



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E**  
**INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS - PPGDITM**

**Gabriel Chaves Neto**

**Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium***  
**L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina**

**João Pessoa-PB**

**2021**

**Gabriel Chaves Neto**

**Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium*  
L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Em Medicamentos – PPGDITM do Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Em Medicamentos

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Co-orientador: Prof. Dr. João Euclides Fernandes Braga

**João Pessoa-PB**

**2021**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

C512e Chaves Neto, Gabriel.

Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina / Gabriel Chaves Neto. – João Pessoa, 2021.  
85 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.  
Coorientação: João Euclides Fernandes Braga.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ansiedade. 2. Óleos voláteis. 3. Citrus. 4. Ciclodextrinas. I. Diniz, Margareth de Fátima Formiga Melo. II. Braga, João Euclides Fernandes. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.89-008.441(043)

**Gabriel Chaves Neto**

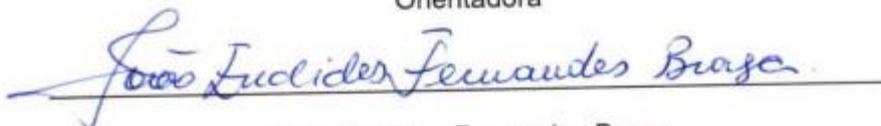
Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina

Tese aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz  
Orientadora



João Euclides Fernandes Braga  
Co-orientador

---

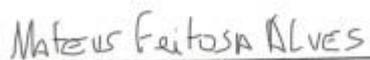
Liana Clébia de M. Pordeus  
Membro Interno

---

Hilzeth de Luna F. Pessoa  
Membro Interno

---

Pablo Queiroz Lopes  
Membro Interno



Mateus Feitosa Alves  
Membro Externo

---

Flavia Maiele Pedroza Trajano  
Membro Externo

As mulheres da minha vida,  
Terezinha Bezerra de Queiroz, minha mãe, meu anjo aqui na terra,  
Tatiany Liberal D. Chaves, minha esposa, por todo amor e cumplicidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, não só hoje, mas todos os dias, por permitir minha existência e todos os momentos únicos que vivo a cada dia. Essa vitória é sem dúvida uma concessão divina.

Aos meus pais, Luiz Queiroz Chaves e Terezinha Bezerra, que me passaram a maior herança possível para um filho, a educação. Sempre me incentivando e torcendo por minhas conquistas em todos os processos de formação.

A minha esposa Tatiany Liberal, por me proporcionar nessa etapa final momentos de alegria, e trazer ao mundo o meu primeiro filho, Levi Gabriel, grande amor da minha vida. Obrigado pela preocupação, palavras de incentivo e pelo companherismo. Eu não poderia ser mais abençoado, pois uma grande mulher caminha ao meu lado.

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Margereth Diniz, por quem tenho enorme admiração, que me acolheu como orientando e embora suas inúmeras atribuições, sempre me recebeu com muito carinho e atenção, contribuindo para conclusão desta etapa.

Ao meu coorientador Professor Dr. João Euclides Fernandes, exemplo de mestre e cidadão, seus ensinamentos vão além da academia. Só tenho a agradecer por toda disponibilidade e ajuda para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos amigos que contribuíram no desenvolvimento e preparação das etapas do estudo, em especial ao amigo Humberto Hugo, que nunca mediu esforços em ajudar a qualquer momento que fosse solicitado, meu muito obrigado. Uma pessoa ímpar, de grande coração. Te desejo muito sucesso meu amigo.

Agradeço ao Laboratório de Psicofarmacologia, na pessoa do Professor Dr. Reinaldo Nóbrega, sempre solícito a ajudar em qualquer dificuldade.

Ao Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológico (LANEF) da Universidade Federal de Sergipe – UFS, na pessoa do Professor Dr. Lucindo Quintans Júnior, pela parceria estabelecida.

Aos amigos Raimundo Filho e Zezito Marcelino, grandes amigos que fiz em João pessoa e que tenho enorme estima e admiração.

As amigas Maiele P., Leidyanny Medeiros e Amanda Machado que compartilhei alegrias e angustias durante toda essa caminhada, desde o início da graduação. Longos anos de batalha, obrigado pelo cuidado e carinho comigo, estarão sempre no meu coração.

A banca examinadora, pela disponibilidade de fazer parte desse momento tão importante de minha vida.

A Universidade Federal da Paraíba e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que direto ou indiretamente fizeram parte dessa etapa da minha formação, o meu muito obrigado.

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | <i>Citrus aurantium</i> L. é popularmente conhecido como laranja-amarga.  | 20 |
| Figura 2  | 2-hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina  | 23 |
| Figura 3  | Camudongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss, albinos, adultos, machos. Arquivo pessoal (2020)  | 32 |
| Figura 4  | Labirinto em Cruz Elevado. Arquivo pessoal (2020)   | 33 |
| Figura 5  | Placa Perfurada. Arquivo pessoal (2020)   | 34 |
| Figura 6  | Teste de Esconder esferas. Esferas distribuídas na serragem   | 35 |
| Figura 7  | Aparelho de Campo Aberto. Arquivo pessoal (2020)  | 36 |
| Figura 8  | Aparelho de Teste Rota-rod (RRT). Arquivo pessoal (2020)  | 37 |
| Figura 9  | (a) Cromatograma do Óleo Essencial de <i>Citrus aurantium</i> L. (By Samia); (b) Espectro de massas do Limoneno, mostrando o pico base em 68 m/z  | 40 |
| Figura 10 | Efeitos no teste de Labirinto de Cruz Elevado (LCE), (A) número de entradas do camundongo nos braços abertos do labirinto. Os resultados são expressos em média e erro padrão; (B) Tempo de permanência do camundongo nos braços abertos do labirinto | 42 |
| Figura 11 | Efeitos no teste de Campo Aberto, (A) Tempo de grooming do camundongo no Campo Aberto; (B) Tempo de ambulação do camundongo no Campo Aberto; (C) Tempo de Rearing do camundongo no Campo Aberto   | 44 |
| Figura 12 | Efeitos no teste de Esconder Esferas  | 45 |
| Figura 13 | Efeitos no teste Placa Perfurada, (A) Tempo de ambulação do camundongo na Placa; (B) número de Mergulhos do camundongo nos espaços perfurados da Placa  | 46 |
| Figura 14 | Efeitos no teste Rota Rod, (A) Tempo de permanência no Rota Rod após 60 minutos. (B) Tempo de permanência no Rota Rod após 90 minutos. (C) Tempo de permanência no Rota Rod após 120 minutos  | 47 |

**LISTA DE TABELAS**

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Pharmacological action of different <i>citrus</i> species (studies in vitro and in vivo) | 21 |
| Tabela 2 | Identificação do composto majoritário Limoneno   | 41 |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|                 |   |
|-----------------|---|
| CCS             | Centro de Ciências da Saúde                         |
| CEUA            | Comitê de Ética na Utilização de Animais            |
| CD              | Ciclodextrina                                       |
| CI              | Complexo de Inclusão                                |
| DZP             | Diazepan  |
| e.p.m.          | Erro padrão da médias                               |
| HP- $\beta$ -CD | 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina             |
| Iperfarm        | Instituto de Pesquisa em Fármacos                   |
| LANEF           | Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológico |
| LCE             | Labirinto em Cruz Elevado                           |
| LIM             | Limoneno  |
| OEC             | Óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> L.        |
| OE              | Óleo essencial                                      |
| UFS             | Universidade Federal de Sergipe                     |
| UFPB            | Universidade Federal da Paraíba                     |
| UPA             | Unidade de Produção Animal                          |
| VO              | Via oral  |
| $\beta$ -CD     | $\beta$ -ciclodextrina                              |

## Resumo

CHAVES NETO, GABRIEL. **Estudo não-clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com  $\beta$ -ciclodextrina.** 2021. 105f. (Tese). Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Em Medicamentos – PPGDITM

A ansiedade tem aumentado de maneira significativa na população mundial, o que tem incentivado a busca por alternativas inovadoras que atuem no tratamento. Pesquisas com óleo essencial do *Citrus aurantium* L. (OEC) tem apresentado resultados com efeitos ansiolíticos tanto em grupos animais como em grupos humanos. Porém limitações em relação ao uso, a sua preservação, estocagem e quantificação da dosagem afetam a eficiência da terapêutica. O uso potencial de complexos de Ciclodextrinas como carreadores de fármacos tem sido explorado com sucesso na produção de medicamentos, melhorando as características físico-químicas. O estudo tem como objetivo avaliar o potencial ansiolítico do complexo de inclusão 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) contendo OEC. A preparação do complexo de inclusão foi desenvolvida pelo método de liofilização usando o modelo de liofilizador Alpha 1-2 LD plus. O limoneno (LIM), principal composto do OEC, com HP- $\beta$ -CD na razão molar (1: 1M) foi disperso em etanol usando um agitador de laboratório por 48 horas em temperatura ambiente (25° C) para permitir a formação de complexos e evitar a perda de voláteis na atmosfera. Foram realizados ensaios farmacológicos não clínicos utilizando camundongos distribuídos em grupos experimentais e grupos controle submetidos ao teste de labirinto de cruz elevado, teste da placa perfurada, teste de esconder esferas, e teste rota-rod. Foram observados resultados satisfatórios do efeito ansiolítico do OEC complexado em HP- $\beta$ -CD, com a indicação de uma potencialização do efeito com doses de 500 mg/kg e 250 mg/kg complexadas, sugerindo menores perdas no processo farmacocinético.

**Palavras chave:** Ansiedade, óleos voláteis, *Citrus*, Ciclodextrinas, Tecnologia Farmacêutica

## Abstract

CHAVES NETO, GABRIEL. **Non-clinical study of the anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin.** 2021. 105f. (Tese). Programa de Pos Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Em Medicamentos – PPGDITM

Anxiety has increased significantly in the world population, which has encouraged the search for innovative alternatives that act in the treatment. Research with essential oil of *Citrus aurantium* L. (OEC) has shown results with anxiolytic effects in both animal and human groups. However, limitations regarding use, preservation, storage and dosage quantification affect the efficiency of the therapy. The potential use of cyclodextrin complexes as drug carriers has been successfully explored. The study aims to evaluate the anxiolytic potential of the inclusion complex 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) containing OEC. The preparation of the inclusion complex was developed by the lyophilization method using the Alpha 1-2 LD plus lyophilizer model. Limonene (LIM), the main OEC compound, with HP- $\beta$ -CD in molar ratio (1: 1M) was dispersed in ethanol using a laboratory shaker for 36 hours at room temperature (25 ° C) to allow the formation of and avoid the loss of volatiles in the atmosphere. Non-clinical pharmacological tests were carried out using mice distributed in experimental groups and control groups submitted to the elevated plus maze test, perforated plate test, sphere hide test, and route-rod test. Satisfactory results of the anxiolytic effect of the OEC complexed in HP- $\beta$ -CD were observed, with the indication of an potentiation of the effect with doses lower than 500 mg / kg and 250 mg / kg complexed, suggesting lower losses in the pharmacokinetic process.

**Keywords:** Anxiety; *Citrus aurantium*; Essential oils; Cyclodextrin; Inclusion complex.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1. <i>Citrus aurantium</i> L. ....  | 21        |
| 2.2. Complexo 2-hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD).....  | 24        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>28</b> |
| 3.1. Geral .....  | 28        |
| 3.2. Específicos.....   | 28        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODO .....</b>  | <b>30</b> |
| 4.1. Desenvolvimento do complexo de inclusão <i>Citrus aurantium</i> L. e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) .....               | 30        |
| 4.1.1. Substâncias.....   | 30        |
| 4.1.2. Preparação do complexo de inclusão contendo óleo essencial de <i>Citrus autantium</i> L. e 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....          | 30        |
| 4.2. Parâmetros cromatográficos.....  | 31        |
| 4.3. Desenvolvimento do estudo não clínico.....   | 31        |
| 4.3.1. Animais .....  | 32        |
| 4.3.2. Testes de avaliação da atividade ansiolítica.....  | 33        |
| 4.4. Planejamento de medidas para amenizar dor, estresse ou outro sofrimento.....   | 38        |
| 4.5. Análise de dados.....  | 39        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1. Controle Analítico do Óleo Essencial de <i>Citrus Aurantium</i> L.....   | 41        |
| 5.2. Avaliação do efeito ansiolítico do complexo de inclusão com óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> L.em modelos experimentais de ansiedade..... | 42        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>9. Anexos.....</b>   | <b>67</b> |
| 9.1. Certidão Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....  | 67        |
| 9.2. Revista Científica.....  | 68        |

|   |    |
|---|----|
| 9.3. Comprovante de aceite de artigo publicado na revista científica..... | 68 |
| 9.4. Artigo Científico Publicado .....                                    | 69 |

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade desempenha uma resposta de adaptação do organismo a situações específicas, normalmente de um perigo interno ou externo iminente, manifestando um estado de tensão, apreensão e desconforto, podendo ser resposta a estresse ou a estímulo ambiental. Estudos apontam um aumento significativo da presença de sintomas ansiosos na população, muitos fatores são indicados como responsáveis por esse aumento, destacando às profundas transformações ocorridas no âmbito econômico, social e cultural (BRAGA et al., 2010; FREITAS, 2013).

Alterações emocionais e fisiológicas são observadas em momentos ansiosos; emocionais tais como o medo, insegurança, apreensão, presença de pensamento catastrófico, bem como o aumento do período de vigília ou alerta, já as fisiológicas podem apresentar-se através dos sinais e sintomas, tais como taquicardia, palidez, taquipnéia, tensão muscular, desordens intestinais, tontura, tremores, dentre outros. Pode ser propulsora do desempenho nas atividades, desde que dentro da normalidade nas experiências humanas (ANDRADE et al., 2013; BRAGA et al., 2010).

Karino e Laros (2014) apontam que as manifestações da ansiedade dependem do enfrentamento dos indivíduos às situações que estes consideram desafiadoras. Na presença de um estímulo causador de ansiedade, a pessoa passa a apresentar reações fisiológicas desagradáveis, a postura fica tensa e a expressão facial cansada, associada a dores de cabeça, acarretando o envolvimento de componentes fisiológicos, comportamentais e cognitivos.

Considera-se um estado de ansiedade normal quando este consiste numa resposta adaptativa do organismo, propulsora do desempenho e com componentes psicológicos e fisiológicos, sendo a frequência e a intensidade em que esses componentes ocorrem, parâmetros fundamentais na caracterização da ansiedade

como normal ou patológica, Quando a resposta ao estímulo causador da ansiedade torna-se desproporcional, de forma frequente, a ansiedade torna-se patológica (BRAGA, 2011; KARINO; LAROS, 2014).

Os transtornos de ansiedade estão entre as condições psiquiátricas mais prevalentes nos Estados Unidos e no Brasil e estão presentes na maioria das populações estudadas. Os benzodiazepínicos e antidepressivos têm sido utilizados nos últimos 45 anos como fármacos de escolha para o tratar as diversas formas de ansiedade, e apesar de apresentarem benefícios, os efeitos colaterais são predominantes, incluindo amnésia anterógrada e dependência física (SADOCK, 2012; VIANA et al., 2016).

Devido aos efeitos colaterais apresentados nos tratamentos convencionais, pesquisas apontam que 43% dos pacientes que apresentam transtornos de ansiedade usam alguma forma complementar de terapia e, por isso, pesquisas buscam encontrar alternativas medicinais que apresentem efeitos ansiolíticos mais específicos com menores danos ao indivíduo (ERNST, 2006; VIANA et al., 2016).

Em busca por alternativas inovadoras que atuem no tratamento da ansiedade, pesquisas têm comprovado efeitos ansiolíticos de óleos essenciais (OE) utilizados tradicionalmente pela população de vários países no tratamento de problemas relacionados com o sistema nervoso, especialmente sintomas de ansiedade (COSTA et al., 2013; VIANA et al., 2016).

Os OE são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico, como destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método dependendo da localização no vegetal. Podem ser encontrados em todas as estruturas vegetais, sendo mais frequente em flores, folhas e frutos. Atualmente são utilizados nas indústrias alimentícias farmacêuticas, cosmética, e importante destaque na aromaterapia (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009;

VIANA et al., 2016). A Aromaterapia é um importante instrumento para profissionais de saúde que podem diversificar a fim de proporcionar uma terapia mais confortável, essa prática tem aumentado ao longo dos anos em comparação com outras abordagens terapêuticas, apresenta menos efeitos adversos e maior adesão ao tratamento, melhorando o bem-estar físico, emocional e espiritual, sendo um método não invasivo e barato (VIANA et al., 2016).

