2011.
- KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 240-249, Sept. 2006.
- KOMORI, T. *et al.* Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 3, p. 174-180, May/June 1995.
- LAVABRE, M. **Aromaterapia, a cura pelos óleos essenciais**. 6. ed, Rio de Janeiro: Nova Era, 2005.
- LEHRNER, J. *et al.* Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1/2, p. 92-95, Sept. 2005.
- LENT, R. **Neurociência: da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- LIMA, V. M. **Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 642-650, June 2009.

- MANUAL Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-IV-TR. Coordenação de Miguel R. Jorge; Tradução de Cláudia Dornelles. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- MARAZZITI, D. *et al.* Neurobiological correlates of social anxiety disorder: an update. **CNS spectrums**, p. 1-12, Feb. 2014.
- MARTIN, E. I. *et al.* The neurobiology of anxiety disorders: brain, imaging, genetics and psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 549-575, May. 2009.
- MARTÍNEZ, A. L. *et al.* Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. **Planta Medica**, v. 75, n. 5, p. 508-511, April 2009.
- MATOS, M. A.; TOMANARI, G. Y. **A análise do comportamento no laboratório didático**. São Paulo: Manole, 2002.
- McCAFFREY, R.; THOMAS, D. J.; KINZELMAN, A. O. The effects of lavender and rosemary essential oils on test-taking anxiety among graduate nursing students. **Holistic Nursing Practice**, v. 23, n. 2, p. 88-93, Mar./April 2009.
- MELO, G. A. N. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits *in vivo* and *in vitro* leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 944-949, Sept. 2011.
- MENGONI, E. S. *et al.* Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 414-421, April 2011.
- MORAES, T. M. *et al.* Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, n. 3, p. 499-505, Aug. 2009.
- MOREIRA, M. B.; MEDEIROS, C. A. **Princípios básicos de análise do comportamento**. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- MOSS, L. *et al.* Differential effects of the aromas of *Salvia* species on memory and mood. **Human Psychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 388-396, July 2010.
- MOSS, M. *et al.* Aromas of Rosemary and Lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. **The International Journal of Neurosciences**, v. 113, n. 1, p. 15-38, Jan. 2003.
- \_\_\_\_\_. Modulation of cognitive performance and mood by aromas of Peppermint and Ylang-Ylang. **The International Journal of Neurosciences**, v. 118, n. 1, p. 59-77, Jan. 2008.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1161-1169, 2010.

NJUNGE, K.; HANDLEY, S.L. Evaluation of marble-burying behaviour as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 38, p. 63-67, Mar. 1991.

ONOZUKA, H. *et al.* Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A $\beta$  pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 3, p. 739-744, Sept. 2008.

OZAROWSKI, M. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. **Fitoterapia**, v. 91, p. 261-271, 2013.

PATTI, C. L. *et al.* Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 1, p. 1-12, Jan. 2006.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug. 1985.

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 Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, Mar. 1986.

PENGELLY, A. *et al.* Short-term study on the effects of rosemary on cognitive function in an elderly population. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 10-17, Jan. 2012.

PRICE, S.; PRICE, L. **Aromatherapy for health professionals**. 3. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2007.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977a.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977b.

PORSOLT, R.D. *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, Feb. 1978.

PORSOLT, R. D. Animal model of depression. **Biomedicine**/[publicado por l'AAICIG], v. 30, p. 139-140, 1979.

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, n. 15, p. 1720-1725, Mar. 2006.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of norepinephrine in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. **CNS Spectrums**, v. 6, n. 8, p. 663-670, Aug. 2001.

\_\_\_\_\_. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 12, n. S1, p. 2-19, 2000.

SAGORCHEV, P.; LUKANOV, J.; BEER, A. M. Investigations into the specific effects of Rosemary oil at the receptor level. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8/9, p. 693-697, July 2010.

SAIYUDTHONG, S.; MARSDEN, C.A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. **Phytotherapy Reserch**, v. 25, n. 6, p. 858-862, June 2011.

SANDERS, C. *et al.* EEG asymmetry responses to lavender and rosemary aromas in adult and infants. **The International Journal of Neuroscience**, v. 112, n. 11, p. 1305-1320, Nov. 2002.

SEOL, G. H. *et al.* Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 187-190, July 2010.

SILVA, A. R. da. **Tudo sobre aromaterapia**: como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.

SILVA, R. H. *et al.* Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. **Psychopharmacology**, v. 129, n. 4, p. 322-328, Feb. 1997.

\_\_\_\_\_. Ganglioside GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia in rats and mice. **Psychopharmacology**, v. 141, n. 2, p. 111-117, Jan. 1999.

\_\_\_\_\_. Effects of amphetamine on the plus-maze discriminative avoidance task in mice. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 1, p. 9-18, Feb. 2002.

SILVA, R.H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 102, n. 2, p. 117-125, 2000.

