



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

NATÁLIA MORAES MARTINS

**EFEITOS DA *Lippia alba* SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS AO MODELO DO LABIRINTO EM T ELEVADO**

BRASÍLIA

2014

NATÁLIA MORAES MARTINS

**EFEITOS DA *Lippia alba* SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS AO MODELO DO LABIRINTO EM T ELEVADO**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Pandossio

Co-orientador: Profa. Dra. Paula Melo Martins

BRASÍLIA

2014

NATÁLIA MORAES MARTINS

**EFEITOS DA *Lippia alba* SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS AO MODELO DO LABIRINTO EM T ELEVADO.**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Pandossio
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Paula Melo Martins
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Graziela Furtado Scarpelli Ferreira
(IESB/Instituto de Educação Superior de Brasília)

BRASÍLIA
2014

RESUMO

Os transtornos ansiosos representam condição psiquiátrica prevalente na prática clínica, associando-se a importante prejuízo social e funcional, comorbidades, incapacidade e redução da qualidade de vida. Dentre as teorias propostas para explicar a neurobiologia dos transtornos de ansiedade, destaca-se o papel dual da serotonina (5-HT), baseado no mecanismo de ação de fármacos que atuam sobre a neurotransmissão serotoninérgica. No entanto, apesar das opções farmacológicas disponíveis na clínica, um número reduzido de pacientes apresenta resposta adequada ao tratamento. Dessa forma, novas abordagens terapêuticas podem garantir maiores taxas de resposta, maior adesão terapêutica, bem como menores prejuízos associados a esses transtornos. Nesse sentido, a *Lippia alba* (*L. alba*), espécie vegetal amplamente empregada na medicina popular, tem sido investigada quanto às suas propriedades ansiolíticas. Com isso, pretendeu-se avaliar os efeitos do extrato aquoso de *L. alba* sobre o comportamento de animais submetidos ao modelo do labirinto em T elevado (LTE). Ratos Wistar fêmeas (n = 58) foram divididos nos grupos salina, fluoxetina, buspirona, flurazepam (controles) e extratos de *L. alba* nas doses de 25, 50 e 75mg/kg (grupos experimentais), todos com administração intraperitoneal, verificando-se a latência de esquiva inibitória e fuga, bem como a frequência de bolos fecais. Após o LTE, foram observados, no campo aberto, os comportamentos de cruzamentos, levantamentos e autolimpeza, avaliando-se a possibilidade de efeito sedativo, além da verificação da frequência de bolos fecais nesse modelo. Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento com o extrato de *L. alba* facilitou a esquiva inibitória (efeito ansiogênico) e prejudicou a fuga (efeito panicolítico) no LTE, principalmente nas doses de 50 e 75mg/kg, em comparação com controles. No campo aberto não foi verificada indução de sedação por nenhuma das doses da planta. Essas observações sugerem que o extrato de *L. alba* pode exercer efeito ansiolítico sobre um conjunto de comportamentos defensivos implicados no pânico, mas não sobre a ansiedade generalizada, assemelhando-se ao encontrado para a buspirona, fármaco que atua seletivamente sobre receptores 5-HT_{1A} implicando, possivelmente, a participação da neurotransmissão serotoninérgica.

Palavras-chave: Ansiedade, pânico, serotonina, *L. alba*, labirinto em T elevado.

ABSTRACT

Anxiety disorders represent prevalent psychiatric condition in clinical practice and are associated with important social and functional impairment, comorbidity, disability and reduced quality of life. Among the theories proposed to explain the neurobiology of anxiety disorders, it is highlighted the dual role of serotonin (5-HT), based on the mechanism of action of drugs that act on serotonergic neurotransmission. However, in spite of the clinic pharmacological options available, only a small number of patients have adequate response to treatment. Therefore, new therapeutic approaches can ensure higher response rates, greater therapeutic adherence, with lower losses associated with these disorders. In this sense, *Lippia alba* (*L. alba*), a plant species widely used in folk medicine, has been investigated as to their anxiolytic properties. Thus, it was intended to evaluate the effects of aqueous extract of *L. alba* on the behavior of animals submitted to the elevated T-maze model (ETM). Female Wistar rats (n = 58) were divided in the groups saline, fluoxetine, buspirone, flurazepam (controls) and extracts of *L. alba* at doses of 25, 50 and 75mg/kg (experimental groups), all with intraperitoneal administration, in order to verify the latency of inhibitory avoidance and escape, as well as the frequency of fecal boli. After the ETM, it was verified, in the open field, the frequencies of crossings, rearings and grooming, evaluating the possibility of sedation, besides verifying the frequency of fecal boli in this model. The results showed that treatment with the extract of *L. alba* facilitated inhibitory avoidance (anxiogenic effect) and impaired escape (panicolytic effect) in ETM, especially at doses of 50 and 75mg/kg, compared with controls. In the open field it was not observed induction of sedation by any of plant doses. These observations suggest that the extract of *L. alba* can exert anxiolytic effect on a set of defensive behaviors implicated in panic, but not on generalized anxiety, resembling found for buspirone, a drug that acts selectively on 5-HT_{1A} receptors, possibly implying the involvement of serotonergic neurotransmission.

Keywords: Anxiety, panic, serotonin, *L. alba*, elevated T-maze.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das alterações causadas pela administração crônica de antidepressivos na neurotransmissão mediada pelos receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} e 5-HT _{2C} nos núcleos dorsal da rafe (NDR) e basolateral da amígdala (ABL) e na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD).....	17
Figura 2 - Desenho do labirinto em T elevado.	19
Figura 3 - <i>Lippia alba</i> – Horto de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da Faculdade de Ceilândia UnB.....	24
Figura 4 - Bateria de extração do óleo essencial para análise qualitativa em cromatógrafo a gás.....	25
Figura 5 - Detalhe do óleo essencial dentro do tubo separador do <i>clevenger</i>	26
Figura 6 - Detalhe <i>Lippia alba</i> quimiotipo carvona.....	27
Figura 7 - Sistema de extração por soxhlet.....	28
Figura 8 - Extrato aquoso formado dentro do balão.....	29
Figura 9 - Efeito sedativo do extrato de <i>L. alba</i> 150mg/kg sobre os animais, com prejuízo locomotor visualizado pela posição das patas traseiras.....	31
Figura 10 - Efeito hipnótico do extrato de <i>L. alba</i> 150mg/kg sobre os animais.....	31
Figura 11 - Labirinto em T elevado.....	32
Figura 12 - Campo aberto.....	33
Figura 13 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva inibitória (s) para animais submetidos ao LTE.....	39
Figura 14 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga (s) para animais submetidos ao LTE.....	41

Figura 15 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 1 (s) para animais submetidos ao LTE.....	42
Figura 16 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 2 (s) para animais submetidos ao LTE.....	43
Figura 17 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 3 (s) para animais submetidos ao LTE.....	43
Figura 18 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 1 (s) para animais submetidos ao LTE.....	44
Figura 19 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 2 (s) para animais submetidos ao LTE.....	45
Figura 20 - Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 3 (s) para animais submetidos ao LTE.....	45
Figura 21 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao LTE.....	46
Figura 22 - Efeito dos tratamentos sobre os comportamentos observados no modelo do campo aberto.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C _n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 1, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.....	36
Tabela 2 - Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C _n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 2, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.....	36
Tabela 3 - Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C _n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 3, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema dos procedimentos, incluindo drogas e doses utilizadas, número de animais por grupo farmacológico, período de administração e comportamentos observados em cada modelo animal.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidróxitriptamina (serotonina)

ABL – Amígdala basolateral

ANOVA - Análise de variância

ANOVA RM - Análise de variância de medidas repetidas

C_n - Cadeia carbônica

CG-MS - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa

CPF - Córtex pré-frontal

EPM - Erro padrão da média

GABA - Ácido gama aminobutírico

IK - Índice de Kovats

IMAO - Inibidor da monoamina oxidase

IP - Intraperitoneal

ISRS - Inibidor seletivo da recaptação de serotonina

L. alba - *Lippia alba*

LCE - Labirinto em cruz elevado

LTE - Labirinto em T elevado

MCPD - Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

Min - Minutos

NR - Núcleos da rafe

OE - Óleo essencial

S - Segundos

SNK - Student Newman-Keuls

TAG - Transtorno de ansiedade generalizada

TP - Transtorno de pânico

TR - Tempo de retenção

\bar{x} - Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 METODOLOGIA.....	24
<i>Parte 1 - Fitoquímica</i>	
3.1 Material vegetal.....	24
3.1.1 Colheita 1 - Identificação de quimiotipos.....	24
3.2 Extração e análise dos óleos essenciais.....	25
3.2.1 Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação.....	25
3.2.2 Análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa.....	26
3.3 Colheita 2 – quimiotipo carvona.....	27
3.4 Produção de extratos.....	28
<i>Parte 2 – Análise comportamental</i>	
3.5 Animais.....	30
3.6 Determinação de curva dose-resposta.....	30
3.7 Drogas e doses.....	31
3.8 Procedimento.....	32
3.9 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	36
<i>Parte 1 – Fitoquímica</i>	
4.1 Identificação de quimiotipos.....	36
4.2 Rendimento dos óleos essenciais.....	37
4.3 Rendimento dos extratos – quimiotipo carvona	37
<i>Parte 2 – Análise comportamental</i>	
4.4 LTE.....	38
4.5 Campo aberto.....	46
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	55
7 PERSPECTIVAS E INVESTIGAÇÕES FUTURAS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ANEXO COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	65
---	-----------

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A ansiedade consiste em estado emocional associado ao comportamento defensivo da espécie humana, desencadeado particularmente na presença de perigo potencial. Diferente do medo, que compreende resposta frente a um perigo real, a ansiedade consiste em sensação antecipatória de apreensão, tendo papel evolutivo importante na preparação do organismo para uma possível situação de enfrentamento. No entanto, a ansiedade pode adquirir papel não adaptativo, manifestando-se de forma persistente e generalizada, passando a compor a ansiedade patológica (GOUVEIA Jr. et al., 2009; BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010; CURRAN; CHALASANI, 2012; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; GELFUSO et al., 2014).

Nesse contexto, os transtornos de ansiedade representam a condição psiquiátrica mais prevalente na prática clínica, compreendendo distintas condições patológicas comumente caracterizadas por sintomas crônicos de medo e preocupação excessivos (FAUCI et al., 2008; STAHL, 2010). De acordo com a classificação do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças (DSM-V), os transtornos de ansiedade são subdivididos em diversas categorias, entre as quais são englobadas a ansiedade generalizada e o pânico (APA, 2013).

O Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) consiste em condição clinicamente caracterizada por preocupação e ansiedade excessiva sobre uma infinidade de eventos e situações cotidianas, acompanhados por sintomas físicos de inquietude, tensão muscular, irritabilidade e dificuldade de sono ou concentração (PINHEIRO et al., 2007; HILBERT; LUEKEN; BEESDO-BAUM, 2014). Em paralelo, o Transtorno de Pânico (TP) é reconhecido por episódios recorrentes e inesperados de súbitos ataques de pânico, nos quais sentimentos de intenso medo e temor são associados a padrões cognitivo-comportamentais como desrealização, desejo de fuga e medo iminente da morte, e a alterações neurovegetativas como palpitações, tonturas, tremores, sudorese e hiperventilação. Diferindo dos ataques de pânico isolados, que constituem períodos pontuais tendo, em geral, causas reconhecidas, no TP esses ataques são seguidos de persistente preocupação sobre o desencadear de novos ataques (YANO; MEYER; TUNG, 2003; GARAKANI; MATHEW; CHARNEY, 2006; PINHEIRO et al., 2007; GRAEFF; DEL-BEN, 2008; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; RONCON et al., 2012; MOREIRA et al., 2013).

Para além das diferenças sintomáticas, essas duas condições parecem envolver distintas áreas e alvos neuronais (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014). Assim, o TAG tem sido relacionado ao comportamento defensivo (ansiedade) desencadeado em resposta a ameaças potenciais, sendo o comportamento de evitação ou esquiva uma abordagem inerente a essas situações. Por outro lado, no TP, as reações defensivas (medo ou pânico) relacionam-se à resposta de fuga frente a ameaças proximais (POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; GOMES et al., 2009).

Nesse sentido, dentre as teorias propostas para explicar a neurobiologia desses transtornos, a participação da serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) adquire papel primordial, sendo descrita na modulação tanto da ansiedade quanto do medo. Com base nisso, drogas relacionadas à neurotransmissão serotoninérgica constituem, atualmente, a estratégia principal na farmacoterapia do TAG e do TP (STAHL, 2010; CURRAN; CHALASANI, 2012; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

A 5-HT é um neurotransmissor monoaminérgico, responsável por modular circuitos neurais e, conseqüentemente, comportamentos, como aqueles relacionados à percepção da dor, sono, agressividade, saciedade, humor e funções cognitivas como memória e aprendizado. Neurônios serotoninérgicos originam-se nos núcleos da rafe (NR), localizados no tronco encefálico e projetam-se em direção a estruturas prosencefálicas e límbicas como amígdala, hipotálamo, hipocampo e córtex frontal (CURRAN; CHALASANI, 2012; AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009).

De acordo com a hipótese de Deakin e Graeff (1991), as evidências clínicas e experimentais demonstram o papel dual desse neurotransmissor nas respostas de defesa que envolvem os transtornos de ansiedade exercendo, assim, função tanto ansiogênica quanto ansiolítica (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; GRAEFF; DEL-BEN, 2008; DEL-BEN; GRAEFF, 2009). Tendo em vista que a 5-HT é um neurotransmissor de ação complexa há, pelo menos, quatorze subtipos de receptores. Assim, o paradoxo do papel dual é explicado pela ativação de diferentes receptores, responsáveis por distintas atividades neuronais, entre os quais, os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} são os mais diretamente envolvidos na ansiedade (JETTY; CHARNEY; GODDARD, 2001; AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009; BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Nesse sentido, receptores dos subtipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} podem regular a liberação e, conseqüentemente, a ação de neurotransmissores. Enquanto autorreceptores pré-sinápticos regulam em especial a neurotransmissão serotoninérgica, receptores pós-sinápticos também participam da regulação de outros neurotransmissores (AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009; BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010).

Devido à elevada densidade de receptores do subtipo 5-HT_{1A} em áreas corticais e subcorticais, esse é considerado um receptor serotoninérgico de ação predominantemente inibitória. Assim, animais geneticamente modificados com déficits ou inativação de receptores do subtipo 5-HT_{1A} podem desenvolver um fenótipo possivelmente relacionado ao comportamento ansioso, enquanto animais com superexpressão desses receptores podem desenvolver um perfil de resposta ansiolítica. Dessa forma, é possível compreender o uso, na clínica, de drogas agonistas serotoninérgicas, como a buspirona (agonista parcial de receptores do subtipo 5-HT_{1A}) no tratamento dos transtornos de ansiedade (JETTY; CHARNEY; GODDARD, 2001; AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009; BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010; LI et al., 2012; STRAUSS; VICENTE; ZANGROSSI Jr., 2013; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

Já para os receptores do subtipo 5-HT_{2C}, experimentos indicam que animais com superexpressão desse receptor no córtex e em estruturas límbicas, como amígdala e hipocampo, podem desenvolver responsividade aumentada ao estresse, enquanto que animais com inativação desse receptor são capazes de apresentar redução do comportamento ansioso (HEISLER et al., 2007; KIMURA et al., 2009; LI et al., 2012). Em corroboração, estudos têm demonstrado que a administração de agonistas do receptor 5-HT_{2C} induz um perfil ansiogênico, em oposição à administração de antagonistas, os quais abolem as propriedades ansiogênicas (MARTIN; BALLARD; HIGGINS, 2002; WALKER et al., 2005).