Estudos mostram a utilidade da aromaterapia, obtendo redução dos níveis de ansiedade e estresse após terapias com OE em diversos grupos sociais (DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011; LYRA; NAKAI; MARQUES, 2010). Dentre espécies que podem ser úteis no tratamento da ansiedade destaca-se a espécie *Citrus aurantium* L. pertencente à família Rutaceae, popularmente conhecido como "laranja amarga" (PIMENTA et al., 2016). O óleo essencial de *Citrus aurantium* L. (OEC) tem como composto majoritário o limoneno (HENRIQUES; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009). Pesquisas não clínicas utilizando camundongos, resultaram em efeitos ansiolíticos observados a partir do comportamento dos animais ao inalarem o OEC (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002; DE MORAES PULTRINI; ALMEIDA GALINDO; COSTA, 2006; LEITE et al., 2008).

Em humanos, o OEC repetiu os efeitos encontrados nas pesquisas com animais. Em um estudo clínico, realizado com pacientes portadores de leucemia mieloide crônica, a análise dos resultados sob os parâmetros psicológicos e fisiológicos demonstrou um efeito ansiolítico do OE (PIMENTA et al., 2016). Administrado por nebulização, o OEC apresentou um efeito ansiolítico agudo em usuários de crack em situação de abstinência (CHAVES NETO et al., 2017).

Uma das limitações em relação ao uso dos OE's é quanto a sua preservação e estocagem, pois grande parte dos componentes é sensível ao calor e à oxidação, além de que a alta volatilidade dificulta a padronização da dosagem a ser administrada

por aromaterapia. Diversas estratégias são empregadas para prolongar a estabilidade dos óleos essenciais, a complexação em ciclodextrinas (CD's) tem sido utilizada como ferramenta para proteção e modulação da liberação de substâncias. Vem sendo aplicada com sucesso na proteção de substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade e reações indesejáveis, permitindo melhor potencial de uso (AGUIAR et al., 2014).

A 2-hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), também chamada  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD), é a comumente utilizada, pois pode hospedar moléculas de massa molecular entre 100 e 400 g/mol em sua cavidade, faixa que compreende a massa molecular da maioria das moléculas de interesse. São solúveis em água e possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando de forma exponencial sua solubilidade em meio aquoso (AGUIAR et al., 2014; VENTURINI et al., 2008).

O uso de complexos com  $\beta$ -CD e fármacos torna-se interessante por apresentar vantagens em comparação aos sistemas convencionais. Permite que diversos óleos essenciais e compostos voláteis possam ser complexados, aumentando sua estabilidade, solubilidade aquosa, fotoestabilidade e estabilidade térmica, além de protegê-los da oxidação, mascarar ou reduzir efeitos fisiológicos indesejados, além de reduzir sua volatilidade (AGUIAR et al., 2014; VENTURINI et al., 2008).

Considerando as características físico-químicas do OEC, a imprecisão da administração por aromaterapia e perdas do OEC por volatilidade, que espalham rapidamente pelo ambiente ao serem retirados do recipiente de armazenamento, o que torna difícil a quantificação do que está sendo realmente inalado pelo indivíduo submetido a terapia. Surge a necessidade de avaliar o uso e potencial ansiolítico do OEC complexado em  $\beta$ -CD, como forma de garantia de estabilidade da substância.

# Revisão da Literatura

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Citrus aurantium* L.

A espécie *Citrus aurantium* L. é popularmente conhecido como laranja-amarga, laranja-azedada ou laranjeira-cavalo, pertencente ao gênero *Citrus* e a família Rutaceae, que é formada por árvores e arbustos. Este gênero produz frutas cítricas como laranjas, limões e tangerinas, amplamente cultivadas nas zonas tropicais e subtropicais do mundo (ZOU et al. 2016).



Figura 1: *Citrus aurantium* L. é popularmente conhecido como laranja-amarga. Fonte: [oficinadeervas.com.br](http://oficinadeervas.com.br)

Em um estudo de revisão, Pimenta e colaboradores (2017) descrevem espécies cítricas (*Citrus aurantium* L.; *Citrus sinensis*; *Citrus bergamia*; *Citrus limon*) e seus efeitos observados em estudos científicos. Conforme a tabela 1, os autores demonstram que das quatro espécies cítricas do estudo, três apresentam pesquisas com demonstração de atividade ansiolítica, entre elas o *Citrus aurantium* L..

Compostos isolados das espécies do gênero *citrus* apresentam atividades a nível de sistema nervoso central. O limoneno é um destes compostos, que está presente em altas concentrações na espécie *Citrus aurantium* L., apresenta um potencial ansiolítico quando testados tanto em animais quanto em seres humanos (GONZALEZ, 2013; PIMENTA et al. 2016).

| Citrus species             | Pharmacological action   |
|----------------------------|--|
| <i>Citrus aurantium</i> L. | Gastrointestinal stimulant and general tonic. Treatment of central nervous system disorders like insomnia, anxiety, and hysteria.<br>Relieve stomach cramps and constipation, combat stomach acidity.<br>Hypoglycemic effect.<br>Anti-inflammatory.<br>Anxiolytic effect.  |
| <i>Citrus sinensis</i>     | Sedative action.<br>Anthelmintic properties.<br>Treatment of liver cirrhosis.<br>Antidiabetic properties.<br>Anxiolytic effect.  |
| <i>Citrus bergamia</i>     | Antibacterial. Antifungal. Anti-inflammatory.<br>Analgesic. Antiproliferative and anticancer properties.<br>Neuropsychopharmacological. Neuroprotective.<br>Anxiolytic activity.<br>Hypoglycemic and hypolipidemic activities.   |
| <i>Citrus limon</i>        | Analgesic. Anti-anemic. Anti-sclerotic. Antipyretic.<br>Antiseptic.<br>Emollient and moisturizer properties.<br>Anti-diarrheal. Diuretic. Intestinal mucosa protector.<br>Local hemostatic.<br>Vascular stimulant and protector.<br>Antioxidant. Antiallergic. Antiviral. Anti-inflammatory.<br>Antiproliferative, antimutagenic, and anticancer activities. |

**Tabela 1.** Pharmacological action of different citrus species (studies *in vitro* and *in vivo*). (Pimenta, 2017)

É comum o uso popular de *Citrus aurantium* L. para fins medicinais pela população brasileira, que descrevem o uso a partir das cascas das frutas, flores e folhas, utilizadas no tratamento dos distúrbios relacionados ao sistema nervoso central, amenizar a insônia, sintomas da ansiedade e histeria (SILVA, DREVECK, ZENI, 2009).

O óleo essencial de *Citrus aurantium* L. é amplamente usado na aromaterapia, é um forte líquido amargo perfumado, produzido por hidrodestilação. Estimula o sistema nervoso central, reduz a pressão arterial e tem sedativo, analgésico, antiinflamatório, antiespasmódico, efeitos carminativos, digestivos e diuréticos (STOHS et al, 2011; ELLOUZE et al, 2012).

Os estudos científicos direcionam as pesquisas para investigação da ação do *Citrus aurantium* L. sobre o sistema nervoso central, mais especificamente no controle da ansiedade. Os resultados publicados utilizando animais e humanos tem convergido evidenciando efeito ansiolítico da espécie. Pesquisadores observaram que o óleo essencial obtido das cascas de *Citrus aurantium* L. demonstrou efeito ansiolítico após administração única em ratos, denotado pelo aumento no tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. (CARVALHO-FREITAS, COSTA; PIMENTA, 2017).

O *Citrus aurantium* L. mesmo utilizado em apenas uma exposição, apresentou desempenho similar a um ansiolítico controle positivo. Pacientes portadores de leucemia mielóide crônica inalaram óleo essencial de *Citrus aurantium* L. no momento que antecede o procedimento de coleta de material medular e apresentou eficácia no controle de ansiedade dos pacientes submetidos ao procedimento de diagnóstico desagradável (PIMENTA et al. 2016).

Conhecida milenarmente e apresentando maior números de pesquisas na última década, os estudos comprovam sua ação sobre o sistema nervoso central, especialmente sobre a ansiedade. A espécie *Citrus aurantium* L. apresenta um grande potencial a ser estudado, com a busca de mecanismos de ação e novas propriedades terapêuticas.

## 2.2. Complexo 2-hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD)

Diferentes polímeros são utilizados na produção de complexos de inclusão, entre os quais podemos destacar HP- $\beta$ -CD, esta é amplamente utilizada na indústria farmacêutica devido a sua facilidade de acesso e baixo custo, bem como sua capacidade de interagir com a maioria moléculas de interesse farmacêutico. Diversas classes terapêuticas, tais como, antibióticos, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos bem como, peptídeos, proteínas e vacinas, tem apresentado estudos promissores com sistema polimérico  $\beta$ -CD na liberação de fármacos (FREITAS, 2017; SILVA, 2015)

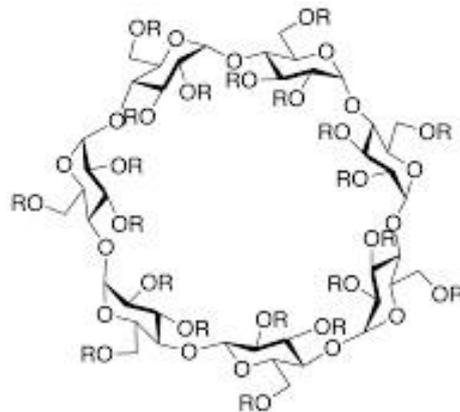


Figura 2 – 2-hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina. Fonte: <https://www.trc-canada.com/> (2020)

A complexação de uma substância consiste no armazenamento da mesma em um agente encapsulante, que a depender do método utilizado transforma-se de um estado líquido para sólido, garantindo uma segurança da substância complexada a limitações pré-existentes. Aumento da estabilidade, diminuição da volatilidade e aromas indesejados estão entre os benefícios do processo (REBELLO, 2009; SCHULTZ MÜLLER, 2011).

No desenvolvimento de fármacos, é uma alternativa satisfatória na proteção de substâncias sensíveis à temperatura, oxidação, umidade e reações indesejáveis, de

modo a facilitar manipulação, transporte e adição em formulações. Podendo ser utilizado na liberação controlada de fármacos por apresentar versatilidade, eficácia e baixo custo (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A escolha do material de revestimento apropriado é responsável, em grande parte, pelas propriedades físicas e químicas resultantes das partículas e, conseqüentemente, esta seleção deve ser levada em consideração. Polímeros naturais tem sido o foco de um número crescente de estudos com potencial utilização como encapsulante em aplicações de pesquisas na área biomédica, tais como encapsulamento de células, carreamento de fármacos e engenharia de tecidos. Nos últimos anos as CDs têm sido amplamente utilizadas para melhorar a biodisponibilidade e aplicação farmacológica dos produtos naturais, como terpenos e OE's (CAMPOS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2017).

As CD's são oligossacarídeos cíclicos formadas durante a ação de enzimas sobre o amido, denominadas como ciclodextrinas glicosiltransferases, produzidas por diferentes microrganismos, como o *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalofílico*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *M. luteus* e *Klebsiella pneumoniae*(VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). São as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, compostas por 6, 7 ou 8 unidades de glicopirranose, as mais comuns (AGUIAR et al., 2014; LYRA; NAKAI; MARQUES, 2010).

As CDs foram descobertas por Villiers em 1891, a partir da digestão de 1000 g de amido com *Bacillus amylobacter*. Ele obteve cerca de 3 g de uma substância cristalina, a qual denominou "celulosina", por suas características semelhantes à celulose. Somente alguns anos depois as CDs foram detalhadas por Schardinger em 1903, que descreveu o processo de preparação e isolamento das mesmas (VENTURINI et al., 2008).

É ao final da década de 60, que se tem o domínio do método de preparação de CDs em escala de laboratório e o acúmulo de informações sobre sua estrutura, propriedades físico-químicas, identificando propriedades de formação de complexos de inclusão, estudos aprofundados nesta temática se iniciaram, visando suas possíveis aplicações (VENTURINI et al., 2008).

Pode-se obter complexos com CD nas fases líquidas, semi-sólidas ou sólidas. A fase que se encontra vai indicar o método a desenvolver. Os métodos de coprecipitação, co-evaporação, neutralização, liofilização e secagem por pulverização são utilizados para fase líquida, malaxagem para a semi-sólida e na fase sólida métodos como moagem e fluídos super-criticos. (DEL VALLE, 2004; MARTINS, 2008).

A estrutura das CD's proporciona a inclusão de várias moléculas orgânicas em sua cavidade central, resultando em complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. A complexação acontece por um processo de substituição das moléculas de água na cavidade central, por moléculas hóspede ou por grupos lipófilos dessa molécula que tenham tamanho, forma e polaridade compatíveis com a CD (PINHO et al., 2014).

Os complexos de inclusão formados com CD apresentam uma característica de solubilidade em água, sendo reversíveis com moléculas apolares. O preço razoável da ciclodextrina também propicia seu uso, e assim diversos OE's e compostos voláteis passaram a ser complexados com ciclodextrinas (AGUIAR et al., 2014).

# Objetivos

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Avaliar o efeito ansiolítico em camundongos do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina

#### 3.2. Específicos

- Realizar cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas para avaliar a composição do OEC;
- Desenvolver sistema complexo de inclusão com HP- $\beta$ -CD incorporando OEC;
- Realizar avaliação comportamental em modelos experimentais clássicos de ansiedade (Labirinto de Cruz Elevado, Campo Aberto, Placa Perfurada e Esconder Esferas) do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD com OEC;
- Avaliar comprometimento motor e/ou miorelaxante em modelo experimental (Rota-rod) do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD com OEC.

# Materiais e Método

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1. Desenvolvimento do complexo de inclusão *Citrus aurantium* L. e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD)

O processo de desenvolvimento do complexo OEC e HP- $\beta$ -CD foi realizado em parceria com o Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológico (LANEF) da Universidade Federal de Sergipe – UFS.

#### 4.1.1. Substâncias

As substâncias utilizadas foram a HP- $\beta$ -CD; C54H102O39; pureza  $\geq$  98%, adquirida na Sigma-Aldrich (EUA), o diazepam (Sigma –USA) e o OEC, adquirido na By-Samia Aromaterapia (Brasil), apresenta as seguintes características: composição Química – 90% de LIM; coloração – amarelo forte a alaranjado; odor – cítrico, refrescante e penetrante; aspecto: líquido límpido; densidade a 20°C: 0,8300 – 0,8500 g/mL; índice de refração a 20°C: 1,4710 – 1,4750; solúvel em etanol.

#### 4.1.2. Preparação do complexo de inclusão contendo óleo essencial de *Citrus aurantium* L. e 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina

A preparação do complexo de inclusão foi desenvolvida pelo método de liofilização usando o modelo de liofilizador Alpha 1-2 LD plus. O LIM, principal composto do OEC, com HP- $\beta$ -CD na razão molar (isto é, 1: 1M) foi disperso em etanol usando um agitador de laboratório por 36 h em temperatura ambiente ( 25° C) para permitir a formação de complexos e evitar a perda de voláteis na atmosfera. A solução foi congelada a -20° C e liofilizada a -50° C. As amostras liofilizadas foram armazenadas em recipientes fechados dentro de um exsiccador (CAMPOS et al., 2019).

#### 4.2. Parâmetros cromatográficos

Os cromatogramas foram obtidos de um cromatógrafo a gás diretamente interfaciado com um espectrômetro de massas (Shimadzu GC-MS-QP5050A). Coluna capilar com fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, fabricada pela J & W Scientific. A programação de temperatura inicial será de 70 °C a 105 °C (8 °C/min) depois segue-se até 250°C (40 °C/min), e temperatura de interfaciamento de 250 °C; com tempo de programação de 9,0 min. À temperatura do injetor será de 250 °C, utilizando o hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,5 mL/min, com razão de Split de 1:5. O volume de injeção será de 10 µL. A ionização dos componentes será realizada por impacto eletrônico a 70 eV, com detector de 1,25 Kv. O espectrômetro será operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massas de 45 a 450 u.m.a. A temperatura da fonte de íons será de 280 °C. A identificação dos compostos será realizada comparando seus espectros de massas com os espectros existentes no banco de dados do equipamento.

#### 4.3. Desenvolvimento do estudo não clínico

O ensaio farmacológico não clínico foi realizado no Laboratório de Psicofarmacologia - CCS/UFPB, com apoio da Unidade de Produção Animal (UPA) Prof. Thomas George vinculado ao Instituto de Pesquisa em Fármacos – IPFARM, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Antecedendo cada procedimento foi realizada a higienização do(s) aparelho(s) teste com álcool a 70% e durante os experimentos foi utilizado álcool a 10% (de baixa graduação). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Iperfarm/UFPB, sob a certidão nº 086/2017.

