



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

KÍMBERLY STEFANNY DA SILVA

**Composição química, avaliação antidepressiva e
antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis*
(laranja doce)**

JOÃO PESSOA – PB

2021

KÍMBERLY STEFANNY DA SILVA

**Composição química, avaliação antidepressiva e
antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis*
(laranja doce)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO

COORIENTADOR: PROF. DR. SÓCRATES GOLZIO DOS SANTOS

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586c Silva, Kimberly Stefanny da.

Composição química, avaliação antidepressiva e antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce) / Kimberly Stefanny da Silva. - João Pessoa, 2021.

59 f. : il.

Orientação: José Maria Barbosa Filho.

Coorientação: Sócrates Golzio dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Laranja (*Citrus sinensis*). 2. Óleo essencial. 3. Plantas medicinais. 4. Antidepressivo. 5. Antioxidante. 6. CG-EM. I. Barbosa Filho, José Maria. II. Santos, Sócrates Golzio dos. III. Título.

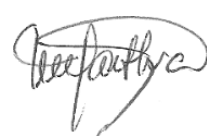
UFPB/BC

CDU 634.31(043)

ATA DE DEFESA

Ata da 447^a (quadringentésima quadragésima sétima) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Kimberly Stefanny da Silva**, candidata ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia trinta de agosto do ano de dois mil e vinte e um (30/08/2021), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/ygm-rhbe-kgf>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Kimberly Stefanny da Silva**, candidata ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Yuri Mangueira do Nascimento, Ph.D em Farmacoquímica, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Ph.D em Farmacologia, Sócrates Golzio dos Santos, Ph.D em Farmacoquímica e Marcelo Sobral da Silva, Ph.D em Química Orgânica. Sendo todos integrantes do corpo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Comissão, professor Marcelo Sobral da Silva, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Kimberly Stefanny da Silva**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Composição química, avaliação antidepressiva e antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce)”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Kimberly Stefanny da Silva** legalmente habilitada a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva (Presidente)	
--	---

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos (Coorientador)	Documento assinado digitalmente  Socrates Golzio dos Santos Data: 31/08/2021 22:57:20-0300 Verifique em https://verificador.itl.br
Dr. Yuri Manguera do Nascimento (Examinador)	
Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (Examinador)	

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho marca o fim de uma importante etapa em minha vida. É com enorme prazer e carinho que agradeço a todos que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, por tudo que tem proporcionado em minha vida.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Rosália Pereira, meus avós Maria das Dores e Severino Pedro (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, palavras de estímulos para estudar e seguir em frente com os meus sonhos.

Ao meu **orientador, Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho** e **coorientador Sócrates Golzio dos Santos**, pela oportunidade, apoio, aprendizado e confiança depositada, na condução de todo o trabalho.

À **Professora Dra. Adriana Fernandes Golzio**, pela ajuda diária no laboratório, pela amizade, pelos conselhos, enfim, por contribuir no processo de elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos, por todo carinho, confiança, e sempre dizendo que eu seria capaz e a **minha turma de mestrado**, em especial a Bárbara Cavalcanti e Jociano Lins, por todo companheirismo, contribuição, conversas, desabafos e auxílio durante as atividades realizadas.

Aos amigos do laboratório, Cleyton Oliveira, Ryta de Kassia, Poliane, Thamires, Humberto e Álef pela realização e imensa ajuda nos experimentos.

À **todos colaboradores da farmácia** em que trabalho, que sempre me ajudaram e torceram por mim, principalmente nas etapas do mestrado. Em especial aos meus gerentes Márcia Kelly e Jackson Eliziel.

À **todos os funcionários** da Universidade Federal da Paraíba, pelos diversos serviços prestados, atenção e por proporcionar o bom andamento dos nossos trabalhos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos bioativos pelos conhecimentos transmitidos.

Muito Obrigada!

SILVA, K. S. **Composição química, avaliação antidepressiva e antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce)**. 59f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS / UFPB, João Pessoa – PB, 2021.

RESUMO

As plantas medicinais são uma grande fonte de medicamentos, sendo utilizada pela população, e suas atividades biológicas são atribuídas a grande diversidade de metabólitos secundários. A espécie *Citrus sinensis* (Rutaceae) é conhecida como “laranja doce”, tem sido usado tradicionalmente para tratar diversos distúrbios, dentre eles distúrbios mentais. A depressão é um transtorno psiquiátrico crônico, multifatorial, caracterizada por sintomas como baixo humor e/ou anedonia, que podem ser acompanhados por déficits cognitivos, neurovegetativos. Aproximadamente 85% dos pacientes com depressão também apresentam sintomas significativos de ansiedade. O óleo essencial de *C. sinensis* apresentam atividades biológicas, tais como antimicrobianas, antioxidantes, e é amplamente estudado por possuir atividade ansiolítica. Com base nisso, o trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química dos constituintes presentes no óleo essencial de *C. sinensis*, obtidos de três (3) diferentes fornecedores, e avaliar o efeito antidepressivo e antioxidante do óleo essencial. A caracterização química foi realizada através de CG-EM, onde foram identificados cinco componentes na amostra do óleo essencial, sendo o limoneno o composto majoritário. Para os testes farmacológicos, foi utilizado um protocolo de indução do comportamento do tipo depressivo por dexametasona. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/UFPB) da Universidade Federal da Paraíba, com a certidão de aprovação nº 8690120320. Os camundongos Swiss foram divididos em seis grupos de 6 a 8 animais e submetidos à testes comportamentais como nado forçado, suspensão da cauda e campo aberto e após isso, foram realizados os testes antioxidantes *in vivo*. No teste de nado forçado não houve diferença entre os grupos tratados com o óleo essencial nas doses 25, 50 e 100 mg/kg e o grupo controle. No teste de suspensão da cauda, foi observado que CS 75 e CS 100 aumentaram o tempo de imobilidade, quando comparado com o grupo tratado com imipramina e não houve diferença significativa do tempo de imobilidade entre as concentrações do OE e o controle. No teste de campo aberto os grupos tratados com as doses CS 75 e CS 100 do óleo essencial, também reduziram o número de cruzamentos quando comparados com o grupo de controle. Os grupos dexametasona, CS 50, CS 75 E CS 100, aumentaram o número de *rearing* quando comparados com o grupo imipramina. No parâmetro de *grooming* houve uma redução na frequência de autolimpeza significativa entre o grupo dexametasona, imipramina, CS 75 e CS 100 em relação ao grupo controle. Os resultados encontrados sugerem que os grupos tratados com o OE de *C. sinensis* não apresentaram efeito antidepressivo quando submetido aos testes comportamentais. No teste antioxidante *in vivo*, o óleo essencial apresentou efeito antioxidante no teste de glutathione redutase (GSH), pois aumentou significativamente a concentração de GSH no grupo tratado CS 75 quando comparado ao grupo controle e imipramina. Já na concentração de nitrito foi observado um aumento significativo na concentração de nitrito no grupo tratado com imipramina e CS 50, em comparação com o grupo controle, sugerindo que esse aumento leva a oxidação de lipídios celulares, formação de radicais livres e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Palavras-chave: Depressão; Modelos animais de depressão; Óleo essencial; *Citrus sinensis*; CG-EM.

SILVA, K. S. **Chemical composition, antidepressive and antioxidant evaluation of the essential oil of *Citrus sinensis* (sweet orange)**. 59f. **Dissertation** ((Post-graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactives) – CCS / UFPB, João Pessoa – PB, 2021.