Além da atuação em diferentes subtipos de receptores, a ação do sistema serotoninérgico em distintas áreas cerebrais também apresenta implicações importantes no papel dual da 5-HT nos transtornos de ansiedade. Sendo assim, enquanto a 5-HT facilita as repostas defensivas de esquiva, inibe respostas de fuga, em diferentes modelos animais. Diante disso, sugere-se que o comportamento de esquiva, relacionado ao TAG, envolva os circuitos neurais do cérebro anterior, como a amígdala e córtex pré-frontal (CPF), enquanto as respostas de fuga relacionadas

ao TP sejam integradas na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) do mesencéfalo (PINHEIRO et al., 2008; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2010; GRAEFF, 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

Como reforço dessa ideia, estudos identificaram que pacientes com TAG apresentam aumento do número de corpos celulares neuronais e hiperresponsividade em estruturas como a amígdala e CPF, além da diminuição de conectividade funcional entre essas áreas (NEWMAN et al., 2013; HILBERT; LUEKEN; BEESDO-Baum, 2014). No que diz respeito aos pacientes com TP, identificou-se aumento do número de corpos celulares neuronais na região dorsal do mesencéfalo, além da ativação da MCPD durante os ataques de pânico (GRAEFF; DEL-BEN, 2008; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; GRAEFF, 2012).

Em resumo, acredita-se que as respostas defensivas nos ataques de pânico sejam desencadeadas na porção dorsal do mesencéfalo, mais especificamente na MCPD e que a neurotransmissão serotoninérgica mediada pelos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} tenha envolvimento na atenuação dessas respostas, através da modulação de neurônios localizados nessa região (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2010; GRAEFF, 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014; RONCON et al., 2012). Em contradição, as respostas defensivas no TAG são, possivelmente, mediadas pela 5-HT através da estimulação de receptores 5-HT_{2C} e reguladas pela ativação de receptores 5-HT_{1A} em estruturas prosencefálicas, como a amígdala e CPF (ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

Com isso, constatou-se, em trabalhos experimentais, que o caráter ansiolítico do esquema de administração crônica de antidepressivos estaria na regulação dos receptores serotoninérgicos por plasticidade neural, com subsequente redução fisiológica de receptores 5-HT_{2C} e aumento da responsividade (atividade intrínseca) de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (Figura 1). Em contraste, o efeito ansiogênico observado na administração de curto prazo estaria, supostamente, implicado na ação serotoninérgica menos evidente sobre receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e consequente estimulação de receptores 5-HT_{2C} (GRAEFF; BRANDÃO, 1996; PINHEIRO et al., 2008; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

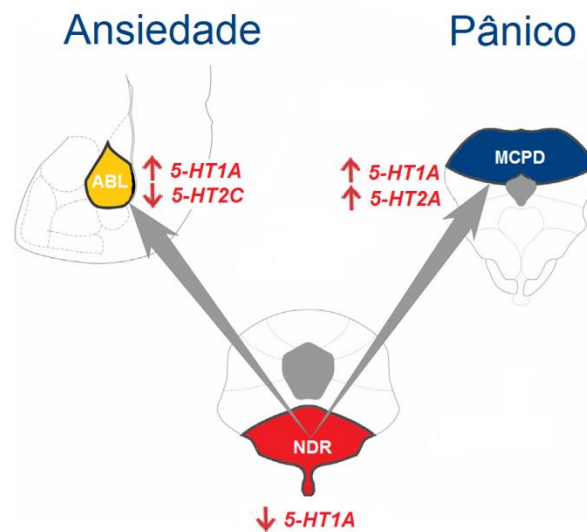


Figura 1 – Esquema das alterações causadas pela administração crônica de antidepressivos na neurotransmissão mediada pelos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} nos núcleos dorsal da rafe (NDR) e basolateral da amígdala (ABL) e na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD).

Fonte: Adaptado de Zangrossi Jr.; Graeff (2014).

Fundamentado nisso, o uso crônico de antidepressivos, com ação sobre 5-HT, é amplamente empregado na terapêutica dos transtornos de ansiedade, apresentando eficácia no controle do TAG e do TP (YANO; MEYER; TUNG, 2003; GRAEFF; DEL-BEN, 2008; MOREIRA et al., 2013). Nesse contexto, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são os medicamentos de escolha, devido a sua maior eficácia e tolerabilidade (YANO; MEYER; TUNG, 2003; STAHL, 2010), embora outras drogas antidepressivas, como os tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase (IMAO), possam ser utilizados (CAMPOS et al., 2013).

Além desses medicamentos, o TAG e o TP podem ser clinicamente tratados com outras classes terapêuticas, como as azaspironas e benzodiazepínicos, sendo distintamente afetados por essas terapias farmacológicas (POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; GOMES et al., 2009). Enquanto no TAG obtém-se êxito com benzodiazepínicos de baixa potência como o diazepam e com compostos serotoninérgicos como a buspirona, o TP, em geral, não responde adequadamente a esses agentes (POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; GRAEFF; DEL-BEN, 2008), com exceção dos benzodiazepínicos de alta potência como o alprazolam e clonazepam (MOREIRA et al., 2013). Contudo, ainda que de eficácia comprovada, o uso de benzodiazepínicos, devido ao potencial indutor de tolerância, abuso e dependência, deve se restringir ao controle agudo das crises de ansiedade ou à atuação como adjuvante temporário durante a introdução de uma terapia de alta

latência, uma vez que, se tratando de condição crônica, os transtornos ansiosos exigem tratamento prolongado (YANO; MEYER; TUNG, 2003; GARAKANI; MATHEW; CHARNEY, 2006; MOREIRA et al., 2013).

Nesse âmbito, apesar das opções farmacológicas disponíveis na clínica, um número reduzido de pacientes com transtornos de ansiedade apresenta resposta adequada ao tratamento, ou ainda desenvolvem efeitos adversos intoleráveis (CAMPOS et al., 2013; GELFUSO et al., 2014). Essa resistência tem especial relevância, uma vez que esses transtornos se associam a elevadas taxas de incapacidade, comorbidades, mortalidade e piora na qualidade de vida (IPSER et al., 2006; MENEZES et al., 2007). Dessa forma, novas abordagens terapêuticas podem garantir maiores taxas de resposta, maior adesão terapêutica, bem como menores prejuízos associados a esses transtornos (MENEZES et al., 2007; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012).

Assim, novos compostos são estudados com o intuito de identificar alternativas que sejam melhor toleradas, apresentem melhor perfil farmacológico e limitado potencial de abuso (GELFUSO et al., 2014). Com isso, avanços na compreensão da neurobiologia e tratamento dos transtornos de ansiedade são alcançados por meio da utilização de modelos animais, os quais podem ser empregados na investigação pré-clínica de novas drogas ansiolíticas, na avaliação de seus mecanismos de ação, bem como no mapeamento dos circuitos neurais envolvidos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; MOREIRA et al., 2013).

Para tanto, esses modelos delineiam os principais sintomas dos transtornos de ansiedade, baseando-se na mensuração de respostas defensivas induzidas por estímulos aversivos, ameaçadores ou conflitantes, os quais desencadeiam, nos animais, duas classes de respostas antecipatórias quando expostos a uma situação de risco. A primeira refere-se às reações de defesa desencadeadas independentemente de aprendizagem prévia, ou seja, decorre de um comportamento inato (medo incondicionado), ao passo que a segunda classe compreende respostas defensivas que atuam sobre os processos de aprendizagem, decorrentes da interação organismo-ambiente (medo condicionado) (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Com base nisso, o labirinto em T elevado (LTE) foi desenvolvido como modelo de ansiedade proposto a estudar especificamente os diferentes tipos de ansiedade, estimulando essas duas classes de resposta no mesmo animal (ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 1997; TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2000;

POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; GOMES et al., 2009). Dessa forma, o LTE consiste em modelo útil no estudo do papel dual da 5-HT nas respostas de defesa (PINHEIRO et al., 2008), permitindo a mensuração de dois comportamentos defensivos no animal, a esquiva inibitória e a fuga, os quais foram pensados no delineamento do medo condicionado (aprendido) e incondicionado (inato), respectivamente (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; PINHEIRO et al., 2008; GOUVEIA Jr. et al., 2009; MOREIRA et al., 2013). Para isso, o modelo baseia-se na aversão natural dos animais a espaços abertos e elevados (GRAEFF, 2004; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI Jr.; 2007).

O equipamento é composto por três braços de madeira de iguais dimensões, sendo um dos braços, delimitado por paredes laterais, perpendicular a dois braços abertos opostos, de modo a se formar um “T” (TORREJAIS et al., 2008; ASTH et al., 2012). Quando exposto à extremidade final do braço fechado, o animal não é capaz de visualizar os braços abertos até que sua cabeça seja exposta para além das paredes do braço fechado. Assim, a tendência natural do animal em explorar novos ambientes é confrontada pelo medo de espaços abertos e elevados. Portanto, visto que os braços abertos são aversivos ao animal, esse segue a tendência natural de permanecer no interior do braço fechado, realizando a tarefa de esquiva. Por outro lado, quando exposto à extremidade de um dos braços abertos, move-se para o interior do braço fechado, realizando a tarefa de fuga (POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014), conforme exemplificado na figura abaixo.

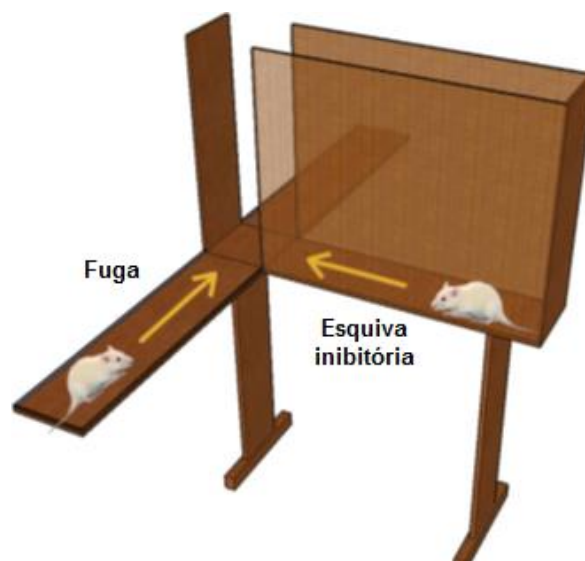


Figura 2 – Desenho do Labirinto em T elevado.
Fonte: Adaptado de Zangrossi Jr.; Graeff (2014).

Nesse sentido, significativa aprendizagem na tarefa de esquiva tem sido demonstrada pelo aumento das latências ao longo de sucessivas exposições no LTE, sendo a experiência no braço aberto fundamental para esse processo. Ao contrário disso, a latência para deixar o braço aberto não costuma ser alterada após sucessivos ensaios, corroborando a motivação aversiva dessa resposta, em contradição ao caráter condicionado da tarefa de esquiva (ZANGROSSI Jr; GRAEFF, 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; ASTH et al., 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

Levando em consideração os diferentes circuitos neuronais que envolvem esses dois comportamentos defensivos, estudos farmacológicos demonstram que compostos ansiolíticos, tais como o diazepam e a buspirona, prejudicam a esquiva inibitória sem, no entanto, alterar o comportamento de fuga (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003), enquanto a administração crônica, mas não aguda, de antidepressivos tricíclicos ou ISRS, tanto afetam a resposta de fuga quanto prejudicam a tarefa de esquiva (TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; PINHEIRO et al., 2008; RONCON et al., 2012).

Diante disso e das evidências farmacológicas clínicas, a esquiva inibitória se qualifica como parâmetro de forte valor preditivo no estudo da ansiedade generalizada, enquanto que a resposta de fuga seria um modelo para a investigação do pânico. Com isso, o LTE constitui modelo importante na detecção e discriminação de novas drogas com potencial ansiolítico e panicolítico (PINHEIRO et al., 2008; GRAEFF; DEL-BEN, 2008; GOUVEIA Jr. et al., 2009; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; GOMES et al., 2009; MOREIRA et al., 2013; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

A esse respeito, as plantas medicinais oferecem fonte rica de compostos neuroativos, ainda pouco explorados, que apresentam elevado potencial investigativo sobre os transtornos de ansiedade, uma vez que aproximadamente 43% dos pacientes fazem uso de terapia complementar (GELFUSO et al., 2014). Os conhecimentos etnofarmacológicos, vinculados ao uso popular, são de grande valia, orientando as investigações experimentais no que diz respeito à espécie e às propriedades a serem avaliadas (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012).

Com base nisso, estudos permitiram associar diferentes espécies medicinais às suas respectivas atividades biológicas, por meio da observação, descrição e investigação experimental (OLIVEIRA et al., 2011), entre os quais diversos trabalhos

tiveram como objetivo validar farmacologicamente extratos de plantas e desenvolver novas opções para o tratamento dos transtornos de ansiedade (HERNÁNDEZ et al., 2004; JUNG et al., 2006; SOUSA et al., 2008; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012; GELFUSO et al., 2014). Assim, dentre as substâncias que teriam efeito sobre a ansiedade, compostos relacionados à *Lippia alba* (Mill.) (*L. alba*), espécie vegetal amplamente empregada na medicina popular, têm sido investigados quanto às suas propriedades analgésicas, sedativas e ansiolíticas (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011).

L. alba (Verbenaceae), conhecida como erva-cidreira, erva cidreira-brasileira ou falsa-melissa é uma espécie aromática nativa do Brasil, de ocorrência em todas as regiões do país (JANNUZZI et al., 2011; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012). Seu aroma está relacionado à presença de constituintes químicos voláteis (terpenos), principalmente monoterpenos como o citral, linalol, limoneno, carvona e mirceno, predominantes no óleo essencial (OE) da planta (OLIVEIRA et al., 2006; TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012).

Os OEs compreendem misturas complexas de diversas substâncias voláteis e lipofílicas, presentes em diferentes concentrações, entre as quais duas ou três são consideradas majoritárias, ou seja, estão em concentrações em torno de 20 a 70% do óleo, e são responsáveis pelas propriedades biológicas encontradas nos óleos essenciais das plantas aromáticas (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012). Esses compostos podem ainda variar qualitativamente e quantitativamente, em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, fatores geográficos e climáticos, fase e parte da planta selecionada para a destilação do OE. Assim, variações na composição do OE têm sido observadas como consequência de influências ambientais, bem como em função de variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2006; CAMÊLO et al., 2011).