#### 4.3.1. Animais

Para as metodologias realizadas no Laboratório de Psicofarmacologia foram utilizados Camudongos (*Mus musculus*) Swiss, albinos, adultos, machos (figura 2), pesando entre 25 a 35 gramas, com aproximadamente 3 meses de idade, fornecidos pela UPA Prof. Thomas George – CCS/UFPB. Todos agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , obedecendo ao ciclo claro e escuro e ausência de ruídos estressores, sem uso de qualquer medicamento, os animais não passaram por procedimentos anteriormente e tiveram livre acesso à comida (tipo pellets) e água, a fim de minimizar variáveis.

Os animais foram agrupados de acordo com o tratamento e posteriormente distribuídos conforme o teste de avaliação, onde um animal não pode ser avaliado em mais de um teste. As doses dos grupos tratados foram definidas de acordo com a literatura. (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002b; DE MORAES PULTRINI; ALMEIDA GALINDO; COSTA, 2006).

- Grupo Controle: Composto por 06 animais que receberam uma solução salina (1 ml/kg);
- Grupo  $\beta$ -CD pura: Composto por 06 animais tratados com complexo de inclusão  $\beta$ -CD sem o OEC incorporado.
- Grupo Diazepam: 06 animais tratados com diazepam (1 mg/kg).
- Grupo *Citrus* 1 g/kg: 06 animais tratados com 1 g/kg do OEC;
- Grupo *Citrus* 500 mg/kg: 06 animais tratados com 500 g/kg do OEC;
- Grupo *Citrus* 250 mg/kg: 06 animais tratados com 250 mg/kg do OEC;
- Grupo *Citrus*/ $\beta$ -CD 1 g/kg: 06 animais tratados com 1 g/kg do complexo de inclusão  $\beta$ -CD com OEC;
- Grupo *Citrus*/ $\beta$ -CD 500 mg/kg: 06 animais tratados com 500 g/kg do complexo de inclusão  $\beta$ -CD com OEC;

- Grupo *Citrus*/ $\beta$ -CD 250 mg/kg: 06 animais tratados com 250 mg/kg do complexo de inclusão  $\beta$ -CD com OEC;

Os tratamentos foram administrados por gavagem (VO) nos grupos Experimentais, grupo  $\beta$ -CD pura e no grupo Controle, e por via intraperitoneal no grupo diazepam, 30 min antes dos testes.

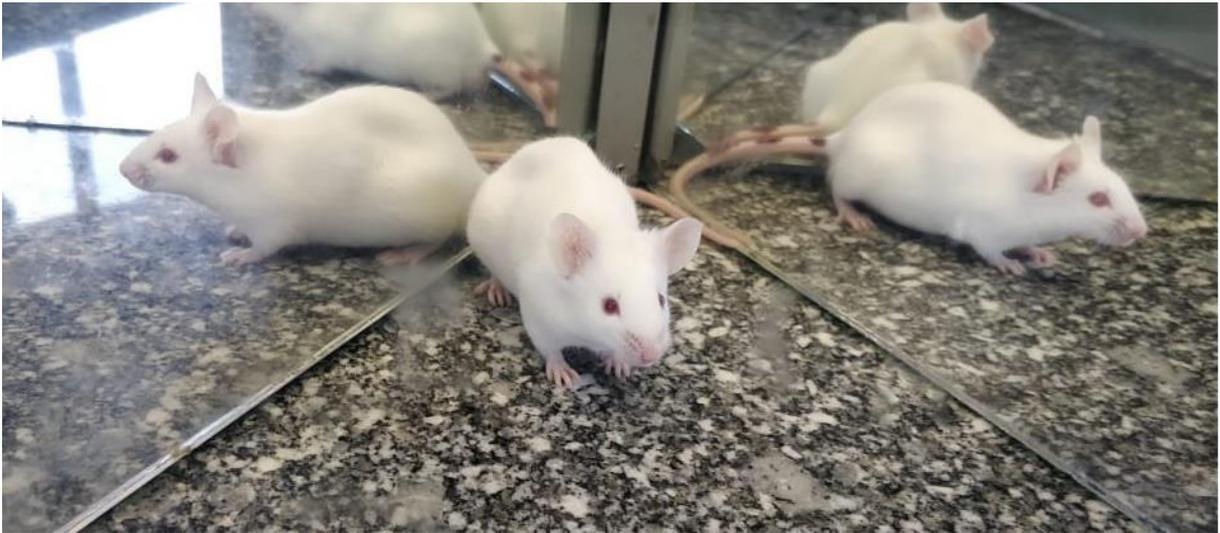


Figura 3 - Camundongos (*Mus musculus*) Swiss, albinos, adultos, machos. Arquivo pessoal (2020).

#### 4.3.2. Testes de avaliação da atividade ansiolítica

##### - Testes

- Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE (Insight® - modelo EP 150), observado na figura 3, é um aparato feito em acrílico, de cor cinza com quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm x 5 cm x 15 cm, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a 90° do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 38,5 cm elevado em relação ao solo. (LEITE et al., 2008b).

Este teste tem como finalidade verificar os possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos das substâncias, uma vez que fármacos ansiolíticos levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (BARETTA et al., 2012).

Após meia hora de administração dos tratamentos, os animais serão levados ao LCE. Os animais serão colocados, individualmente, na plataforma central de frente para um dos braços abertos do labirinto, sendo o número de entradas e o tempo de permanência em cada tipo de braço registrado por um período de 5 minutos. Considerando-se entrada nos braços quando o animal encontrar-se com as quatro patas dentro dos limites dos mesmos (LEITE et al., 2008).



Figura 4 - Labirinto em Cruz Elevado. Arquivo pessoal (2020).

- Teste da Placa Perfurada

O aparelho consiste em uma caixa quadrada de acrílico transparente (50 X 50 X 30 cm) de 10 cm de altura, com 8 orifícios de 2 cm de diâmetro, equidistantes um dos outros e das bordas (figura 4) (ALMEIDA, 2006).

O teste baseia-se na observação de que a atividade de mergulhos dos animais é inversamente proporcional ao estado de ansiedade. Cada animal será colocado individualmente na placa perfurada por um tempo de 5 minutos, sendo registrado o número de mergulhos nos orifícios da placa (ALMEIDA, 2006).



Figura 5 – Aparelho Placa Perfurada. Arquivo pessoal (2020).

- Teste de Esconder Esferas

Nesse teste, 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 na serragem. A administração de drogas ansiolíticas reduz o comportamento de recobrir as esferas de vidro (ALMEIDA, 2006).

O aparato consiste em uma caixa de polietileno (46,5 X 31 X 16 cm – comprimento, largura e altura) recoberta por uma camada de serragem, sobre a qual será distribuída homogeneamente 25 esferas de vidro (figura 5). Os animais serão

colocados individualmente na caixa, e ao final de 10 min, registra-se o número de esferas escondidas na serragem (ALMEIDA, 2006).



Figura 6 – Teste de Esconder esferas. Esferas distribuídas na serragem.

- Campo aberto

O teste do campo aberto (figura 6) é realizado em uma arena circular cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir. O assoalho é marcado com pequenos quadrados, o que permite a quantificação da atividade locomotora do animal. Alta defecação e baixa atividade locomotora indicam a ansiedade do animal. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do campo aberto como medida da mais seletiva de ansiedade, enquanto a atividade locomotora na periferia do aparato como um indicador da atividade locomotora do animal. O efeito de drogas ansiolíticas tem sido amplamente demonstrado nesse modelo. (ALMEIDA, 2006; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).



Figura 7 – Aparelho de Campo Aberto. Arquivo pessoal (2020).

- Teste Rota-rod (RRT)

Teste que é utilizado para a detecção do comprometimento motor devido a agentes farmacológicos. O aparelho (figura 7) consiste em uma barra de plástico não escorregadia, 3,0 cm de diâmetro, rodando a 5 Rpm. Cada camundongo foi colocado no aparelho para avaliar a capacidade de caminhar na barra rotativa por 1 min, com uma tolerância de até três quedas (COSTA et al., 2013b; DE MORAES PULTRINI; ALMEIDA GALINDO; COSTA, 2006b).

Para evitar um viés de incapacidade não relacionada ao tratamento medicamentoso, os animais foram avaliados em um teste de rotina, 24 horas antes do início do procedimento experimental. Apenas os animais que realizaram satisfatoriamente nesta avaliação inicial foram avaliados no RRT (COSTA et al., 2013).



Figura 8 – Aparelho de Teste Rota-rod (RRT). Arquivo pessoal (2020).

#### 4.4. Planejamento de medidas para amenizar dor, estresse ou outro sofrimento

Para a realização dos experimentos foram utilizados roedores provenientes da UPA Prof. Dr. Thomas na UFPB. Em todos os procedimentos experimentais foram utilizados grupos de 6 animais, e a administração das substâncias-testes por via oral e intraperitoneal. Após o período experimental, os ratos e camundongos foram pré-anestesiados com acepromazina (3 mg/kg), e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal (Rev. Assoc. Med. Bras. 2010 ). Após a ausência do reflexo corneal, administrou-se 2 mL/kg de cloreto de potássio e os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical (DAMY et al., 2010). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

#### 4.5. Análise de dados

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o GraphPadPrism (version 6.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade, resultando positivamente, na sequência os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando apresentarem um nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ).

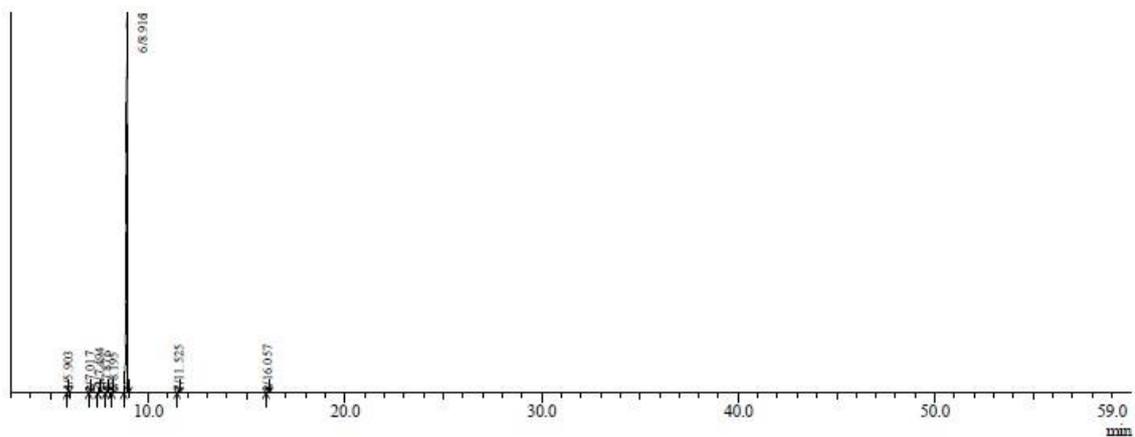
# Resultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Controle Analítico do Óleo Essencial de *Citrus Aurantium* L.

Os picos dos compostos analisados estão representados na figura 8a, sendo o Limoneno o composto majoritário, evidenciado pelo maior pico, com um tempo de retenção de 8,9 min e área 48124161, correspondendo a 97,99 % do óleo essencial analisado. A figura 8b representa o espectro de massa do composto Limoneno com peso molecular 136 m-z, tendo como pico base 68 m-z. Foi calculado o índice de Kovats (1029) e comparado com a literatura, conforme tabela 2.

(a)



(b)

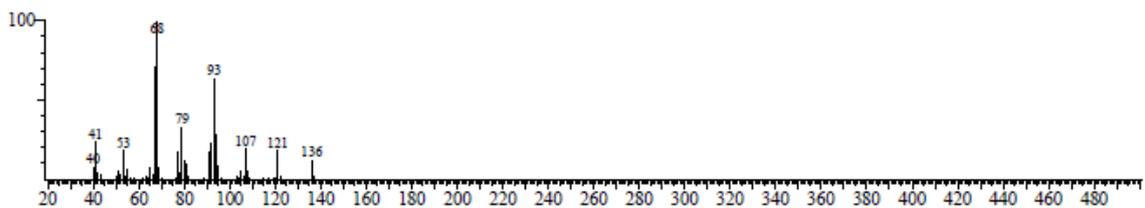


Figura 9. (a) Cromatograma do Óleo Essencial de *Citrus aurantium* L. (By Samia); (b) Espectro de massas do Limoneno, mostrando o pico base em 68 m/z.

| Nome     | Pico | Tempo de Retenção | Área     | Área % | Índice de Kovats - Calculado | Índice de Kovats - Literatura |
|----------|------|-------------------|----------|--------|------------------------------|-------------------------------|
| Limoneno | 68   | 8,9 min           | 48124161 | 97,99  | 1029                         | 1031                          |

Tabela 2: Identificação do composto majoritário Limoneno.

## 5.2. Avaliação do efeito ansiolítico do complexo de inclusão com óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em modelos experimentais de ansiedade

Os resultados do teste de LCE são apresentados na Figura 10. Após os tratamentos os camundongos foram avaliados quanto ao número de entradas nos Braços Abertos do Labirinto (A), assim como o Tempo de Permanência nos Braços Abertos (B). Após o tratamento único, o *Citrus* 1,0 g/kg, o grupo de *Citrus*/β-CD 1,0 g/kg e o DZP a 1,0 mg/kg aumentaram significativamente ( $p < 0,0017$ ) o número de entradas nos Braços Abertos do Labirinto em comparação ao grupo Controle e o grupo β-CD Pura. Os camundongos do grupo Controle apresentaram uma média de 4 (0,5) entradas nos Braços Abertos do Labirinto, Camundongos do grupo β-ciclodextrina obtiveram média de 6 (1,02) entradas. O grupo tratado com OEC. 1,0 g/kg apresentou média 9 (1,19) entradas segundos. O grupo tratado com o *Citrus*/β-CD 1,0 g/kg obteve média de entradas de 10 (1,2), assim como o grupo tratado com Diazepan, também com 10 (1,7) entradas. Observa-se uma diferença significativa entre o grupo *Citrus* 250 mg/kg e o grupo *Citrus*/β-CD 250 mg/kg, com o segundo grupo apresentando um maior número de entradas nos braços abertos.

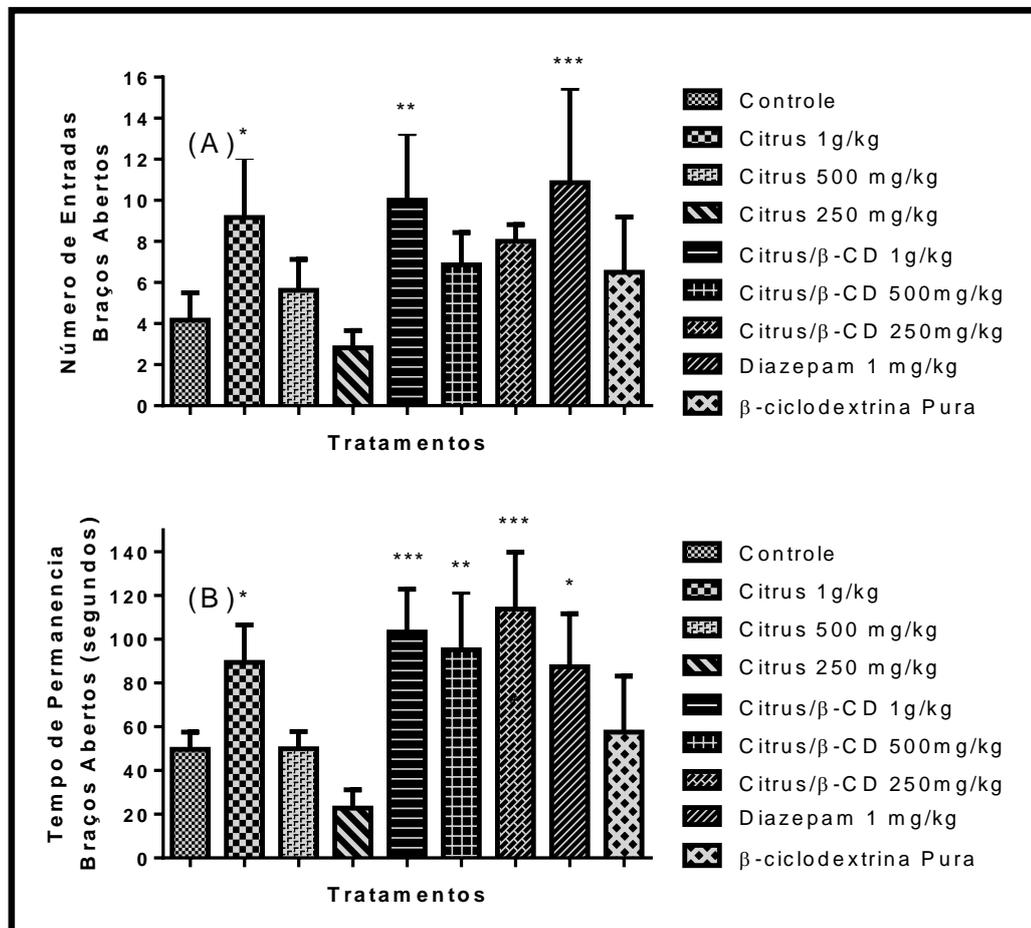


Figura 10. Efeitos no teste de Labirinto de Cruz Elevado (LCE) após tratamento único com os grupos Controle: Solução Salina; *Citrus* 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus* 500 mg/kg : óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus* 250 mg/kg : óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 500 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 250 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; Diazepam 1,0 mg/kg; β-ciclodextrina Pura. (A) número de entradas do camundongo nos braços abertos do labirinto; (B) Tempo de permanência do camundongo nos braços abertos do labirinto. Os resultados são expressos em média e erro padrão. \*Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em comparação com o grupo controle; #Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em comparação com o grupo *Citrus* 250 mg/kg (ANOVA).