STASI, L. C. D. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical Atlantic forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, Feb. 2002.

STERNBACH, L. H. The benzodiazepine story. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-7, Jan. 1979.

TAKAKI, I. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 741-746, Dec. 2008.

THOMAS, A. *et al.* Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, v. 204, p. 361-373, Feb. 2009.

TISSERAND, R. **The art of aromatherapy**. 2. ed. Saffron Walden: C. W. Daniel, 1985.

TUNDIS, R. *et al.* Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. H40-H46, Jan. 2012.

WATTANATHORN, J. *et al.* Effect of aroma of orange essential oil on working memory of young adults. **North-Eastern Thai Journal of Neuroscience**, v. 7, n.4, p. 42-50, [s.d].

YI, Li-Tao. *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of nobiletin. **Physiology & Behaviour**, v. 102, n. 1, p. 1-6, Jan. 2011.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3144-3152, Nov. 2010.

## ANEXOS

A Tabela 1 ilustra a mediana dos dados de locomoção central entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto1.

Nos dados referentes à administração por via intraperitoneal (i.p.), é possível visualizar que o grupo alecrim e o grupo *petitgrain* exibiram valores de locomoção inferiores quando comparados ao grupo controle e esta diferença mostrou-se estatisticamente significativa para ambos os óleos essenciais ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente, análise pelo teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via oral (p.o.), os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via inalatória (i.n.), os valores apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais quando comparados com o grupo controle não demonstraram diferença significativa entre os mesmos ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Comparando as diferentes vias entre si, nota-se que apenas a administração dos óleos pela via intraperitoneal produziu efeitos estatísticos significativos nos animais que

os receberam ao reduzir seus valores de locomoção central. Outro parâmetro analisado no Piloto 1 referente a locomoção do animal foi a locomoção periférica, a mesma está representada na tabela seguinte.

**Tabela 1. Locomoção Central (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	23.83±3.6	14.00	27.00	30.25	-
Alecrim	6.00±1.6	2.50	5.50	10.25	p=0.05**
<i>Petitgrain</i>	10.50±3.2	4.75	8.00	16.00	p=0.016*
<b>Via Oral</b>					
Controle	10.67±3.6	4.00	9.50	16.25	-
Alecrim	10.17±2.9	2.50	11.00	17.25	p=0.936
<i>Petitgrain</i>	8.00±2.8	3.25	5.50	14.00	p=0.469
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	13.00±3.7	8.00	10.50	19.25	-
Alecrim	13.33±4.8	2.50	12.00	22.50	p=0.748
<i>Petitgrain</i>	18.00±3.4	8.25	22.50	23.50	p=0.520

TABELA 1 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de locomoção central de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). \* e \*\* indicam p<0.05 e p<0.01, respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 2 ilustra a mediana dos dados de locomoção periférica entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto 1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível observar que, os animais dos grupos alecrim e *petitgrain* demonstraram valores de locomoção periférica inferiores quando comparados ao grupo controle e estas diferenças mostraram-se estatisticamente significativas para ambos os grupos de óleos essenciais (p<0.01 e p<0.05, respectivamente, análise pelo teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível observar que, os animais do grupo *petitgrain* apresentaram valores inferiores aos do grupo controle e esta diferença se mostrou estatisticamente significativa (p<0.05, análise pelo teste de Mann-

Whitney) contudo o grupo alecrim não se mostrou diferente do grupo controle ( $p>0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível observar que, os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* quando comparados com o grupo controle não demonstraram diferença significativa entre os mesmos ( $p>0.05$  teste de Mann-Whitney).

Ao comparar as diferentes vias estudadas é possível notar que a administração de ambos os óleos pela via intraperitoneal e do óleo de *petitgrain* pela via oral produziram efeitos estatísticos significativos nos animais que os receberam ao reduzir seus valores de locomoção periférica. A Tabela 3, a seguir, mostra a locomoção total dos animais, ou seja, ela se refere a soma das unidades de locomoção central e periférica analisadas no Piloto 1.

**Tabela 2. Locomoção Periférica (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	75.83±8.4	62.00	76.50	94.50	-
Alecrim	25.00±8.2	5.75	21.50	44.00	p=0.006**
<i>Petitgrain</i>	35.00±11.2	6.25	37.00	60.25	p=0.025*
<b>Via Oral</b>					
Controle	54.00±4.6	45.75	51.00	62.75	-
Alecrim	43.00±7.0	33.25	44.50	54.50	p=0.197
<i>Petitgrain</i>	32.67±8.1	13.00	40.00	49.00	p=0.037*
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	41.00±5.4	32.50	38.00	50.50	-
Alecrim	43.33±10.9	22.00	47.00	58.00	p=0.630
<i>Petitgrain</i>	55.67±7.8	40.50	57.00	73.50	p=0.109