ABSTRACT

Medicinal plants are a great source of medicines, being used by the population, and their biological activities are attributed to a great diversity of secondary metabolites. The species *Citrus sinensis* (Rutaceae) is known as “sweet orange”, it has been traditionally used to treat various disorders, including mental disorders. Depression is a chronic, multifactorial psychiatric disorder characterized by symptoms such as low mood and/or anhedonia, which may be accompanied by cognitive, neurovegetative deficits. Approximately 85% of patients with depression also have significant anxiety symptoms. The essential oil of *C. sinensis* has biological activities, such as antimicrobials, antioxidants, and is widely studied for having anxiolytic activity. Based on this, the work aimed to carry out the chemical characterization of the constituents present in the essential oil of *C. sinensis*, obtained from three (3) different suppliers, and to evaluate the antidepressant and antioxidant effect of the essential oil. Chemical characterization was performed using GC-MS, where five components were identified in the essential oil sample, with limonene being the major compound. For pharmacological tests, a dexamethasone-type behavior induction protocol was used. The project was approved by the Ethics Committee on the use of animals (CEUA/UFPB) of the Federal University of Paraíba, with approval certificate nº 8690120320. The Swiss mice were divided into six groups of 6 to 8 animals and submitted to behavioral tests as forced swimming, tail suspension and open field and after that, in vivo antioxidant tests were performed. In the forced swim test there was no difference between the groups treated with essential oil at doses 25, 50 and 100 mg/kg and the control group. In the tail suspension test, it was observed that CS 75 and CS 100 increased the immobility time when compared to the group treated with imipramine and there was no significant difference in the immobility time between the EO concentrations and the control. In the open field test the groups treated with CS 75 and CS 100 doses of essential oil also reduced the number of crossings when compared to the control group. The dexamethasone groups, CS 50, CS 75 and CS 100, increased the number of rearing when compared to the imipramine group. In the grooming parameter, there was a significant reduction in the frequency of self-cleaning between the dexamethasone, imipramine, CS 75 and CS 100 groups compared to the control group. The results found suggest that the groups treated with the EO of *C. sinensis* did not show an antidepressant effect when submitted to behavioral tests. In the in vivo antioxidant test, the essential oil showed an antioxidant effect in the glutathione reductase (GSH) test, as it significantly increased the GSH concentration in the CS 75 treated group when compared to the control and imipramine group. In the nitrite concentration, a significant increase was observed in the concentration of nitrite in the group treated with imipramine and CS 50, compared to the control group, suggesting that this increase leads to oxidation of cellular lipids, formation of free radicals and generation of reactive species of oxygen (ROS).

Keywords: Depression; Animal models of depression; Essential oil; *Citrus sinensis*; CG-EM.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5 - HT	5- hidroxitriptamina (serotonina)
ADT	Antidepressivo tricíclico
ANOVA	Análise de variância
β-CD	Beta ciclodextrina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CUMS	Estresse crônico moderado e imprevisível
GABA	Ácido γ – aminobutírico
GCs	Glicocorticoides
GSH	Glutathione Reduzida
HPA	Hipotalâmico-pituitário-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
IMAO	Inibidores da Monoamina Oxidase
IPeFarm	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
ISRSN	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina
KI	Índice de Kovats
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização a Análise
NA	Noradrenalina
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos constituintes mais encontrados no óleo essencial da espécie <i>C. sinensis</i>	18
Figura 2: Delineamento dos grupos experimentais	27
Figura 3: Cronograma experimental para aplicação das substâncias	27
Figura 4: Aparelho utilizado para o teste do nado forçado.....	28
Figura 5: Teste de Suspensão da Cauda.	29
Figura 6: Aparelho utilizado no Teste do Campo Aberto.	29
Figura 7: Cromatograma de íons totais (TIC) das amostras do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> (PYT, NAT, BIO) em equipamento CG-EM.	32
Figura 8: Cromatograma do índice de retenção de alcanos.	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, via i.p., no tempo de imobilidade dos camundongos, submetidos ao teste de nado forçado. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$ 36

Gráfico 2: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, via i.p. no tempo de imobilidade dos camundongos, submetidos ao teste de suspensão da cauda. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle. ## $p < 0,005$ vs imipramina..... 37

Gráfico 3: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no número de cruzamentos dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ em relação ao grupo controle..... 38

Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no tempo de rearing dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, **** $p < 0,0005$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina, ## $p < 0,005$ vs imipramina, ### $p < 0,0005$ vs imipramina. 38

Gráfico 5: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no número de grooming, dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle; **** $p < 0,0005$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina..... 39

Gráfico 6: Avaliação do efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) em relação aos níveis de glutathione em camundongos. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina. 40

Gráfico 7: Avaliação do efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) em relação a concentração de nitrito em camundongos. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, ** $p < 0,005$ vs controle..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.	26
Tabela 2: Cálculo de Kovats para a amostra PYT.	33
Tabela 3: Cálculo de Kovats para a amostra NAT.	33
Tabela 4: Cálculo de Kovats para a amostra BIO.	34
Tabela 5: Dados cromatográficos da amostra PYT.	35
Tabela 6: Dados cromatográficos da amostra NAT.	35
Tabela 7: Dados cromatográficos da amostra BIO.	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	15
2.2 A FAMÍLIA RUTACEAE	16
2.2.1 CITRUS SINENSIS (LARANJA DOCE)	16
2.2.1.1 Composição química do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	17
2.2.1.2 <i>Citrus sinensis</i> e sua atividade sobre o sistema nervoso	19
2.3 DEPRESSÃO	20
2.3.1. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DEPRESSÃO	21
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.1 LOCAL DE PESQUISA	24
4.2 POSICIONAMENTO ÉTICO	24
4.3 MATERIAL	24
4.3.1 PADRÕES E REAGENTES	24
4.3.2 ANIMAIS	24
4.4 MÉTODOS	25
4.4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	25
4.4.2 ESTUDO COMPORTAMENTAL	26
4.4.2.1 Grupos experimentais	26
4.4.3 ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	27
4.4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	28
4.4.4.1 Teste do nado forçado	28
4.4.4.2 Teste de suspensão da cauda	28
4.4.4.3 Teste do campo aberto	29
4.4.5 TESTES ANTIOXIDANTES <i>IN VIVO</i>	30
4.4.5.1 Determinação de Glutathione Reduzida (GSH)	30
4.4.5.2 Determinação de nitrito	30
4.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5. RESULTADOS	32
5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	32
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA PYT	34
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA NAT	35
5.1.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA AMOSTRA BIO	35
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS SINENSIS</i> (CS) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A DEPRESSÃO INDUZIDA POR DEXAMETASONA	36
5.2.1 TESTE DO NADO FORÇADO	36
5.2.2 TESTE DA SUSPENSÃO DA CAUDA	36
5.2.3 TESTE DE CAMPO ABERTO	37
5.3 ESTUDO ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i>	39
5.3.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATHIONE REDUZIDA (GSH)	39
5.3.2 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO	40
6. DISCUSSÃO	41

7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I	56

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com fins de prevenção, tratamento e cura de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade e essa cultura se propaga até os dias atuais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), define-se como planta medicinal, “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O uso de plantas medicinais aromáticas, tem sido utilizado na medicina popular, pois apresenta uma diversidade de efeitos farmacológicos como: ansiolítico, anticonvulsivante, analgésico, antidepressivo, anti-inflamatório, antioxidante, cicatrizante, entre outros (ROSA, 2011), essas atividades em geral tem sido atribuída aos óleos essenciais (BARBOSA-FILHO; MEDEIROS; DINIZ; BATISTA et al. 2006).

A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros e 1.800 espécies, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais (KAHER; REX; SANTOS; SEBEM, 2016). Dentre as espécies, a *Citrus sinensis* é uma planta conhecida popularmente como “laranja doce”, é muito utilizada devido conter diversos metabólitos secundários, responsáveis por sua proteção contra fatores bióticos e abióticos, dentre eles, terpenoides, carotenoides, cumarinas, furanocumarinas e flavonoides, principalmente flavononas e flavonas polimetoxiladas, raras em outras plantas, e uma grande fonte de óleo essencial (OE) (AHMAD; SALIM-UR-REHMAN; IQBAL; ANJUM et al., 2006; EZEJIOFOR; EKE; OKECHUKWU; NWOGUIKPE et al., 2011).