Quanto ao tempo de permanência nos Braços Abertos (B), Figura 10. Após o tratamento único, o *Citrus* 1,0 g/kg, os três grupos de *Citrus*/β-CD (1,0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/kg) e o DZP a 1,0 mg/kg aumentaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) o tempo

de permanência nos Braços Abertos do Labirinto em comparação ao grupo Controle, *Citrus* 500 mg/kg, *Citrus* 250 mg/kg e o grupo  $\beta$ -CD pura. Os camundongos do grupo Controle apresentaram uma média de 49,7 (2,96) segundos nos Braços Abertos do Labirinto, o grupo *Citrus* 500 mg/kg apresentou média de 49,9 (2,8) segundos, o *Citrus* 250 mg/kg obteve média de 22,8 (2,97) segundos, Camundongos do grupo  $\beta$ -CD pura permaneceram em média 57,6 (9,04) segundos. O grupo que recebeu o DZP como tratamento, obteve média de permanência de 87,4 (9,1) segundos. O grupo tratado com OEC 1,0 g/kg apresentou média de permanência de 89,4 (6,48) segundos. Os grupos tratados com o *Citrus*/ $\beta$ -CD (1,0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/k) obtiveram média de tempo de permanência em segundos de 103 (6,96), 95,2 (9,35), 114 (9,17), respectivamente.

Os resultados do teste de Campo Aberto são apresentados na Figura 11. Após os tratamentos os camundongos foram avaliados quanto ao Tempo de Grooming (A), Tempo de Ambulação (B) e Tempo de Rearing (C). Após o tratamento único, o *Citrus*, *Citrus*/ $\beta$ -CD 500 mg/kg e o DZP a 1,0 mg/kg aumentaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) o Tempo de Grooming (A), com média de 55 (11,4) segundos e 66 segundos (10,7), respectivamente, em comparação ao grupo Controle, média de 10 (2,5) segundos, e o grupo  $\beta$ -CD Pura, 19 (4,2) segundos de média. Quanto ao Tempo de Ambulação (B) no campo aberto os três grupos de *Citrus*/ $\beta$ -CD (1,0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/k) e o DZP a 1,0 mg/kg apresentaram diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) do grupo Controle e o grupo  $\beta$ -CD Pura. Os três primeiros apresentaram média de tempo de ambulação de 86 (2,96), 86 (4,5) e 98 (5,5) segundos, respectivamente, o diazepam apresentou média de 132 (18,4) segundos, grupo controle com média de 46,5 (1,3), grupo  $\beta$ -CD Pura com média 52,3 (4,8) segundos.

Na avaliação do tempo de Rearing, embora se observe um discreto aumento na média de tempo dos grupos tratados, não foram observadas diferenças

significativas atribuídas ao efeito das substâncias estudadas, assim como o controle positivo, o DZP.

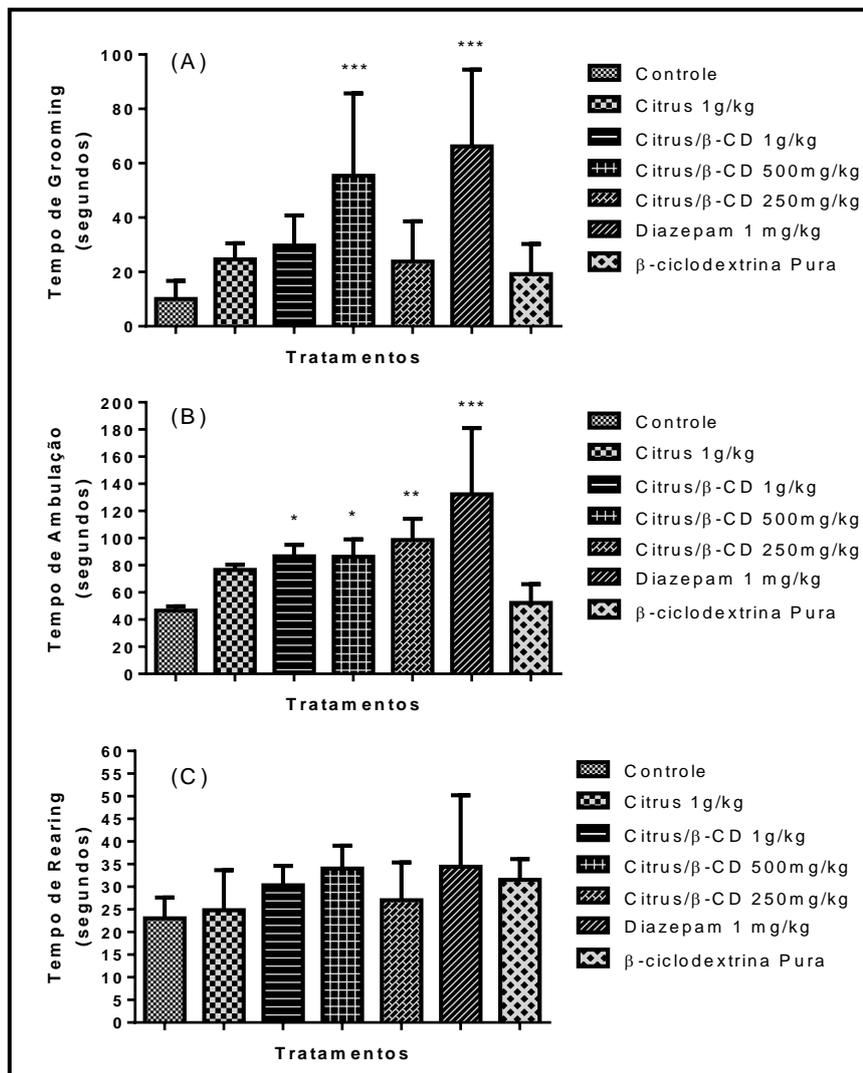


Figura 11. Efeitos no teste de Campo Aberto após tratamento único com os grupos Controle: Solução Salina; *Citrus* 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 500 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 250 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; Diazepam 1,0 mg/kg; β-ciclodextrina Pura. (A) Tempo de grooming do camundongo no Campo Aberto; (B) Tempo de ambulação do camundongo no Campo Aberto; (C) Tempo de Rearing do camundongo no Campo Aberto. \*  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo controle (ANOVA).

A figura 12 apresenta a média do número de esferas escondidas por cada grupo do estudo. Os grupos *Citrus* 1,0 g/kg, *Citrus*/β-CD 1,0 g/kg e DZP a 1,0 mg/kg

apresentaram diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo Controle. O grupo tratado com OEC apresentou média de 0,6 (0,3) esferas escondidas, seguido do grupo *Citrus*/ $\beta$ -CD 1,0 g/kg com média de 1,7 (0,4) e o grupo DZP com média de 0,8 (0,4) esferas. O grupo controle escondeu em média 5,3 (1,47) esferas.

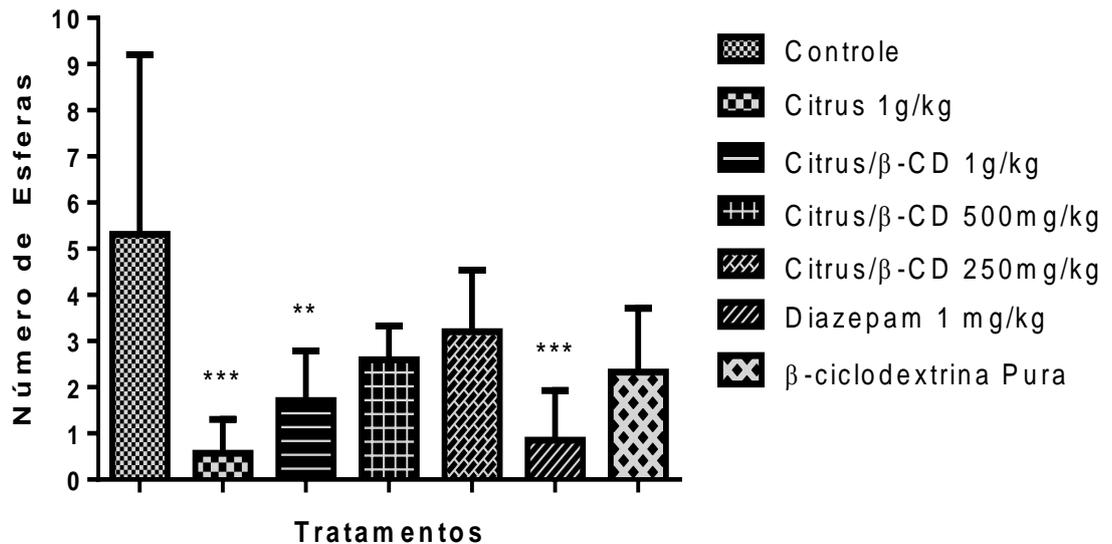


Figura 12. Efeitos no teste de Esconder Esferas após tratamento único com os grupos Controle: Solução Salina; *Citrus* 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus*/ $\beta$ -CD 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina; *Citrus*/ $\beta$ -CD 500 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina; *Citrus*/ $\beta$ -CD 250 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão  $\beta$ -ciclodextrina; Diazepam 1,0 mg/kg;  $\beta$ -ciclodextrina Pura. Diazepam 1,0 mg/kg; Micropartícula Pura. \*  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo controle (ANOVA).

No teste Placa Perfurada (Figura 13) observa-se o número de mergulhos dos camundongos nos espaços perfurados da placa. Apenas o DZP 1,0 mg/kg apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) dos grupos Controle e  $\beta$ -CD Pura. Os dois últimos apresentaram média de 14 (1,3) e 21 (2,1) mergulhos, respectivamente, o grupo que recebeu DZP 1,0 mg/kg apresentou média de 32 (2,5) mergulhos. O grupo *Citrus* 1,0 g/kg apresentou média de 9 (1,4) mergulhos, seguido de *Citrus*/ $\beta$ -CD 1,0 g/kg com média de 8 (0,8) mergulhos. Destaca-se os grupos *Citrus*/ $\beta$ -CD 500 mg/kg e 250

mg/kg que apresentaram médias mais elevadas, 17 (1,3) e 19 (2,3) mergulhos, respectivamente, com diferença significativa comparadas ao grupo *Citrus* 1,0 g/kg.

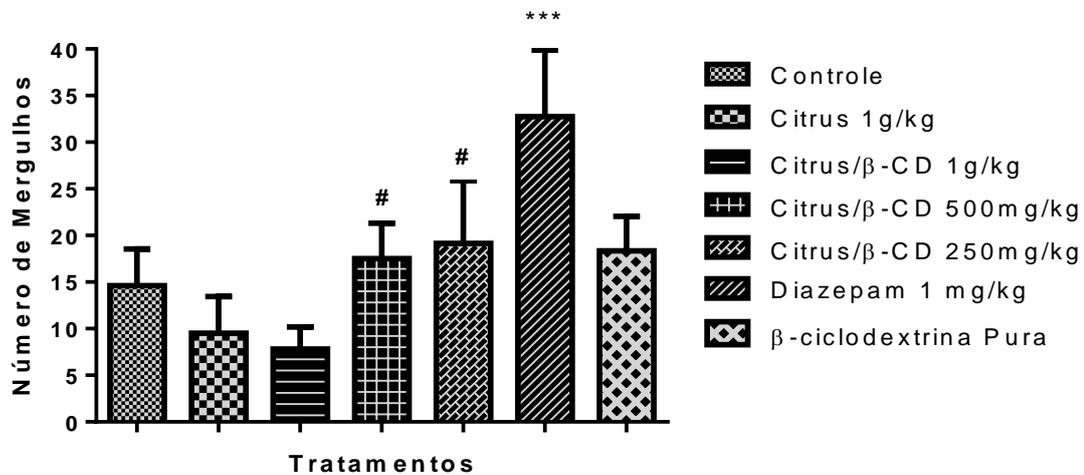


Fig. 13. Efeitos no teste Placa Perfurada após tratamento único com os grupos Controle: Solução Salina; *Citrus* 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 500 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; *Citrus*/β-CD 250 mg/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; Diazepam 1,0 mg/kg; β-ciclodextrina Pura. (A) Tempo de ambulação do camundongo na Placa; (B) número de Mergulhos do camundongo nos espaços perfurados da Placa. \*  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo controle; #Diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em comparação com o grupo *Citrus* 1 g/kg (ANOVA).

Na avaliação do comprometimento motor devido aos agentes farmacológicos administrados nos camundongos, o teste Rota rod (Figura 14) apresenta resultados satisfatórios que sugerem o não comprometimento motor por parte do OEC, assim como sua apresentação no complexo com β-CD. Para os resultados são verificados os tempos de permanência no Rota Rod após 60 min, 90 min e 120 min após administração. Os resultados se evidenciam pelo maior tempo de permanência dos grupos Controle, *Citrus* 1 g/kg, *Citrus*/β-CD 1 g/kg e β-CD Pura em relação ao DZP, com diferença significativa no tempo de 60 min (A) e 90 min (B). O DZP é um fármaco com efeito ansiolítico que interfere na parte motora animal. Na aferição do tempo de permanência com 120 min de administração nos grupos, considera-se que o DZP não

apresentava mais efeito nos camundongos, visto que a diferença estatística entre os grupos foi finalizada, tendo os camundongos apresentado tempo de permanência similar em todos os grupos estudados.

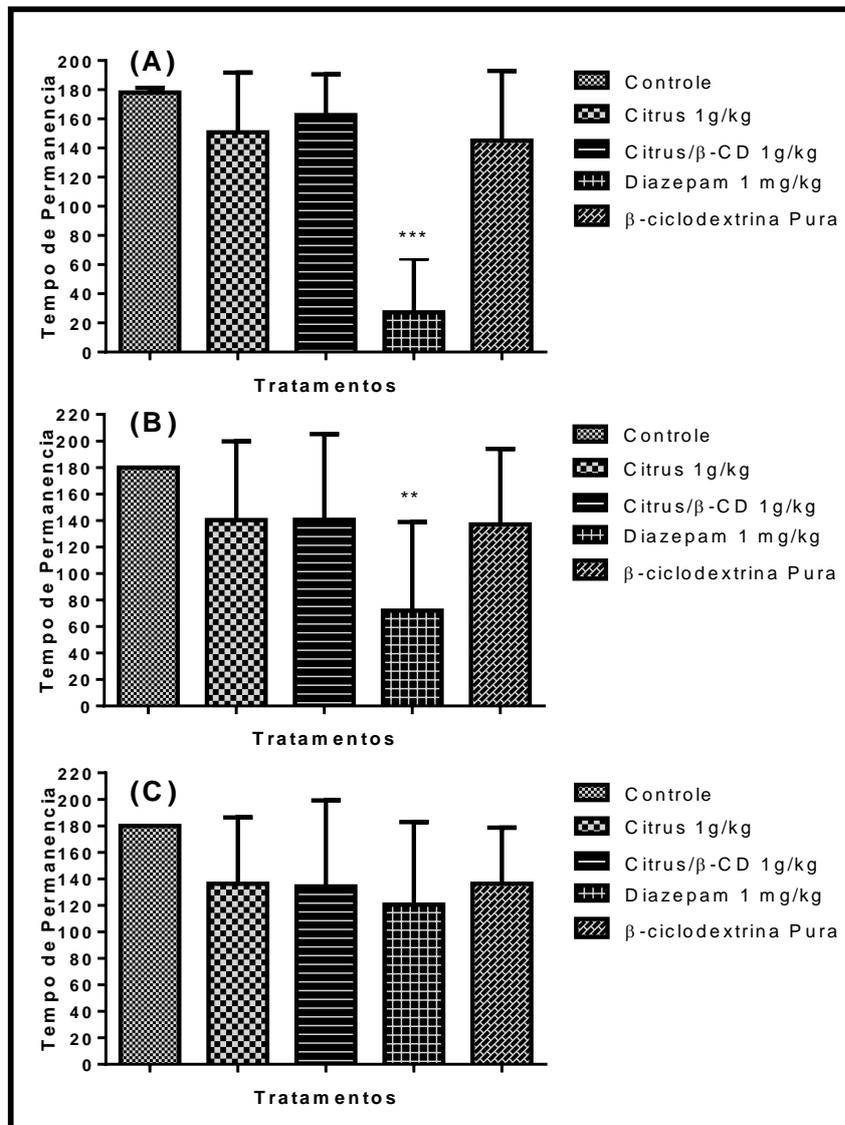


Figura 14. Efeitos no teste Rota Rod após tratamento único com os grupos Controle: Solução Salina; *Citrus* 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L.; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em complexo de inclusão β-ciclodextrina; Diazepam 1,0 mg/kg; β-ciclodextrina Pura. (A) Tempo de permanência no Rota Rod após 60 minutos. (B) Tempo de permanência no Rota Rod após 90 minutos. (C) Tempo de permanência no Rota Rod após 120 minutos. \*  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo controle (ANOVA).