Nesse aspecto, a espécie *L. alba* é caracterizada por variabilidade fitoquímica na composição de seu OE, sugerindo a separação da espécie em diferentes quimiotipos. Com base nos componentes químicos majoritários do OE, pelo menos sete quimiotipos têm sido descritos, os quais podem apresentar distintas atividades farmacológicas (TAVARES et al., 2005; HENNEBELLE et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009; LÓPEZ, 2011). Dessa forma, estudos farmacológicos do OE de *L. alba* têm despertado o interesse de pesquisadores, a fim de estabelecer experimentalmente seus efeitos (YAMAMOTO, 2006).

Estudo envolvendo animais tratados com o OE de *L. alba* indicou efeito ansiolítico de três quimiotipos da planta no labirinto em cruz elevado (LCE) (VALE et al., 1999), enquanto testes com constituintes isolados (citrinal, beta-mirceno e limoneno) não foram capazes de demonstrar tal efeito (VALE et al., 2002). Nesse sentido, visto que alguns compostos são utilizados no tratamento de subtipos específicos dos transtornos de ansiedade, HATANO et al. (2012) propuseram a investigação das propriedades ansiolíticas da *L. alba* utilizando o LTE. Com isso, foi possível verificar que animais tratados cronicamente com OE de um dos quimiotipos de *L. alba* e um de seus constituintes isolados (carvona) apresentaram redução na latência de esquiva inibitória, sem alteração nas mensurações de fuga (HATANO et al., 2012).

Sendo assim, apesar da *L. alba* ser uma espécie vegetal amplamente empregada na medicina popular, administrada na forma de chá, com fins ansiolíticos (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011), os poucos estudos experimentais a respeito das propriedades ansiolíticas dessa planta são centrados no estudo do OE. Além disso, comparando-se ao déficit de publicações sobre a composição de seus extratos (VALE et al., 1999; VALE et al., 2002; MESO-ARANGO et al., 2009; HATANO et al., 2012), a avaliação do tratamento crônico do extrato aquoso se justifica, na medida que se aproxima do uso clínico de drogas utilizadas nos transtornos ansiosos (NIMH, 2009) e representa a forma de uso empregada na medicina popular (MESO-ARANGO et al., 2009; BRASIL 2010), podendo constituir terapia complementar e, em alguns casos, alternativa no tratamento dos transtornos de ansiedade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração crônica do extrato aquoso de *L. alba* (quimiotipo carvona) e outras drogas sobre o comportamento de animais submetidos ao modelo do LTE, analisando a possível interação dos compostos dessa planta e a neurotransmissão serotoninérgica.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar uma curva dose-resposta para o extrato de *L. alba*.
- Avaliar a latência de esquiva inibitória e fuga, bem como a frequência de bolos fecais nos diferentes grupos de animais submetidos ao LTE, após administração intraperitoneal de salina, fluoxetina, buspirona, flurazepam e extrato de *L. alba*.
- Avaliar o comportamento dos diferentes grupos de animais no modelo do campo aberto, determinando o número de cruzamentos e levantamentos centrais e periféricos, bem como a frequência de autolimpeza e de bolos fecais, a fim de verificar possível comprometimento motor para as substâncias administradas.

3 METODOLOGIA

Parte 1 - Fitoquímica

3.1 Material vegetal

3.1.1 Colheita 1 - Identificação de quimiotipos

Partes aéreas de três quimiotipos da espécie *L. alba* foram colhidas no Horto de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia (UnB – FCE), sendo as plantas provenientes de acessos obtidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O procedimento foi realizado no período da manhã (JANNUZZI et al., 2011), durante o crescimento vegetativo da planta (TAVARES et al., 2005).



Figura 3 - *Lippia alba* – Horto de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da Faculdade de Ceilândia UnB.

Os materiais vegetais foram separados, sendo utilizadas 100 gramas (g) de flores e folhas de cada quimiotipo. O material selecionado foi seco em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 35°C, por 3 dias.

3.2 Extração e análise dos óleos essenciais

3.2.1 Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação

O material seco de cada quimiotipo foi colocado separadamente em balões volumétricos de 2 litros (L), sendo acrescidos 1,5L de água destilada. Após o preenchimento dos balões, os mesmos foram colocados em manta aquecedora e condensadores acoplados a *clevengers* foram adaptados aos balões. Os *clevengers* foram preenchidos com água destilada e um sistema de refrigeração da água (8°C), conectado ao condensador, foi acionado. O procedimento de destilação foi realizado sob temperatura controlada com duração de aproximadamente 1 hora e meia (JANNUZZI et al., 2010).

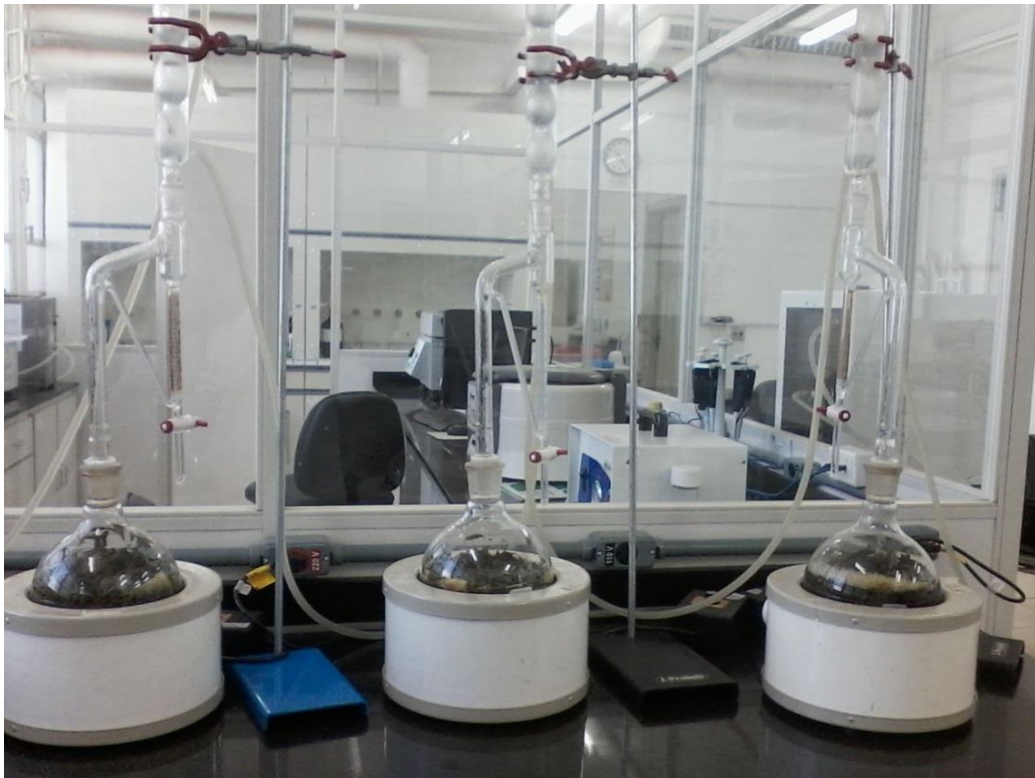


Figura 4 - Bateria de extração do óleo essencial para análise qualitativa em cromatógrafo a gás.

A mistura de água e material vegetal presente nos balões, ao entrar em ebulição, forma vapores de água e voláteis, os quais são conduzidos ao condensador. As formas líquidas condensadas de ambos, água e OE ficam, então, alojadas no tubo separador do extrator, sendo que a água retorna ao balão através do tubo de retorno, e o OE fica retido no tubo separador (Figura 5), devido às diferenças de densidade (SANTOS et al., 2004).

Dessa forma, após o término do processo de destilação e resfriamento das amostras, o OE de cada quimiotipo foi coletado no tubo separador com auxílio de pipeta de Pasteur e armazenado em *vials* devidamente identificados. O rendimento do óleo (em porcentagem) foi obtido através da relação massa de óleo extraído e massa de material vegetal seco, multiplicada por 100.



Figura 5 - Detalhe do óleo essencial dentro do tubo separador do *clevenger*.

3.2.2 Análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa

Com auxílio de micropipeta, aproximadamente 2 microlitros (μl) de cada amostra foram pesados em balões volumétricos de 2 mililitros (ml), sendo esses completados com hexano destilado até o volume de 2ml. Para obtenção de soluções na concentração de 0,01 miligramas (mg) por ml, 20 μl das soluções anteriores foram diluídos em hexano destilado até obtenção de 2ml de volume. As amostras foram, então, injetadas no volume de 1 μl em cromatógrafo gasoso (Agilent 7890A; coluna DB-5, 30m x 0,25mm d, 0,25 μm , Supelco) acoplado à espectrometria de massa (Agilent 5975C inert XL EI/ CI MSD, triple axis detector) (CG-MS), utilizando-se Hélio como gás de arraste. A ionização foi feita por impacto de elétrons (70eV; temperatura da fonte de 270°C). Foram utilizados programas de temperatura a 5°C por minuto (min) de 50°C (1min) até 150°C (0,1min), e 10°C por min até 250°C (10min). Os dados foram coletados com o software ChemStation®, utilizando a Biblioteca NIST 2008.

Cada amostra apresentou corrida de 40min no CG-MS. Posterior à emissão dos resultados, a leitura dos picos foi realizada através do programa *Agilent MSD*

productive Data Analysis®. Para identificação dos constituintes individuais foi realizada uma análise comparativa através de padrões descritos na literatura. A definição dos compostos separados por cromatografia foi realizada comparando-se o tempo de retenção relativo (TR) da substância; imagem da substância no cromatograma e índice de Kovats (IK), o qual relaciona o tempo de retenção das substâncias ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos (C_n) homólogos, sendo calculado através da fórmula (ADAM, 2007):

$$IK = \left(\left(\left(\frac{\log_{10} \left(\frac{TR}{TR_{C_n}} \right)}{\log_{10} \left(\frac{TR_{C_{n+1}}}{TR_{C_n}} \right)} \right) + C_n \right) \times 100 \right)$$

A descrição a seguir refere-se ao quimiotipo carvona selecionado para investigação quanto ao potencial ansiolítico e panicolítico, devido a maior concentração desse constituinte majoritário na planta em comparação aos demais quimiotipos, conforme demonstrado nas tabelas 1, 2 e 3 na seção resultados.

3.3 Colheita 2 – quimiotipo carvona

O procedimento de colheita realizado anteriormente foi também adotado nesse momento sendo, no entanto, colhidas apenas partes aéreas do quimiotipo carvona, no período entre as 8:00 - 8:15 da manhã. Utilizou-se todo o material vegetal disponível na ocasião, aproximadamente 270g, sendo seco em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 35°C por 3 dias.



Figura 6 - Detalhe *Lippia alba* quimiotipo carvona.

3.4 Produção de extratos

Aproximadamente 10g do material seco foram colocados no extrator de soxhlet, sendo a amostra compactada entre camadas de algodões.

O extrator foi encaixado a um balão volumétrico contendo 1L de água destilada e acoplou-se a ele um condensador de bolas, conectado a um sistema contínuo de resfriamento. O sistema foi mantido sobre chapa aquecedora durante todo o processo de extração, o qual teve duração de aproximadamente 5 horas. O esquema do equipamento e procedimento de extração é ilustrado na Figura 7. Esse mesmo procedimento foi realizado repetidas vezes, até que todo material vegetal fosse utilizado.

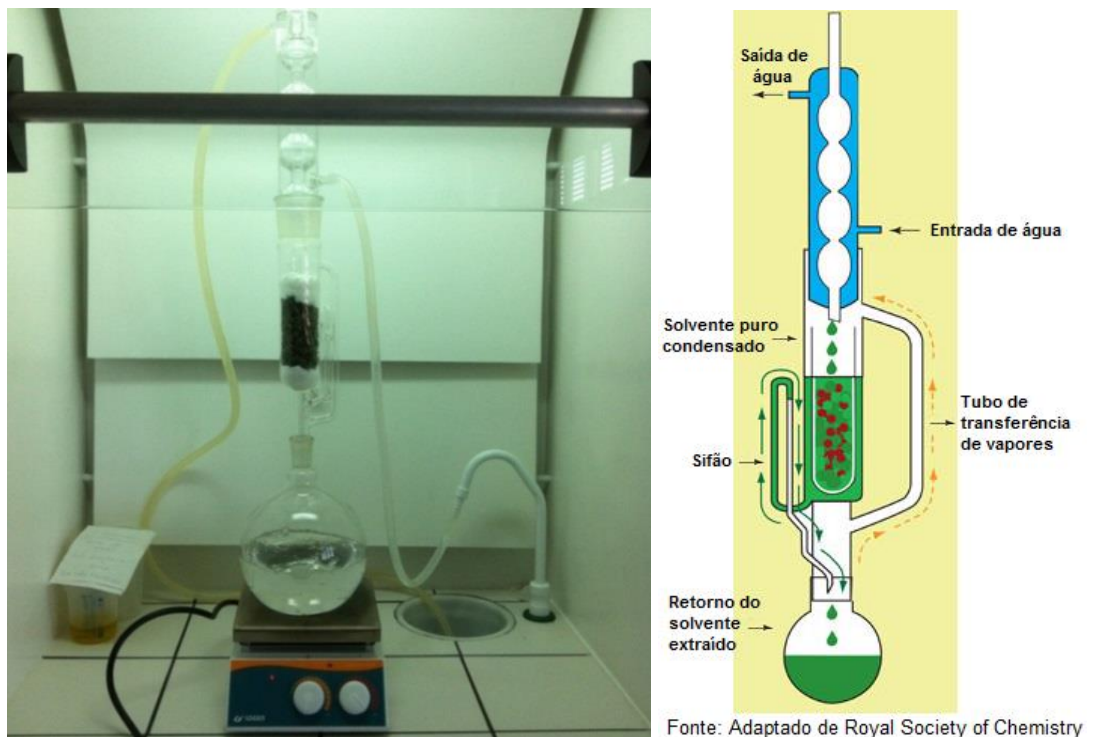


Figura 7 - Sistema de extração por soxhlet.

Com a ebulição da água, os vapores são conduzidos pelo tubo de transferência de vapor até entrar em contato com a superfície refrigerada do condensador e condensar-se. O solvente puro na forma líquida percorre toda a amostra, extraíndo seus constituintes, e a mistura de água, compostos bioativos e aromáticos (hidrolato), extraídos do material vegetal, retorna para o balão através do sifão de retorno. Esse ciclo foi repetido continuamente até que a operação de

extração fosse esgotada. Após resfriamento do extrato, esse foi armazenado em geladeira a uma temperatura de aproximadamente 5-7°C, para conservação.



Figura 8 - Extrato aquoso formado dentro do balão.

