

Efeito ansiolítico do extrato etanólico das folhas de *Citrus aurantium L.* em *Mus musculus*

Anxiolytic effect of the ethanolic extract of the leaves of *Citrus aurantium L.* on *Mus musculus*

Efecto ansiolítico del extracto etanólico de las hojas de *Citrus aurantium L.* sobre *Mus musculus*

Recebido: 21/09/2023 | Revisado: 30/09/2023 | Aceitado: 02/10/2023 | Publicado: 05/10/2023

Tássyo Alax Nascimento Sampaio de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7682-9586>

Centro Universitário Unifacid Idomed, Brasil

E-mail: sampaioatassyo@gmail.com

Ana Beatriz Ferreira Diniz

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-1197-0514>

Centro Universitário Unifacid Idomed, Brasil

E-mail: anabial23fd@gmail.com

Célio Augusto Freitas Melo Junior

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-1389-4588>

Centro Universitário UNINOVAFAPI, Brasil

E-mail: celiomelojunior@gmail.com

Tássyla Nascimento Sampaio de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4225-8857>

Faculdade Pitágoras de Medicina de Codó, Brasil

E-mail: tassyla.18@hotmail.com

Cristiano Ribeiro Gonçalves Affonso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-2641>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: cristianorgaffonso@yahoo.com

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito ansiolítico do extrato etanólico das folhas de *Citrus aurantium L.*, sobre modelos experimentais sensíveis às drogas ansiolíticas. Os camundongos foram divididos em três grupos (teste, controle positivo, controle negativo) para administração do extrato etanólico das folhas de *Citrus aurantium L.*, diazepam e veículo. Para avaliação da atividade motora em camundongos (atividade espontânea), foram realizados os testes de Campo Aberto “Open Field” e Esconder as Esferas. Os valores experimentais obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e as análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn’s e da espectrofotometria para identificação dos principais compostos presente no EECAL. Os resultados mostraram que para o grupo dos animais tratados com o EECAL (500mg/kg), observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) da capacidade exploratória em $66,4 \pm 6\%$ em relação ao controle negativo (CN), quando comparado os três tempos de forma cumulativa. Os dados da avaliação da compulsividade animal no modelo de esconder esferas, evidenciam que o EECAL (500mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a compulsão aparente em $79,2 \pm 0,3\%$, quando comparado ao controle negativo (CN). Desta forma, tendo como base as análises realizadas, pode-se concluir que o Extrato Etanólico da *Citrus aurantium L.* apresenta significativo efeito ansiolítico, além da diminuição da atividade motora espontânea, indicando um possível perfil de efeito semelhante aos benzodiazepínicos com provável depressão do SNC.

Palavras-chave: Ansiedade; *Citrus aurantium L.*; Extrato; Fitoterapia.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the possible anxiolytic effect of the ethanolic extract of *Citrus aurantium L.* leaves on experimental models sensitive to anxiolytic drugs. The mice were divided into three groups (test, positive control, negative control) for administration of the ethanolic extract of *Citrus aurantium L.* leaves, diazepam and vehicle. To assess motor activity in mice (spontaneous activity), the Open Field and Hide the Spheres tests were carried out. The experimental values obtained are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and statistical analysis was carried out using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn’s multiple comparison test and spectrophotometry to identify the main compounds present in EECAL. The results showed that for the group of animals treated with EECAL (500mg/kg), there was a significant reduction ($p < 0.05$) in exploratory capacity of $66.4 \pm 6\%$ compared to the negative control (NC), when the three times were compared cumulatively. The data from the evaluation of animal compulsivity in the ball-hiding model showed that EECAL (500mg/kg) significantly ($p < 0.05$) reduced apparent compulsion by $79.2 \pm 0.3\%$ when compared to the negative control (NC). Thus, based on

the analyses carried out, it can be concluded that the ethanolic extract of *Citrus aurantium L.* has a significant anxiolytic effect, as well as a decrease in spontaneous motor activity, indicating a possible profile of effects similar to benzodiazepines with probable CNS depression.

Keywords: Anxiety; *Citrus aurantium L.*; Extract; Phytotherapy.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el posible efecto ansiolítico del extracto etanólico de hojas de *Citrus aurantium L.* en modelos experimentales sensibles a fármacos ansiolíticos. Los ratones se dividieron en tres grupos (prueba, control positivo, control negativo) para la administración del extracto etanólico de hojas de *Citrus aurantium L.*, diazepam y vehículo. Para evaluar la actividad motora de los ratones (actividad espontánea), se llevaron a cabo las pruebas de campo abierto y esconder las esferas. Los valores experimentales obtenidos se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) y se realizaron análisis estadísticos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn y espectrofotometría para identificar los principales compuestos presentes en EECAL. Los resultados mostraron que para el grupo de animales tratados con EECAL (500mg/kg), hubo una reducción significativa ($p < 0,05$) en la capacidad exploratoria de $66,4 \pm 6\%$ en comparación con el control negativo (NC), cuando se compararon los tres tiempos acumulativamente. Los datos de la evaluación de la compulsividad animal en el modelo de esconder pelotas mostraron que EECAL (500mg/kg) redujo significativamente ($p < 0,05$) la compulsión aparente en un $79,2 \pm 0,3\%$ en comparación con el control negativo (NC). Así, en base a los análisis realizados, se puede concluir que el extracto etanólico de *Citrus aurantium L.* tiene un efecto ansiolítico significativo, así como una disminución de la actividad motora espontánea, indicando un posible perfil de efectos similares a las benzodiazepinas con probable depresión del SNC.