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

A literatura apresenta uma variedade de óleos essenciais que desempenharam um efeito ansiolítico em diferentes modelos animais (*Achillea wilhemsii*, *Angelica sinensis*, *Alpinia zerumbet*, *Celastarus paniculatus*, *Chamaecyparis obtuse*, *Citrus aurantium*, *Citrus aurantium subsp. bergamia*, *Citrus janus*, *Citrus latifolia*, *Citrus reticulate*, *Citrus sinensis*, *Cymbopogon citratus*, *Copaifera reticulate*, *Ducrosia anethifolia*, *Foeniculum vulgare*, *Lavendula angustifolia*, *Lippia alba*, *Spiranthera odoratissima* e *Stachys tibetica*). Sousa e colaboradores (2015) fazem destaque ao *Citrus aurantium* L., que pode ser encontrado com diferentes vias de administração e com efeitos significativos em vários modelos animais, estudos que foram corroborados por diferentes grupos de pesquisa (DE SOUSA et al., 2015).

Os achados no Labirindo em cruz elevado identificados neste estudo, corroboraram com pesquisas anteriores, Montoya e colaboradores (2008) sugerem efeito ansiolítico do OEC (1 g/kg), que se reflete no aumento do tempo gasto nos braços abertos do labirinto e aumento do número de entradas e da porcentagem de entradas nos braços abertos, os autores sugerem o uso do *Citrus aurantium* L. como ansiolítico pelo comportamento observado (MONTROYA et al., 2008).

Como apresentado, neste estudo o Tempo de Permanência nos Braços Abertos do Labirinto foi maior nos grupos tratados com o óleo essencial de *Citrus* 1,0 g/kg, os três grupos *Citrus*/β-CD (1,0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/kg) e o DZP a 1,0 mg/kg, com diferença significativa do grupo controle. Destaca-se que os grupos *Citrus* 500 mg/kg e 250 mg/kg não apresentaram uma diferença significativa do grupo controle quanto ao tempo de permanência, divergindo dos grupos complexados, o que sugere uma potencialização do efeito do OEC nessa apresentação.

O LCE se encontra entre os modelos animais de ansiedade mais utilizados e com melhor resposta para o estudo experimental de drogas ansiolíticas. Foi desenvolvido por Handley e Mithani e posteriormente validado por (PELLOW et al., 1985). O modelo aplica a tendência natural de roedores explorarem ambientes novos e o medo natural que apresentam a altura e espaços abertos. A ação de drogas ansiolíticas permite um maior tempo de permanência nos braços abertos do labirinto, assim como um maior número de entradas, inibindo o medo e ansiedade (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Ao avaliar o efeito ansiolítico em camundongos expostos à inalação de óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* L., Leite (2008), observou redução da ansiedade, assim como redução do estresse psicológico de forma segura. O óleo essencial induziu um aumento significativo no tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos do labirinto, bem como uma tendência a diminuição do tempo em que permaneceram nos braços fechados, quando comparados aos animais controle, o que corrobora com nossos achados. Leite e colaboradores (2008), considerando que ratos ansiosos não se socializam, destaca o tempo de interação social ativa dos animais expostos à inalação do óleo de *citrus*, com diferenças significativas em relação ao tempo de interação dos animais controle, sendo essa diferença de tempo observada também com os animais que receberam o padrão.

Neste estudo, quanto ao número de entradas nos Braços Abertos do Labirinto, o grupo óleo essencial de *Citrus* 1,0 g/kg, o grupo *Citrus*/β-CD 1,0 g/kg e o diazepam a 1,0 mg/kg apresentaram maior número de entradas, com diferença significativa do grupo controle, cabe destaque ao observar as múltiplas comparações do teste, o grupo *Citrus*/β-CD 250 mg/kg apresentou um número de entradas nos braços do

labirinto mais elevado que o grupo *Citrus* 250 mg/kg, com diferença significativa, reiterando uma potencialização do efeito do OE na apresentação microencapsulada.

No teste de caixa claro-escuro, realizado por Costa, (2013) os resultados revelaram um aumento significativo da quantidade de tempo gasto na câmara de luz após a administração de uma dose única de *citrus aurantium* L. quando comparado ao grupo controle. Um aumento em parâmetros exploratórios foram observados após o tratamento com diazepam e com óleo essencial. O uso de flumazenil, agonistas gabaérgicos, sugerem que a atividade ansiolítica do *citrus aurantium* foi mediada pelo sistema serotoninérgico (receptores 5-HT<sub>1A</sub>). O tratamento agudo não mostrou atividade no teste de natação forçada, sensível aos antidepressivos, como também não foi observado nenhum comprometimento locomotor ou sinais de toxicidade ou alterações bioquímicas, exceto uma redução nos níveis de colesterol, foram observados após o tratamento com o óleo essencial (COSTA et al., 2013).

No teste de Campo Aberto realizado neste estudo, o *Citrus*/β-CD (500 mg/kg) e o diazepam a (1 g/kg) aumentaram significativamente do Tempo de Grooming dos camundongos em comparação ao grupo Controle e o grupo β-CD Pura. Em roedores, o grooming atua na termorregulação, higienização do pelo e socialização, o aspecto que mais tem se destacado é a sua relação com o contexto estressor em que ocorre, tornando-o potencialmente informativo nos estudos sobre ansiedade animal (ESTANISLAU, 2012; KALUEFF et al., 2016).

Estanislau et al., (2013), observando comundongos em teste de campo aberto, considerando uma situação de aversividade em declínio ao longo do tempo, visto que a habituação reduziria essa aversividade, os animais apresentaram menor atividade de limpeza no início do teste, mostrando aumentos graduais até cerca da metade da duração da sessão. Destaca-se que exposições em níveis diferentes parecem

produzir efeitos distintos sobre o grooming, o aumento da ansiedade e/ou medo, estimulação do circuito da amígdala ou administração de medicamentos ansiogênicos, provavelmente impedirão o aparecimento de grooming (FERNÁNDEZ-TERUEL; ESTANISLAU, 2016).

Quanto ao Tempo de Ambulação no campo aberto, os três grupos de *Citrus*/β-CD (1,0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/k) e o DZP a 1,0 mg/kg apresentaram diferença significativa do grupo Controle e o grupo β-CD Pura. Não observa-se aumento da ambulação no grupo *Citrus* 1,0 g/kg, o que representa uma possível potencialização do efeito do *citrus aurantium* L. no complexo β-CD. Corroborando com achados de Leite e colaboradores (2008), que não observaram resultados que diferiram em relação à deambulação dos grupo tratado com óleo essencial de *citrus* e o grupo controle, assim como o tempo de criação ou congelamento não foi alterado.

Quanto ao teste de esconder esferas, os grupos *Citrus* 1,0 g/kg, *Citrus*/β-CD 1,0 g/kg e DZP a 1,0 mg/kg apresentaram diferença significativa do grupo Controle. Tratamento com óleo essencial (0,5 e 1,0 g /kg) e DZP (2,0 mg / kg) diminuiram significativamente a número de esferas escondidas após administração única e tratamentos repetitivos. O teste é um modelo experimental baseado no comportamento defensivo desencadeado em roedores em resposta estímulos aversivos. O procedimento experimental parece relacionado ao transtorno obsessivo-compulsivo, caracterizado pela obsessão, pensamentos recorrentes que levam a ansiedade e desconforto acentuados, ou compulsão, comportamento estereotipado ou rituais para aliviar a ansiedade. Drogas ansiolíticas suprimem o comportamento de esconder as esferas, embora outras classes de drogas também reduzam ou extingam esta exibição defensiva, indicando ausência de especificidade farmacológica (DE MORAES PULTRINI; ALMEIDA GALINDO; COSTA, 2006).

No teste Placa Perfurada destaca-se os grupos *Citrus*/β-CD 500 mg/kg e 250 mg/kg que apresentaram médias de mergulho mais elevadas, com diferença significativa comparadas ao grupo não complexado *Citrus* 1,0 g/kg. A potencialização do efeito de uma substância complexada é observada em outras pesquisas. Em um estudo utilizando Citral, um monoterpene e o principal composto do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, conhecido como “capim-limão”, observou-se os efeitos anti-hiperalgésicos e anti-inflamatórios do Citral em complexos de inclusão de β-CD em modelos animais. As amostras demonstraram atividade anti-hiperalgésica e anti-inflamatória devido à redução dos níveis totais de leucócitos, ressaltando que o Citral em complexos de inclusão de β-CD apresentou melhores efeitos farmacológicos entre as amostras avaliadas, demonstrando um potencial para o desenvolvimento de produtos para o tratamento de reações inflamatórias e dolorosas (CAMPOS et al., 2019).

Camargo e colaboradores (2018), em um estudo similar, avaliou os efeitos cardiovasculares do Linalol, um álcool monoterpene presente em algumas plantas medicinais aromáticas com atividades biológicas, complexado em β-CD. O complexo de inclusão contendo Linalol no β-CD produziu um perfil anti-hipertensivo mais elevado quando comparado à forma não complexadas. Os resultados sugeriram um potencial efeito anti-hipertensivo e complexo se tornou importante para melhorar a atividade cardiovascular (CAMARGO et al., 2018).

O desenvolvimento de um complexo de OEC com β-CD com resultados ansiolíticos positivos em animais se torna promissor para futuras pesquisas e desenvolvimento de fármacos para humanos, visto que pesquisas em humanos com o óleo essencial não complexado já apresentam resultados promissores.

Um estudo clínico realizado com pacientes que aguardavam atendimento odontológico, expos os indivíduos a inalação do óleo essencial de laranja na sala de espera, os indivíduos que foram expostos ao óleo se apresentaram mais calmos e com um menor nível de ansiedade estado (LEHRNER et al., 2005). Goes e colaboradores, 2012, obtiveram resultados que mostraram propriedades ansiolíticas do óleo essencial de laranja doce em indivíduos saudáveis ao desenvolverem uma tarefa ansiogênica, evidenciadas pela diferença significativa dos níveis de ansiedade estado entre o grupo expostos ao aroma e grupo controle (GOES et al., 2012).

Em um estudo com a flor de *Citrus aurantium* L. destilada, duas horas antes do procedimento, pacientes apresentaram redução na ansiedade pré-operatória na cirurgia ambulatorial (AKHLAGHI et al., 2011). Outro estudo realizado com pacientes portadores de leucemia mielóide crônica no momento que antecede o procedimento de coleta de material medular, pode-se observar que pacientes que inalaram o OEC apresentaram uma diminuição da ansiedade e permaneceram relaxados durante o procedimento (PIMENTA et al., 2016).

Ao avaliar o OEC inalado por usuário de crack em abstinência, Chaves neto e colaboradores (2017), apresentaram efeito ansiolítico do óleo em um grupo que convive diariamente com ansiedade em seus diferentes níveis, sendo um dos problemas enfrentados no período de abstinência e de manutenção do abandono das drogas. Um estudo clínico apresentou a eficácia da aromaterapia usando OEC na síndrome pré-menstrual, podendo ser eficaz como um novo método terapêutico para as emoções e sintomas da TPM (CHAVES NETO et al., 2017; HEYDARI et al., 2018).

Os resultados da presente pesquisa, no teste rota rod, demonstram que o OEC, assim como na apresentação complexada em  $\beta$ -Ciclodextrina, apresentam efeito ansiolítico sem interferir ou apresentar comprometimento motor nos camundongos.

Carvalho-Freitas e Costa, (2002), apresentaram que camundongos tratados com as mesmas doses de óleo essencial usadas no presente trabalho não mostrou comprometimento da deambulação espontânea. Assim como Pultrini, 2006, que conclui que o OEC apresenta atividade ansiolítica em roedores sem qualquer comprometimento motor, mesmo após 15 dias consecutivos de tratamento (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002; DE MORAES PULTRINI; ALMEIDA GALINDO; COSTA, 2006)

# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

- Com o método utilizado, foi possível desenvolver um sistema de complexo de inclusão com 2-hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina incorporando óleo essencial de *Citrus aurantium* L..
- Foram observados resultados satisfatórios do efeito ansiolítico do OEC complexado em 2-hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina, o que se mostra um achado importante por garantir a administração de doses sem perdas por volatilidade.
- O estudo acrescenta a observação do efeito ansiolítico com doses de 500 mg/kg e 250 mg/kg complexadas, que não é observado nas mesmas doses com OE puro, um melhor aproveitamento dos princípios ativos.
- O comprometimento motor não foi afetado, observado no teste rota-rod, que apresenta um achado desejado para uma substância de ação ansiolítica.
- O desenvolvimento de um complexo de óleo essencial de *Citrus aurantium* L. com 2-hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina com resultados ansiolíticos positivos em animais se torna promissor para futuras pesquisas e desenvolvimento de medicamentos para humanos.

## 8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A., STEFFENS, R. D. A. K., GANZERT, M. L., VIANA, M. D. S., LIZ, C. M. D., BRANDT, R., DOMINSKI, F. H. Ansiedade associada a fatores sociodemográficos e clínicos de mulheres com síndrome da fibromialgia. **Revista Dor**, v. 14, n. 3, p. 200-203, 2013.

AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G. D., ROCHA, M. S., FREITAS, R. M. D., OLIVEIRA, T. M., SILVA, R. M., DE ALMEIDA, L. T. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de croton zehntneri com b-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 50–55, 2014.

AKHLAGHI, M., SHABANIAN, G., RAFIEIAN-KOPAEI, M., PARVIN, N., SAADAT, M., & AKHLAGHI, M. Flor de *Citrus aurantium* e ansiedade pré-operatória. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 6, p. 707–712, 21 dez. 2011.

ALMEIDA, R. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1. ed. João Pessoa - Brazil: [s.n.].

ANDRADE, A., STEFFENS, R. D. A. K., GANZERT, M. L., VIANA, M. D. S., LIZ, C. M. D., BRANDT, R., & DOMINSKI, F. H. Ansiedade associada a fatores sociodemográficos e clínicos de mulheres com síndrome da fibromialgia. **Revista Dor**, v. 14, n. 3, p. 200–203, set. 2013.

BARETTA, I. P., FELIZARDO, R. A., BIMBATO, V. F., DOS SANTOS, M. G. J., KASSUYA, C. A. L., JUNIOR, A. G., ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 46–54, 6 mar. 2012.

BRAGA, J. Ensaio farmacológico clínico com o extrato das raízes do Panaxginseng C. A. Meyer no controle da ansiedade. **Tese [Doutorado] – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa**. [s.l.: s.n.].

BRAGA, J. E. F., PORDEUS, L. C., SILVA, A. T. M. C., PIMENTA, F. C. F., DINIZ, M. F. F. M., ALMEIDA, R. N. D. Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.

CAMARGO, S. B., SIMÕES, L.O, DE AZEVEDO MEDEIROS, C.F, DE MELO JESUS,

A., FREGONEZE, J.B, EVANGELISTA, A., SILVA, D.F. Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with  $\beta$ -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochemical Pharmacology**, v. 151, p. 38–46, 2018.

CAMPOS, C. A., LIMA, B.S, TRINDADE, G.G, SOUZA, E.P, MOTA, DS, HEIMFARTH, L., THANGARAJ, P. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. **Life Sciences**, v. 229, n. May, p. 139–148, 2019a.

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

CHAVES NETO, G., BRAGA, J.E.F, ALVES, M.F, DE MORAIS PORDEUS, L.C, DOS SANTOS, S.G, SCOTTI, M.T, DINIZ, M.F.F.M. Anxiolytic Effect of *Citrus aurantium* L. in Crack Users. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

COSTA, C. A. R. A., CURY, T. C., CASSETTARI, B. O., TAKAHIRA, R. K., FLÓRIO, J. C., & COSTA, M. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT<sub>1A</sub>-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 23 fev. 2013.

CRUZ, A. P. DE M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192–217, 2012.

DAMY, S. B., CAMARGO, R. S., CHAMMAS, R., & POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. The fundamentals of experiments with animals - Applications in experimental surgery. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DE MORAES PULTRINI, A.; ALMEIDA GALINDO, L.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 15, p. 1720–1725, 6 mar. 2006.