TABELA 2 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de locomoção periférica de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). \* e \*\* indicam  $p<0.05$  e  $p<0.01$ , respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 3 ilustra a mediana dos dados de locomoção total sendo esta a soma das unidades de locomoção central e periférica do animal, entre os grupos controle,

alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível visualizar que, os valores de locomoção central e periférico ao serem somados mostraram-se estatisticamente significativos nos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente, análise pelo teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível visualizar que os valores de locomoção total dos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* quando comparados ao grupo controle, não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível visualizar que os animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados aos animais do grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Levando em consideração que a locomoção total do animal no campo aberto é a soma da locomoção central e periférica, ao se comparar as diferentes vias de administração entre si, é possível notar que apenas a administração dos óleos pela via intraperitoneal produziu efeitos estatísticos significativos nos animais que os receberam ao reduzir seus valores de locomoção total. Outro parâmetro analisado no Piloto 1 se refere ao comportamento de levantar do animal, e o mesmo está representado na tabela seguinte.

**Tabela 3. Locomoção Total (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	<b>Média±Desvio Padrão</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>p</b>
Controle	99.67±10.9	80.50	105.00	121.50	-
Alecrim	31.00±8.7	10.50	28.50	52.75	p=0.006**
<i>Petitgrain</i>	45.50±14.0	11.75	44.50	76.25	p=0.025*
<b>Via Oral</b>					
Controle	64.67±5.2	52.75	64.00	72.75	-
Alecrim	53.17±7.7	38.75	52.00	68.50	p=0.144
<i>Petitgrain</i>	40.67±10.3	16.25	45.50	63.00	p=0.078
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	54.00±6.9	40.50	54.50	70.25	-
Alecrim	56.67±15.4	23.50	61.00	77.50	p=0.873
<i>Petitgrain</i>	73.67±9.1	60.00	72.50	96.25	p=0.150

TABELA 3 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de locomoção total de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). \* e \*\* indicam p<0.05 e p<0.01, respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 4 ilustra a mediana dos dados de levantar entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto 1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível visualizar que os animais do grupo controle exibiram valores de levantar superiores aos animais dos grupos de óleos essenciais e demonstraram diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo alecrim (p<0.01 teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível observar que os valores de levantar apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* quando comparados ao grupo controle, não se mostraram estatisticamente significativos (p>0.05 teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível visualizar que os valores de levantar dos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados com os animais do grupo controle (p>0.05 teste de Mann-Whitney).

Ao se comparar as diferentes vias entre si é possível observar que, apenas a administração do óleo de alecrim pela via intraperitoneal produziu efeitos estatísticos significativos nos animais ao reduzir seus valores de levantar. Outro parâmetro analisado no Piloto 1 se refere a limpeza do animal, o mesmo está representado na tabela seguinte.

**Tabela 4. Levantar (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	18.17±2.5	13.50	17.50	24.50	-
Alecrim	3.67±2.1	0.75	1.50	6.50	p=0.006**
<i>Petitgrain</i>	11.67±4.1	0.00	14.00	19.00	p=0.296
<b>Via Oral</b>					
Controle	20.17±5.1	12.00	17.00	29.25	-
Alecrim	11.67±1.0	9.75	11.00	13.75	p=0.109
<i>Petitgrain</i>	8.83±2.1	5.25	10.00	12.00	p=0.065
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	14.83±3.1	6.50	16.00	21.75	-
Alecrim	15.83±4.7	6.75	13.50	24.75	p=0.810
<i>Petitgrain</i>	21.67±3.4	15.50	19.50	30.75	p=0.172

TABELA 4 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre o levantar de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de levantar de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). \*\* indica p<0.01, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5 ilustra a mediana dos dados de limpeza entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto 1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível visualizar que os valores de limpeza apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa (p>0.05 teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível observar que os valores de limpeza apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais, quando

comparados ao grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível visualizar que os valores de limpeza apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Comparando as diferentes vias entre si é possível notar que a administração dos óleos essenciais não apresentou diferença estatística significativa em nenhuma das vias estudadas no parâmetro de limpeza. Outro parâmetro analisado no Piloto 1 se refere a duração de imobilidade do animal e o mesmo está representado na tabela seguinte.