Palabras clave: Ansiedad; *Citrus aurantium L.*; Extracto; Fitoterapia.

1. Introdução

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (Andrade et al., 2007).

O Brasil apresenta um grande arsenal de plantas medicinais ainda disponíveis para estudo. De acordo com Pedrosa et al. (2021), planta medicinal é toda planta que administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica. Tendo em vista que estas são utilizadas pela grande maioria da população de forma indiscriminada como um tratamento alternativo frente à terapia com medicamentos alopáticos. A utilização de plantas também pode levar à ocorrência de efeitos adversos, seja pelo seu uso isolado, de modo inadequado, uso crônico ou em associação com medicamentos convencionais ou mesmo com outras plantas e fitoterápicos (Enioutina et al., 2017).

Diante do interesse pelas plantas medicinais, surgiu a fitoterapia, que compreende a utilização de matérias primas vegetais para a produção de medicamentos, no qual teve início do seu reconhecimento na década de 70 pela OMS (Organização Mundial de Saúde), acentuando as práticas de atividades alternativas no cuidado à saúde (Brasil, 2006). A segurança e a eficácia na utilização de uma planta medicinal dependem da identificação correta da planta, conhecimento de qual parte deve ser usada, modo de preparo, forma de uso e dose apropriada, que agregam saberes do uso popular consolidado e evidências reveladas por estudos científicos (Colet et al., 2015).

Nesse sentido, o Estado brasileiro instituiu a Portaria nº 22/1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Resolução - RDC nº 17/2000 que classifica os fitoterápicos como medicamentos e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Direcionando assim o desenvolvimento de pesquisas, resultando na construção de um elenco de plantas fitoterápicas, com ações comprovadas em diversos tratamentos, dentre eles o TAG (Tratamento de ansiedade generalizada) como, *Ginkgo biloba*, *Matricaria recutita* (camomila), *Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Galphimia glauca* e *Piper methysticum* (Kava-Kava) (Faustino et al., 2010).

A ansiedade apresenta-se como um dos temas mais discutidos cientificamente, posto sua associação às alterações neuropsicofisiológicas. A ansiedade é caracterizada pela presença do medo persistente, excessivo e irracional. Como característica geral, os quadros ansiosos apresentam-se como estado de apreensão ou tensão, frequentemente acompanhado de sensações físicas. Segundo Lee et al. (2011), cerca de 10% da população mundial sofre a partir das várias formas de transtornos de ansiedade, e seus reflexos patológicos, a partir de sintomas, como: hipertensão arterial, frequência cardíaca elevada, sudorese, cansaço, sensação desagradável, tensão, irritabilidade, agitação, entre outros. Se não tratada, 40% a 50% dos pacientes podem evoluir para estados depressivos e possíveis ideações suicidas. Os sintomas trazem enorme impacto negativo para o indivíduo acometido, suas famílias, seu âmbito social e profissional.

Os benefícios das frutas cítricas para saúde têm sido atribuídos à presença de constituintes bioativos como compostos fenólicos, vitamina C, monoterpênicos e carotenóides, entretanto outros estudos também mostram que as espécies pertencentes a este gênero são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (Viana et al., 2016). O *Citrus aurantium L.* (CAL), popularmente conhecido como Laranja-azedada, tem sido utilizado para fins de pesquisa como alternativa substitutiva a drogas antidepressivas, ansiolíticas, anticonvulsivantes e indutores do sono, o que sugere ações depressoras do SNC. Tradicionalmente, é usado como um medicamento alternativo em alguns países para tratar ansiedade, insônia e como anticonvulsivante, o que sugere ações depressoras do SNC. Tem-se apresentado resultados significativos em estudos pré-clínicos, principalmente no que se refere à redução de sintomas ansiogênicos (Carvalho & Costa, 2002).

Considerando as indicações populares para o uso da espécie vegetal, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito ansiolítico do extrato etanólico das folhas de *Citrus aurantium L.*, sobre modelos experimentais sensíveis a drogas ansiolíticas, pois o seu uso popular como planta medicinal para o tratamento dos sintomas característicos da ansiedade já está presente em várias culturas, sendo o chá da folha uma das partes mais utilizadas como adjuvantes no tratamento da ansiedade.