DE SOUSA, D., HOCAYEN, P. D. A. S., ANDRADE, L. N., & ANDREATINI, R. A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18620–18660, 14 out. 2015.

DEL VALLE, EM Martin. Ciclodextrinas e seus usos: uma revisão. **Bioquímica do processo**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DOBETSBERGER, C.; BUCHBAUER, G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 5, p. 300–316, 1 set. 2011.

ELLOUZE, I. ABDERRABBA, M., SABAOU, N., MATHIEU, F., LEBRIHI, A., & BOUAJILA, J. Season's variation impact on Citrus aurantium leaves essential oil: chemical composition and biological activities. **Journal of food science**, v. 77, n. 9, p. T173-T180, 2012.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety - A systematic review of controlled clinical trials. **Phyto medicine Urban & Fischer**, 13 fev. 2006.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology and Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 105–112, jan. 2012.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESTANISLAU, C. Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 591, 2016.

FERREIRA, C. L. Universidade, contexto ansiogênico? Avaliação de traço e estado de ansiedade em estudantes do ciclo básico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 973-981, 2009.

FREITAS, F. F. Avaliação dos efeitos psicológicos da L-teanina em modelo de ansiedade em humanos [dissertação]. **João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 1 mar. 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/4291>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

FREITAS, T. Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de Hyptis martiusii benth e de seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina [dissertação]. **Crato (CE): Universidade Regional do Cariri – URCA**. [s.l.: s.n.].

GOES, T. C., ANTUNES, F. D., ALVES, P. B., TEIXEIRA-SILVA, F. Effect of Sweet Orange Aroma on Experimental Anxiety in Humans. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 8, p. 798–804, 1 ago. 2012.

GOMES, E. T., MELO, R. L. A. S., VASCONCELOS, E. M. R., ALENCAR, E. M.. Ansiedade e medo em enfermagem médico-cirúrgica. **Enfermagem Brasil**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2014.

GONZÁLEZ, C.A.; SALA, N.; ROKKAS, T. Câncer gástrico: aspectos epidemiológicos. **Helicobacter**, v. 18, p. 34-38, 2013.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, mar. 1984.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. Yunes RA, Cechimel Filho V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia, v. 2, 2009.

HEYDARI, N., ABOOTALEBI, M., JAMALIMOGHADAM, N., KASRAEIAN, M., EMAMGHOREISHI, M., & AKBARZADEH, M. Investigation of the effect of aromatherapy with *Citrus aurantium* blossom essential oil on premenstrual syndrome in university students: A clinical trial study. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 32, p. 1–5, 1 ago. 2018.

KALUEFF, A. V., STEWART, A. M., SONG, C., BERRIDGE, K. C., GRAYBIEL, A. M., & FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.

KARINO, C. A.; LAROS, J. A. Ansiedade em situações de prova: evidências de validade de duas escalas. **Psico-USF**, v. 19, n. 1, p. 23–36, abr. 2014.

LEHRNER, J., MARWINSKI, G., LEHR, S., JOHREN, P., DEECKE, L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. **Physiology and Behavior**, v. 86, n. 1–2, p. 92–95, 15 set. 2005.

LEITE, M. P., FASSIN JR, J., BAZILONI, E. M., ALMEIDA, R. N., MATTEI, R., & LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. SUPPL., p. 661–666, 2008.

LIMA, B. DOS S. de ALCÂNTARA CAMPOS, C., DA SILVA SANTOS, A.C.R, SANTOS, V.C.N, TRINDADE, G.D.G.G, SHANMUGAM, S., de SOUZA ARAÚJO, A. A. Development of morin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex:

Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 126, p. 15–24, 1 abr. 2019.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LYRA, C. S.; NAKAI, L. S.; MARQUES, A. P. Effectiveness of aromatherapy in reducing stress and anxiety levels in undergraduate health science students: a preliminary study. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 17, n. 1, p. 13–17, 2010.

MARTINS, E. A. Obtenção e caracterização de complexos ternários de Saquinavir,  $\beta$ -ciclodextrina e polivinilpirrolidona. 2008. [Tese]. **Universidade de São Paulo**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-19092017-124146/en.php>>. Acesso em: 6 jan. 2021.

MONTOYA, C., MORENO, E., ROMERO, M., TORALES, J., CENTURIÓN, C. El uso del laberinto en cruz elevado para medir los efectos ansiolíticos producidos por el *Citrus aurantium* L. (petit grain) en los ratones. **Medicine actual**, p. 8–12, 2008.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PIMENTA, F. C. F., ALVES, M. F., PIMENTA, M. B. F., MELO, S. A. L., ALMEIDA, A. A. F. D., LEITE, J. R., ALMEIDA, R. N. Anxiolytic Effect of *Citrus aurantium* L. on Patients with Chronic Myeloid Leukemia. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 4, p. 613–617, 1 abr. 2016.

PIMENTA, F. C. F., CUNHA-TAVARES, N. A., CHAVES-NETO, G., ALVES, M., FERNANDES-PIMENTA, M., MELO-DINIZ, J., MELO-DINIZ, M. F. F. **Pharmacological Actions of Citrus Species**. Citrus Pathology; Gill, H., Garg, H., Eds, p. 197-211, 2017.

PINHO, E. GROOTVELD, M., SOARES, G., HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

REBELLO, F.F.P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista**

**Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, 2009.

RODRIGUES, L. B. MARTINS, A. O. B. P. B., RIBEIRO-FILHO, J., CESÁRIO, F. R. A. S., E CASTRO, F. F., DE ALBUQUERQUE, T. R., DE MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 836–846, 1 nov. 2017.

SADOCK, B. J. Inevitable Suicide. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 18, n. 3, p. 221–224, maio 2012.

SAMPAIO, C. E. P.; SILVA, R. V., DA SILVEIRA COMINO, L. B., ROMANO, R. A. T. Nível de ansiedade dos acompanhantes de crianças em cirurgia ambulatorial: contribuições da consulta de enfermagem [Anxiety level of children's companions in outpatient surgery: contributions of the nursing appointment]. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 22, n. 2, p. 233-238, 2014.

SCHULTZ MÜLLER, P. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **[Tese] - Universidade Federal do Paraná - Curitiba**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/26320>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

SILVA, P. V. DA. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e Ciclodextrinas **[dissertação] - Universidade Federal de Itajubá- UNIFEI, ITAJUBÁ-MG**. [s.l: s.n.].

SILVA, M. D.; DREVECK, S.; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of medicinal plants used by rural population around the Itajaí National Park. **Indaial**, v. 10, n. 2, p. 54-64, 2009.

STOHS, S.J. PREUSS, H.G, KEITH, S.C, KEITH, P.L, MILLER, H., KAATS, G.R. Efeitos da p-sinefrina sozinha e em combinação com bioflavonóides selecionados no metabolismo de repouso, pressão arterial, frequência cardíaca e alterações de humor auto-relatadas. **Revista Internacional de Ciências Médicas**, v. 8, n. 4, pág. 295, 2011.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, Minerva Coimbra: Coimbra**. [s.l: s.n.].

VENTURINI, C. D. G. NICOLINI, J., MACHADO, C., MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VIANA, M. D. M., VIEIRA, A. C. S., DA SILVA NETO, G. J., PÓVOAS, F. T. X., CAMPESATTO, E. A. Potencial ansiolítico do gênero citrus : revisão integrativa. **Revista Científica da Unipar**, v. 20, p. 73–79, 2016.

ZOU, Z., XI, W., HU, Y., NIE, C., ZHOU, Z. Atividade antioxidante de frutas cítricas.

**Química alimentar**. v. 196, p. 885-896, 2016. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>

# Anexos

## 9. Anexos

### 9.1. Certidão Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Estudo não clínico do potencial ansiolítico e toxicológico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. microencapsulado” protocolo nº 086/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 08/06/2017.

|                     |  |
|---------------------|--|
| Vigência do Projeto | 2017 - 2019  |
| Espécie/linhagem    | Camundongos Swiss ( <i>Mus musculus</i> )<br>Ratos Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ) |
| Número de animais   | 216 Camundongos Swiss<br>24 Ratos Wistar   |
| Idade/peso          | 90 dias/ 30 g  |
| Sexo                | Machos   |
| Origem              | Biotério Prof. Thomas George / IPerFarM - UFPB   |

Profa. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB

## 9.2. Revista Científica

rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/about



Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada  
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences  
ISSN 1808-4532  
e-ISSN 2179-443X

Casa Equipe editorial Submissões Diretrizes do autor Atual Arquivos Contato

Casa / Sobre o jornal

### Sobre

A **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** (ISSN 2179-443X Online) é uma revista de Acesso Aberto publicada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP. Os artigos são publicados em modelo de publicação contínua e coletados em volume anual. Os manuscritos aceitos serão publicados em inglês e as contribuições devem ser enviadas em inglês.

O título do periódico a ser utilizado nas citações do artigo é “ **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**”, ou “**Rev Ciênc Farm Básica Apl**” na forma abreviada.

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>1808-4532</b> | <b>REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E APLICADA</b> | <b>B2</b> |
| <b>2179-443X</b> | <b>REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS BÁSICA E APLICADA</b> | <b>B2</b> |

## 9.3. Comprovante de aceite de artigo publicado na revista científica

Fwd: [RCFBA] Editor Decision

De: **Patricia de Carvalho Mastroianni** <[patricia.mastroianni@unesp.br](mailto:patricia.mastroianni@unesp.br)>

Date: qui, 12 de nov de 2020 11:32

Subject: [RCFBA] Editor Decision

To: Gabriel Chaves Neto <[gabrielchavesufpb@hotmail.com](mailto:gabrielchavesufpb@hotmail.com)>, Humberto Hugo Nunes de Andrade <[humberto.hugo10@gmail.com](mailto:humberto.hugo10@gmail.com)>, João Euclides Fernandes Braga <[joefebra@gmail.com](mailto:joefebra@gmail.com)>, Lucindo José Quintans Júnior <[lucindojr@gmail.com](mailto:lucindojr@gmail.com)>, Reinaldo Nóbrega de Almeida <[reinaldoan@uol.com.br](mailto:reinaldoan@uol.com.br)>, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz <[margareth.diniz@gmail.com](mailto:margareth.diniz@gmail.com)>

Gabriel Chaves Neto, Humberto Hugo Nunes de Andrade, João Euclides Fernandes Braga, Lucindo José Quintans Júnior, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz:

We have reached a decision regarding your submission to Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, "Non-clinical study of the anxiolytic effect of Citrus aurantium L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin".

Our decision is to: Accept Submission

I kindly ask you to forward the approved version of the manuscript, in addition to the certificate of English language review, to the e-mail [revistacfba.fcf@unesp.br](mailto:revistacfba.fcf@unesp.br)

- Highlights in a separate file (mandatory), in Portuguese and English language. Highlights consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point);

Thank you for considering Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada for the publication of your research.

## 9.4. Artigo Científico Publicado

10.4322/2179-443X.0705

ORIGINAL ARTICLE

e705

Received on September 8th 2020. Accepted on November 12th 2020.

**Non-clinical study of the anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin**

**Estudo não clínico do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. em um complexo de inclusão com 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

**Anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L.**

Gabriel Chaves Neto

João Euclides Fernandes Braga

Humberto Hugo Nunes de Andrade

Lucindo José Quintans Júnior

Reinaldo Nóbrega de Almeida

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

### Abstract

Anxiety in the world population has increased significantly; the problem has encouraged studies regarding innovative alternatives for treatment. Research with *Citrus aurantium* L. essential oil (CEO) has revealed positive results with anxiolytic effects in both animals and humans. However, certain limitations affect its storage and preservation, its efficiency in therapy, and determination of adequate posologies. The potential use of cyclodextrins as drug carriers has been successfully explored. This study aims to assess the anxiolytic potential of a CEO/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) inclusion complex. Preparation of the inclusion complex was performed using the Alpha 1-2 LDplus lyophilizer. To allow formation, and avoid loss of volatiles to the atmosphere, Limonene (LIM), the main compound in CEO, together with HP- $\beta$ -CD in a molar ratio of (1: 1M) was dispersed in ethanol for 36 hours using a laboratory shaker at room temperature (25°C). Non-clinical murine pharmacological tests were performed for anxiety assessment in experimental and control groups. To assess anxiety and motor impairment, the animals were evaluated using the elevated plus maze, open field, and rota-rod tests. Satisfactory results of the anxiolytic effect of the OEC complexed in HP- $\beta$ -CD were observed, with the indication of an potentiation of the effect with doses lower than 500 mg / kg and 250 mg / kg complexed, suggesting improvement in the anxiolytic properties of the OEC.

**Key words:** Anxiety, volatile oils, Citrus, Cyclodextrins, Pharmaceutical Technology

## 1. Introduction

Anxiety has increased significantly in the world population. Many factors have been indicated as responsible for this change, and they include profound economic, social, and cultural change. Anxiety is regarded as a state of tension, apprehension, and discomfort, which originates as a response to imminent internal or external danger, to stress, or to some environmental stimulus (1,2).

Study (3) point out that manifestations of anxiety depend on how individuals cope with situations they consider challenging. In the presence of an anxiety-causing stimulus, the person begins to present unpleasant physiological reactions, the posture becomes tense, the facial expression is stressed, and associated headaches may cause involvement of physiological, behavioral, and cognitive components.

Anxiety disorders are present in most populations studied, yet in the United States, they are among the most prevalent psychiatric conditions. Benzodiazepines have been used in recent years as drugs of choice to treat the various forms of anxiety, and more recently, antidepressants have become an option. Yet, although they have benefits, side effects are frequent and include anterograde amnesia and physical dependence (4,5).

Studies have found that due to the side effects often presented by conventional treatments, up to 43% of patients with anxiety disorders use some form of complementary therapy. And thus medicinal alternatives which present specific anxiolytic effect, and yet are less harmful to the individual are now being sought (5,6).

In the search for innovative pharmacological alternatives to treat anxiety, various scientific investigations have demonstrated the anxiolytic effects of essential oils. In many countries, essential oils have been traditionally used as folk medicine to treat problems related to the nervous system, especially symptoms of anxiety (5,7).

Essential oils, obtained from plants through physical processes are volatile. Of species that can be used to treat anxiety, essential oil from *Citrus aurantium* L. popularly known as "bitter orange" (Rutaceae) (8) contains a majority fraction of limonene. As observed from animal behavior when inhaling *Citrus aurantium* L. essential oil (CEO), non-clinical rat studies have demonstrated its anxiolytic effects (9–11). The effects of CEO in humans have verified those found in research with animals (8,12).

In relation to the use of essential oils, one of the limitations is preservation and storage, this, since most of the components are sensitive to heat and oxidation. In addition, their high volatility makes aromatherapy dosages difficult to standardize.

The inclusion of substances in complexes with HP- $\beta$ -CD has been studied to improve the safety and efficacy of products, since it can increase the solubility, permeability and chemical stability of various compounds, such as essential oils, medicines and volatile products (13).

The potential use of cyclodextrins as drug carriers has been successfully explored, improving the physicochemical characteristics of drugs. They are cyclic oligosaccharides, obtained by the action of the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase by the degradation of starch. Due to its ease of access and low cost, HP- $\beta$ -CD is widely used in the pharmaceutical industry, in addition to its ability to interact with most molecules of pharmaceutical interest (14).

The use of complexes with HP- $\beta$ -CD and drugs is important because it presents advantages compared to conventional systems. The present manuscript aims to evaluate the anxiolytic effect of the EOC in an HP- $\beta$ -CD inclusion complex, seeking a system with anxiolytic potential that presents a reduction in the preservation, storage and volatility limitations of the OEC.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. The *Citrus aurantium* L. and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex**

Development of the CEO and HP- $\beta$ -CD complex was carried out in partnership with the Neuroscience and Pharmacological Tests Laboratory (LANEF), at Sergipe Federal University of - UFS.

#### **2.1.2. Substances**

2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD; C<sub>54</sub>H<sub>102</sub>O<sub>39</sub>; purity  $\geq$  98%) was purchased from Sigma-Aldrich (USA), Diazepam (Sigma –USA), *Citrus aurantium* L. essential oil (CEO), presenting the following characteristics: chemical composition - 90% limonene; color - strong yellow to orange; odor - *citrus*, refreshing and penetrating; aspect: clear liquid;

density: 0.8300 - 0.8500 g/mL at 20°C; refractive index at 20°C: 1.4710 - 1.4750; and soluble in ethanol, was purchased from By -Samia Aromatherapy (Brazil).

### **2.1.3. Preparation of the *Citrus autantium* L. essential oil/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex**

Preparation of the inclusion complex was performed by lyophilization using the Alpha 1-2 LDplus lyophilizer. Limonene (LIM), the main CEO compound, and HP- $\beta$ -CD in a molar ratio of 1: 1M was dispersed in ethanol using a laboratory shaker for 36 hours at room temperature (25°C), allowing formation and avoiding loss of volatiles to the atmosphere. The solution was frozen at -20°C and lyophilized at -50°C. The lyophilized samples were stored in closed containers inside a desiccator (15).