**Tabela 5. Limpeza (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	<b>Média±Erro Padrão</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>p</b>
Controle	0.83±0.5	0.00	0.50	1.50	-
Alecrim	0.17±0.2	0.00	0.00	0.25	p=0.211
<i>Petitgrain</i>	0.33±0.2	0.00	0.00	1.00	p=0.465
<b>Via Oral</b>					
Controle	1.00±1.0	0.00	0.00	1.50	-
Alecrim	3.17±1.2	0.00	3.00	6.25	p=0.128
<i>Petitgrain</i>	0.50±0.3	0.00	0.00	1.25	p=0.674
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	0.17±0.2	0.00	0.00	0.25	-
Alecrim	0.33±0.3	0.00	0.00	0.50	p=0.902
<i>Petitgrain</i>	0.00±0.0	-	-	-	p=0.317

TABELA 5 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a limpeza de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de limpeza de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). Análise estatística realizada em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 6 ilustra a mediana em segundos dos dados referente a duração de imobilidade entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível observar que os valores de imobilidade apresentados pelos animais do grupo alecrim, quando comparados ao grupo controle, demonstraram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney), contudo, os valores dos animais do grupo *petitgrain* não foram estatisticamente significativos ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível visualizar que os valores de imobilidade apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain*, quando comparados ao grupo controle, não foram estatisticamente significativos ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível observar que, os valores de imobilidade dos animais do grupo *petitgrain*, apresentou diferença estatística significativa quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney), porém, os animais do grupo alecrim não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Ao comparar as diferentes vias estudadas é possível notar que, a administração do óleo essencial de alecrim pela via intraperitoneal produziu efeitos estatísticos significativos nos animais ao aumentar seus valores de imobilidade, ademais, a administração do óleo de *petitgrain* pela via inalatória produziu efeitos estatísticos significativos nos animais ao reduzir seus valores de imobilidade. Outro parâmetro analisado no Piloto 1 se refere a defecação do animal e o mesmo está representado na figura seguinte.

**Tabela 6. Duração de Imobilidade (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	0.33±0.3	0.00	0.00	0.50	-
Alecrim	43.00±18.5	1.50	33.00	87.00	p=0.016*
<i>Petitgrain</i>	41.17±28.7	0.00	10.50	79.50	p=0.153
<b>Via Oral</b>					
Controle	12.67±8.0	0.00	0.00	36.50	-
Alecrim	7.33±3.0	0.00	6.00	15.00	p=0.732
<i>Petitgrain</i>	31.33±16.3	3.75	17.50	57.50	p=0.212
<b>Via Inalatória</b>					
Controle	27.00±16.3	2.25	8.00	55.75	-
Alecrim	26.67±24.5	0.00	1.50	43.25	p=0.327
<i>Petitgrain</i>	0.00±0.0	-	-	-	p=0.007**

TABELA 6 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a duração de imobilidade de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de duração de imobilidade de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). \* e \*\* indicam  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$  em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 7 ilustra a mediana dos dados referente a defecação entre os grupos controle, alecrim e *petitgrain* nas diferentes vias de administração (intraperitoneal, oral e inalatória) referentes ao campo aberto do Piloto1.

Nos dados referentes à administração por via i.p., é possível visualizar que os valores de defecação dos animais do grupo alecrim e do grupo *petitgrain* não se mostraram estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via p.o., é possível observar que não houve diferença estatística significativa nos valores de defecação dos animais do grupo alecrim e do grupo *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes à administração por via i.n., é possível visualizar que os valores de defecação apresentados pelos animais dos grupos de óleos essenciais, quando comparados com o grupo controle, não demonstraram diferença estatística significativa ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Ao se comparar as diferentes vias entre si é possível notar que a administração dos óleos essenciais não apresentou diferença estatística significativa em nenhuma das vias estudadas no parâmetro de defecação.

**Tabela 7. Defecação (Piloto1)**

<b>Via Intraperitoneal</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	3.17±0.7	2.25	3.50	4.25	-
Alecrim	2.50±0.6	1.50	2.50	4.00	p=0.365
<i>Petitgrain</i>	1.67±0.8	0.00	1.00	4.00	p=0.249
<b>Via Oral</b>					
Controle	1.67±0.8	0.00	1.00	3.50	-
Alecrim	0.33±0.2	0.00	0.00	1.00	p=0.163
<i>Petitgrain</i>	1.00±0.5	0.00	0.50	2.25	p=0.557
<b>Via Inalató</b>					
Controle	2.17±0.8	0.00	2.50	4.00	-
Alecrim	2.17±0.9	0.00	2.00	4.25	p=1.000
<i>Petitgrain</i>	1.83±0.5	0.75	2.00	3.00	p=0.621

TABELA 7 - Efeitos da administração de óleos essenciais sobre a defecação de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de defecação de animais que receberam solução salina (controle) em todas as vias, 250mg/kg de alecrim (alecrim) ou 250mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via intraperitoneal; ou, 500mg/kg de alecrim (alecrim) ou 500mg/kg de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via oral; ou, 15% de alecrim (alecrim) ou 15% de *petitgrain* (*petitgrain*) pela via inalatória (n=6). Análise estatística realizada em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

Comparando de maneira geral as três vias entre si, nota-se que na maioria dos parâmetros analisados, a administração dos óleos pela via intraperitoneal promoveu mais efeitos no modelo de campo aberto ao reduzir de maneira estatisticamente significativa os valores apresentados pelos animais dos grupos alecrim e *petitgrain* quando comparados ao controle, enquanto que a administração destas substâncias pelas vias oral e inalatória não promoveu tais efeitos.