2. Metodologia

O presente estudo encontra-se de acordo com os procedimentos éticos regulamentados na *Lei Nº 11.794 (2008)* inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, do *Decreto nº 6.899 (2009)* e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais em projetos de Pesquisa.

Está pesquisa é do tipo experimental, a qual inclui parâmetros observacionais e analíticos, que segundo Wolffenbüttel (2023) caracteriza-se como pesquisa qualitativa e quantitativa. Para compor o cenário da pesquisa foram coletados 400g de folhas da *Citrus aurantium L.*, provenientes da cidade de Teresina-PI, Latitude -5.10568 e Longitude -42.6988, cultivados no *Viveiro Júlio César*. Cabe ressaltar, que o material coletado fora descrito em uma exsicata depositada no *Herbário Graziela Barroso (TAPB)*, localizado na Universidade Federal do *Piauí*, sob nº 31.673.

Baseando-se em outros projetos de pesquisas e metodologias adotadas disponíveis na literatura, como a utilizada por Pultrini et al., (2006) e na política da redução do número de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014, utilizou-se apenas o número mínimo para as análises estatísticas. A amostra constituiu-se, no total por 36 (trinta e seis) camundongos da linhagem *swiss*, espécie *Mus musculus*, do sexo masculino com peso de 25-40g. Os camundongos foram divididos em três grupos (teste, controle positivo, controle negativo) nos seguintes testes: método de Campo Aberto “Open Field” e Teste de Esconder Esferas. Para cada teste, foram utilizados 18 (dezoito) animais divididos igualmente entre os grupos. Esse número justifica-se pela necessidade da obtenção de resultados estatisticamente significativos em modelos comportamentais, assim assegurando respeito aos animais e garantindo a qualidade científica ao projeto de pesquisa. Logo após, como método de eutanásia, utilizou-se sobredose de anestésico barbitúrico por via

intraperitoneal associado a anestésico local (lidocaína 2%). Os testes foram realizados no Laboratório do Centro Universitário Unifacid Idomed, em Teresina-PI, durante o período de fevereiro a dezembro de 2018.

2.1 Preparação do Extrato

Para preparo do extrato, utilizou-se cerca de 180g de material em pó (folhas secas e trituradas) repousado em becker embebido em 500 mL de etanol a 95%. O recipiente com o conteúdo foi selado e mantido por um período de 7 (sete) dias de acompanhamento com agitação ocasional. Toda a mistura foi submetida a uma filtração grosseira por um pedaço de material de algodão limpo e branco. Em seguida, filtrada através de papel filtro. O filtrado (extrato etanólico) foi submetido a processo de evaporação. O concentrado final, designado como extrato bruto de etanol, foi transferido para um recipiente fechado para utilização posterior (Zulfiker et al., 2010). O concentrado obtido, denominado Extrato Etanólico de *Citrus aurantium L.* (EECAL), apresentou como características coloração esverdeada, com massa de 7,08g.

2.2 Triagem Fitoquímica

Para a análise da substância proposta neste trabalho, utilizou-se um Espectrofotômetro UV-Vis Duplo Feixe (QUIMIS, modelo Q798UV-06/118/220 V 100W), com escala de absorvância (abs) de 0 - 1,5 e transmitância de 190nm - 500nm. Realizou-se a identificação dos grupos químicos presentes no EECAL, através da análise do comprimento de onda em comparativo com as literaturas disponíveis acerca dos constituintes da espécie estudada.

2.3 Teste Campo aberto (Open Field)

Inicialmente, realizou-se uma análise do estado físico e comportamental dos camundongos selecionados para a realização do teste, sendo excluídos os que não responderam positivamente às características de peso (25-40g), apresentação de ferimentos e comportamento agressivo. Utilizou-se 18 (dezoito) animais divididos igualmente entre os três grupos experimentais, sendo administrado por via oral o EECAL (Extrato Etanólico de *Citrus aurantium L.*) 500mg/kg, Diazepam 5mg/kg e Solução Salina 0,1ml/10g. O campo aberto consistiu de uma caixa quadrada de madeira (45 x 45 cm) com paredes laterais de 30 cm e o solo dividido em 9 quadrantes (15 x 15 cm), sem barreira física entre eles. Nesse teste foi registrado o número de cruzamentos (número de quadrantes percorridos). Após 30 minutos da administração, os camundongos foram colocados no centro do campo aberto, contando-se o número de quadrantes invadidos pelos animais durante o tempo de 5 minutos, dando-se intervalo de 10 minutos e repetindo-se a contagem de quadrantes invadidos por mais 5 minutos, procedendo-se da mesma maneira mais 1 (uma) vez (30, 45, 60 minutos) após a administração do EECAL, diazepam e solução salina.