Para concentração do extrato e cálculo da dose, esse sofreu redução de volume por evaporação em chapa aquecedora, e posterior processo de liofilização. O processo de secagem por liofilização envolve a eliminação da água da amostra após seu prévio congelamento, baseando-se no fenômeno da sublimação, ou seja, a mudança do estado físico de sólido para vapor, sem a passagem pelo estado líquido. Dessa forma, o material previamente congelado foi submetido a vácuo elevado e aquecimento pelo equipamento, de modo que a água congelada sublimasse, restando apenas os sólidos secos da solução original. A sublimação da água ocorre a pressões e temperatura abaixo do ponto triplo (4,579 milímetros de mercúrio (mmHg) e 0,01°C) (NIREESHA et al., 2013). Assim, no procedimento, foram empregados os liofilizadores LIOTOP modelos L101 e K202, sendo o congelamento realizado à -54°C e pressão média de aproximadamente 130 micrômetros de mercúrio (μHg).

Com a obtenção do liofilizado, foi realizada uma curva dose-resposta para avaliação dos seus efeitos sobre o comportamento dos animais. O material na forma de pó foi refrigerado, para conservação, até o momento de sua utilização.

Parte 2 – Análise comportamental

3.5 Animais

Foram utilizadas fêmeas, com peso entre 150–270g, da espécie *Rattus norvegicus*, pertencentes à linhagem Wistar. Os animais, provenientes do Biotério do curso de Psicologia da Universidade Católica de Brasília (UCB), foram alojados em gaiolas, em grupos de 3 a 6 animais, mantidos à temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade do ar (55%) controladas, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e comida. Os experimentos foram realizados com um total de 58 animais, separados em grupos, de acordo com o tratamento farmacológico recebido, sendo esses: salina, fluoxetina, buspirona, flurazepam (controles) e nas doses de 25, 50 e 75mg/kg do extrato aquoso de *L. alba* (grupos experimentais).

O estudo (UnB DOC n.º 30581/2014) passou pela análise e aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília – Instituto de Biologia (IB), sendo os experimentos conduzidos em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

3.6 Determinação de curva dose-resposta

Considerando a dificuldade em encontrar referências na literatura científica para as doses do extrato aquoso de *L. alba* a serem administradas nos animais, as doses empregadas, no presente trabalho, foram determinadas por meio de uma curva dose-resposta. Sendo assim, utilizou-se como dose inicial 300mg/kg, baseando-se em referências de trabalhos experimentais que utilizaram extrato aquoso de outras espécies aromáticas (DANTAS et al., 2004; SHEIBANI et al., 2011), visto que a dose encontrada para a *L. alba* quimiotipo carvona referia-se ao OE, em que há maior concentração dos compostos e, por isso, foi considerada baixa (HATANO et al., 2012).

No entanto, após dois dias de administração, dois animais de um grupo de seis morreram, e um terceiro foi descartado por apresentar sinais de debilidade. Dessa forma, no terceiro dia de administração, os demais animais receberam a metade da dose (150mg/kg), ficando em observação por alguns minutos após a administração. Dessa forma, foi possível notar que a dose de 150mg/kg apresentou efeito sedativo-hipnótico, identificado pelo comprometimento motor e pela indução

de sono nos animais após, aproximadamente, 15min da administração (Figuras 9 e 10).

Com isso, a dose foi novamente reduzida pela metade e estabilizada em 75mg/kg, uma vez que essa dosagem não demonstrou prejuízo motor, visualmente identificado, nos animais. Tomando a dose de 75mg/kg como ponto de partida, as demais doses foram determinadas gradativamente em 50 e 25mg/kg.



Figura 9 – Efeito sedativo do extrato de *L. alba* 150mg/kg sobre os animais, com prejuízo locomotor visualizado pela posição das patas traseiras.



Figura 10 – Efeito hipnótico do extrato de *L. alba* 150mg/kg sobre os animais.

3.7 Drogas e doses

O extrato liofilizado foi diluído em salina (NaCl 0,9%) e os animais tratados com as doses de 25, 50 e 75mg/kg, intraperitonalmente, por 15 dias consecutivos (GOMES et al, 2009). Foram administrados também, sob as mesmas condições, NaCl 0,9% como controle geral, fluoxetina 30mg/kg, buspirona 10mg/kg (VARTY et

al., 2002) e flurazepam 10mg/kg (DAVIS, 1979; NUTT; COWEN; GREEN, 1981) como controles positivos (drogas com efeito descrito na literatura). O volume das substâncias administradas foi de 1ml/kg. Todas as drogas foram diluídas em salina.

3.8 Procedimento

Após o tratamento farmacológico, no 16º dia, cada animal foi submetido ao LTE (Figura 11). O equipamento é composto por quatro braços de madeira de iguais dimensões (50cm x 10cm), situados a 50cm do solo. Dois dos braços, delimitados por paredes laterais de 40cm, são perpendiculares a dois braços abertos opostos. Esses são envoltos por bordas de acrílico de 2cm de altura, a fim de prevenir quedas. Um dos braços fechados apresenta bloqueio de madeira, impedindo a entrada do animal. Entre os braços abertos e os fechados há uma área central de 10cm x 10cm.



Figura 11 - Labirinto em T elevado.

Inicialmente, o animal foi exposto à extremidade final do braço fechado no modelo, onde foram realizadas três mensurações da latência de esquivia inibitória, ou seja, o tempo necessário para que o animal entrasse com as quatro patas em um dos braços abertos. Posteriormente, para a medida da latência de fuga, o animal foi exposto por três vezes à extremidade de um dos braços abertos, registrando-se o

tempo gasto para o animal entrar no braço fechado, com as quatro patas (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; PINHEIRO et al., 2007; TORREJAIS et al., 2008; RONCON et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014). Cada exposição foi realizada com 1min de intervalo e com tolerância máxima de 5min para a ocorrência do comportamento (ANDRADE; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2013). Tendo em vista que o manipulador pode ser uma motivação adicional ao comportamento do animal, as três medidas são realizadas, a fim de minimizar essa influência, permitindo uma avaliação mais fiel do efeito da droga em análise (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998). Depois de cada medida de esquiva e fuga, foi avaliada a frequência de bolos fecais nos braços do LTE, uma vez que essa medida representa a atividade neurovegetativa do animal frente a uma situação estressante (RANG et al., 2007).

Após a exposição ao LTE, cada animal foi submetido por 5min ao modelo do campo aberto (Figura 12), a fim de identificar possível comprometimento motor. Durante esse período, o número de cruzamentos e levantamentos periféricos e centrais, bem como a frequência de *grooming* (auto-limpeza) e bolos fecais foram mensurados (PRUT; BELZUNG, 2003; HATANO et al., 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

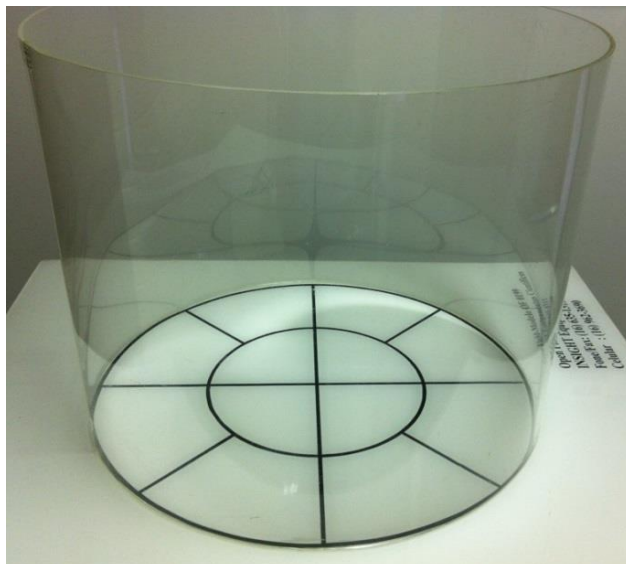


Figura 12 - Campo aberto.

O campo aberto utilizado consistiu em arena circular acrílica com 60cm de diâmetro e 50cm de altura, colocado sobre base acrílica, de forma que o animal não pudesse escapar. O assoalho, subdividido em 12 secções concêntricas, permite a

quantificação da atividade motora do animal. Os cruzamentos foram considerados quando o animal cruzava as secções do modelo com as quatro patas, andando ou correndo, enquanto que os levantamentos foram considerados quando o animal sustentava o corpo nas patas traseiras, apoiando-se ou não com as dianteiras nas paredes do modelo (PRUT; BELZUNG, 2003). Enquanto a defecação e atividade motora no centro do modelo são mais seletivas para o estudo da ansiedade, a movimentação na periferia do aparato é indicador da atividade locomotora do animal (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Após o término dos testes, esses foram reinseridos junto aos demais animais, nas respectivas gaiolas coletivas. Os experimentos foram cronometrados, acompanhados em sala adjacente, por meio de televisão (Panasonic, Brasil) e gravados em fita VHS com câmera de vídeo (Panasonic, Brasil). O quadro 1 esquematiza o procedimento realizado.

Drogas	Nº animais	Doses	IP	TESTE (16º dia)	
				Comportamentos	
				LTE	Campo aberto
Salina	10	0,9%	Tratamento por 15 dias ininterruptos	Latência de esquiva Latência de fuga Frequência de bolos fecais.	Avaliação Motora (número de levantamentos e cruzamentos). Frequência de <i>gromming</i> e bolos fecais.
Fluoxetina	8	30mg/kg			
Flurazepam	10	10mg/kg			
Buspirona	10	10mg/kg			
Extrato de <i>L. alba</i>	8	75mg/kg			
	6	50mg/kg			
	6	25mg/kg			
Total = 58					

IP = Injeção Intraperitoneal.

Quadro 1 – Esquema dos procedimentos, incluindo drogas e doses utilizadas, número de animais por grupo farmacológico, período de administração e comportamentos observados em cada modelo animal.

3.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software Sigma Stat® versão 2.0. A análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) foi utilizada para comparar tanto as latências de esquiva inibitória quanto as latências de fuga nos diferentes

grupos farmacológicos, além dos bolos fecais no LTE. Utilizou-se também a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA *one-way repeated measures* (RM)) para análise das latências de esquiva 1, 2 e 3 e de fuga 1, 2 e 3 como medidas repetidas, dentro de um mesmo tratamento. Para os dados que não se enquadraram na curva de normalidade, foi também realizada a ANOVA não-paramétrica Kruskal-Wallis, utilizando as medianas. A análise dos dados do campo aberto também foi realizada através da ANOVA *one-way*, comparando-se as medidas de cruzamentos, levantamentos, *grooming* e bolos fecais entre os diferentes grupos experimentais. As análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Student Newman-Keuls (SNK) ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

Parte 1 – Fitoquímica

4.1 Identificação de quimiotipos

As tabelas 1, 2 e 3 descrevem os constituintes identificados em cada amostra de OE analisada.

Tabela 1 – Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C_n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 1, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.

Pico	TR	C_n	TR C_n	TR C_{n+1}	IK	Constituinte	Porcentagem (%)
1	4,911	9	4,671	7,326	911	não identificado	6,557
2	5,482	9	4,671	7,326	936	a-pineno	13,472
3	7,382	10	7,326	10,951	1002	ciclotetraloxano, octametil	5,838
4	7,511	10	7,326	10,951	1006	a-felandreno	14,092
5	10,482	10	7,326	10,951	1089	z-citral	21,810
6	10,754	11	10,951	15,173	1094	e-citral	38,231

Tabela 2 – Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C_n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 2, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.

Pico	TR	C_n	TR C_n	TR C_{n+1}	IK	Constituinte	Porcentagem (%)
1	5,482	9	4,671	7,326	936	a-pineno	12,334
2	7,496	10	7,326	10,951	1006	a-felandreno	9,387
3	8,292	10	7,326	10,951	1031	limoneno	10,919
4	8,601	10	7,326	10,951	1040	gama- terpeneno	6,764
5	10,473	11	10,951	15,173	1086	z-citral	19,011
6	10,744	11	10,951	15,173	1094	e-citral	32,729
7	13,44	11	10,951	15,173	1161	elemol	8,856

Tabela 3 – Tempo de retenção (TR), cadeia carbônica (C_n), índice de Kovats (IK), constituintes identificados e porcentagens encontradas para as substâncias presentes na amostra 3, com destaque (em vermelho) para os constituintes majoritários.

Pico	TR	C _n	TR C _n	TR C _{n+1}	IK	Constituinte	Porcentagem (%)
1	5,501	9	4,671	7,326	936	a-pineno	29,885
2	7,506	10	7,326	10,951	1006	a-felandreno	4,032
3	8,292	10	7,326	10,951	1031	limoneno	17,220
4	10,601	10	7,326	10,951	1092	l-carvona	44,883
5	12,949	11	10,951	15,173	1149	b-cubeno	3,981

4.2 Rendimento dos óleos essenciais

A partir dos 100g de material vegetal *in natura* colhidos, foram obtidos 30g, 32,7g e 28,7g de material seco, após secagem em estufa, para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente. Desses últimos, obteve-se, respectivamente, 0,098g, 0,5g e 0,22g de OE. Dessa forma, os rendimentos de óleos obtidos foram de 0,33% para a amostra 1, 1,53% para a amostra 2 e 0,77% para a amostra 3.

4.3 Rendimento dos extratos – quimiotipo carvona

A massa de material vegetal fresco, quimiotipo carvona, forneceu um total de 77,79g de material seco, após secagem em estufa. Esse material, após processo de hidrodestilação e liofilização, produziu uma massa de aproximadamente 7g de extrato concentrado. Assim, o rendimento do extrato concentrado foi estimado em 9%.

Parte 2 – Análise comportamental

De acordo com a ANOVA *one-way* e ANOVA *one-way* RM, devido à variabilidade intra e inter-grupos, algumas comparações entre os dados (esquivas dos tratamentos fluoxetina, flurazepam e salina, bem como bolos fecais no LTE e levantamentos centrais no campo aberto) não se enquadram dentro da curva de normalidade. Apesar disso optou-se, neste trabalho, pela apresentação dos dados a

partir da análise paramétrica, utilizando-se as médias, no sentido de facilitar a visualização.