Além disso, ao analisar as tabelas apresentadas referentes ao experimento do campo aberto foi possível identificar, que entre todos os parâmetros estudados neste experimento, o comportamento de levantar, a duração de imobilidade e a locomoção central, periférica e total apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo que estas diferenças estão relacionadas a via intraperitoneal.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do Piloto 1, que era determinar a melhor via de administração dos óleos essenciais, optou-se em prosseguir os experimentos utilizando a via intraperitoneal como via de administração dos óleos essenciais.

Desta maneira, as tabelas apresentadas a seguir referem-se ao Piloto 2 cujo objetivo era determinar a melhor dose a ser administrada para cada óleo essencial.

A Tabela 8 ilustra a mediana dos dados de locomoção central, periférica e total entre os grupos controle e alecrim nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto 2.

Nos dados referentes a locomoção central, é possível visualizar que apenas os valores de locomoção apresentados pelos animais das doses de 10mg/kg e 100mg/kg, quando comparados ao grupo controle, se mostraram estatisticamente significativos ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a locomoção periférica, é possível visualizar que apenas os valores de locomoção apresentados pelos animais das doses de 30mg/kg e 100mg/kg, quando comparados ao grupo controle, se mostraram estatisticamente significativos ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a locomoção total, levando em consideração que a locomoção total é a soma da locomoção central e periférica, é possível visualizar que os valores de locomoção apresentados pelos animais das doses de 30mg/kg e 100mg/kg demonstraram diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Desta maneira, com relação aos valores de locomoção central, periférica e total apresentadas na Tabela 8, foi possível observar que três das cinco doses testadas (10mg/kg, 30mg/kg e 100mg/kg) produziram efeitos estatísticos significativos na atividade locomotora dos animais. Outros parâmetros analisados no Piloto 2 se referem aos comportamentos de levantar e limpeza do animal que estão representados na tabela seguinte.

**Tabela 8. Locomoção Central, Periférica e Total (Alecrim - Piloto2)**

<b>Central</b>	<b>Média±Erro Padrão</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>p</b>
Controle	14.33±3.16	8.00	15.00	21.00	-
10mg/kg	3.83±1.58	0.75	2.50	7.75	p=0.024*
30mg/kg	8.17±3.47	1.75	5.00	15.50	p=0.173
100mg/kg	4.00±1.44	0.75	4.00	6.25	p=0.030*
300mg/kg	12.33±3.59	7.00	9.50	20.75	p=0.470
450mg/kg	4.83±2.32	1.50	3.50	7.00	p=0.077
<b>Periférico</b>					
Controle	45.83±5.38	33.50	44.00	60.25	-
10mg/kg	38.00±14.55	9.00	22.00	82.00	p=0.336
30mg/kg	24.50±5.99	15.00	23.50	34.50	p=0.016*
100mg/kg	10.33±2.87	3.75	11.00	17.25	p=0.004**
300mg/kg	29.00±7.34	12.00	27.50	44.75	p=0.128
450mg/kg	38.50±5.05	27.25	37.00	50.00	p=0.200
<b>Total</b>					
Controle	60.17±6.25	46.75	56.50	74.25	-
10mg/kg	41.83±15.95	11.75	22.50	91.25	p=0.337
30mg/kg	32.67±9.19	19.75	26.50	50.00	p=0.030*
100mg/kg	14.33±3.85	6.75	16.00	22.25	p=0.004**
300mg/kg	41.33±10.79	19.00	37.00	65.50	p=0.109
450mg/kg	43.33±6.62	29.50	40.00	61.00	p=0.128

TABELA 8 - Efeitos da administração do óleo essencial de alecrim sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de locomoção de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de alecrim (10mg/kg), 30mg/kg de alecrim (30mg/kg), 100mg/kg de alecrim (100mg/kg), 300mg/kg de alecrim (300mg/kg) ou 450mg/kg de alecrim (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente a locomoção central, locomoção periférica e locomoção total (n=6 em cada dose). \* e \*\* indicam p<0.05 e p<0.01, respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 9 ilustra a mediana dos dados de levantar e limpeza entre os grupos controle e alecrim nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto2.

Nos dados referentes ao parâmetro de levantar, é possível visualizar que os valores de levantar apresentados pelos animais das doses de 30mg/kg, 100mg/kg e 450mg/kg demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.01$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes ao parâmetro de limpeza, é possível notar que não houve diferença estatística significativa nos valores de limpeza dos animais de todas as doses de alecrim quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Assim, com relação aos valores do comportamento de levantar e de limpeza apresentados na Tabela 9, foi possível observar que apenas as doses de 30mg/kg, 100mg/kg e 450mg/kg demonstraram diferença estatística significativa referente ao levantar e nenhuma dose de alecrim apresentou diferença estatística significativa quanto a limpeza. Outros parâmetros analisados no Piloto 2 se referem aos comportamentos de duração da imobilidade e defecação do animal, os mesmos estão representados na tabela seguinte.