2.4 Teste de Esconder as Esferas (TEE)

Para a realização do teste, foi feita uma análise do estado físico e comportamental dos camundongos selecionados, sendo excluídos os que não responderam positivamente às características de peso (25-40g), apresentação de ferimentos e comportamento agressivo. Utilizou-se 18 (dezoito) animais divididos igualmente entre os três grupos experimentais, sendo administrado por via oral o EECAL (Extrato Etanólico de *Citrus aurantium L.*) 500mg/kg, Diazepam 5mg/kg e Solução Salina 0,1ml/10g. Para o procedimento experimental fez-se uso de caixas de policarbonato de 27 x 16 x 13 cm forrando-as com uma camada de 5 cm de maravalha sobre a qual foram distribuídas de forma organizada 12 esferas de vidro com 1,5 cm de diâmetro. Após 30 minutos de tratamento, o animal foi colocado individualmente no campo de esferas e ao término de 5 minutos, registrou-se o número de bolas de vidro escondidas.

2.5 Organização e Análise de Dados

Os valores experimentais obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's sendo utilizado para comparar as médias. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0,05$. Utilizando o programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) para construção dos gráficos.

3. Resultados e Discussão

Como controle positivo utilizou-se o diazepam (5mg/kg), sendo ele um princípio ativo do grupo farmacológico das benzodiazepinas, do qual é o mais representativo, sendo considerado o protótipo deste grupo (Guimarães et al., 2016). Esta substância ativa possui uma especificidade de ação ansiolítica e uma curva dose resposta muito achatada, daí que a designação de tranquilizante seja muito apropriada (Katzung et al., 2009). Esse fármaco, quando induzido nos animais, reduziu o número de esferas escondidas, indicando um menor nível de ansiedade. A administração de drogas como inibidores da recaptação de serotonina, benzodiazepínicos e pentobarbital reduz esse comportamento (Guarnieri, 2013).

Os benzodiazepínicos foram amplamente prescritos no tratamento dos transtornos ansiosos, como uma opção segura e de baixa toxicidade. Porém a empolgação inicial deu lugar à preocupação com o consumo ao passar dos anos, pesquisadores começaram a detectar potencial de uso nocivo e risco de dependência entre os usuários de tais substâncias. Os benzodiazepínicos são indicados para o tratamento da ansiedade severa, insônia, epilepsia, espasmos musculares, síndrome de abstinência alcoólica e como adjuvante no tratamento da esquizofrenia.

Wolffenbuttel (2014), em seu trabalho nos propõem que após a inalação do OE das folhas de *C. aurantium* (rico em linalol) e o OE do pericarpo de *C. sinensis* (rico em limoneno), os camundongos apresentaram comportamento indicativo de redução da ansiedade através do teste claro-escuro e diminuição da sua atividade locomotora no teste de atividade locomotora, indicando um efeito depressor do SNC. A aromaterapia se baseia na utilização de óleos essenciais extraídos de folhas, flores e outras partes de plantas, visando o tratamento de várias enfermidades. Essa prática é vista como uma terapia holística complementar, que tem sido empregada para proporcionar bem-estar e aliviar o desconforto emocional. Muitos autores afirmam que ela pode ser benéfica para reduzir a ansiedade, depressão e estresse.

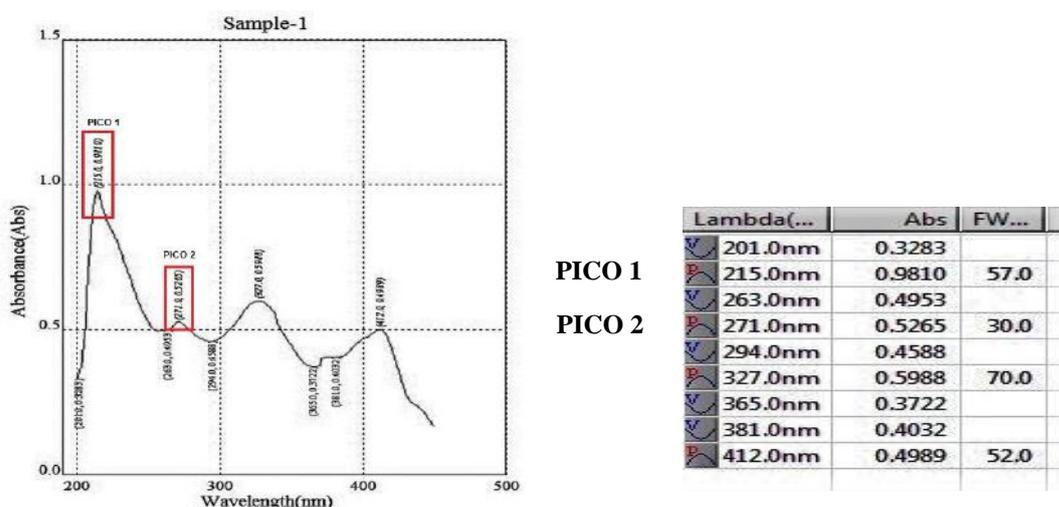
Nas ciências biológicas, Claude Bernard foi o primeiro, ainda em meados do século XIX, a empregar modelos animais com a finalidade de estudar experimentalmente reações fisiológicas humanas. Desde então os modelos animais jamais deixaram de ser empregados nos mais variados ramos da ciência. Na psicologia, o interesse pelo estudo do comportamento animal surgiu com o behaviorismo. Mais tarde, esses modelos foram incorporados a diversas áreas do conhecimento com objetivo de investigar diferentes aspectos do comportamento humano. Os primeiros modelos animais de ansiedade surgiram a partir de pequenos ajustes de procedimentos de aprendizagem associativa consagrados pelo behaviorismo para avaliar o potencial terapêutico de drogas ansiolíticas. Entre alguns dos modelos mais importantes balizados nessa abordagem estão: campo aberto, interação social em ratos, vocalização ultrassônica, transição claro-escuro, interação presa-predador, ocultação defensiva condicionada, labirinto em cruz elevado, labirinto em "T" elevado (Cruz & Fernandes, 2012).