A lyophilization method was used to prepare CEO/HP- $\beta$ -CD according to the literature (15,16), distilled water (20 mL) containing 1: 1 molar ratios (CEO: HP- $\beta$ -CD) was mixed. The solution was stirred using a magnetic stirring device operating at 150 rpm (Quimis Q 261A21, Brazil) at room temperature for 36 hours. After mixing, the solution was frozen to - 50°C and lyophilized in a freeze dryer until all moisture was sublimated. The lyophilized powder was stored in closed containers inside a desiccator at 25°C.

## **2.2. Development of the non-clinical study**

A non-clinical pharmacological trial at the Psychopharmacology Laboratory - Health Sciences Center - CCS of Paraíba Federal University of (UFPB) was performed. All experimental procedures were previously analyzed and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Iperfarm/UFPB, under certificate No. 086/2017. The study was developed according to the ARRIVE guidelines (17).

Swiss mice (*Mus musculus*), albinos, adults, males, weighing between 25 and 35 grams, and approximately 3 months of age were supplied by the Prof. Thomas George Vivarium - CCS/UFPB.

Swiss mice (*Mus musculus*) were used; albinos, adults, males, weighing between 25 and 35 grams, at approximately 3 months of age, healthy, and supplied by the Prof. Thomas George - CCS/UFPB vivarium.

All were grouped in polyethylene cages, kept under controlled conditions of temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , obeying a light and dark cycle and absence of stressful noises, and without using

any medication. The animals had not previously undergone any procedures, and had free access to food (pellet type) and water, in order to minimize variables.

The animals were randomly divided into groups of 06 according to treatments and later distributed according to evaluation testing. The experimental groups were grouped into the Control group, treated with saline solution; the experimental groups - *Citrus* 1 g/kg, *Citrus* 500 mg/kg and *Citrus* 250 mg/kg, treated with *Citrus aurantium* L. essential oil; the experimental groups - *Citrus*/ $\beta$ -CD 1 g/kg; *Citrus*/ $\beta$ -CD 500 mg/kg; *Citrus*/ $\beta$ -CD 250 mg/kg, treated with *Citrus aurantium* L. essential oil in a 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex; the Diazepan 1.0 mg/kg group, and the pure  $\beta$ -cyclodextrin group.

## 2.3. Tests

### 2.3.1 Elevated Plus Maze Test (EPM)

The elevated plus maze (Insight® - model EP 150) is an apparatus made of acrylic, gray in color with four arms, two of which present side walls without covers (called closed arms), and two which are open planks. Each arm is positioned at 90°, and they cross at the center, where the animal is placed (9).

The test aims to verify possible anxiolytic or anxiogenic effects of administered substances; anxiolytic drugs lead to increases in the number of entries and time spent in the open arms (18).

At half an hour from administration of the treatments, the animals were taken to the EPM. The animals were individually placed on the central platform facing one of the open arms of the maze. The number of entries and the length of stay in each type of arm were recorded for a period of 5 minutes. Entry into an arm was considered when all four legs of the animal meets were within its boundary (9).

### 2.3.2 Open field

The Open field test is carried out in a walled circular arena so that the animal cannot escape. The floor is marked with small squares, which allow quantification of the animal's locomotor activity. High defecation and low locomotor activity indicate the animal's anxiety. The animal's locomotor activity in the center of the open field is used as a more selective measure of anxiety. Locomotor activity in the periphery of the apparatus being normal, suggests that a further increase of time spent on the periphery is a principal indicator of anxiety. The effect of anxiolytic drugs, such as diazepam, has been largely demonstrated in this model (19).

### 2.3.3 Rota-rod test (RRT)

This test is used to detect motor impairment due to pharmacological agents. The device consists of a non-slip plastic bar, 3.0 cm in diameter, running at 5 rpm. Each mouse is placed on the device to assess its ability to continue on the rotating bar for 1 minute, with a tolerance of up to three falls (7,11)).

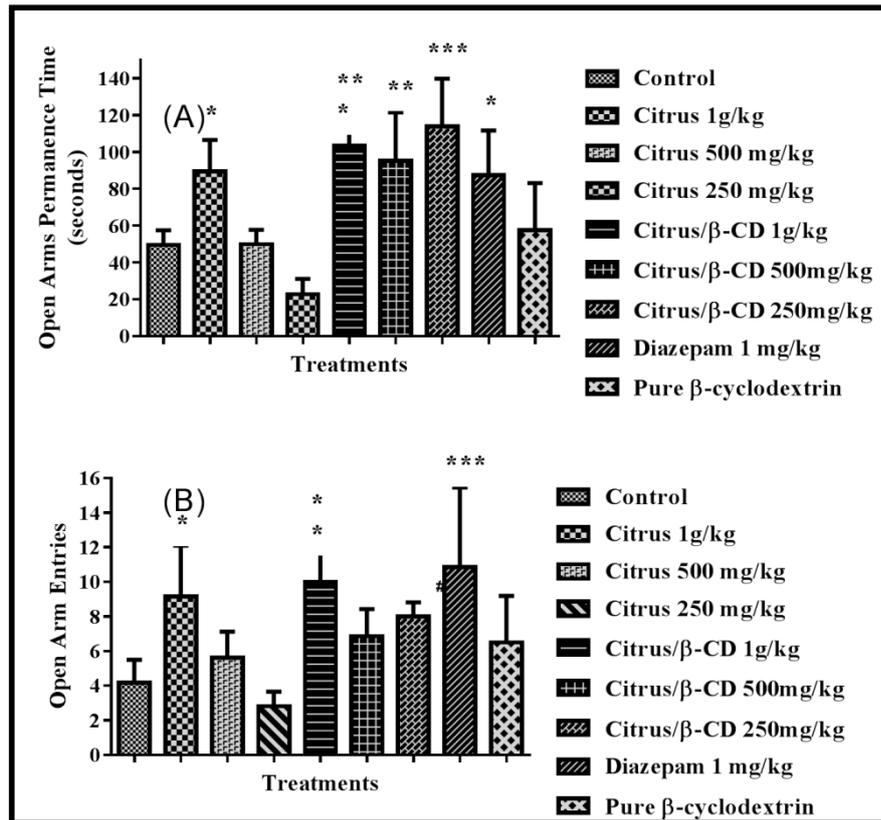
To avoid disability bias (unrelated to the drug treatments), the animals were evaluated in a routine test, and 24 hours before the start of the experimental procedure the animals performing satisfactorily in the initial evaluation were evaluated in the RRT (7).

### 2.4. Data analysis

For statistical analysis of the results, GraphPadPrism (version 6.00, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used. Quantitative data were subjected to the normality test. With a positive result, the data were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's exact test, and presented as averages with the standard error in parentheses. The results were considered significant at a level of 95% ( $p \leq 0.05$ ).

## 3. Results

After the treatments, the mice were evaluated for the Number of Entries (Figure 1A), and the Length of Stay in the open arms of the Elevated Plus Maze (EPM) (Figure 1B). After a single treatment, the *Citrus* 1.0 g/kg, *Citrus*/ $\beta$ -CD 1.0 g/kg, and diazepam 1.0 mg/kg groups presented a significantly increased ( $p < 0.0017$ ) number of entries in the open arms of the EPM compared to the Control and pure  $\beta$ -cyclodextrin groups. The mice in the Control group presented an average of 4 (0.54) entries in the open arms of the maze. Mice in the  $\beta$ -cyclodextrin group presented an average of 6 (1.02) entries. The group treated with *Citrus aurantium* L. essential oil 1.0 g/kg presented an average of 9 (1.19) entries. The group treated with *Citrus*/ $\beta$ -CD 1.0 g/kg presented an average of 10 (1.23) entries, as did the group treated with diazepam, with 11 (1.73) entries. There was a significant difference between the *Citrus* 250 mg/kg group and the *Citrus*/ $\beta$ -CD 250 mg/kg group; the latter presented a greater number of entries in the open arms.



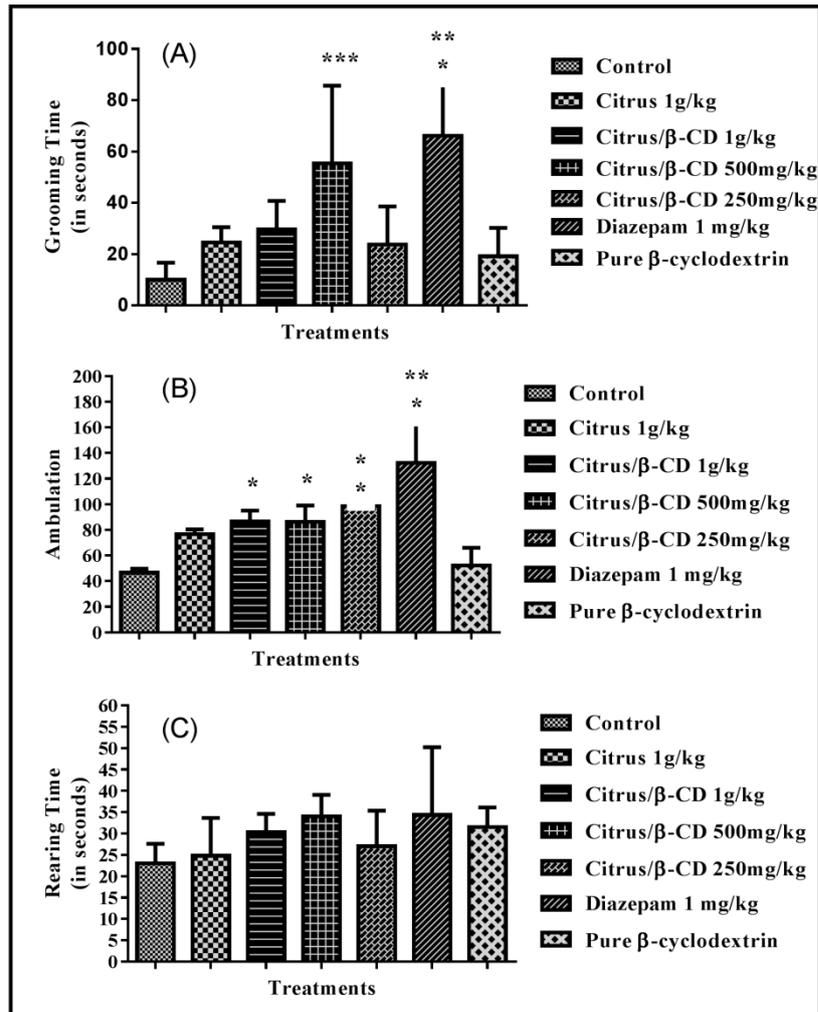
**Figure 1.** Effects measured in the Elevated Plus Maze test (EPM) after single treatment. Control group: Saline solution; *Citrus* 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil; *Citrus* 500 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil; *Citrus* 250 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; *Citrus*/β-CD 500 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; *Citrus*/β-CD 250 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; Diazepam 1.0 mg/kg; Pure β-cyclodextrin: 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. (A) Number of mouse entries into the open arms of the maze; (B) Time of permanence of the mouse in the open arms of the maze. The results are expressed as mean and standard error. \* Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) compared to the control group; # Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) compared to the *Citrus* 250 mg/kg group (ANOVA).

As for the permanence time in the EPM open arms (figure 1B), *Citrus* 1.0 g/kg, the three *Citrus*/β-CD (1.0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/kg) groups, and diazepam at 1.0 mg/kg presented significantly increased ( $p < 0.0001$ ) permanence times in the open arms of the EPM as compared to the Control group, *Citrus* 500 mg/kg, *Citrus* 250 mg/kg, and the pure β-cyclodextrin group. The mice in the Control group presented an average of 50 (2.96) seconds in the open arms of the maze, the *Citrus* group 500 mg/kg presented an average of 50 (2.81) seconds, the *Citrus* 250 mg/kg obtained an average of 23 (2.97) seconds. Mice from the pure β-cyclodextrin group remained on average 58 (9.04) seconds. The group that received diazepam as a treatment presented an average stay of 87 (9.14) seconds. The group treated with CEO 1.0 g/kg presented an average stay of 89 (6.48) seconds. The groups treated with *Citrus*/β-CD (1.0 g/kg; 500

mg/kg, 250 mg/k) presented average respective permanence times in seconds of 103 (6.96), 95 (9.35), and 114 (9.17).

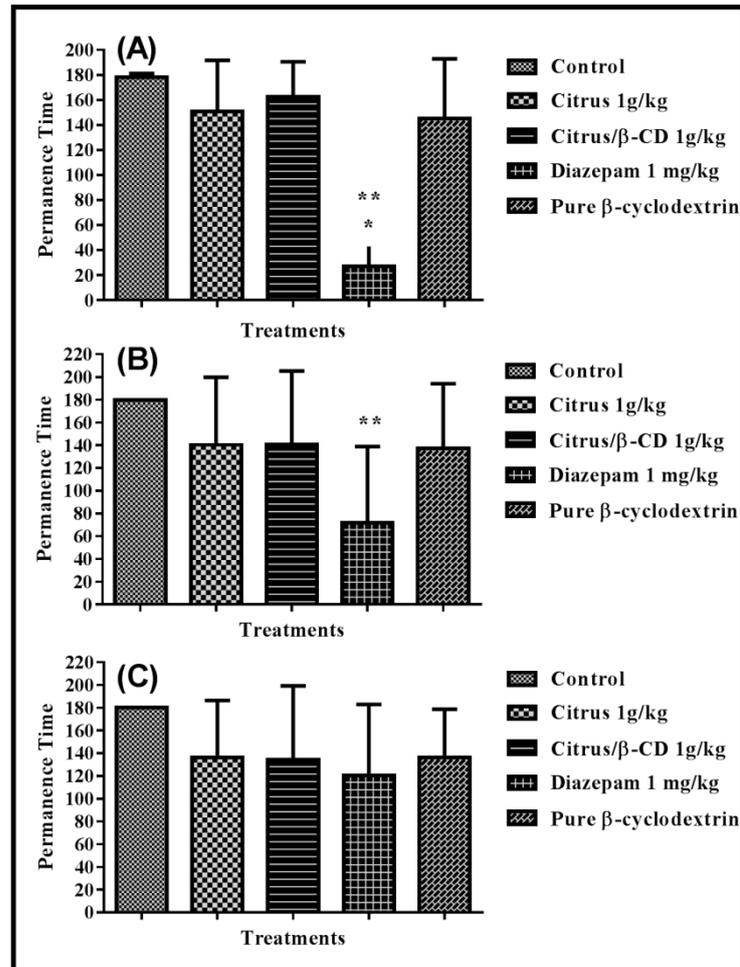
The results of the Open Field test are shown in Figure 2. After the treatments, the mice were evaluated for Grooming Time (A), Ambulation Time (B), and Rearing Time (C). After the single treatment, *Citrus*/β-CD 500 mg/kg and diazepam at 1.0 mg/kg significantly increased ( $p < 0.0001$ ) Grooming Time (A), with an average of 55 (11.44) seconds and 66 (10.68) seconds respectively, as compared to the Control group average of 10 (2.53) seconds, and the Pure β-cyclodextrin group average of 19 (4.21) seconds. As for Ambulatory Time (B) in the Open Field test, the three groups of *Citrus*/β-CD (1.0 g/kg; 500 mg/kg, and 250 mg/k) and diazepam at 1.0 mg/kg presented a difference ( $p < 0.0001$ ) from the Control group and the Pure β-cyclodextrin group. The first three presented respective average ambulation times of 86 (2.96), 86 (4.51), and 98 (5.59) in seconds, the diazepam group presented an average of 132 (18.41) seconds, the control group presented an average of 46 (1.32) seconds, the pure β-cyclodextrin group presented an average of 52 (4.85) seconds.

Evaluating Rearing time, although a slight increase was observed in the average time of the treated groups, no significant differences attributable to the effect of the studied substances, nor for diazepam, the positive control were observed.



**Figure 2-** Effects on Open Field test results after a single treatment. Control: Saline Solution; *Citrus* 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; *Citrus*/β-CD 500 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; *Citrus*/β-CD 250 mg/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; Diazepam 1.0 mg/kg; Pure β-cyclodextrin: 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. (A) Grooming time in the Open Field; (B) Ambulation time in the Open Field; (C) Rearing time in the Open Field. \*  $p \leq 0.05$  as compared to the control group (ANOVA).