A composição do OE é específica para cada espécie, com compostos específicos ou proporções de compostos em comuns. Alguns fatores são responsáveis pelas variações da composição e rendimento dos OEs, além da atividade biológica como variabilidade genética, órgão da planta, estágio de maturação do fruto, umidade, altitude, luminosidade, temperatura, condições do solo e nutrientes, pluviometria, radiação ultravioleta, sazonalidade, método de coleta, secagem e parte da planta utilizada (GOMES; ALMEIDA; LEITE; SCHWAIGER et al., 2019; LURO; GARCIA NEVES; COSTANTINO; DA SILVA GESTEIRA et al., 2020).

O óleo essencial da laranja doce apresenta baixa solubilidade em água e alta tendência à auto-oxidação, e se caracteriza por ser límpido, de cor amarelo-escura, com um aroma forte característico (BIZZO, 2009). Além disso, o óleo essencial de *C.*

sinensis apresentam algumas atividades biológicas, tais como antimicrobianas, antioxidantes (RASPO; VIGNOLA; ANDREATTA; JULIANI, 2020), e é amplamente estudado por possuir atividade ansiolítica (MANNUCCI; CALAPAI; CARDIA; INFERRERA et al., 2018). Ansiedade e depressão são dois dos transtornos mentais mais prevalentes no mundo, sendo apontado por diversos estudiosos uma possível etiologia em comum (CUMMINGS; CAPORINO; KENDALL, 2014; KESSLER; NELSON; MCGONAGLE; LIU et al., 1996; WITTENBORN; NATAMBA; RAINEY; ZLOTNICK et al., 2020).

A depressão, é um dos transtornos psiquiátricos mais predominante, em que muitos fatores estão envolvidos na sua origem, incluindo sexo, genética, química do cérebro e eventos estressantes incontrolláveis. Dentre as principais teorias sobre a etiologia da depressão, destaca-se a dos eventos estressores que podem contribuir para o aparecimento da doença, através da resposta adaptativa que acabam por gerar o hipercortisolismo, decorrente da hiperativação do eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e aumento da secreção dos glicocorticoides, que pode se originar da geração de radicais livres, envolvendo o estresse oxidativo (DEAN; KESHAVAN, 2017). Inúmeros medicamentos eficazes encontram-se disponíveis para o tratamento dos transtornos da depressão, tais como inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da monoamina oxidase (IMAO) (YUAN; CHEN; XUE; ZHANG et al. 2020) e antidepressivos tricíclicos (ADT), dentre outros. Entretanto, alguns demoram a reduzir os sintomas depressivos, outros apresentam muitos efeitos colaterais ou causam dependência (ROSA, 2011).

Portanto, justifica-se que em virtude das limitações acerca do tratamento farmacológico atual da depressão, visando à descoberta de novas fontes terapêuticas, é necessário despertar novos estudos para a descoberta de substâncias que sejam capazes de corroborar com a formulação de medicamentos que tenham eficácia, efetividade e eficiência, trazendo maior adesão do paciente ao tratamento, em virtude do aparecimento de menos efeitos adversos e, assim, melhor qualidade de vida.

Dessa forma, o presente estudo vem caracterizar os principais constituintes químicos presente no óleo essencial da espécie *C. sinensis*, e avaliar o efeito antidepressivo e antioxidante em modelo animal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são uma grande fonte de medicamentos, sendo utilizada pela população, como terapia alternativa para o tratamento de muitas doenças devido ao seu valor terapêutico, é uma prática comum desde milhares de anos antes de Cristo, quer como compostos puros ou como extratos de plantas padronizados, isso tem proporcionado oportunidades ilimitadas para novas drogas (BUSATO DE FEIRIA; SANTANA; BONI; ANIBAL et al., 2016; SALAKO; SILVA; AZUBUIKE; SALAKO, 2018). O conhecimento sobre as propriedades medicinais das plantas, foi adquirido de forma totalmente empírica, esse era a única forma de conhecimento disponível, sendo transmitido através do tempo. O Brasil possui a maior biodiversidade total do mundo, em vista disso e devido à grande influência ética da colonização precoce, os brasileiros têm um grande interesse no uso de fitoterápicos no tratamento de diferentes doenças (ORLANDA, 2011).

As atividades biológicas das plantas medicinais são atribuídas a grande diversidade de metabólitos secundários, estes podem apresentar estrutura química complexa com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de compostos bioativos com ação farmacológica e são potencialmente utilizados para tratamento e prevenção de distúrbios, devido esses compostos fitoquímicos terem papéis farmacológicos no tratamento de várias doenças; além de ser amplamente disponível na natureza e comercialmente benéfico (MARTINS; S, 2018).

Sendo uma fonte rica em moléculas bioativas, as plantas medicinais oferecem esperança de desenvolvimento de novos medicamentos, apresentando como abordagem alternativa as plantas aromáticas, que produzem os óleos essenciais (SOUSA; HOCAYEN; ANDRADE; ANDREATINI, 2015). Algumas plantas apresentam atividade no sistema nervoso, dentre elas, *Passiflora incarnata* L. (ansiolítico), *Valeriana officinalis* L. (ansiolítico/sedativo), *Lavandula angustifolia* (ansiolítico), *Lippia alba* (sedativo, anticonvulsivante, anti-espasmódica), *Citrus aurantium* L. (ansiolítico), *Citrus sinensis* (ansiolítico) (CARLINI, 2003; DE SOUSA; SILVA; SILVA; GAVIOLI, 2017; SOUSA; HOCAYEN; ANDRADE; ANDREATINI, 2015), *Hypericum perforatum* L. (antidepressivo) (ALVES et al., 2014).

2.2 A família Rutaceae

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas pertencentes à família Rutaceae, que apresentam espécies de importância econômica e terapêutica (ORLANDA, 2011). A família Rutaceae possui cerca de 150 gêneros e 1.800 espécies, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Caracterizada por ser uma família de árvores e arbustos aromáticos, possui folhas simples ou compostas, alternas e raramente opostas (KAFFER; REX; SANTOS; SEBEM, 2016).

Dentre os diversos gêneros dessa família, encontra-se o gênero *Citrus*, pertencente à ordem Sapindales, oriundas do sudeste tropical e subtropical da Ásia e apresenta árvores frutíferas de origem oriental. No Brasil, foram encontrados 32 gêneros nativos de Rutaceae e 154 espécies. O grupo é conhecido por conter três espécies e numerosos híbridos naturais e cultivados, incluindo as frutas conhecidas por cítricas, como a laranja, o limão, lima, bergamota, tangerina e a cidra. Como exemplo de espécies do gênero *Citrus* podem-se citar: *Citrus bergamia*, *Citrus limonum*, *Citrus deliciosa*, *Citrus reticulada*, *Citrus aurantium* L. e *Citrus sinensis* (COSTA; JUIZ; PEDRO; DAVID et al., 2010; OLIVEIRA; SILVA; ROSSI, 2014).

A composição química das frutas cítricas é caracterizada por conter uma variedade de nutrientes essenciais para saúde como vitamina C, vitamina A, folato, potássio, selênio e fibra alimentar, além da presença de constituintes bioativos (metabólitos secundários), como flavonoides (hesperidina, naringina, narirutina, nobiletina, tangeretina), óleo essencial (limoneno, linalol), limonoides (limonina, nomilina), alcaloides (sinefrina), carotenóides, cumarinas, glucaratos, antocianinas e ácidos fenólicos (VIANA; VIEIRA; SILVA-NETO; PÓVOAS et al., 2016).

Devido à presença desses fitoquímicos no gênero *Citrus*, têm sido atribuídos a uma ampla gama de atividades biológicas, como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatório, hipolipidêmico, anti-hipertensivo, antiaterosclerótico, antitrombótico, atividades antiulcera, antialérgica e antimicrobiana. Além disso, espécies de *Citrus* têm sido exploradas por atividades relacionadas ao SNC (SOHI; SHRI, 2018).