O EECAL e os seus possíveis isolados, como o mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila possuem resultados indicativos de seu potencial terapêutico na saúde mental, tendo como componentes majoritários o linalol e o acetato de linalila. Na sua composição estão presentes flavonoides os quais são moléculas químicas complexas que agem como ligantes para os receptores benzodiazepínicos. A noção de que os flavonoides são agonistas dos receptores benzodiazepínicos sugere que os flavonoides extraídos do EECAL em nosso estudo podem agir como agonistas dos receptores benzodiazepínicos e reduzir a ansiedade. A aplicação do EECAL e seus constituintes no auxílio terapêutico das patologias da área da saúde mental são

promissores, tanto pelo seu baixo custo frente a outros investimentos, como pela redução dos efeitos colaterais em relação aos medicamentos tradicionais.

Se compararmos os resultados obtidos na espectrofotometria UV-Vis do EECAL (Figura 1), com os resultados dos autores citados anteriormente e sendo o linalol um composto alifático insaturado, podemos supor que pelas formas das bandas de absorção do pico 1 tendo absorvância 0,98 e comprimento de onda 215 nm e/ou o pico 2 com absorvância 0,52 e comprimento de onda 271 nm, esses achados são sugestivos dos constituintes químicos flavonoides e linolol, sendo necessários outros teste de identificação para melhor caracterização dos presentes constituintes e atribuição do seu efeito depressor no sistema nervoso e ansiolítico.

Figura 1 - Espectrofotometria UV Visível do Extrato Etanólico da *Citrus aurantium L.*



Fonte: Dados da Pesquisa (2018).

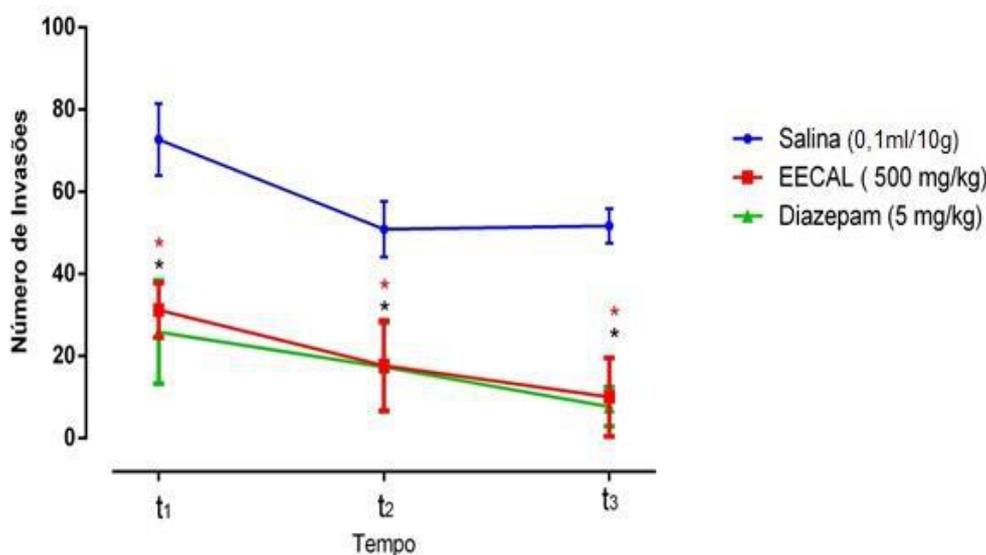
O campo aberto foi desenvolvido por Hall em 1934 para o estudo da emocionalidade em ratos, normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como os movimentos locomotores que são os deslocamentos entre um ponto a outro da arena e os movimentos de exploração ou não locomotores que são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento como, por exemplo, elevação vertical, cheirar o ambiente e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para compreender o efeito de diferentes drogas psicoestimulantes (Prut & Belzuung, 2003).