**Tabela 9. Levantar e Limpeza (Alecrim - Piloto2)**

<b>Levantar</b>	<b>Média±Erro Padrão</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>p</b>
Controle	17.33±1.76	12.00	19.00	20.50	-
10mg/kg	11.67±5.76	4.75	5.00	18.25	p=0.052
30mg/kg	8.50±3.07	2.00	5.50	18.00	p=0.035*
100mg/kg	1.67±0.56	0.75	1.50	2.50	p=0.004**
300mg/kg	8.67±3.71	0.75	7.50	16.50	p=0.147
450mg/kg	4.50±1.26	1.50	5.00	7.25	p=0.004**
<b>Limpeza</b>					
Controle	0.17±0.17	0.00	0.00	0.25	-
10mg/kg	0.67±0.49	0.00	1.00	1.50	p=0.461
30mg/kg	0.67±0.21	0.00	0.00	1.00	p=0.093
100mg/kg	0.50±0.50	0.00	0.00	0.75	p=0.902
300mg/kg	0.17±0.17	0.00	0.00	0.25	p=1.000
450mg/kg	0.17±0.17	0.00	0.00	0.25	p=1.000

TABELA 9 - Efeitos da administração do óleo essencial de alecrim sobre o levantar e a limpeza de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de alecrim (10mg/kg), 30mg/kg de alecrim (30mg/kg), 100mg/kg de alecrim (100mg/kg), 300mg/kg de alecrim (300mg/kg) ou 450mg/kg de alecrim (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente ao comportamento de levantar e ao comportamento de limpeza (n=6 em cada dose). \* e \*\* indicam  $p<0.05$  e  $p<0.01$ , respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 10 ilustra a mediana dos dados de duração de imobilidade e defecação entre os grupos controle e alecrim nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto2.

Nos dados referentes a duração de imobilidade, é possível visualizar que os valores de imobilidade apresentados pelos animais das doses de 30mg/kg e 100mg/kg, demonstraram diferença estatística quando comparados ao grupo controle ( $p<0.05$  e  $p<0.01$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a defecação, é possível notar que os valores de defecação apresentados pelos animais das doses de 10mg/kg e 450mg/kg se mostraram estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle ( $p<0.05$  e  $p<0.01$ , respectivamente, teste de Mann-Whitney).

Portanto, com relação aos valores da duração de imobilidade e de defecação apresentadas na Tabela 10, foi possível visualizar que as doses de 30mg/kg e 100mg/kg se mostraram estatisticamente significativas referente a duração de imobilidade dos animais, enquanto que as doses de 10mg/kg e 450mg/kg foram estatisticamente significativas no parâmetro de defecação dos animais.

**Tabela 10. Duração de Imobilidade e Defecação (Alecrim - Piloto2)**

<b>Duração de Imobilidade</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	0.67±0.33	0.00	0.50	1.25	-
10mg/kg	34.33±19.01	0.00	12.50	78.75	p=0.134
30mg/kg	27.50±21.97	2.25	6.50	43.25	p=0.027*
100mg/kg	50.00±27.46	5.75	18.00	101.75	p=0.004**
300mg/kg	34.33±26.80	0.00	9.00	57.50	p=0.242
450mg/kg	18.33±17.74	0.00	0.50	28.25	p=0.730
<b>Defecação</b>					
Controle	3.00±0.52	2.00	2.50	4.25	-
10mg/kg	1.17±0.48	0.00	1.00	2.25	p=0.033*
30mg/kg	1.83±0.70	0.75	1.50	2.75	p=0.113
100mg/kg	2.50±1.34	0.00	1.00	5.75	p=0.292
300mg/kg	1.67±0.84	0.00	1.00	3.50	p=0.216
450mg/kg	0.33±0.21	0.00	0.00	1.00	p=0.003*

TABELA 10 - Efeitos da administração do óleo essencial de alecrim sobre a duração de imobilidade e de defecação de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de alecrim (10mg/kg), 30mg/kg de alecrim (30mg/kg), 100mg/kg de alecrim (100mg/kg), 300mg/kg de alecrim (300mg/kg) ou 450mg/kg de alecrim (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente a duração de imobilidade e a defecação (n=6 em cada dose). \* e \*\* indicam p<0.05 e p<0.01, respectivamente, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

Comparando de maneira geral as diferentes doses de alecrim, nota-se que na maioria dos parâmetros analisados, a administração da dose de 100mg/kg promoveu mais efeitos no modelo de campo aberto ao exibir diferença estatística significativa nos

parâmetros de locomoção central, periférica e total, bem como no comportamento de levantar e na duração de imobilidade do animal.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do Piloto 2, que era determinar a melhor dose a ser administrada para cada óleo essencial, optou-se em prosseguir os experimentos utilizando a dose de 100mg/kg para o grupo alecrim.