Assessing motor impairment (due to the administered pharmacological agents), there was a longer permanence time recorded for the Control, *Citrus* 1 g/kg, *Citrus*/β-CD 1 g/kg, and Pure β-cyclodextrin groups as compared to diazepam, with a significant difference for the 60 minute (A) and 90 minute (B) time periods. diazepam presents an anxiolytic effect which also interferes with the animal locomotor activity. From measurements of permanence time at 120 minutes from administrations, it was considered that diazepam presented no further effect on the mice, since the statistical difference between the groups was gone, with the mice (in all groups studied) presenting similar permanence time. In the tests performed, no adverse effects were observed that could be attributed to the EO or its complexed form.



**Figure 3.** Effects on the Rota Rod test results after a single treatment. Control: Saline solution; *Citrus* 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil; *Citrus*/β-CD 1 g/kg: *Citrus aurantium* L. essential oil in an inclusion complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; Diazepam 1.0 mg/kg; Pure β-cyclodextrin: 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. (A) Length of stay on the Rota Rod after 60 minutes. (B) Length of stay on the Rota Rod after 90 minutes. (C) Length of stay on the Rota Rod after 120 minutes. \*  $p \leq 0.05$  compared to the control group (ANOVA).

#### 4. Discussion

For the objective of understanding etiological factors, mechanisms, and disease treatments, using animal species as models has been effective despite difficult extrapolation of such results to humans. The limitations for investigating a human disease may involve ethical or aspects inherent to the disease itself, as well as the mode of investigation (20). Animal models using mice to investigate drugs with an anxiolytic profile are considered a viable option, since such models are capable of reproducing behavioral and pathological characteristics interpreted using anxiety syndrome characteristics. The species was chosen based on its biological, behavioral, and genetic makeup (21,22).

According to the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic Purposes (DBCA) of the National Council for Animal Experimentation Control

(CONCEA), a reduction in the number of animals used should not be at the expense of loss of reliability in the results. According to the CONCEA definition, the present study is characterized as presenting a low Degree of Invasiveness (GI1); experiments that cause little or no discomfort or stress (23).

The literature presents a variety of essential oils with anxiolytic effects in different animal models. Research highlights *Citrus aurantium* L., which can be used in different administration routes, with significant effects in various animal models, and with results corroborated by different research groups (24).

The EPM findings corroborate previous research. Study (25) indicates anxiolytic effect for CEO (1 g/kg), as reflected in an increased time spent in the open arms of the EPM, and an increase in the number of and percentage of entries in the open arms. Due to the observed behavior, the authors suggest CEO as an anxiolytic.

The permanence time in the open arms of the EPM was longer in the groups treated with 1.0 g/kg *Citrus* essential oil, the three *Citrus*/ $\beta$ -CD groups (1.0 g/kg; 500 mg/kg, 250 mg/kg), and diazepam at 1.0 mg/kg, with significant differences from the control group. It is noteworthy that for the length of stay, the 500 mg/kg and 250 mg/kg *Citrus* groups presented no significant differences from the control group, differing from the 500 mg/kg and 250 mg/kg groups complexed with  $\beta$ -CD. This suggests CEO enhancement effects in these presentations.

The results observed, potentiated in groups treated with complexed EOC reiterate the effect of the studied substance and the safety of its complexation, since such effects are not observed with  $\beta$ -CD without EOC. Studies demonstrate that the proposed complexation method with  $\beta$ -CD is effective, economical and improves the physical-chemical character of limonene, a major component of the EOC (14,26,27). Monoterpenes, including limonene, when complexed with  $\beta$ -CD and its derivatives present better stability, thus improving efficiency compared to non-complexed monoterpenes, a result attributed to the stability and bioavailability provided by  $\beta$ -CB (28,29).

Study (30) attributes that the inclusion of substances in complexes has been able to improve the characteristics of the drug, such as bioavailability, solubility and stability; increasing activity and effectiveness, which corroborates the results presented. Experimental evidence is demonstrated that cyclodextrin improves the anxiolytic properties of OEC, an innovative finding.

In a study using Citral, a monoterpene, and the principal compound found in the essential oil of *Cymbopogon citratus*, known as "lemongrass", were observed (in animal

models) anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects for Citral/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. The samples demonstrated anti-hyperalgesic and anti-inflammatory activity, being due to reductions in total leukocyte levels. Of the samples evaluated, the Citral in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes presented the best pharmacological effects (15).

For the EPM tests, the 1.0 g/kg *Citrus* essential oil group, the 1.0 g/kg *Citrus*/ $\beta$ -CD group, and 1.0 mg/kg diazepam treated mice presented more entries in the open arms, with a significant difference from the control group. A study (10) that evaluated anxiolytic effects in rats exposed by inhalation to essential oil from the shells of *Citrus aurantium* L., observed safe reductions in anxiety and psychological stress. Corroborating our findings, the essential oil induced a significant increase in the time that the animals remained in the open arms of the maze, as well as a tendency to decrease the time spent in the closed arms, as compared to the control animals.

Research shows that in addition to finding significant anxiolytic activity in the EOC (7), in addition to finding significant anxiolytic activity in the EOC, present results that strongly suggest involvement of 5-HT<sub>1a</sub> receptors, a subtype of serotonin receptors. This presents a possible path for EOC activity. *Citrus aurantium* L. reinforces serotonergic pathways to increase the effect of serotonin in synaptic clefts, this leads to continued tranquility and reduced anxiety in the laboratory animals (31).

It is noteworthy when observing the multiple comparisons of the test, the 250 mg/kg *Citrus*/ $\beta$ -CD group presented a higher number of entries into the open arms of the EPM than the 250 mg/kg *Citrus* group, presenting a significant difference, and reiterating the potentiation effect of the complexed *Citrus* essential oil presentation. Researchers (32), evaluated the cardiovascular effects of Linalool, (a monoterpene alcohol present in certain aromatic medicinal plants with biological activity), when complexed in  $\beta$ -cyclodextrin. The Linalool in  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complex produced a higher antihypertensive profile than the non-complexed form, suggesting potent antihypertensive effects important to cardiovascular activity.

In the Open Field test, *Citrus*/ $\beta$ -CD (500 mg/kg) and diazepam at (1 g/kg) significantly increased the Grooming Time of the mice as compared to the Control group and the  $\beta$ -CD Pure group. In rodents, grooming involves thermoregulation, hair hygiene, and socialization. Grooming stands out most for its relationship to stress, when it occurs, and is potentially informative for studies in animal anxiety (33).

A study carried out with mice exposed to the open field test (34), observing mice in an open field test, observed a situation of declining averseness over time, (habituation might reduce averseness), the animals presented less grooming activity at the beginning of the test, with gradual increases of up to about half of the session's duration. Exposures at different levels are highlighted for appearing to produce different effects on grooming, increased anxiety, and/or fear, stimulation of the amygdala circuit, and administration of anxiogenic drugs, would likely prevent grooming.

As for Ambulation Time in the open field, the three groups: *Citrus*/ $\beta$ -CD (1.0 g/kg, 500 mg/kg, and 250 mg/kg), and diazepam at 1.0 mg/kg presented significant differences from the Control and the pure  $\beta$ -CD groups. There was no increase in ambulation for the 1.0 g/kg *Citrus* group; this implies possible potentiation of the effect of *Citrus aurantium* L. when in the HP- $\beta$ -CD complex. It also corroborates the findings (9), did not observed no changes in relation to the ambulation of a group treated with CEO and the control group; rearings and freezing times revealed no changes as well.

Research with CEO in humans is promising, in a study carried out with patients with chronic myeloid leukemia (in the moments preceding collection of spinal material), it was observed that patients inhaling CEO present a decrease in anxiety and remain relaxed during the procedure (8). Evaluating CEO inhaled by crack users (in abstinence), study (12), demonstrated the anxiolytic effect of the oil in a group living daily with anxiety in different levels. The problem of anxiety is faced during the period of abstinence, maintenance, and final abandonment of drugs. A clinical study presented the effectiveness of aromatherapy using CEO for premenstrual syndrome (PMS); it may well be effective as a new therapeutic method for the emotions and symptoms of PMS (35).

The rota rod test results in the present research demonstrate that CEO alone, and in the HP- $\beta$ -CD complex as well, presents anxiolytic effects without motor impairment in the mice. The literature (10) shows that mice treated with the same doses of CEO, presented no impairment in spontaneous ambulation. Another study (11) also concluded that CEO presents anxiolytic activity in rodents, yet without motor impairment, even after 15 consecutive days of treatment.

This is a non-clinical study, so all data are preliminary, needing more in-depth studies for greater solidity of the results presented. In the clinic, anxiety is diagnosed and evaluated mainly by patients' reports, indicating the subjective nature, which brings a limitation to animal models of anxiety. The use of fewer animals in the present study is also one of its limitations, for being a representative sample, for obtaining reliable results.

## 5. Conclusion

Satisfactory results for the anxiolytic effect of CEO complexed with HP- $\beta$ -CD were observed, an important finding for ensured dose administration without losses due to volatility. The study also indicates a potentiation effect for doses lower than 500 mg/kg and 250 mg/kg when complexed, suggesting lower losses of active ingredient during the pharmacokinetic process. It is also noteworthy that motor impairment was not affected; a desired finding for a substance with anxiolytic action. The development of a CEO/HP- $\beta$ -CD complex with positive anxiolytic results in animals is promising for future research and development of medicines for humans.

## Acknowledgments

This study was supported by funds from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## 6. References

1. Braga JEF. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica Pathological Anxiety: Neural Bases and Advances in Psychopharmacological Approach Liana Clébia Pordeus 2 Ana Tereza Medeiros Cavalcanti Da Silva 3 Flávia Cristina Fernandes Pime. Rev Bras Ciências da Saúde [Internet]. 2010 [cited 2020 Jun 2];14(2):93–100. Available from: <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs>
2. Freitas F da F. Avaliação dos efeitos psicofisiológicos da l-teanina em modelo de ansiedade em humanos [Internet]. [João Pessoa]: Universidade federal da Paraíba; 2013 [cited 2020 Jun 2]. Available from: <https://repositorio.ufpb.br/handle/tede/4291>
3. Karino CA, Laros JA. Ansiedade em situações de prova: evidências de validade de duas escalas [Internet]. redalyc.org. 2014 [cited 2020 Jun 2]. Available from: [www.scielo.br](http://www.scielo.br)
4. Sadock BJ. Inevitable Suicide. J Psychiatr Pract [Internet]. 2012 May [cited 2020 Jun 17];18(3):221–4. Available from: <http://journals.lww.com/00131746-201205000-00010>
5. Viana MDM, Vieira ACS, Neto GJ da S, Póvoas FTX, Campesatto EA. Potencial ansiolítico do gênero citrus : revisão integrativa. Rev Cient da Unipar. 2016;20:73–9.
6. Ernst E. Herbal remedies for anxiety - A systematic review of controlled clinical trials. Vol. 13, Phytomedicine. Urban & Fischer; 2006. p. 205–8.
7. Costa CARA, Cury TC, Cassettari BO, Takahira RK, Flório JC, Costa M. Citrus

- aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT<sub>1A</sub>-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Feb 23;13(1):1–10.
8. Pimenta FCF, Alves MF, Pimenta MBF, Melo SAL, Almeida AAF de, Leite JR, et al. Anxiolytic Effect of *Citrus aurantium* L. on Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Phyther Res* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Jun 2];30(4):613–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5566>
  9. Leite MP, Fassin J, Baziloni EMF, Almeida RN, Mattei R, Leite JR. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008 Dec;18(SUPPL.):661–6.
  10. Carvalho-Freitas MIR, Costa M. Anxiolytic and Sedative Effects of Extracts and Essential Oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2002 [cited 2020 Jun 2];25(12):1629–33. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/25.1629?from=CrossRef>
  11. De Moraes Pultrini A, Almeida Galindo L, Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci*. 2006 Mar 6;78(15):1720–5.
  12. Chaves Neto G, Braga JEF, Alves MF, De Moraes Pordeus LC, Santos SG Dos, Scotti MT, et al. Anxiolytic Effect of *Citrus aurantium* L. in Crack Users. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2017;2017:1–8.
  13. Junior JACN, Almeida LN de, Silva CML, Serafini MR. Analysis of recent patent applications involving cyclodextrins the pharmaceutical industry. *Rev Interdiscip Pesqui e Inovação*. 2015;1:1–11.
  14. Costa MDS, Rocha JE, Campina FF, Silva ARP, Da Cruz RP, Pereira RLS, et al. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of D-limonene alone and complexed with  $\beta$ -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2019;128:158–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.036>
  15. Campos CA, Lima BS, Trindade GGG, Souza EPBSS, Mota DSA, Heimfarth L, et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. *Life Sci* [Internet]. 2019;229(May):139–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.026>

16. Lima B dos S, Campos C de A, da Silva Santos ACR, Santos VCN, Trindade G das GG, Shanmugam S, et al. Development of morin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. *Food Chem Toxicol*. 2019 Apr 1;126:15–24.
17. McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2020 Nov 4];160(7):1573–6. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2010.00873.x%4010.1111/%28ISSN%291476-5381.AnimalModelsinPharmacologyResearchupdatedJanuary2015>
18. Baretta IP, Felizardo RA, Bimbato VF, Santos MGJ Dos, Kassuya CAL, Gasparotto Junior A, et al. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. *J Ethnopharmacol*. 2012 Mar 6;140(1):46–54.
19. Almeida R. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. 1st ed. João Pessoa - Brazil; 2006. 384 p.
20. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2004 Jan [cited 2020 Oct 14];19(1):59–65. Available from: <http://www.scielo.br/acb>.
21. Andreatini R, Boerngen-Lacerda R, Filho DZ. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: Future perspectives [Internet]. Vol. 23, *Revista Brasileira de Psiquiatria*. Associação Brasileira de Psiquiatria; 2001 [cited 2020 Oct 14]. p. 233–42. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462001000400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462001000400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
22. Nunes EA, Hallak JEC. Modelos animais em psiquiatria: Avanços e desafios. *Rev Latinoam Psicopatol Fundam* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2020 Oct 14];17(3):528–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1415-4714.2014v17n3p528-10>
23. CONCEA. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Brasília - DF. 2013. p. 1–50.
24. de Sousa D, Hocayen P, Andrade L, Andreatini R. A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. *Molecules* [Internet]. 2015 Oct 14 [cited 2017 May 19];20(10):18620–60. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473822>
25. Montoya C, Moreno E, Romero M, Actual JT-M, 2008 U. El uso del laberinto en cruz elevado para medir los efectos ansiolíticos producidos por el citrus aurantium L.(petit grain) en los ratones. *Med actual*. 2008;8–12.
  26. dos Passos Menezes P, dos Santos PBP, Dória GAA, de Sousa BMH, Serafini MR, Nunes PS, et al. Molecular Modeling and Physicochemical Properties of Supramolecular Complexes of Limonene with  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(1):49–57.
  27. Araújo-Filho HG, Pereira EWM, Rezende MM, Menezes PP, Araújo AAS, Barreto RSS, et al. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a  $\beta$ -cyclodextrin-complexed form in chronic musculoskeletal pain reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. *Neuroscience* [Internet]. 2017;358:158–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.037>
  28. Brito RG, Araújo AAS, Quintans JSS, Sluka KA, Quintans LJ. Enhanced analgesic activity by cyclodextrins - A systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 12, *Expert Opinion on Drug Delivery*. Taylor and Francis Ltd; 2015 [cited 2020 Oct 21]. p. 1677–88. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.2015.1046835>
  29. De Oliveira MG, Guimarães AG, Araújo AA, Quintans JS, Santos MR, Quintans-Júnior LJ. Cyclodextrins: Improving the therapeutic response of analgesic drugs: A patent review [Internet]. Vol. 25, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Taylor and Francis Ltd; 2015 [cited 2020 Oct 21]. p. 897–907. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/13543776.2015.1045412>
  30. Lima PSS, Lucchese AM, Araújo-Filho HG, Menezes PP, Araújo AAS, Quintans-Júnior LJ, et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2016;151:965–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>
  31. Saketi S, Bananej M, Jahromy MH. Effect of *Citrus aurantium* L. Essential Oil and Its Interaction with Fluoxetine on Anxiety in Male Mice. *J Behav Brain Sci*. 2014 Jul 8;4(7):285–90.
  32. Camargo SB, Simões LO, Medeiros CF de A, de Melo Jesus A, Fregoneze JB, Evangelista A, et al. Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with

- $\beta$ -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018;151:38–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.014>
33. Kalueff A V., Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Vol. 17, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2016. p. 45–59.
  34. Estanislau C, Díaz-Morán S, Cañete T, Blázquez G, Tobeña A, Fernández-Teruel A. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neurosci Res*. 2013;77(4):187–201.
  35. Heydari N, Abootalebi M, Jamalimoghadam N, Kasraeian M, Emamghoreishi M, Akbarzadeh M. Investigation of the effect of aromatherapy with *Citrus aurantium* blossom essential oil on premenstrual syndrome in university students: A clinical trial study. *Complement Ther Clin Pract* [Internet]. 2018;32:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2018.04.006>