O teste de campo aberto é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais, proporcionando uma avaliação do efeito estimulante ou depressor de uma substância específica sobre essa atividade. Roedores, por natureza, tendem a preferir a periferia do espaço e evitam a área central durante o teste de campo aberto. Um aumento na atividade na região central costuma ser interpretado como um indicativo de menor ansiedade. Os camundongos e ratos frequentemente percorrem as proximidades das paredes ou cercas, este comportamento exploratório é conhecido como tigmotactismo, onde os roedores se sentem mais seguros e protegidos quando estão perto de superfícies de apoio. Esses parâmetros comportamentais são altamente sensíveis aos efeitos ansiolíticos, fazendo do teste de campo aberto um método amplamente aceito para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores.

Para o registro de locomoção foi utilizado contador manual (número de entrada do animal com as quatro patas em qualquer um dos quadrados), locomoção periférica (número de entradas com as quatro patas nos quadrados próximos à parede do aparato), locomoção central (número de entradas com as quatro patas em qualquer unidade distante da parede do aparato). Todos esses parâmetros foram contabilizados após colocação do camundongo no quadrante central do aparelho. Os resultados

mostraram que para o grupo dos animais tratados com o EECAL (500mg/kg), observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) da capacidade exploratória em $66,4 \pm 6\%$ em relação ao controle negativo (CN), quando comparado os três tempos de forma cumulativa, sendo esse resultado estatisticamente semelhante ao controle positivo (diazepam), o qual mostrou uma redução de $71,0 \pm 5\%$ em relação ao CN (salina) como se pode observar no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Registro do número de invasões no campo aberto durante 5 minutos nos tempos t1, t2, t3 (30, 45 e 60 minutos), após a administração do EECAL, diazepam e solução salina. Os dados representam a média \pm E.P.M. ($n = 6$ animais/grupo), com análise estatística realizada pelo Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn's, onde $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo (salina).

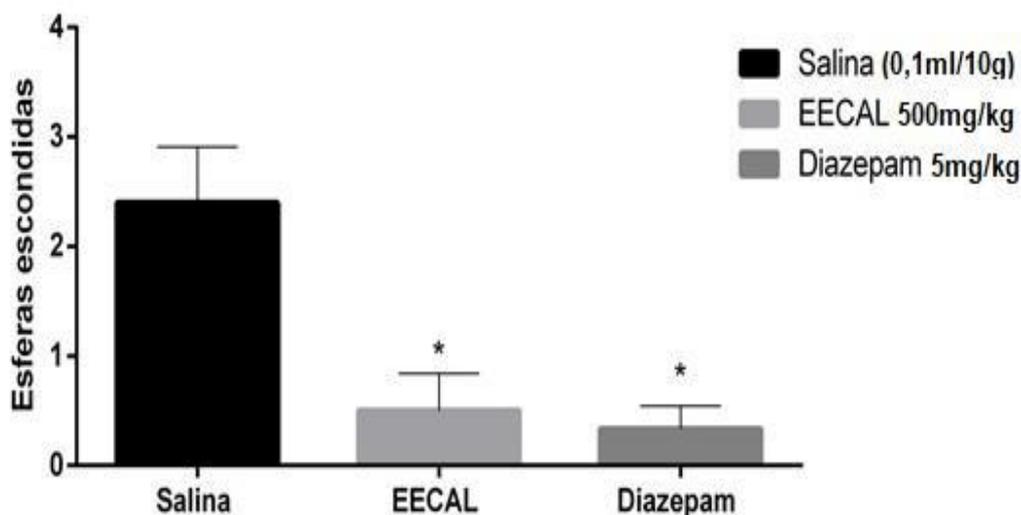


Fonte: Dados da Pesquisa (2018).

O Teste de Esconder Esferas (TEE) verificam-se possíveis alterações comportamentais de drogas que possam promover um perfil ansiogênico ou ansiolítico. Isto é determinado pelo aumento ou diminuição do comportamento de esconder esferas de vidro (“bola de gude”) que são distribuídas, ao acaso, na superfície da caixa coberta de serragem. O aumento de esferas recobertas é apontado como indicativo de “ansiedade”, já que se supõe representar para o animal o desconhecido, ou seja, um agente estranho cuja presença pode significar uma ameaça (Pultrini et al., 2006). Tal comportamento é observado em ratos e camundongos quando estes enterram alguma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados sobre uma camada de material. A administração de droga ansiolítica reduz esse comportamento de recobrir as esferas de vidro.