Desta maneira, as figuras apresentadas a seguir referem-se ao Piloto 2 com as diferentes doses de *petitgrain*, visando também determinar a melhor dose a ser administrada para este óleo essencial.

A Tabela 11 ilustra a mediana dos dados de locomoção central, periférica e total entre os grupos controle e *petitgrain* nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto2.

Nos dados referentes a locomoção central, é possível observar que não houve diferença estatística significativa nos valores de locomoção dos animais de todas as doses de *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a locomoção periférica, é possível notar que não houve diferença estatística significativa nos valores de locomoção dos animais de todas as doses de *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a locomoção total, levando em consideração que a locomoção total é a soma da locomoção central e periférica, é possível visualizar que os valores de locomoção apresentados pelos animais da dose de 300mg/kg foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Portanto, com relação aos valores de locomoção central, periférica e total apresentadas na Tabela 11, foi possível observar que, apenas a dose de 300mg/kg apresentou diferença estatística significativa na locomoção total quando comparada com o grupo controle. Outros parâmetros analisados no Piloto 2 se referem aos comportamentos de levantar e de limpeza dos animais realizado no campo aberto, os mesmos estão representados na tabela seguinte.

**Tabela 11. Locomoção Central, Periférica e Total (*Petitgrain* - Piloto2)**

<b>Central</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	14.33±3.16	8.00	15.00	21.00	-
10mg/kg	11.83±3.10	5.75	10.00	17.50	p=0.522
30mg/kg	6.00±3.53	1.00	2.00	11.00	p=0.076
100mg/kg	11.67±2.72	7.00	12.00	17.50	p=0.423
300mg/kg	8.50±2.01	4.25	8.50	12.75	p=0.173
450mg/kg	12.50±2.67	7.00	12.50	17.00	p=0.575
<b>Periférico</b>					
Controle	45.83±5.38	33.50	44.00	60.25	-
10mg/kg	50.17±9.55	33.75	53.50	70.75	p=0.522
30mg/kg	34.33±7.05	20.75	33.00	48.25	p=0.261
100mg/kg	36.67±5.33	25.00	35.00	47.50	p=0.229
300mg/kg	34.82±1.42	31.75	34.00	39.00	p=0.172
450mg/kg	34.00±7.90	11.75	40.00	48.75	p=0.423
<b>Total</b>					
Controle	60.17±6.25	46.75	56.50	74.25	-
10mg/kg	62.00±10.86	44.25	67.00	83.75	p=0.522
30mg/kg	40.33±10.10	22.25	34.00	59.25	p=0.128
100mg/kg	48.33±6.67	30.00	51.00	64.00	p=0.422
300mg/kg	43.33±2.55	37.75	43.50	50.00	p=0.036*
450mg/kg	46.50±9.89	16.75	54.50	66.75	p=0.631

TABELA 11 - Efeitos da administração do óleo essencial de *petitgrain* sobre a locomoção de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 das unidades de locomoção de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de *petitgrain* (10mg/kg), 30mg/kg de *petitgrain* (30mg/kg), 100mg/kg de *petitgrain* (100mg/kg), 300mg/kg de *petitgrain* (300mg/kg) ou 450mg/kg de *petitgrain* (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente a locomoção central, locomoção periférica e locomoção total (n=6 em cada dose). \* indica p<0.05, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 12 ilustra a mediana dos dados de levantar e de limpeza entre os grupos controle e *petitgrain* nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto2.

Nos dados referentes ao comportamento de levantar, é possível visualizar que não houve diferença estatística significativa nos valores de levantar dos animais de todas as doses de *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes ao comportamento de limpeza, é possível notar que não houve diferença estatística significativa nos valores de limpeza dos animais de todas as doses de *petitgrain* quando comparados ao grupo controle ( $p > 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Desta maneira, com relação aos valores de levantar e de limpeza apresentados na Tabela 12, foi possível observar que nenhuma dose estudada demonstrou diferença estatística significativa em ambos os parâmetros. Outros parâmetros analisados no Piloto 2 se referem a duração de imobilidade e defecação dos animais no campo aberto, os mesmos estão representados na tabela seguinte.