4.4 LTE

Com relação à latência de esquiva, em segundos (s), a ANOVA *one-way* RM, seguida pelo teste SNK, mostrou aumento, ao longo das sucessivas tentativas, para os grupos *L. alba* 75mg/kg (Esquiva 1: Média (\bar{x}) = 22,13; Erro Padrão da Média (EPM) = 3,63; Esquiva 2: \bar{x} = 86,00; EPM = 36,55; Esquiva 3: \bar{x} = 257,1; EPM = 20,03) ($F_{(2,8)} = 23,74$; $p = 0,00003$) e bupiriona (Esquiva 1: \bar{x} = 12,90; EPM = 8,86; Esquiva 2: \bar{x} = 21,40; EPM = 7,81; Esquiva 3: \bar{x} = 60,90; EPM = 21,95) ($F_{(2,10)} = 3,49$; $p = 0,052$), reforçando a ideia de aprendizado na esquiva inibitória para esses grupos, e ausência de efeito ansiolítico do extrato e da bupiriona nas respectivas doses. Para os demais grupos: salina (Esquiva 1: \bar{x} = 16,60; EPM = 2,31; Esquiva 2: \bar{x} = 18,70; EPM = 6,08; Esquiva 3: \bar{x} = 53,60; EPM = 26,69) ($F_{(2,10)} = 1,59$; $p = 0,23$); fluoxetina (Esquiva 1: \bar{x} = 102,30; EPM = 40,90; Esquiva 2: \bar{x} = 149,90; EPM = 43,77; Esquiva 3: \bar{x} = 151,30; EPM = 46,53) ($F_{(2,8)} = 1,37$; $p = 0,29$), flurazepam (Esquiva 1: \bar{x} = 77,60; EPM = 35,28; Esquiva 2: \bar{x} = 48,70; EPM = 27,12; Esquiva 3: \bar{x} = 73,50; EPM = 36,06) ($F_{(2,10)} = 1,11$; $p = 0,35$), *L. alba* 25mg/kg (Esquiva 1: \bar{x} = 54,00; EPM = 17,45; Esquiva 2: \bar{x} = 126,5; EPM = 52,45; Esquiva 3: \bar{x} = 103,00; EPM = 39,67) ($F_{(2,6)} = 1,41$; $p = 0,29$) e *L. alba* 50mg/kg (Esquiva 1: \bar{x} = 27,67; EPM = 4,93; Esquiva 2: \bar{x} = 99,50; EPM = 49,86; Esquiva 3: \bar{x} = 131,20; EPM = 41,14) ($F_{(2,6)} = 2,34$; $p = 0,15$), não foi verificada diferença estatisticamente significativa na latência de esquiva, durante as três repetições executadas embora, para a maioria dos grupos, com exceção do grupo flurazepam, pode ser verificado uma tendência de aumento da latência entre as sucessivas repetições (Figura 13).

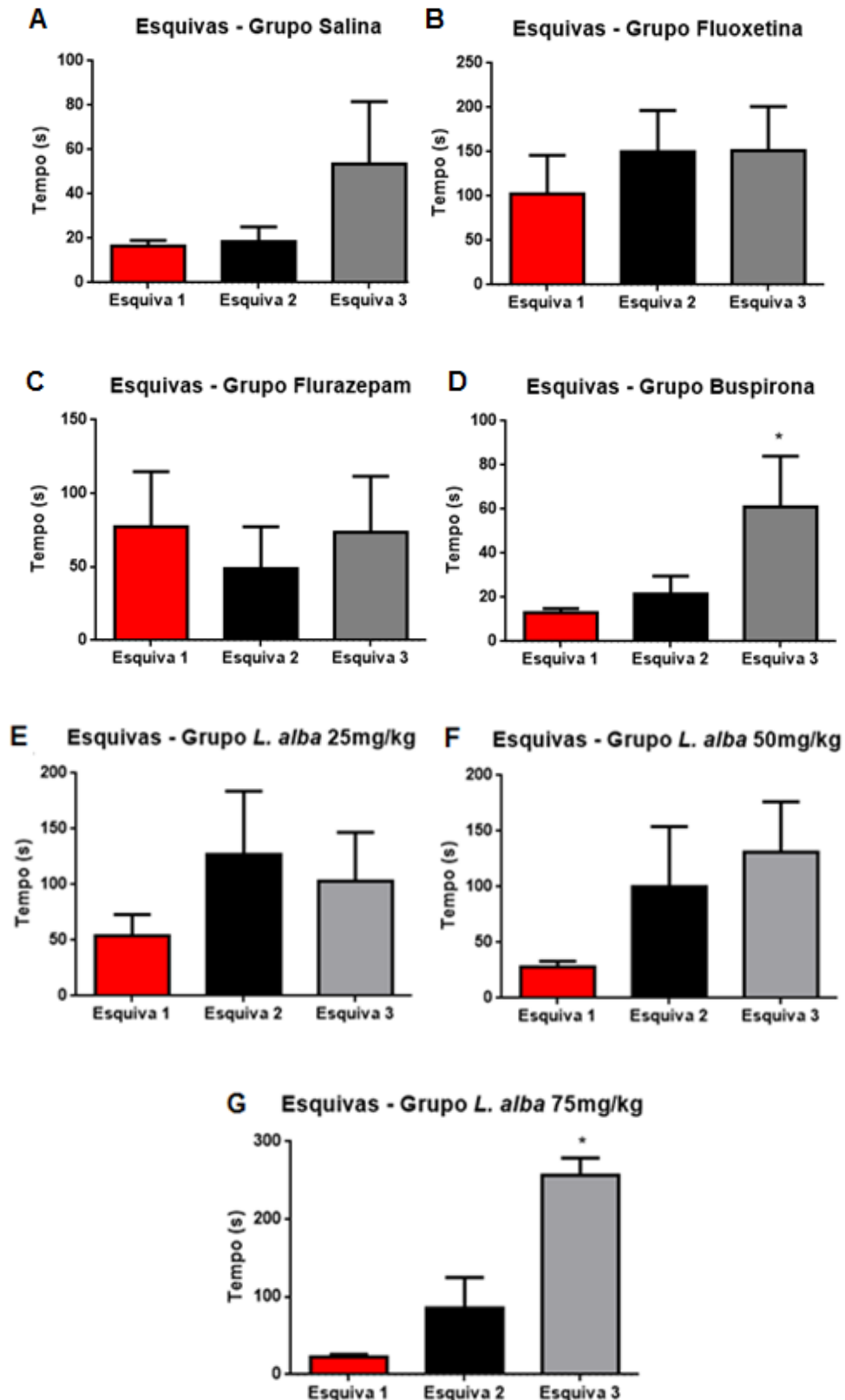


Figura 13 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiwa inibitória (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ segundo o teste de SNK. **Gráfico D:** * Indica diferença estatisticamente significativa entre as tentativas de esquiwa 1 e 3. **Gráfico G:** * Indica diferença estatisticamente significativa entre as tentativas de esquiwa 1 e 2 com a esquiwa 3.

Com relação à latência de fuga (s), a ANOVA *one-way* RM, seguida pelo teste de SNK, mostrou aumento estatisticamente significativo, ao longo das sucessivas tentativas para os grupos *L. alba* 50mg/kg (Fuga 1: \bar{x} = 26,50; EPM = 6,65; Fuga 2: \bar{x} = 72,83; EPM = 16,07; Fuga 3: \bar{x} = 113,50; EPM = 36,94) ($F_{(2,6)} = 5,35$; $p = 0,02$) e *L. alba* 75mg/kg (Fuga 1: \bar{x} = 17,50; EPM = 6,05; Fuga 2: \bar{x} = 75,38; EPM = 24,52; Fuga 3: \bar{x} = 93,25; EPM = 36,27) ($F_{(2,8)} = 4,40$; $p = 0,03$). Em contraste, para os tratamentos: salina (Fuga 1: \bar{x} = 37,20; EPM = 9,18; Fuga 2: \bar{x} = 66,60; EPM = 17,78; Fuga 3: \bar{x} = 64,50; EPM = 19,52) ($F_{(2,10)} = 1,38$; $p = 0,28$), fluoxetina (Fuga 1: \bar{x} = 45,75; EPM = 11,24; Fuga 2: \bar{x} = 36,38; EPM = 10,24; Fuga 3: \bar{x} = 59,63; EPM = 12,40) ($F_{(2,8)} = 0,87$; $p = 0,44$), flurazepam (Fuga 1: \bar{x} = 43,60; EPM = 11,94; Fuga 2: \bar{x} = 39,00; EPM = 6,89; Fuga 3: \bar{x} = 51,80; EPM = 15,46) ($F_{(2,10)} = 0,29$; $p = 0,75$), buspirona (Fuga 1: \bar{x} = 14,60; EPM = 5,55; Fuga 2: \bar{x} = 26,40; EPM = 6,26; Fuga 3: \bar{x} = 18,90; EPM = 6,59) ($F_{(2,10)} = 0,74$; $p = 0,49$), e *L. alba* 25mg/kg (Fuga 1: \bar{x} = 71,33; EPM = 32,40; Fuga 2: \bar{x} = 123,00; EPM = 33,61; Fuga 3: \bar{x} = 133,70; EPM = 39,87) ($F_{(2,6)} = 0,93$; $p = 0,43$), não foi verificada diferença estatisticamente significativa na latência de fuga, durante as três repetições executadas (Figura 14).

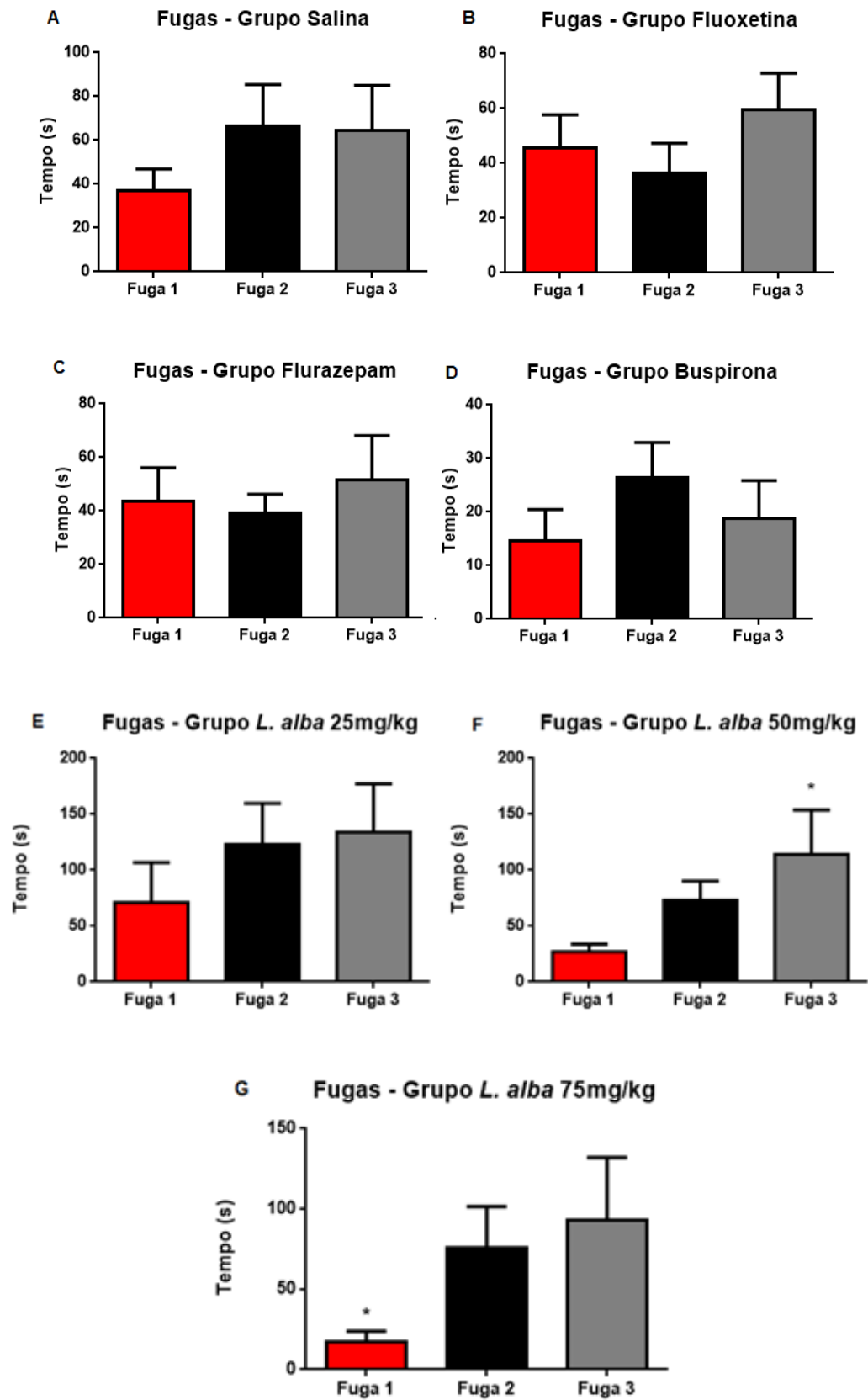


Figura 14 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ segundo o teste de SNK. **Gráfico F:** * Indica diferença estatisticamente significativa entre a tentativa de fuga 3 com a fuga 1. **Gráfico G:** * Indica diferença estatisticamente significativa entre a tentativa de fuga 1 com as fugas 2 e 3.

Através de análise comparativa entre os diversos tratamentos farmacológicos, separando cada tarefa executada pelo animal, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,14$; $p = 0,06$), seguida pelo teste de SNK, não demonstrou diferença estatisticamente significativa para a latência de esquiva 1 (s), entre os tratamentos: salina ($\bar{x} = 16,60$; EPM = 2,31), fluoxetina ($\bar{x} = 102,30$; EPM = 40,90), flurazepam ($\bar{x} = 77,60$; EPM = 35,28), buspirona ($\bar{x} = 12,90$; EPM = 8,86), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 54,00$; EPM = 17,45), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 27,67$; EPM = 4,93) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 22,13$; EPM = 3,63) (Figura 15).

De acordo com a ANOVA *one-way* não-paramétrica Kruskal-Wallis ($H = 18,60$; $p = 0,005$), seguida pelo teste de Dunn, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos fluoxetina (mediana = 37,00) e buspirona (mediana = 11,00).

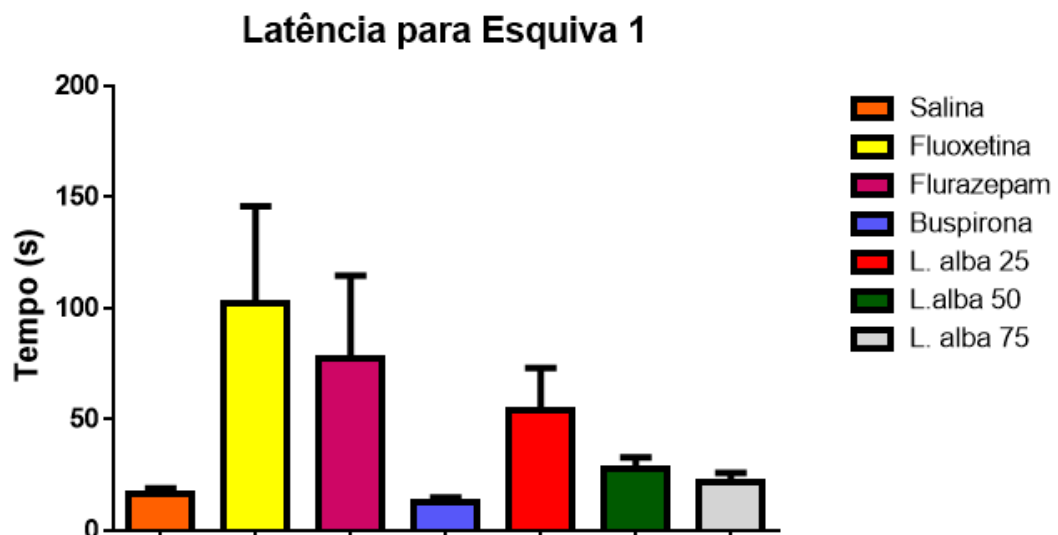


Figura 15 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 1 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK.