O Teste de Esconder Esferas (TEE) é também um modelo experimental para a avaliação comportamental, onde se modela, em roedores, o Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC). No TEE os camundongos apresentam comportamento consistente de esconder poucas ou muitas esferas, independentemente do número de vezes que são expostos ao procedimento. O tratamento agudo com a maioria dos antidepressivos reduz a quantidade de esferas escondidas pelos camundongos. Os dados da avaliação da compulsividade animal no modelo de esconder esferas, mostram que o EECAL (500mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a compulsão aparente em $79,2 \pm 0,3\%$, quando comparado ao controle negativo (CN) e este resultado foi estatisticamente semelhante ao controle positivo que mostrou uma redução de $86,1 \pm 0,2\%$ em relação ao CN como demonstrado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Registro do número de esferas escondidas pelos camundongos durante o tempo de 5 minutos, após a administração do EECAL, diazepam e solução salina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6 animais/grupo), com análise estatística realizada pelo Kruskal-Wallis, seguida do teste Dunn's, onde $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo (salina).



Fonte: Dados da Pesquisa (2018).

Atividade ansiolítica ou depressora do SNC desse gênero (*citrus*) e espécie (*Citrus aurantium L.*) em modelos animais de ansiedade que procuram reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão/desconforto é citada na literatura constantemente. Leite (2008), em seu estudo “Efeitos comportamentais em ratos após inalação do óleo essencial de *Citrus aurantium L.*”, com o objetivo de avaliar o efeito ansiolítico do óleo essencial das cascas, os ratos foram previamente expostos à inalação do óleo nas concentrações de 1,0%; 2,5% e 5,0%, p/v, durante 7 minutos em caixas de acrílico, sendo avaliados em dois modelos de ansiedade: labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto, concluiu que a exposição ao óleo essencial da casca de laranja reduziu a ansiedade, assim como reduziu o estresse psicológico de forma segura.

De acordo com essa perspectiva, as raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais diante de estímulos que representam perigo ou ameaça à sua sobrevivência. Perante esses estímulos, os animais procuram responder segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilização, ataque defensivo e submissão. O Teste de Esconder Esferas (TEE) citado anteriormente, é também um modelo experimental para a avaliação comportamental do Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC).

Pultrini et al. (2006), avaliou o óleo essencial de *C. aurantium* sobre modelos de ansiedade generalizada e transtorno obsessivo compulsivo. Para melhor caracterizar a atividade do óleo essencial, foi avaliado em dois outros modelos experimentais: a caixa claro-escuro e o teste do mármore (Teste de Esconder Esferas), respectivamente relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada e ao transtorno obsessivo-compulsivo. Os ratos foram tratados de forma aguda por via oral 30 min (dose única) ou uma vez por dia durante 15 dias (doses repetidas) antes dos procedimentos experimentais. Pultrini e colaboradores concluíram que o efeito do óleo essencial parece ter sua atividade ansiolítica mais específica sobre o modelo de transtorno obsessivo compulsivo.

De acordo com as análises estatísticas realizadas, conforme demonstrado nos Gráficos 1 e 2, os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os resultados obtidos relatados por Leite (2008), Pultrini et al. (2006) e outras

literaturas. Eles evidenciam que os achados são sugestivos da atividade ansiolítica e depressora do Extrato Etanólico da *Citrus aurantium L.*, o que instiga o prosseguimento da pesquisa.

4. Conclusão

Com base nas análises realizadas, mediante a caracterização dos constituintes químicos em comparativo com a literatura e em modelos experimentais sensíveis a drogas que afetem o Sistema Nervoso Central (SNC), é possível inferir que para o grupo de animais tratados com o EECAL (500mg/kg) no Teste de Campo Aberto, foi possível identificar no extrato as propriedades depressoras do sistema nervoso nos camundongos, havendo diminuição significativa do número de quadrantes invadidos. Logo, os resultados preliminares apresentam efeitos satisfatórios semelhantes aos benzodiazepínicos, em concomitância com a atividade ansiolítica esperada no trabalho.

No que diz respeito ao Teste de Esconder Esferas (TEE), quando comparado com o controle positivo e negativo, observou-se redução significativa do número de esferas escondidas pelos camundongos tratados com o EECAL (500mg/kg). Os resultados obtidos no Teste de Campo Aberto corroboram com os obtidos no Teste de Esconder Esferas. Desta forma, tendo como base as análises realizadas, pode-se concluir que o Extrato Etanólico da *Citrus aurantium L.* apresenta significativo efeito ansiolítico, além da diminuição da atividade motora espontânea, indicando um possível perfil de efeito semelhante aos benzodiazepínicos com provável depressão do SNC, respondendo de forma positiva ao objetivo geral da pesquisa.

Com base nos resultados obtidos a partir do estudo preliminar e das análises realizadas, torna-se evidente a necessidade de aprofundar a pesquisa sobre o Extrato Etanólico da *Citrus aurantium L.* (EECAL). É essencial conduzir testes adicionais que avaliem o comportamento e a emocionalidade/ansiedade em animais não humanos, bem como coletar mais dados etológicos que possam comprovar o potencial ansiolítico e depressor do sistema nervoso central do EECAL. A justificativa para a expansão desses estudos é amplamente respaldada pela escassez de publicações brasileiras relacionadas a essa temática. O Brasil, devido às suas condições climáticas e de solo favoráveis, abriga uma grande parte das espécies do gênero *Citrus* e é reconhecido como um dos maiores produtores mundiais de frutos cítricos. Portanto, explorar as propriedades do EECAL pode contribuir significativamente para a compreensão e aproveitamento desses recursos naturais em benefício da saúde e do bem-estar.