2.2.1 *Citrus sinensis* (laranja doce)

A espécie *Citrus sinensis* (Rutaceae) é conhecida como “laranja doce”. O seu fruto popularmente denominado de laranja, é um fruto híbrido, resultante do cruzamento entre pomelo (*Citrus maxima*) e tangerina (*Citrus reticulata*). Seu sabor varia do doce ao levemente ácido. São caracterizadas por serem frutas cítricas esféricas, possuem uma casca áspera, com pigmentação entre laranja escura ou avermelhada, a laranja clara, amarela ou verde (FAVELA-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-SANTIAGO; RAMÍREZ-CABRERA; ESQUIVEL-FERRIÑO et al., 2016).

É uma espécie muito utilizada devido conter na casca dos frutos cítricos diversos metabólitos secundários, responsáveis por sua proteção contra fatores bióticos e abióticos, incluindo uma rica fonte de flavanonas que são muito raras em outras plantas, flavonas, flavanos e flavonóis, hidroxiamidas, esteróides, terpenoides, carotenoides, alcanos e ácidos graxos, cumarinas, carboidratos, peptídeos, carbamatos e alquilaminas, carotenóides, compostos voláteis e minerais como potássio, magnésio, cálcio e sódio (MANNUCCI; CALAPAI; CARDIA; INFERRERA et al., 2018; VERMA; PATHAK, 2015) além disso, comprovaram que a casca do fruto possui grande fonte de óleo essencial (AHMAD; SALIM-UR-REHMAN; IQBAL; ANJUM et al., 2006; EZEJIOFOR; EKE; OKECHUKWU; NWOGUIKPE et al., 2011).

Estudos clínicos e pré-clínicos recentes de óleos essenciais e/ou de seus constituintes químicos isolados, mostram que após a administrados por via oral ou absorção por inalação, estes exercem efeitos psicológicos, devido ao seu caráter hidrofóbico, os terpenóides podem atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e atuar no SNC (GUTIÉRREZ; CHILPA; JAIME, 2014; OLIVEIRA JÚNIOR; FERRAZ; SILVA; DE ANDRADE TELES et al., 2018).

O estudo clínico de Goes et al. (2012), mostrou propriedades ansiolíticas em voluntários, com o uso do óleo essencial de laranja doce, demonstrando, assim, que o óleo essencial de *Citrus sinensis* poderia apresentar uma alternativa para o tratamento da ansiedade. No entanto, não foram identificados estudos que correlacionassem o óleo essencial de *Citrus sinensis* para o tratamento da depressão.

2.2.1.1 Composição química do óleo essencial de *Citrus sinensis*

Quimicamente, os óleos essenciais são uma mistura orgânica complexa de substâncias voláteis, pertencentes, na sua maioria, à classe dos terpenos, que são derivados da via do ácido mevalônico ou da rota da xilulose 5-P, e à classe dos

fenilpropanóides, produto adquirido pela via chiquimato (SIMÕES; SCHENKEL; MELLO; PETROVICK, 2017).

Os óleos essenciais podem ser constituídos por hidrocarbonetos, álcoois, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e vários compostos orgânicos nitrogenados e sulfurados. A composição química exata dos óleos é característica de cada espécie, é particularmente propenso a alterações qualitativas e quantitativas devido ao genótipo, origem, variação sazonal, estação, etc (MEDEIROS, 2014).

Dentre os componentes mais abundantes encontrados no óleo essencial de *C. sinensis*, o limoneno é o componente majoritário, com sua composição variando de 32 a 98% (MEDEIROS, 2014). Outros compostos de menor teor, consiste principalmente em alfa-pineno, Sabineno, beta-pineno, óxido de linalol, limoneno, óxido de limoneno, beta-terpineol, carveol (Figura 1) (VERMA; PATHAK, 2015).

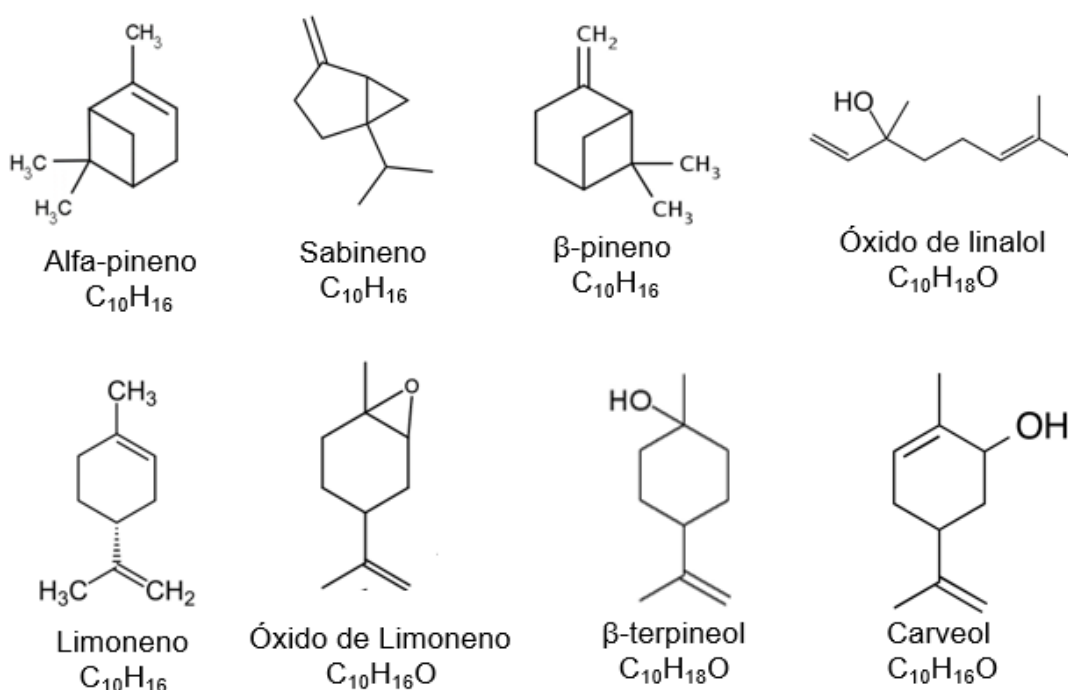


Figura 1: Estruturas químicas dos constituintes mais encontrados no óleo essencial da espécie *C. sinensis*

Há diversas técnicas cromatográficas utilizadas para determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas. Para separação e identificação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis como os óleos essenciais, uma das técnicas mais importantes, disponível e muito utilizada é a cromatografia gasosa

acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), pois apresenta grande sensibilidade e elevada detectabilidade (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Apresenta algumas limitações. Para serem analisadas as substâncias devem ser voláteis e termicamente estáveis, caso contrário, é necessário formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável (BEREZKIN, 2019; PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

2.2.1.2 *Citrus sinensis* e sua atividade sobre o sistema nervoso

A espécie *Citrus sinensis* tem sido usado tradicionalmente para tratar diversos distúrbios, dentre eles distúrbios mentais (ansiedade, depressão e estresse), (FAVELA-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-SANTIAGO; RAMÍREZ-CABRERA; ESQUIVEL-FERRIÑO et al., 2016; MANNUCCI; CALAPAI; CARDIA; INFERRERA et al., 2018). A espécie de *Citrus sinensis* é rica em flavonoides que são moléculas químicas complexas e possuem afinidade com os receptores benzodiazepínicos (CITRARO; NAVARRA; LEO; DONATO DI PAOLA et al., 2016; HANRAHAN; CHEBIB M FAU - JOHNSTON; JOHNSTON, 2011), além de outros compostos polifenólicos com inúmeras propriedades farmacológicas. Com base nisso, há a sugestão de que a redução da ansiedade seja causada devido a essa interação com o receptor de benzodiazepínicos (AKHLAGHI; SHABANIAN; RAFIEIAN-KOPAEI; PARVIN et al., 2011).

A inalação de componentes voláteis do *Citrus* é capaz de influenciar a atividade de áreas cerebrais como o hipotálamo, o hipocampo e o piriforme; pesquisas pré-clínicas e clínicas mostraram que a fragrância cítrica pode restaurar o córtex induzido pelo estresse e a imunossupressão e pode ter potenciais efeitos antidepressivos em ratos (COSTA; CURY; CASSETTARI; TAKAHIRA et al., 2013) (ZHANG; YANG; FAN; REN et al., 2019).