Para a latência de esquiva 2 (s), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,34$ e $p = 0,04$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo fluoxetina ($\bar{x} = 149,90$; EPM = 43,77) apresentou diferença estatisticamente significativa (maior latência) em comparação ao grupo salina ($\bar{x} = 18,70$; EPM = 6,08). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa com os demais tratamentos: flurazepam ($\bar{x} = 48,70$; EPM = 27,12), buspirona ($\bar{x} = 21,40$; EPM = 7,81), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 126,5$; EPM = 52,45), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 99,50$; EPM = 49,86) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 86,00$; EPM = 36,55) (Figura 16).

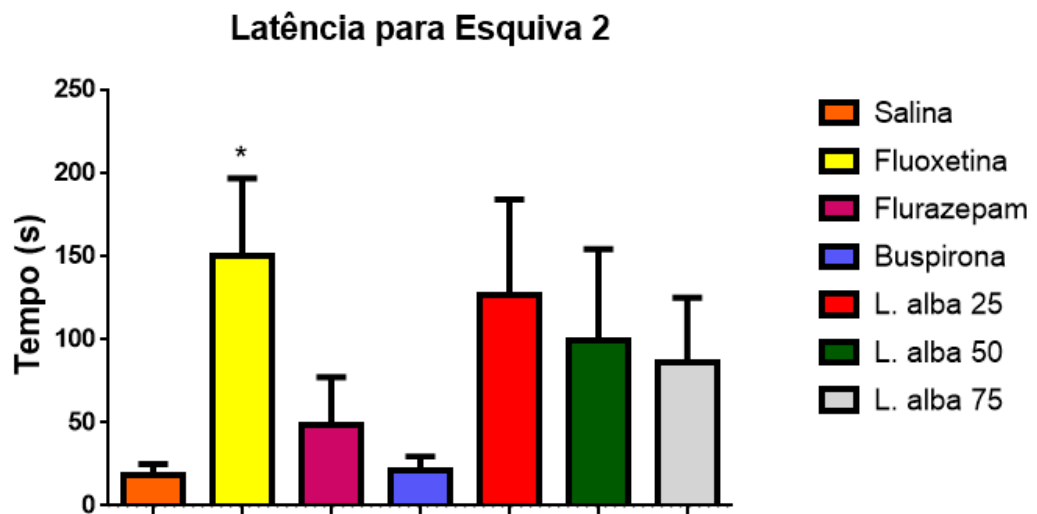


Figura 16 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 2 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo fluoxetina ($n = 8$) com o grupo salina ($n = 10$).

Na latência de esquiva 3 (s), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 4,13$ e $p = 0,001$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 257,10$; EPM = 20,03) apresentou diferença estatisticamente significativa (maior latência) em comparação aos grupos salina ($\bar{x} = 53,60$; EPM = 26,69), flurazepam ($\bar{x} = 73,50$; EPM = 36,06), buspirona ($\bar{x} = 60,90$; EPM = 21,95) e *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 103,00$; EPM = 39,67). Não foi verificada diferença significativa com os tratamentos: fluoxetina ($\bar{x} = 151,30$; EPM = 46,53) e *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 131,20$; EPM = 41,14), (Figura 17).

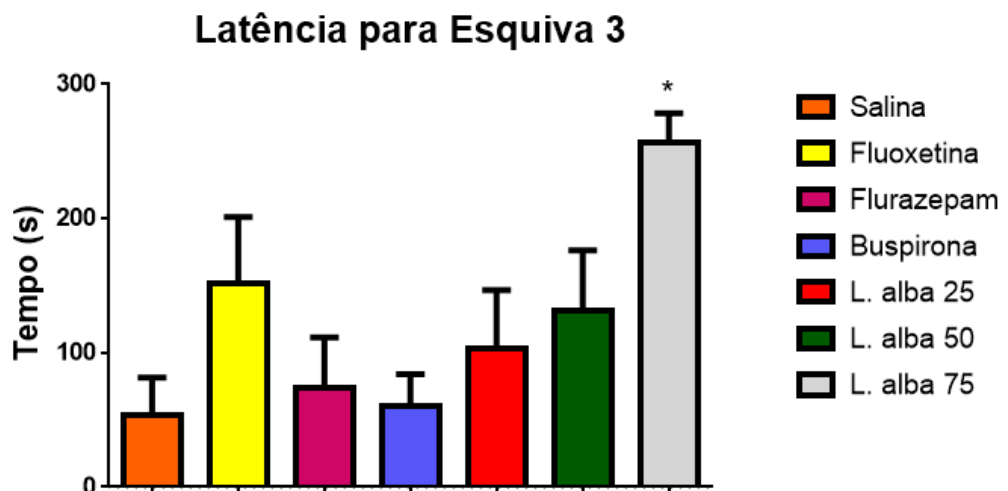


Figura 17 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de esquiva 3 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 75mg/kg ($n = 8$) com os grupos salina ($n = 10$), flurazepam ($n = 10$), buspirona ($n = 10$) e *L. alba* 25mg/kg ($n = 6$).

Com relação à latência de fuga 1 (s), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 1,88$ e $p = 0,10$), seguida pelo teste de SNK, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 37,20$; EPM = 9,18), fluoxetina ($\bar{x} = 45,75$; EPM = 11,24), flurazepam ($\bar{x} = 43,60$; EPM = 11,94), buspirona ($\bar{x} = 14,60$; EPM = 5,55), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 71,33$; EPM = 32,40), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 26,50$; EPM = 6,65), *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 17,50$; EPM = 6,05) (Figura 18).

De acordo com a ANOVA *one-way* não-paramétrica Kruskal-Wallis ($H = 13,70$; $p = 0,03$), seguida pelo teste de Dunn, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *L. alba* 25mg/kg (mediana = 39,50) e buspirona (mediana = 5,50).

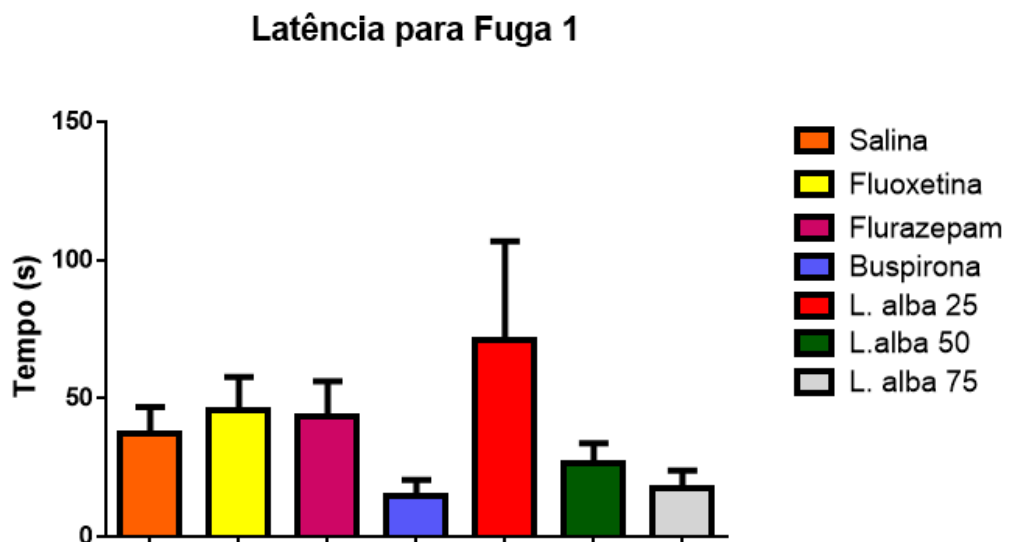


Figura 18 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 1 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK.

Para a latência de fuga 2 (s), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,96$ e $p = 0,01$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 123,00$; EPM = 33,61) apresentou diferença estatisticamente significativa (maior latência) em comparação aos grupos fluoxetina ($\bar{x} = 36,38$; EPM = 10,24), flurazepam ($\bar{x} = 39,00$; EPM = 6,89) e buspirona ($\bar{x} = 26,40$; EPM = 6,26). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa com os demais grupos: salina ($\bar{x} = 66,60$; EPM = 17,78), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 72,83$; EPM = 16,07) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 75,38$; EPM = 24,52). Embora não demonstrada diferença estatística, as três doses do extrato de *L. alba* apresentaram uma tendência para o aumento da latência de fuga em comparação aos demais grupos analisados (Figura 19).

Latência para Fuga 2

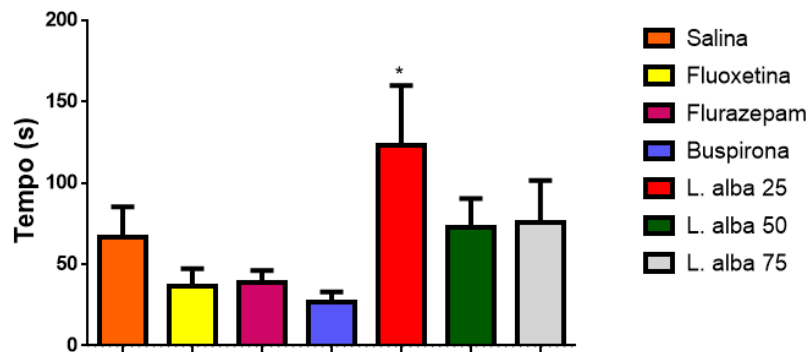


Figura 19 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 2 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 25mg/kg ($n = 6$) com os grupos fluoxetina ($n = 8$), flurazepam ($n = 10$) e buspirona ($n = 10$).

Na latência de fuga 3 (s), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,25$ e $p = 0,05$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 133,70$; EPM = 39,87) apresentou diferença estatisticamente significativa (maior latência) em comparação ao grupo buspirona ($\bar{x} = 18,90$; EPM = 6,59). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa com os demais grupos: salina ($\bar{x} = 64,50$; EPM = 19,52), fluoxetina ($\bar{x} = 59,63$; EPM = 12,40), flurazepam ($\bar{x} = 51,80$; EPM = 15,46), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 113,50$; EPM = 36,94) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 93,25$; EPM = 36,27). Embora não demonstrada diferença estatística, as três doses do extrato de *L. alba* apresentaram uma tendência para o aumento da latência de fuga em comparação aos demais grupos analisados (Figura 20).

Latência para Fuga 3

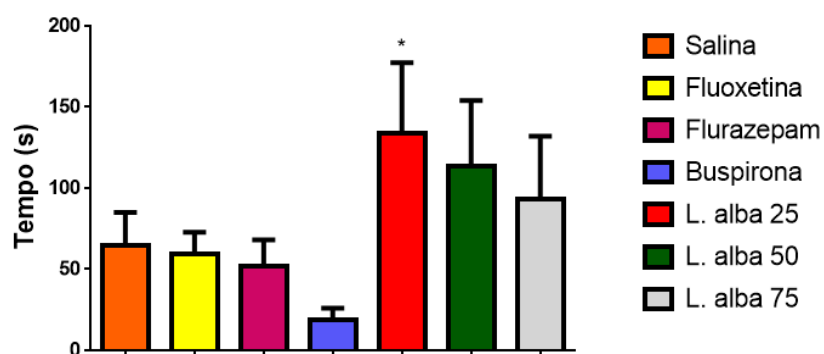


Figura 20 – Efeito dos tratamentos sobre a latência de fuga 3 (s) para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK. * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 25mg/kg ($n = 6$) com o grupo buspirona ($n = 10$).

Com relação aos bolos fecais (frequência), a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 1,30$ e $p = 0,27$), seguida pelo teste de SNK, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 2,40$; EPM = 0,76), fluoxetina ($\bar{x} = 4,38$; EPM = 1,19), flurazepam ($\bar{x} = 3,80$; EPM = 0,99), buspirona ($\bar{x} = 1,20$; EPM = 0,46), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 3,17$; EPM = 0,96), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 3,33$; EPM = 1,22) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 2,50$; EPM = 0,75) (Figura 21). Esses dados sugerem que não houve alteração na resposta do sistema neurovegetativo com os tratamentos realizados.

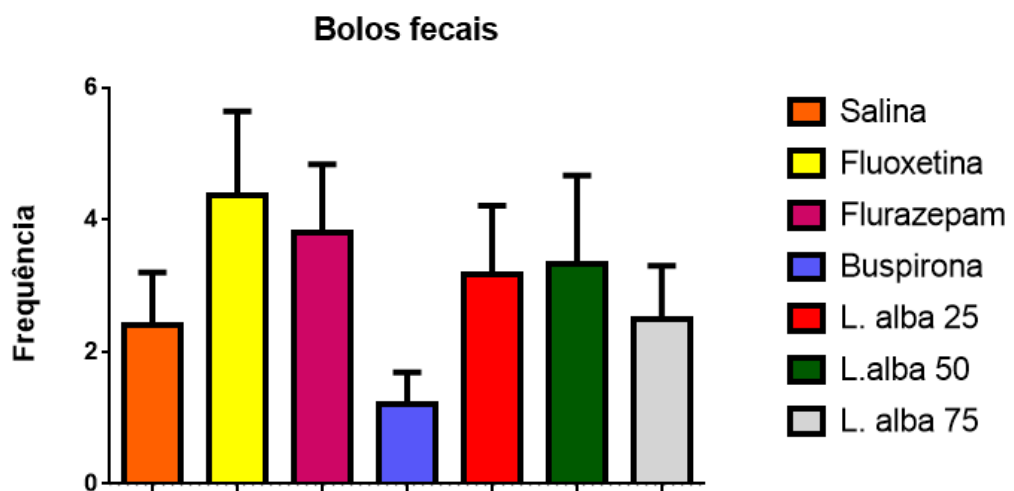


Figura 21 – Efeito dos tratamentos sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao LTE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK.

4.5 Campo aberto

Com relação ao número de cruzamentos periféricos, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,82$ e $p = 0,01$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 26,17$; EPM = 4,19) apresentou diferença estatisticamente significativa (menor número de cruzamentos) em comparação ao grupo flurazepam ($\bar{x} = 44,30$; EPM = 4,81). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa com os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 28,40$; EPM = 4,22), fluoxetina ($\bar{x} = 42,63$; EPM = 6,51), buspirona ($\bar{x} = 43,60$; EPM = 3,23), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 28,67$; EPM = 3,94) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 30,75$; EPM = 3,90).

Para os cruzamentos centrais, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,22$ e $p = 0,05$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 3,25$; EPM = 0,77) apresentou diferença estatisticamente significativa (menor número de cruzamentos) em comparação ao grupo flurazepam ($\bar{x} = 7,80$; EPM = 1,01). Não foi

verificada diferença significativa para os grupos: salina ($\bar{x} = 4,40$; EPM = 1,10), fluoxetina ($\bar{x} = 4,25$; EPM = 0,98), buspirona ($\bar{x} = 5,30$; EPM = 0,91), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 4,17$; EPM = 1,04) e *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 4,333$; EPM = 0,56).

Com relação aos levantamentos periféricos, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 2,80$ e $p = 0,020$), seguida pelo teste de SNK, demonstrou que o grupo *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 14,63$; EPM = 1,42) apresentou diferença estatisticamente significativa (menor número de levantamentos) em comparação aos grupos flurazepam ($\bar{x} = 27,50$; EPM = 2,71) e buspirona ($\bar{x} = 27,00$; EPM = 2,22). Em contraste, não foi verificada diferença significativa com os grupos: salina ($\bar{x} = 20,20$; EPM = 3,02), fluoxetina ($\bar{x} = 21,88$; EPM = 3,07), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 18,50$; EPM = 3,44) e *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 19,50$; EPM = 1,93).