**Tabela 12. Levantar e Limpeza (*Petitgrain* - Piloto2)**

<b>Levantar</b>	<b>Média±Erro Padrão</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>p</b>
Controle	17.33±1.76	12.00	19.00	20.50	-
10mg/kg	21.00±5.50	9.50	22.50	29.25	p=0.332
30mg/kg	11.83±2.98	6.75	10.00	15.50	p=0.076
100mg/kg	15.67±2.67	8.75	15.50	22.50	p=0.687
300mg/kg	10.83±2.91	3.00	12.00	15.25	p=0.241
450mg/kg	9.17±2.96	3.25	7.50	16.25	p=0.053
<b>Limpeza</b>					
Controle	0.17±0.17	0.00	1.00	2.75	-
10mg/kg	1.50±0.76	0.00	0.00	1.25	p=0.072
30mg/kg	0.83±0.83	0.00	1.00	2.25	p=0.902
100mg/kg	1.17±0.48	0.00	0.50	1.00	p=0.072
300mg/kg	0.50±0.22	0.00	0.00	0.25	p=0.241
450mg/kg	0.17±0.17	0.00	0.00	0.25	p=1.000

TABELA 12 - Efeitos da administração do óleo essencial de *petitgrain* sobre o levantar e a limpeza de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de *petitgrain* (10mg/kg), 30mg/kg de *petitgrain* (30mg/kg), 100mg/kg de *petitgrain* (100mg/kg), 300mg/kg de *petitgrain* (300mg/kg) ou 450mg/kg de *petitgrain* (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente ao comportamento de levantar e ao comportamento de limpeza (n=6 em cada dose). Análise estatística realizada em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

A Tabela 13 ilustra a mediana dos dados de duração de imobilidade e de defecação entre os grupos controle e *petitgrain* nas diferentes doses de administração referentes ao campo aberto do Piloto2.

Nos dados referentes a duração de imobilidade, é possível visualizar que apenas os valores de imobilidade apresentados pelos animais da dose de 30mg/kg demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Nos dados referentes a defecação, é possível notar que os valores de defecação apresentados pelos animais da dose de 450mg/kg demonstraram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$  teste de Mann-Whitney).

Desta forma, com relação aos valores de duração de imobilidade e de defecação apresentados na Tabela 13, foi possível observar que apenas a dose de 30mg/kg apresentou diferença estatística significativa no parâmetro de imobilidade e, com relação ao parâmetro de defecação, apenas a dose de 450mg/kg se mostrou estatisticamente significativa.

**Tabela 13. Duração de imobilidade e Defecação (*Petitgrain* - Piloto2)**

<b>Duração de Imobilidade</b>	Média±Erro Padrão	Q1	Mediana	Q3	p
Controle	0.67±0.33	0.00	0.50	1.25	-
10mg/kg	15.83±8.57	0.00	9.00	31.25	p=0.441
30mg/kg	20.83±7.10	2.25	23.00	34.00	p=0.027*
100mg/kg	1.67±1.48	0.00	0.00	3.00	p=0.719
300mg/kg	13.83±8.38	0.00	6.50	25.50	p=0.134
450mg/kg	15.33±8.11	0.00	7.00	33.50	p=0.134
<b>Defecação</b>					
Controle	3.00±0.52	2.00	2.50	4.25	-
10mg/kg	2.83±0.95	1.00	2.00	4.75	p=0.453
30mg/kg	2.33±0.99	0.00	2.00	4.50	p=0.517
100mg/kg	2.50±0.43	1.75	2.50	3.25	p=0.557
300mg/kg	1.67±0.76	0.00	1.00	4.00	p=0.142
450mg/kg	1.50±0.34	0.75	2.00	2.00	p=0.032*

TABELA 13 - Efeitos da administração do óleo essencial de *petitgrain* sobre a duração de imobilidade e de defecação de ratos em campo aberto. Na tabela estão representados os valores da média±erro padrão, a mediana, os quartis Q1 e Q3 de animais que receberam solução salina (controle) ou 10mg/kg de *petitgrain* (10mg/kg), 30mg/kg de *petitgrain* (30mg/kg), 100mg/kg de *petitgrain* (100mg/kg), 300mg/kg de *petitgrain* (300mg/kg) ou 450mg/kg de *petitgrain* (450mg/kg) pela via intraperitoneal referente a duração de imobilidade e a de defecação (n=6 em cada dose). \* indica p<0.05, em relação ao grupo controle (teste de Mann-Whitney). Fonte: Próprio autor.

Comparando de maneira geral as diferentes doses de *petitgrain*, nota-se que a dose de 30mg/kg apresentou diferença estatística significativa no parâmetro de imobilidade dos animais, enquanto que a dose de 300mg/kg apresentou diferença

estatística significativa no parâmetro de locomoção total e a dose de 450mg/kg apresentou diferença estatística significativa no parâmetro de defecação.

A partir destes resultados e retomando o objetivo do Piloto 2 que era determinar a melhor dose a ser administrada para cada óleo essencial, observou-se que, apesar da dose de 300mg/kg demonstrar uma diminuição na locomoção total dos animais, esta não demonstrou diferença nos valores de locomoção central e periférico ao serem analisados separadamente, com relação a dose de 450mg/kg a mesma reduziu apenas os valores de defecação dos animais, desta forma, optou-se em prosseguir os experimentos utilizando a dose de 30mg/kg, uma vez que a mesma aumentou a duração de imobilidade dos animais.