Referências

- Andrade, S. F., Cardoso, L. G. & Bastos, J. K. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 464-71. [http://www.pppg.ufma.br/cadernosdespesquisa/uploads/files/Artigo%2010\(7\).pdf](http://www.pppg.ufma.br/cadernosdespesquisa/uploads/files/Artigo%2010(7).pdf).
- Brasil. (2006). A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. 148p. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2008). *Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008*. <https://legis.senado.leg.br/norma/582216/publicacao/15745691>.
- Brasil. (2009.) *Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009*. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm.
- Brasil. (2014). *Resolução normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014*. <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-18-de-24-de-setembro-de-2014.pdf/view>.
- Carvalho, F. M. I. R. & Costa, M. (2002). Anxiolytic and sedative effect of extracts and essential oil from *Citrus aurantium*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1629-1633. 10.1248/bpb.25.1629
- Colet, C. F., Molin, G. T. D., Cavinatto, A. W., Baiotto, C. S. & Oliveira, K. R. (2015). Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(2), 331-339. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_027.
- Cruz, A. P. M. & Fernandes, L. L. (2012). Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. *NNCE - Núcleo de Neuropsicologia Clínica & Experimental*, 192-217. <http://www.soupro.com.br/nnce/index.php/publicacoes/artigos>.
- Enioutina, E. Y., Salis, E. R., Trabalho, K. M., Gubarev, M. I., Krepkova, L. V. & Sherwin C. M. T. (2017). Herbal Medicines: challenges in the modern world. Part 5. status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 10(3), 327-338. 10.1080/17512433.2017.1268917.

- Faustino, T. T., Almeida, R. B. & Andreatini, R. (2010) Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies. *Revisão Braz. J. Psychiatry* 32 (4). <https://doi.org/10.1590/S1516-44462010005000026>.
- Guarnieri, L. O. (2013). *Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina*. [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Florianópolis, SC. 101 p.
- Guimarães, S., Moura, D. & Silva, P. (Eds.). (2016). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia*. (6a ed.). Porto Editora.
- Katzung, B., Masters, S. & Trevor, A. (Eds.). (2009). *Sedative-hipnotic drugs*. In: *Katzung, B., Trevor, A. Masters, S. (11a ed.). Basic and clinical pharmacology*. 318-333.
- Lee, Y. L., Wu, Y., Tsang, H. W., Leung, A. Y. & Cheung, W. (2011). A systematic review on the anxiolytic effect so aromatherapy in people with anxiety symptoms. *Journal of alternative and complementary medicine*, 17(2), 101–108. [10.1089/acm.2009.0277](https://doi.org/10.1089/acm.2009.0277).
- Leite, M. P., Junior, J. F., Baziloni, E. M. F., Almeida, R. N., Mattei, R. & Leite, J. R. (2008). Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (Supl.): 661-666. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500003>.
- Pedroso, R. S., Andrade, G. & Pires, R. H. (2021). Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro*, 31(2), e310218. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>.
- Pultrini, A. M., Galindo, L. A. & Costa, M. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Science*, (p. 1720- 1725). [10.1016/j.lfs.2005.08.004](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.004).
- Prut, L. & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, (pp. 3-33). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- Viana, M. D. M., Vieira, A. C. S., Neto, G. J. S., Póvoas, F. T. X. & Campesatto, E. A. (2016). Potencial ansiolítico do gênero *Citrus*: revisão integrativa da literatura. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, 20(1), 73-79. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v20i1.2016.4851>.
- Wolffenbützel, A. N. (2014). *Perfil químico dos óleos essenciais de Citrus aurantium Lineu e Citrus sinensis (L.) Osbeck e avaliação psicofarmacológica da ação ansiolítica*. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Wolffenbützel, C. (2023). *Pesquisa qualitativa e quantitativa: compreendendo as abordagens e construindo possíveis combinações. Conhecimento e divulgação científica: Investigação e transformação para popularização da ciência*. v.1 (pp.39-53). [10.47402/ed.ep.c20231583747](https://doi.org/10.47402/ed.ep.c20231583747).
- Zulfiker, A. H. M., Rahman, M. M., Hossain, M. K., Hamid, K., Mazumder, M. E. H. & Rana, M. S. (2010). In vivo analgesic activity of ethanolic extracts of two medicinal plants—*Scoparia dulcis* L. and *Ficus racemosa* Linn. *Research Article Biology and Medicine*, 2(2): 42-48. <https://www.researchgate.net/publication/235998383>.