Estima-se que a ansiedade seja a segunda causa de incapacitação mundial entre os transtornos psiquiátricos (SOUZA, 2017). A depressão junto à ansiedade está associada ao prejuízo das relações sociais e a redução da qualidade de vida, sendo esse diagnóstico mais frequente do que a ocorrência dos transtornos isoladamente,

Aproximadamente 85% dos pacientes com depressão também apresentam sintomas significativos de ansiedade (PATRIQUIN, 2018).

2.3 Depressão

A depressão é um transtorno psiquiátrico crônico, multifatorial (ABBASI-MALEKI; KADKHODA; TAGHIZAD-FARID, 2020), que envolve diversos mecanismos biológicos em sua etiologia. Clinicamente, a depressão é caracterizada por sintomas como baixo humor e/ou anedonia, que podem ser acompanhados por déficits cognitivos, neurovegetativos, (TUBBS; DING; BAUM; SHAM, 2020) alterações no comportamento motivacional, desregulação do sono e fadiga (ABBASI-MALEKI; KADKHODA; TAGHIZAD-FARID, 2020). A depressão é a principal causa de deficiência no mundo (WORLD HEALTH, 2017), essa condição é frequentemente encontrada em coocorrência com doenças crônicas ou outros transtornos de humor, o que causa debilitação da qualidade de vida relacionada à saúde e aumento da mortalidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 264 milhões de pessoas de todas as idades no mundo, sofrem com a doença e que a maior carga estará relacionada a esse transtorno em 2030 (ABBASI-MALEKI; KADKHODA; TAGHIZAD-FARID, 2020).

Evidências crescentes indicam que as principais teorias envolvidas nos mecanismo fisiológicos da depressão são relacionados ao desequilíbrio das monoamina, resposta inflamatória, ativação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (NEDIC ERJAVEC; SAGUD; NIKOLAC PERKOVIC; SVOB STRAC et al., 2021), superestimulação de aminoácidos excitatórios e uma ação mais fraca de fatores neurotrópicos (DETKA; KUREK; KUCHARCZYK; GŁOMBIK et al., 2015) e estresse oxidativo (SPIERS et al., 2015).

Na desregulação do eixo HPA, os níveis de cortisol são encontrados em níveis elevadíssimos. O hipotálamo dispõe do controle das funções vegetativas tal como a liberação do hormônio liberador da corticotrofina. Uma vez que a alça de liberação do cortisol é ativada, o cortisol, por sua vez, atua em feedback negativo, desligando a atuação do eixo, impedindo, em teoria, a continuação da liberação da corticotrofina ou até mesmo do próprio hormônio liberador da corticotrofina. Em situações de estresse crônico, ocorre uma insensibilidade do eixo à inibição pelo feedback negativo, ocasionando uma constante liberação do glicocorticoide. (CURI, PROCÓPIO; 2017; STAHL, STEPHEN M.; 2019).

A dexametasona é um corticosteróide com ação preferencial sobre receptores glicocorticoides (GCs). Os GCs são amplamente utilizados para o tratamento de muitas doenças devido às suas propriedades antiinflamatórias, antialérgicas e imunossupressoras. Um dos sintomas apresentado por boa parte dos portadores do transtorno depressivo é a hipercortisolemia que, pode ser revertida pelo tratamento com antidepressivos. Esse resultado indica que alguns aspectos da depressão podem surgir pela desregulação do eixo HPA, causada por altos níveis de glicocorticoides, como por exemplo, a desregulação do feedback entre o eixo HPA e o hipocampo, alterando os níveis de glicocorticoides. Baseado nessa elevação dos níveis de glicocorticoides em pacientes deprimidos, surgiu o modelo de indução da depressão experimental através da administração de corticosterona em roedores (STERNER; KALYNCHUK, 2010).

Wróbel e colaboradores (2014, 2015), desenvolveram dois protocolos de estudo com o objetivo de determinar se o tratamento com dexametasona induzia o comportamento do tipo depressivo em ratos e concluíram que esse modelo da administração de dexametasona é válido para o estudo da fisiopatologia da depressão e para avaliar a eficácia de novas drogas antidepressivas, pois a administração de doses únicas ou repetidas de corticosterona provocaram alterações comportamentais e neuroquímicas similares à depressão.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a resposta fisiológica de defesa antioxidante, onde isso acarreta em uma agressão celular e molecular implicando na falha da boa funcionalidade da célula. (CORTEZ; SILVA, 2008). Este desequilíbrio entre a oxidação e a antioxidação na depressão pode acabar, por fim, resultando em um maior dano de várias biomoléculas, incluindo o próprio DNA (CZARNY; 2018).

2.3.1. Tratamento farmacológico da depressão

Os medicamentos mais comumente usados, são os fármacos antidepressivos de segunda geração, dentre eles os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRSs) e os inibidores da recaptação de serotonina-norepinefrina (IRSNs), os fármacos de primeira geração, que incluem os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) (YUAN; CHEN; XUE; ZHANG et al., 2020) e os antidepressivos tricíclicos (ADT) (FAJEMIROYE; SILVA; OLIVEIRA; COSTA, 2016; ROSA, 2011; BRUNTON, et

al., 2012). A Imipramina foi a primeira substância sintetizada da classe dos antidepressivos tricíclicos, os quais são conhecidos por sua estrutura química que, caracteristicamente contém três anéis benzênicos. O mecanismo de ação dos ADTs em nível pré-sináptico ocorre pelo bloqueio de recaptura de monoaminas, principalmente noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (BRUNTON, 2012; HILLHOUSE; PORTER, 2015). Porém, uma proporção significativa de pessoas não consegue reduzir seus sintomas depressivos devido aos efeitos colaterais desses medicamentos. Com base nisso, há uma necessidade de investigar tratamentos alternativos e estratégias de prevenção (DING; LI; TIAN; SHEN et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar a caracterização química dos constituintes presentes no óleo essencial de *C. sinensis*, obtidos de três (3) diferentes fornecedores, bem como avaliar o efeito antidepressivo e antioxidante do óleo essencial.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química dos óleos essenciais de *C. sinensis*, por Cromatografia Gasosa com detector de Massas (CG-EM), obtido de três (3) fornecedores diferentes;
- Induzir comportamento semelhante à depressão na espécie animal;
- Investigar o possível efeito antidepressivo do óleo essencial estudado, utilizando metodologias específicas;
- Analisar o efeito antioxidante *in vivo* do óleo essencial estudado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise – LMCA, Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os estudos da atividade antidepressiva e antioxidante foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Posicionamento ético

Para realização desse trabalho foi levado em consideração os aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo animais, manipulados de acordo com o Guia da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/UFPB) da Universidade Federal da Paraíba, com a certidão de aprovação nº 8690120320 – Anexo 1.

4.3 Material

4.3.1 Padrões e reagentes

- O nitrogênio líquido e o fluxo de nitrogênio gasoso utilizados nos experimentos foram obtidos da usina de nitrogênio do UNICAL – UFPB.
- Os óleos essenciais de *C. sinensis* foram obtidos de três fornecedores diferentes, sendo designados como PYT, NAT e BIO, sendo utilizado o óleo essencial BIO.
- Dexametasona (Sigma-aldrich) e Imipramina (EMS) foram utilizados nos testes comportamentais.
- O ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, n-butanol, ácido 5-5-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), Tris-EDTA, sulfanilamida, Cloridrato de N- (1-naftil) etilenediamina 0,1%, ácido fosfórico 5%, NaNO₂, provenientes da Sigma-aldrich, foram utilizados para os testes antioxidantes.

4.3.2 Animais

Os camundongos machos Swiss albinos (*Mus musculus*) foram provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), com peso médio de 30 a 35 g, onde foram previamente selecionados,

pesados e transferidos ao local de experimentação no dia anterior aos testes, afim de que pudessem se adaptar ao novo ambiente, minimizando o estresse aos animais. Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padrão, acondicionados em gaiolas de polipropileno, mantidos em ambiente com temperatura controlada (25 ± 1 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e água disponíveis ad libitum.