Para o número de levantamentos centrais, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 1,80$ e $p = 0,12$), seguida pelo teste de SNK, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 0,70$; EPM = 0,38), fluoxetina ($\bar{x} = 0,63$; EPM = 0,35), flurazepam ($\bar{x} = 1,70$; EPM = 0,55), buspirona ($\bar{x} = 1,50$; EPM = 0,52), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 1,17$; EPM = 0,89), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 2,50$; EPM = 0,61) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 0,25$; EPM = 0,15).

Do mesmo modo, em relação à frequência de *grooming*, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 1,09$ e $p = 0,38$), seguida pelo teste de SNK, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 0,70$; EPM = 0,38), fluoxetina ($\bar{x} = 1,00$; EPM = 0,18), flurazepam ($\bar{x} = 1,20$; EPM = 0,42), buspirona ($\bar{x} = 1,60$; EPM = 0,45), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 1,83$; EPM = 0,55), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 1,83$; EPM = 0,55) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 1,75$; EPM = 0,23).

Com relação à frequência de bolos fecais, a ANOVA *one-way* ($F_{(6,58)} = 1,37$ e $p = 0,24$), seguida pelo teste de SNK, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos farmacológicos: salina ($\bar{x} = 3,00$; EPM = 0,53), fluoxetina ($\bar{x} = 2,13$; EPM = 0,62), flurazepam ($\bar{x} = 4,10$; EPM = 0,59), buspirona ($\bar{x} = 3,90$; EPM = 0,71), *L. alba* 25mg/kg ($\bar{x} = 2,67$; EPM = 0,93), *L. alba* 50mg/kg ($\bar{x} = 3,17$; EPM = 1,14) e *L. alba* 75mg/kg ($\bar{x} = 1,88$; EPM = 0,45). A Figura 22 resume os dados do campo aberto apresentados.

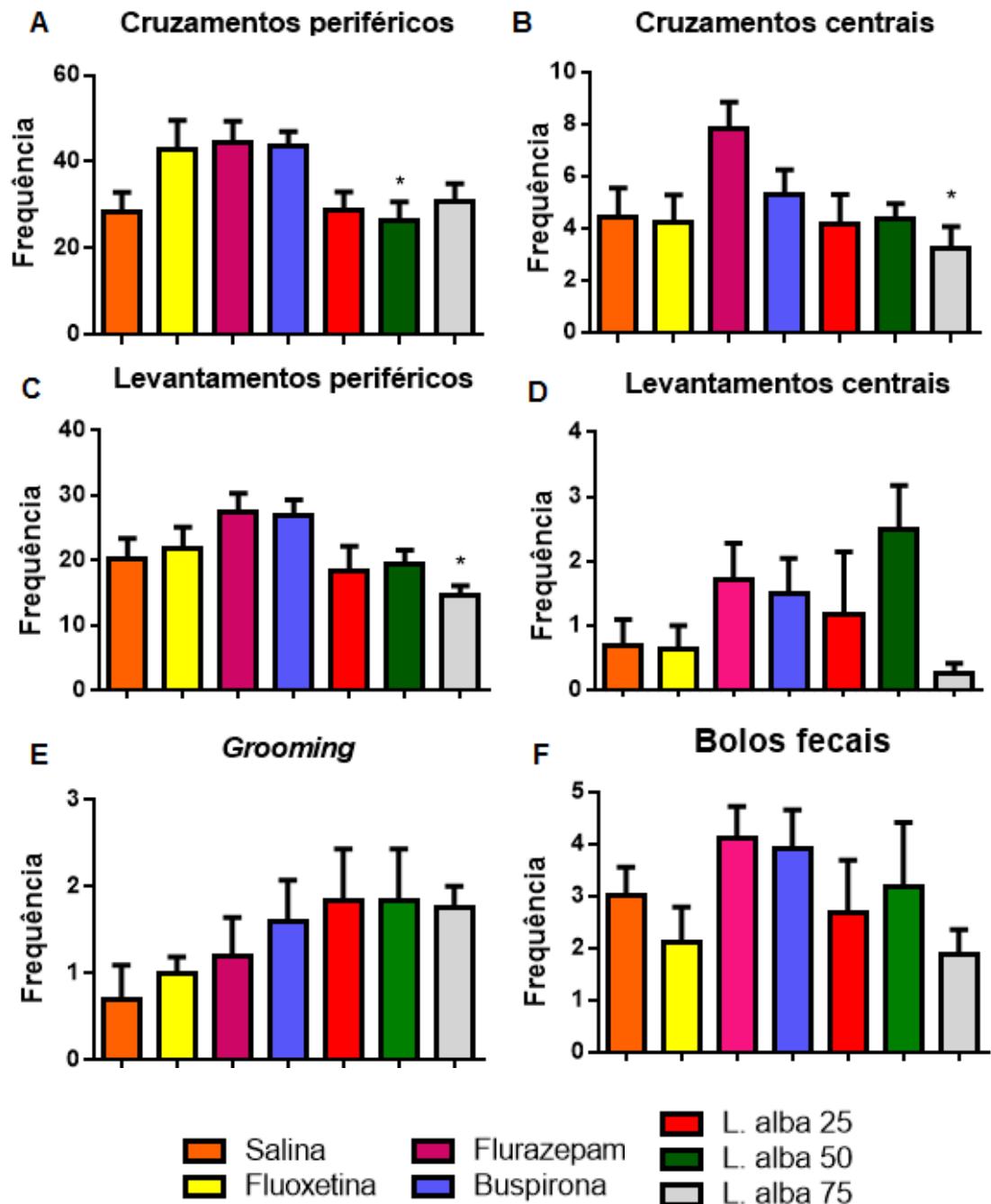


Figura 22 – Efeito dos tratamentos sobre os comportamentos observados no modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de SNK. **Gráfico A:** * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 50mg/kg ($n = 6$) com o grupo flurazepam ($n = 10$). **Gráfico B:** * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 75mg/kg ($n = 8$) com o grupo flurazepam ($n = 10$). **Gráfico C:** * Indica diferença estatisticamente significativa do grupo *L. alba* 75mg/kg ($n = 8$) com os grupos flurazepam ($n = 10$) e buspirona ($n = 10$).

5 DISCUSSÃO

Através da composição química identificada para cada amostra de OE de *L. alba* foi possível classificar as amostras 1, 2 e 3 nos quimiotipos citral, citral-limoneno e carvona-limoneno, respectivamente. Além disso, os rendimentos encontrados para os OEs foram superiores, embora não muito discrepantes, de rendimentos citados na literatura (citral: 0,19%, citral-limoneno: 0,80% e carvona-limoneno: 0,69%). Essa diferença pode evidenciar menor concentração dos constituintes para cada quimiotipo utilizado no presente trabalho, tendo em vista que os valores de rendimento são inversos à porcentagem de compostos presentes no óleo, pois quanto maior a produção, maior a diluição de seus constituintes (JANNUZZI, 2010).

No que diz respeito à análise comportamental, com os resultados obtidos, evidencia-se que o extrato de *L. alba*, nas três doses utilizadas, promoveu alteração dos comportamentos observados tanto no LTE quanto no campo aberto. Nesse sentido, visto que o LTE permite a mensuração de duas tarefas para o mesmo animal, a esquiva inibitória e a resposta de fuga, respectivamente relacionadas ao TAG e ao TP (GRAEFF; DEL-BEN, 2008; TORREJAIS et al., 2008; GOUVEIA Jr. et al., 2009; GOMES et al., 2009; MOREIRA et al., 2013), os dados encontrados permitem a avaliação do potencial ansiolítico e panicolítico do extrato, nas respectivas doses administradas. É importante ressaltar que os diferentes tratamentos empregados não alteraram significativamente a frequência dos comportamentos observados no campo aberto, em comparação ao controle geral, demonstrando que os efeitos observados no LTE não foram em decorrência de um possível comprometimento motor.

Assim, com relação às alterações na esquiva inibitória, animais controle mostram aumento na latência para abandonar o braço fechado, ao longo dos sucessivos ensaios, fornecendo evidência sobre a aquisição da esquiva inibitória, em resposta ao medo inato a espaços abertos e elevados (SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI Jr., 2005; TORREJAIS et al., 2008; ASTH et al., 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014). Dessa forma, esse padrão de resposta tem sido relacionado a um processo associativo de aprendizagem e memória sobre o caráter aversivo que os braços abertos do modelo representam para o animal (VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; GRAEFF, 2004; PINHEIRO et

al., 2007; GOMES et al., 2009; ASTH et al., 2012).

Nesse contexto, correlacionando com a clínica, sugere-se que esse padrão condicionado da tarefa de esquiva no LTE seja análogo aos comportamentos e sintomatologia observados no TAG, sendo essa tarefa considerada modelo preditivo para avaliação de drogas com efeito sobre esse transtorno (PINHEIRO et al., 2008; TORREJAIS et al., 2008; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014). Sendo assim, uma facilitação da aquisição de esquiva inibitória tem sido relacionada a um provável efeito ansiogênico, enquanto sua redução ou inibição tem sido relacionada a um possível efeito ansiolítico (SOARES; ZANGROSSI Jr., 2004; BUENO; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2007; GOMES et al., 2009; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014).

Com isso, o perfil das latências de esquiva, apontados pela ANOVA *one-way* RM para a *L. alba* 75mg/kg, apresentou aumento estatisticamente significativo entre as esquivas 1 e 3, sendo o mesmo perfil encontrado para a buspirona (Figura 13), o que pode indicar provável efeito ansiogênico para ambas as drogas. Esse dado pode estar relacionado ao papel dual da 5-HT na ansiedade, uma vez que a buspirona, um agonista parcial de receptores do subtipo 5-HT_{1A}, modula as ações desse neurotransmissor, podendo apresentar, no primeiro momento, um efeito ansiogênico (STAHL, 2010).

O dado estatisticamente significativo, obtido com a ANOVA *one-way*, quando realizada a comparação entre tratamentos para cada esquiva, corrobora esse resultado da ANOVA *one-way* RM para a *L. alba* 75mg/kg, uma vez que, na esquiva 3, essa dose do extrato apresentou maior latência de esquiva em comparação aos grupos salina, flurazepam e buspirona (Figura 17), confirmando o efeito ansiogênico para essa dose. Ao contrário, a mesma análise não confirmou o efeito ansiogênico apontado pela ANOVA *one-way* RM para a buspirona, uma vez que essa droga não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (Figuras 13, 14 e 15).

Esse dado contradiz os resultados obtidos em trabalhos experimentais em que a administração de buspirona reduz significativamente a latência de esquiva em comparação ao controle. No entanto, esses resultados são observados para a administração aguda da buspirona (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003;), o que pode constituir um resultado falso-positivo, uma vez que evidências clínicas mostram que o efeito ansiolítico

dessa droga aparece após 1 a 3 semanas de repetida administração (VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; CONNOR; DAVIDSON, 1998).

No que diz respeito à administração crônica empregada neste trabalho, os resultados obtidos corroboram estudo anterior, no qual a administração crônica de buspirona não alterou a latência de esquiva em comparação ao grupo controle (POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003). Assim, em desacordo com a clínica, a administração crônica de buspirona não foi capaz de promover efeito ansiolítico no LTE. Esse resultado não é claro, mas pode ser explicado pelo tempo de administração da buspirona empregado no presente trabalho (15 dias), o qual pode ter sido insuficiente para o início de ação da droga, uma vez que a buspirona tem como desvantagem uma alta latência de ação, sendo necessárias semanas de repetida administração para que surjam os efeitos esperados (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO, 2001). Essa suposição pode ainda ser reforçada pelo fato de outro estudo experimental demonstrar prejuízo na tarefa de esquiva (efeito ansiolítico), com uma administração crônica de 21 dias consecutivos (ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI Jr., 2005).

Quanto a esquiva 2 (Figura 16), os resultados obtidos (diferença estatisticamente significativa entre fluoxetina e salina na ANOVA *one-way* entre tratamentos) corroboram achados anteriores, mostrando que a administração crônica de fluoxetina facilitou a expressão desse comportamento no LTE (GOMES et al., 2009; TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003), ou seja, representando um efeito ansiogênico.

De acordo com a ANOVA *one-way* RM, para a fuga (Figura 14), também foi observado um aumento entre as latências do extrato de *L. alba* nas doses 50 e 75mg/kg, após as sucessivas tentativas. Por se tratar de uma tarefa relacionada ao medo incondicionado, estudos experimentais, em geral, não relatam alteração das latências de fuga ao longo das tentativas (ZANGROSSI Jr; GRAEFF, 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; ASTH et al., 2012; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2014). Dessa forma, em oposição ao concluído para as latências de esquiva, o aumento das latências de fuga pode sugerir um efeito panicolítico. Esse perfil é reforçado pela tendência de aumento das latências de fuga para as três doses administradas, parecendo haver uma relação dose dependente, uma vez que foi observada diferença estatisticamente significativa apenas com as doses de 50 e 75mg/kg, sendo essa diferença mais evidente com a maior dose (diferença da fuga 1

com as fugas 2 e 3).

Para a dose de 25mg/kg do extrato de *L. alba*, as ANOVAs paramétrica e não-paramétrica evidenciaram um aumento das latências para as fugas 1, 2 e 3 em relação ao grupo buspirona (Figuras 18, 19 e 20), enquanto que para os grupos flurazepam e fluoxetina ocorreu o mesmo em relação à fuga 2 (Figura 19). Em conjunto, esses dados estão de acordo com os achados que mostram a ausência de efeito da buspirona e do flurazepam na tarefa de fuga no LTE, confirmando o efeito panicolítico do extrato nessa dose (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI Jr., 2007). Além disso, para as fugas 2 e 3, as três doses do extrato foram superiores àquelas dos demais tratamentos, o que reforça o efeito panicolítico do extrato de *L. alba*.

No todo, esses dados apontam para um possível envolvimento dos componentes da *L. alba* com a neurotransmissão serotoninérgica pois, ao mesmo tempo que o extrato foi capaz de facilitar a tarefa de esquiva (efeito ansiogênico), prejudicou a tarefa de fuga (efeito ansiolítico), perfil que pode reforçar o papel dual da serotonina nas respostas de defesa, visto que essas duas tarefas envolvem distintos circuitos e áreas neuronais. Em corroboração, enquanto a maior dose (75mg/kg) foi capaz de evidenciar efeito ansiogênico na tarefa de esquiva, a dose de 50mg/kg apresentou uma tendência de aumento das latências entre as esquivas 1 e 3, enquanto que a dose de 25mg/kg não apresentou o mesmo perfil de resposta. Esse perfil pode ter relação com o papel dual da 5-HT na ansiedade pois, quanto maior a dose empregada, maior o número de receptores que podem ser ocupados, e mais evidentes podem ser os efeitos sobre receptores serotoninérgicos relacionados ao papel ansiogênico da 5-HT (GRAEFF et al., 1996). Isso indica que a facilitação da esquiva obtida com a *L. alba* relaciona-se com os dados da literatura envolvendo o mecanismo de ação da buspirona e da fluoxetina, ambas contribuindo para o aumento da neurotransmissão serotoninérgica, o que poderia explicar o efeito ansiogênico relatado por alguns pacientes em início de tratamento com esses fármacos.