Em todos os procedimentos experimentais a cada aparato utilizado pelos animais foram realizadas limpezas com etanol a 10%, a fim de remover qualquer vestígio de cheiro deixado pelo animal que possa interferir nos resultados comportamentais, apresentados pelo animal posteriormente analisado. Os animais foram manipulados de acordo com o Guia da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.

4.4 Métodos

4.4.1 Análise cromatográfica

A metodologia utilizada foi com finalidade de identificar e caracterizar constituintes do OE do *C. sinensis* através do cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas: modelo GCMS-QP2010 Ultra, marca Shimadzu. Foi reproduzida pela metodologia cromatográfica desenvolvida pelo NIST 2008 (*National Institute of Standards and Technology*) que consistiu em: temperatura inicial a 60 °C com uma taxa de aquecimento de 3 °C/min até 240 °C, com tempo total de análise de 60 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 °C com fluxo de 1 mL/min, controlado com uma pressão de 57 kPa. Razão de split 1/20, volume de injeção 1 µL. Coluna RTX-5MS de 30 metros de comprimento com 0,25 mm de diâmetro interno e com 0,25 µm de espessura de filme. Temperatura de interface de 260 °C. O gás de arraste utilizado para a análise foi o Hélio. Aquisição de m/z 12 a 600.

A integração dos sinais foi estabelecida seguindo os parâmetros físicos descritos na tabela 1. A detecção dos picos e o cálculo da área de cada sinal nos cromatogramas gerados durante as análises por CG-EM foi determinada através do software GC-MS Solutions.

Slope	150/min
Width	3s
Drift	300/min
T. dbl	1500/min
Min. Área-heigth	300.000

Tabela 1: Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.

O Índice de Kovats (KI) foi introduzido em 1958 para ser utilizado em separações isotérmicas. Foi calculado empregando a equação abaixo, e os compostos foram identificados por comparação de seus índices de retenção e espectros de Massas em biblioteca (NIST 2008).

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right)$$

Onde t'_R é o tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna cromatográfica). i – analito n – número de carbonos do padrão adjacente menos retido, e $n + 1$ é o número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

4.4.2 Estudo comportamental

4.4.2.1 Grupos experimentais

Para o estudo comportamental, os camundongos Swiss foram organizados em grupos e divididos aleatoriamente em seis grupos, sendo de 6 a 8 animais por grupo, como demonstrado na Figura 2.



Figura 2: Delineamento dos grupos experimentais

4.4.3 Administração das substâncias

A administração das substâncias seguiu um cronograma experimental de acordo com a figura 3. A dexametasona, diluída em solução salina, foi administrada 4h antes do início dos testes comportamentais, por via subcutânea (s.c.), na dose de 64 µg/kg, no período matutino, para induzir comportamento semelhante à depressão (LI; FUJITA; ZHANG; REN et al., 2014; WRÓBEL et al., 2014, 2015). A imipramina, solubilizada em solução salina, foi administrada 30 minutos antes do início dos testes, por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 30mg/kg. Todas as drogas foram administradas na proporção de 10mL/kg. O óleo essencial *Citrus sinensis*, diluído em Tween 80 (1%) e água deionizada, foi administrado por via intraperitoneal (i.p.), em três doses (50, 75 e 100 mg/kg).

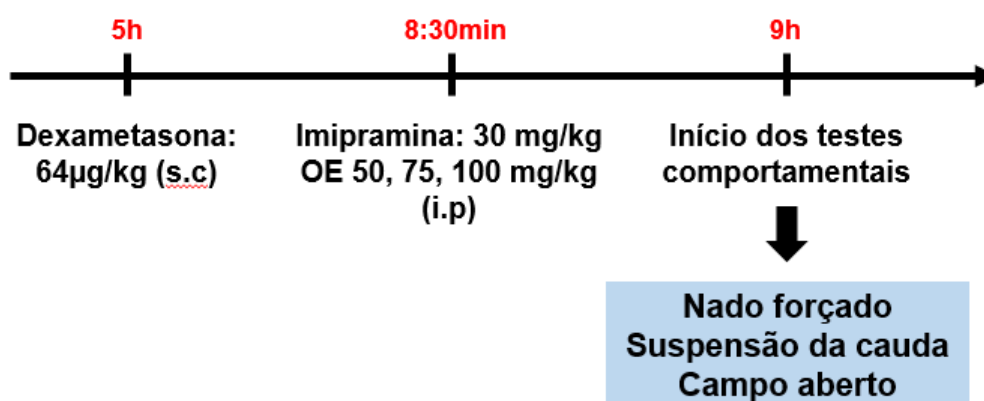


Figura 3: Cronograma experimental para aplicação das substâncias

4.4.4 Testes comportamentais

4.4.4.1 Teste do nado forçado

O teste foi executado de acordo com a metodologia proposta por (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977), os animais foram colocados individualmente em cilindros de vidro (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura), preenchido com água a 25°C até 2/3 da capacidade volumétrica do aparelho (figura 4), deixados por 6 min. Após o primeiro minuto de habituação, a duração total de imobilidade foi mensurada, durante o restante do tempo (5min). Foi julgado imóvel, o animal que permaneceu flutuando passivamente, executando lentos movimentos para permanecer com a cabeça fora da água. Quanto maior o tempo de imobilidade do animal, maior o comportamento depressivo (PORSOLT; ANTON; BLAVET; JALFRE, 1978).



Figura 4: Aparelho utilizado para o teste do nado forçado.

Fonte: Valvassori, 2017

4.4.4.2 Teste de suspensão da cauda

Com essa metodologia, foi mensurado o tempo total de imobilidade do animal. Os camundongos foram isolados (visual e acusticamente) e suspensos pela cauda, por um adesivo, colocado a aproximadamente da ponta da sua cauda (figura 5). Foi registrado por um tempo total de 6 min. Foi avaliado o parâmetro de imobilidade, onde os animais foram considerados imóveis apenas quando ficarem pendurados passivamente sem nenhum movimento (DUAN; CHEN; YANG; TU et al., 2015; STERU; CHERMAT; THIERRY; SIMON, 1985).



Figura 5: Teste de Suspensão da Cauda.

Fonte: Valvassori, 2017.

4.4.4.3 Teste do campo aberto

Permite avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais no campo aberto. O aparato do teste consiste em uma caixa circular, com dimensões de 50 cm (altura)×60 cm (diâmetro), com o piso dividido em 12 espaços equivalentes (figura 6). O teste foi realizado em uma sala com condição de luz fraca. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto, sendo observados por 5 min, para os parâmetros comportamentais: número de cruzamentos com as quatro patas, número de comportamentos de “autolimpeza” (*grooming*) e número de levantamentos (*rearing*). O piso foi limpo com solução de etanol a 10%, depois de cada sessão.



Figura 6: Aparelho utilizado no Teste do Campo Aberto.

Fonte: Scienlabor.com.br

4.4.5 Testes antioxidantes *in vivo*

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina para a retirada das estruturas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal). As áreas dissecadas foram pesadas em balança analítica e armazenadas em *eppendorfs* devidamente identificados, para serem utilizados para avaliação da atividade antioxidante *in vivo*.

4.4.5.1 Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

O GSH é um método baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Os níveis de glutathiona reduzida foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Sedlak, Lindsay (1968), em 412 nm. As áreas cerebrais (hipocampo) de cada animal foram dissecadas e usadas para preparar um homogenato a 10% (p/v). Então, as amostras foram precipitadas com ácido tricloacético a 50% e centrifugado (1000 g, 5 min). A mistura da reação contendo 0,5mL de sobrenadante, 2mL de Tris-EDTA (0,2 M, pH 8.9) e 0,1 mL de 10 mM DTNB (5-5-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico), permaneceu em temperatura ambiente por 5min e a absorbância foi lida a 412 nm.