Em oposição, a menor dose de *L. alba* (25mg/kg) foi capaz de promover um efeito panicolítico na tarefa de fuga. Essa afirmação também é possível, uma vez que, independente da dose do extrato de *L. alba*, não houve diferença entre os tratamentos em relação à salina no campo aberto, descartando um possível

comprometimento motor (Figura 22).

Ainda em relação ao campo aberto, a ANOVA *one-way* mostrou um possível efeito ansiolítico do flurazepam, havendo um aumento da frequência de cruzamentos (centro e periferia) e levantamentos (periferia) em relação às doses de 50 e 75mg/kg de *L. alba*. Esses dados estão de acordo com o achado para o aumento da latência de esquiva no LTE nas mesmas doses do extrato, sugerindo um efeito ansiogênico. Além disso, a diferença obtida no campo aberto, provavelmente, deve-se ao mecanismo de ação do flurazepam como agonista ácido gama aminobutírico (GABA), contrariamente à ação do extrato. Nesse contexto, a deambulação na área central do campo aberto tem sido relacionada à ansiedade e pode ser utilizada como parâmetro para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas, assim como proposto para a esquiva inibitória no LTE. Enquanto a atividade motora no centro do modelo é mais seletiva para o estudo da ansiedade, a movimentação na periferia do aparato é indicador da atividade exploratória do animal (PRUT; BELZUNG, 2003; TORREJAIS et al., 2008; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Quanto a utilização do extrato de *L. alba*, diferentemente do que foi encontrado por HATANO et al. (2012), em seu trabalho com o OE de *L. alba* quimiotipo carvona, relacionando esse quimiotipo com a diminuição das latências de esquiva sem alteração das latências de fuga, o presente trabalho encontrou resultados distintos, com o efeito ansiolítico observado sobre a tarefa de fuga, demonstrando possível atuação sobre o TP. Esses resultados discordantes podem evidenciar diferentes propriedades existentes entre o OE puro e o extrato aquoso da *L. alba*, uma vez que o último apresenta componentes do OE em menor concentração, somado a outros constituintes solúveis em água. A associação desses fatores, ou seja, maior diluição e a presença de outros componentes junto à carvona, podem justificar a diferença com os dados envolvendo o OE, evidenciando um possível efeito sinérgico.

Além disso, o achado contraditório em relação ao trabalho de HATANO et al. (2012) pode ser em decorrência de variações no ciclo estral das fêmeas utilizadas no presente trabalho. Assim, como uma das limitações deste trabalho pode-se citar a não realização de um controle do ciclo estral por esfregaço vaginal, fato que pode ter influência sobre os resultados obtidos. Ademais, o procedimento empregado não adotou uma pré-exposição dos animais aos braços abertos, uma vez que nem todos os trabalhos descritos na literatura utilizam esse procedimento (GRAEFF; VIANA;

TOMAZ, 1993; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI Jr., 1998; GOMES et al., 2009). No entanto, trabalhos experimentais têm demonstrado que a pré-exposição ao braço aberto, por 30min, 24 horas antes do teste, reduz a influência da atividade exploratória dos animais, aumentando a sensibilidade de drogas na tarefa de fuga (TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; PINHEIRO et al., 2007).

Portanto, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, a utilização do extrato de *L. alba* nas doses avaliadas (25, 50 e 75mg/kg) mostrou promover um efeito panicolítico no modelo do LTE, podendo o extrato constituir alternativa aos fármacos convencionais utilizados no tratamento do TP. Somado a isso, os dados apontam para uma possível interação dos componentes da planta com a neurotransmissão serotoninérgica, pois o extrato apresentou perfil semelhante à buspirona (fármaco agonista parcial de receptores 5-HT_{1A} serotoninérgicos), nas latências de esquiva, ao longo das diferentes tentativas, além de promover efeitos contraditórios (ansiógenos e ansiolíticos) nas diferentes tarefas executadas, o que pode configurar o papel dual da 5-HT na ansiedade.

6 CONCLUSÕES

- O extrato de *L. alba* na dose de 75mg/kg apresentou efeito ansiogênico, representado pelo aumento da latência entre as tentativas de esquiva, e pela maior latência de esquiva em comparação aos grupos salina, flurazepam e buspirona.
- O extrato de *L. alba* nas doses de 25, 50 e 75mg/kg apresentou efeito panicolítico, evidenciado pelo aumento da latência entre as tentativas de fuga ou pela maior latência de fuga em comparação aos grupos fluoxetina, flurazepam e buspirona.
- As três doses do extrato apresentaram maiores latências de fuga em relação àquelas dos demais tratamentos, o que reforça o efeito panicolítico do extrato de *L. alba*.
- Os dados do campo aberto descartam a possibilidade de sedação para as doses administradas do extrato, evidenciando que não houve comprometimento motor associado ao aumento das latências de esquiva e fuga no LTE.
- Em conjunto, os dados apontam para possível envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica na interação com os componentes da *L. alba*, reforçando o papel dual da 5-HT na ansiedade.
- Os resultados obtidos para o extrato de *L. alba* no LTE, diferem dos achados anteriores utilizando o OE, podendo evidenciar distintas propriedades entre essas duas formas de extração.
- Sugere-se que o extrato de *L. alba* quimiotipo carvona possa constituir terapia complementar ou alternativa no tratamento do TP.

7 PERSPECTIVAS E INVESTIGAÇÕES FUTURAS

- Sugere-se a utilização do extrato de *L. alba* em menores e/ou maiores doses, a fim de confirmar os resultados obtidos no presente estudo.
- Sugere-se, ainda, a investigação com maior número de animais para os grupos do extrato de *L. alba*, uma vez que uma das limitações deste trabalho constituiu em um n reduzido para esse tratamento (n = 6 para as doses de 25 e 50mg/kg e n = 8 para a dose de 75mg/kg).
- Propõe-se um trabalho posterior utilizando machos, a fim de comparar as respostas obtidas com as fêmeas, uma vez que uma das limitações do presente trabalho consistiu na não realização do controle do ciclo estral.
- Propõe-se, também, um trabalho que adote a pré-exposição aos braços abertos do LTE, para confirmação dos efeitos observados sobre a tarefa de fuga, apesar de não constituir um protocolo obrigatório.
- A utilização de outros modelos animais que delineiem o TAG e o TP, como a transição claro-escuro e a estimulação da MCPD, respectivamente, pode ratificar os resultados obtidos com o LTE.
- Injeções locais, intracerebrais, podem ratificar o envolvimento da 5-HT na interação com os componentes da planta, bem como relacionar o papel dual desse neurotransmissor na atuação do extrato sobre diferentes subtipos de transtornos ansiosos, pontuando seus efeitos sobre estruturas mesencefálicas relacionadas ao pânico, como a MCPD e prosencefálicas relacionadas à ansiedade generalizada, como a amígdala, hipocampo e CPF.
- Aumentar o tempo de administração seria desejável, visto que muitas drogas com efeito sobre a ansiedade apresentam alta latência para o início da ação, e diversos estudos reproduzem, experimentalmente, um tratamento crônico com um período de 21 dias de injeção (TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr., GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI Jr.; VIANA, 2003; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI Jr., 2007; PINHEIRO et al., 2008; RONCON et al., 2012).

- Sugere-se, também, a análise da composição química do extrato, bem como separação das substâncias para avaliação dos efeitos individuais de cada componente, visando verificar se os efeitos observados se devem a uma substância específica, ou ao sinergismo entre os constituintes, fornecendo base para o desenvolvimento de nova opção farmacoterapêutica sintética ou fitoterápica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R. P. **Identification of essential oil component by Gas chromatography mass spectrometry**. 4. ed. Allured Pub Corp, 2007. 804 p.

AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. **Biological Psychiatry**, v. 66, p. 627-635, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5. ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F. G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1107-1115, 2013.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO, D. F. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 233-242, 2001.

ASTH, L. et al. The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 6, p. 526– 533, 2012.

BORDUKALO-NIKSIC, T. et al. 5HT-1A receptors and anxiety-like behaviours: studies in rats with constitutionally upregulated/downregulated serotonin transporter. **Behavioural Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 238–245, 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 10, de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mar. 2010. Seção 1, p. 52-59.

BUENO, C. H.; ZANGROSSI Jr., H.; VIANA, M. B. GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 74, n. 1-3, p. 134-141, 2007.

CAMÊLO, L. C. A. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.

CAMPOS, A. C. et al. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 1, p. 13–24, 2013.

CONNOR, K. M.; DAVIDSON, J. R. T. Generalized anxiety disorder: neurobiological and pharmacotherapeutic perspectives. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1286–1294, 1998.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2012. p. 192 – 217.

CURRAN, K. P.; CHALASANI, S. H. Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us. **Invertebrate Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 81-92, 2012.

DANTAS, M. C. et al. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p.129–133, 2004.

DAVIS, M. Diazepam and flurazepam: effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 62, n. 1, p. 1-7, 1979.

DEAKIN J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305-315, 1991.

DEL-BEN, C. M.; GRAEFF, F. G. Panic Disorder: Is the PAG involved? **Neural Plasticity**, 2009.

FAUCI, S. et al. **Harrison Medicina Interna**. 17 ed. Mc Graw Hill, 2008. 2 v.

GARAKANI, A.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 73, n. 7, p. 941-949, 2006.

GELFUSO, E. A. et al. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, n. 1, p. 150-165, 2014.

GOMES, K. S. et al. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 78, n. 6, p. 323–327, 2009.

GOUVEIA Jr., A. et al. The effects of diazepam on the elevated T-maze are dependent on the estrous cycle of rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 227 – 233, 2009.

GRAEFF, F. G. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 366-375, 2012.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239–259, 2004.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 3. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1996.

GRAEFF, F. G.; DEL-BEN, C. M. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1326–1335, 2008.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI Jr., H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–246, 1998.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI Jr., H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 207-217, 2010.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238-243, 2012.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 5, p. 491–496, 2007.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211–222, 2008.

HERNÁNDEZ, M. M. et al. Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 93–98, 2004.

HILBERT, K.; LUEKEN, U.; BEESDO-BAUM, K. Neural structures, functioning and connectivity in generalized anxiety disorder and interaction with neuroendocrine systems: a systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 158, p. 114–126, 2014.

IPSER, J. C. et al. Pharmacotherapy augmentation strategies in treatment-resistant anxiety disorders. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 18, n. 4, 2006.

JANNUZZI H. et al. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H. et al. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

JETTY, P. V.; CHARNEY, D. S.; GODDARD, A. W. Neurobiology of generalized anxiety disorder. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 75-97, 2001.

JUNG, J. W. Anxiolytic effects of the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 193-197, 2006.

KIMURA, A. et al. Overexpression of 5-HT_{2C} receptors in forebrain leads to elevated anxiety and hypoactivity. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 299–306, 2009.

LI, Q. et al. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptors and anxiogenic effects of 5-HT_{2C} receptors in the amygdala of mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 474-484, 2012.

LÓPEZ, M. A. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 479-488, 2011.

MARTIN, J. R.; BALLARD, T. M.; HIGGINS, G. A. Influence of the 5-HT_{2C} receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 4, p. 615–625, 2002.

MENEZES, G. B. et al. Resistência ao tratamento nos transtornos de ansiedade: fobia social, transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p. 55-60, 2007.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MOREIRA, F. A. et al. Modeling panic disorder in rodents. **Cell and Tissue Research**, v. 354, n. 1, p. 119-125, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH (NIMH). Department of Health and Human Services. **Anxiety disorders**. U.S.A., n. 9, 2009. Disponível em: <http://www.nimh.nih.gov>. Acesso em: 07/06/2014.

NEWMAN, M. G. et al. Worry and generalized anxiety disorder: a review and theoretical synthesis of evidence on nature, etiology, mechanisms, and treatment. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 9, p. 275–97, 2013.

NIREESHA, G. R. et al. Lyophilization/Freeze Drying - an review. **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 87-98, 2013.

NUTT, D. J.; COWEN, P. J.; GREEN, A. R. Studies on the post-ictal rise in seizure threshold. **European Journal of Pharmacology**, v. 71, n. 2-3, p. 287-295, 1981.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103–108, 2006.

OLIVEIRA, L. S. et al. Plantas medicinais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da reserva biológica do Tinguá, RJ, Brasil - metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, p. 54-74, 2011.

PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 71-85, 2007.

PINHEIRO, S. N. et al. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 132–137, 2008.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI Jr., H.; VIANA, M. B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185-92, 2003.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RANG, H. P. et al. Fármacos antidepressivos. In_____. **Farmacologia**, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 557-574.

RONCON, C. M. et al. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 525-531, 2012.

SANTOS, A. S. et al. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado Técnico 99**, Belém, PA, 2004.

SANTOS, L.; ANDRADE, T. G.; ZANGROSSI Jr., H. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 4, p. 733-741, 2005.

SHEIBANI, V. et al. Evaluation of *Origanum Vulgare* L. ssp. *Viridis* leaves extract effect on discrimination learning and LTP induction in the CA1 region of the rat hippocampus. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 177-184, 2011.

SOARES, V. P.; ZANGROSSI Jr., H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 181-188, 2004.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2012. 372 p.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações práticas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

STRAUSS, C. V. A.; VICENTE, M. A.; ZANGROSSI Jr., H. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. **Behavioural Brain Research**, v. 246, p.103–110, 2013.

TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204–220, 2011.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 4, p. 571–576, 2000.

TORREJAIS, J. C. M. et al. The elevated T-maze as a measure of two types of defensive reactions: a factor analysis. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 4, p. 376–379, 2008.

VALE, T.G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, n. 2, p. 127–133, 1999.

_____. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709–714, 2002.

VARTY, G. B. et al. The gerbil elevated plus-maze I: behavioral characterization and pharmacological validation. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 357-370, 2002.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C. GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 549-554, 1994.

WALKER, E. A. et al. Selective and nonselective serotonin antagonists block the aversive stimulus properties of MK212 and m-chlorophenylpiperazine (mCPP) in mice. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 8, p. 1210-1219, 2005.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Instituto Agrônomo, Campinas, SP, 2006.

YANO, Y.; MEYER, S. B.; TUNG, T. C. Modelos de tratamento para o transtorno do pânico. **Revista Estudos de Psicologia**, v. 20, n. 3, p. 125-134, 2003.

ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

_____. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2014.


ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI Jr., H. Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 4, p. 1188-1195, 2007.

_____. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 7, p. 543-52, 2005.

ANEXO

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO TRABALHO

PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de março de 2014.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**EFEITOS DA LIPPIA ALBA SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO LABIRINTO EM T ELEVADO**”, UnBDOC n.º 30581/2014, sob responsabilidade do Professor José Eduardo Pandóssio foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.