4.4.5.2 Determinação de nitrito

Para a determinação dos efeitos da substância estudada no óxido nítrico (NO), os níveis do nitrito no hipocampo foram determinados usando o Reagente de Griess (GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005). O homogenato foi centrifugado (800g/10min), 100 µL do sobrenadante foi coletado e adicionado 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%/ Cloridrato de N- (1-naftil) etilenediamina 0,1% / ácido fosfórico 5% / água destilada – 1:1:1:1) e incubados, em temperatura ambiente, por 10 min.

A curva de calibração foi preparada sob as mesmas condições, usando concentrações diferentes de NaNO₂ (0,75–100 mM). O branco foi preparado usando 100 µL do reagente de Griess com 100 µL do tampão usado no homogenato. A absorbância, das amostras, foi determinada no comprimento de onda de 560nm, sendo a concentração de nitrito expressa como nM nitrite/g tecido.

4.4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente empregando-se o teste ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, considerando como significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise cromatográfica

Através da CG-EM, foram analisadas as três amostras de óleo essencial de *Citrus sinensis*, codificadas como PYT, NAT e BIO, obtendo-se o cromatograma de íons totais (TIC) Figura 7. O cromatograma apresenta a intensidade total dos íons detectados (eixo y) em função do tempo de retenção em minutos da eluição de cada analito (eixo x).

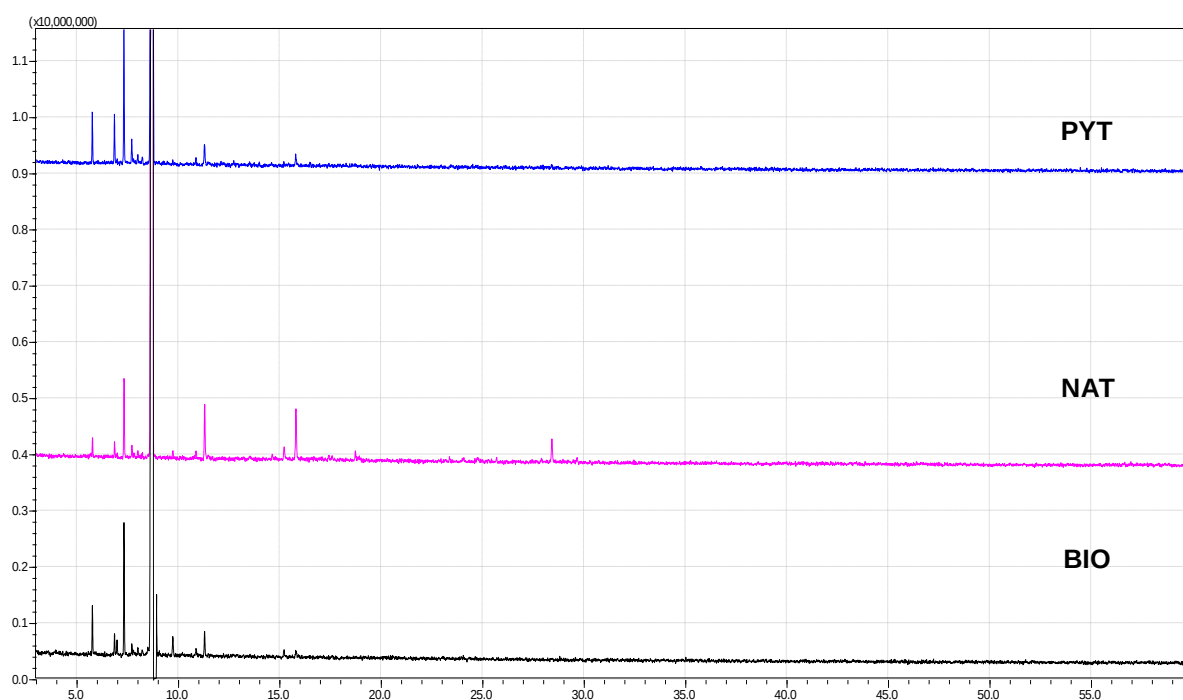


Figura 7: Cromatograma de íons totais (TIC) das amostras do óleo essencial de *Citrus sinensis* (PYT, NAT, BIO) em equipamento CG-EM.

Após a obtenção desses dados, os mesmos foram comparados com o banco de dados da NIST 2008 do CG-EM, e o índice de retenção de Kovats dos compostos foram calculados (Tabela 2, 3 e 4), e para a detecção dos sinais gerados na análise foram comparados os índices de retenção dos componentes do óleo com os da série alceno (C8-C40) (Figura 8).

Amostra PYT	
Kovats	Nome
934,7601476	3-Octen-5-yne, 2,7-dimethyl
975,0184502	-
992,2509225	Beta mirceno
1004,755435	-
1033,179348	Limoneno

Tabela 2: Cálculo de Kovats para a amostra PYT.

Amostra NAT	
Kovats	Nome
992,4723247	-
1032,961957	Limoneno
1102,206573	Linalol
1207,494357	-
1497,617925	-

Tabela 3: Cálculo de Kovats para a amostra NAT.

Amostra BIO	
Kovats	Nome
934,6863469	-
992,2509225	Beta mirceno
1032,880435	Limoneno
1059,782609	-
1101,877934	Linalol

Tabela 4: Cálculo de Kovats para a amostra BIO.

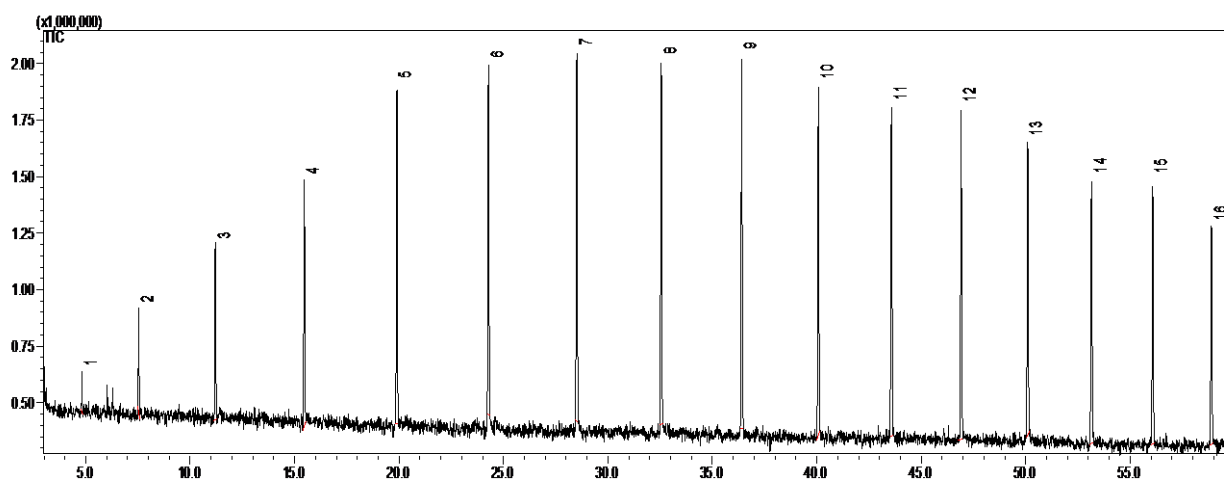


Figura 8: Cromatograma do índice de retenção de alcanos.

5.1.1 Caracterização química da amostra PYT

De acordo com a tabela 5, foram identificados cinco compostos quando comparados a biblioteca NIST 2008, onde o limoneno foi o composto mais abundante (97.61%), seguido de beta mirceno (1.28%) e linalol (0.44 %).

Pico	Tempo ret.	Início tm	Final tm	m/z	Área	Área %	Altura	Altura %	A/H	Nome
1	5.752	5.700	5.795	TIC	1994983	0.44	901788	1.03	2.21	Linalol
2	6.843	6.790	6.900	TIC	2033896	0.44	859712	0.98	2.37	-
3	7.310	7.250	7.380	TIC	5833560	1.28	2447283	2.78	2.38	Beta Mirceno
4	7.695	7.645	7.755	TIC	1066055	0.23	414628	0.47	2.57	-
5	8.741	8.540	8.835	TIC	446165857	97.61	83281807	94.74	5.36	Limoneno

Tabela 5: Dados cromatográficos da amostra PYT.

5.1.2 Caracterização química da amostra NAT

De acordo com a tabela 6, foram identificados cinco compostos quando comparados a biblioteca NIST 2008, onde o limoneno foi o composto mais abundante (97.26%), seguido de linalol (0.80%).

Pico	Tempo ret.	Início tm	Final tm	m/z	Área	Área %	Altura	Altura %	A/H	Nome
1	7.316	7.255	7.380	TIC	3427687	0.83	1390223	1.59	2.47	-
2	8.733	8.550	8.825	TIC	403252623	97.26	83738646	95.81	4.82	Limoneno
3	11.294	11.215	11.395	TIC	3304840	0.80	985394	1.13	3.35	Linalol
4	15.792	15.705	15.885	TIC	3075470	0.74	879453	1.01	3.50	-
5	28.409	28.335	28.485	TIC	1514964	0.37	399239	0.46	3.79	-

Tabela 6: Dados cromatográficos da amostra NAT.

5.1.3 Caracterização química da amostra BIO

De acordo com a tabela 7, foram identificados cinco compostos quando comparados a biblioteca NIST 2008, onde o limoneno foi o composto mais abundante (97.57%), seguido de beta mirceno (1.38%) e linalol (0.31%).

Pico	Tempo ret.	Início tm	Final tm	m/z	Área	Área %	Altura	Altura %	A/H	Nome
1	5.756	5.705	5.805	TIC	1939984	0.46	868701	0.99	2.23	-
2	7.313	7.250	7.375	TIC	5774311	1.38	2348269	2.66	2.46	Beta Mirceno
3	8.739	8.545	8.780	TIC	408141328	97.57	84192499	95.46	4.85	Limoneno
4	9.724	9.640	9.800	TIC	1160798	0.28	342088	0.39	3.39	-
5	11.289	11.200	11.340	TIC	1317093	0.31	438859	0.50	3.00	Linalol

Tabela 7: Dados cromatográficos da amostra BIO.

5.2 Avaliação da atividade antidepressiva do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) em camundongos submetidos a depressão induzida por dexametasona

5.2.1 Teste do nado forçado

Como demonstrado no Gráfico 1, não houve diferença significativa entre as doses do óleo essencial de CS, em relação ao grupo controle (CS 50, $p=0,8578$; CS 75, $p=0,7528$ e CS 100, $p=0,1303$).

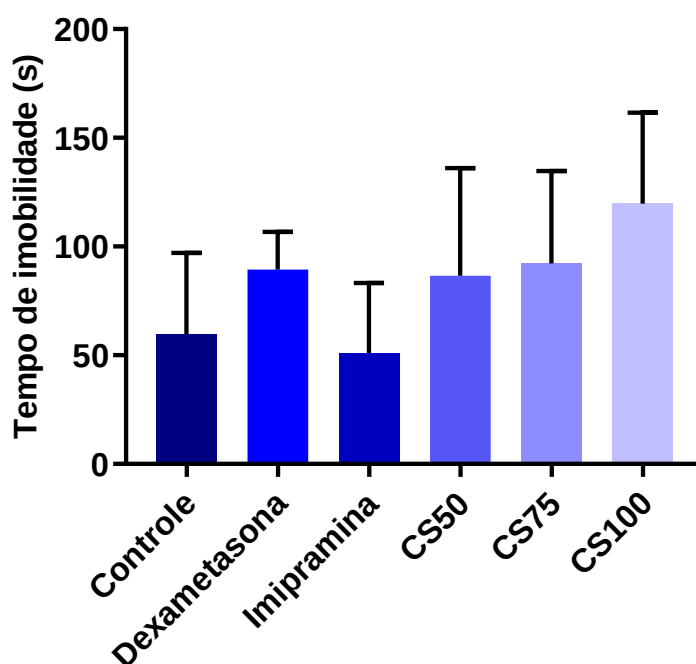


Gráfico 1: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, via i.p., no tempo de imobilidade dos camundongos, submetidos ao teste de nado forçado. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM ($n=6$ a 8 , por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$.

5.2.2 Teste da suspensão da cauda

Os resultados mostrados no Gráfico 2 evidenciam uma diminuição do tempo de imobilidade do grupo tratado com imipramina ($44,67 \pm 11,83$) em relação ao grupo controle ($111,3 \pm 14,40$), e aumento significativo do tempo de imobilidade nos animais tratados com o CS 50 ($123,8 \pm 20,93$), CS 75 ($128,9 \pm 8,38$) e com o CS 100 ($135,9 \pm 11,83$), quando comparados com o grupo tratado com imipramina (30 mg/kg) ($44,67 \pm 11,83$), não havendo diferença em relação ao grupo controle.

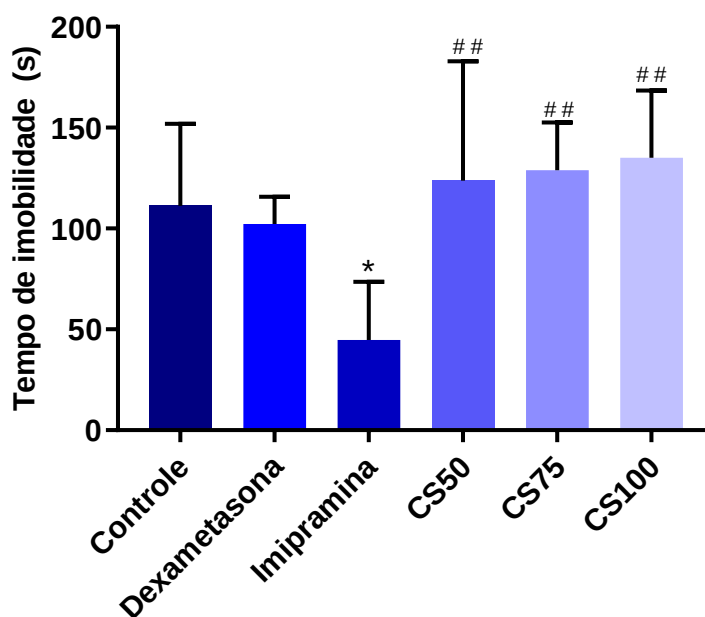


Gráfico 2: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, via i.p. no tempo de imobilidade dos camundongos, submetidos ao teste de suspensão da cauda. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM ($n = 6$ a 8 , por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle. ## $p < 0,005$ vs imipramina.

5.2.3 Teste de campo aberto

No teste de campo aberto, foi observado uma diminuição significativa do número de cruzamentos dos animais tratados com dexametasona ($54 \pm 5,79$), imipramina ($61,33 \pm 11,07$), CS 75 ($69,25 \pm 7,37$) e CS 100 ($56,63 \pm 8,54$), em relação ao grupo controle ($110,1 \pm 13,80$) (Gráfico 3).

Para o parâmetro de número de levantamentos (*rearing*), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com imipramina ($7,57 \pm 3,33$) em relação ao grupo controle ($50,25 \pm 4,94$). Entre o grupo dexametasona ($31,38 \pm 5,85$) em relação ao grupo imipramina ($7,57 \pm 3,33$), e entre os grupos CS 50 ($34,13 \pm 4,36$), CS 75 ($38,50 \pm 4,21$) e CS 100 ($38,88 \pm 4,37$) em relação ao grupo imipramina ($7,57 \pm 3,33$) (Gráfico 4).

Em relação ao parâmetro de autolimpeza (*grooming*), houve diferença significativa entre o grupo dexametasona ($2,87 \pm 0,48$), imipramina ($1,00 \pm 0,33$), CS 75 ($2,87 \pm 0,69$) e CS 100 ($3,25 \pm 0,82$) em relação ao controle ($6,12 \pm 1,09$). Além disso, houve um aumento significativo no número de autolimpeza entre o grupo CS 50 ($4,00 \pm 0,27$) em relação ao grupo imipramina ($1,00 \pm 0,33$) (Gráfico 5).

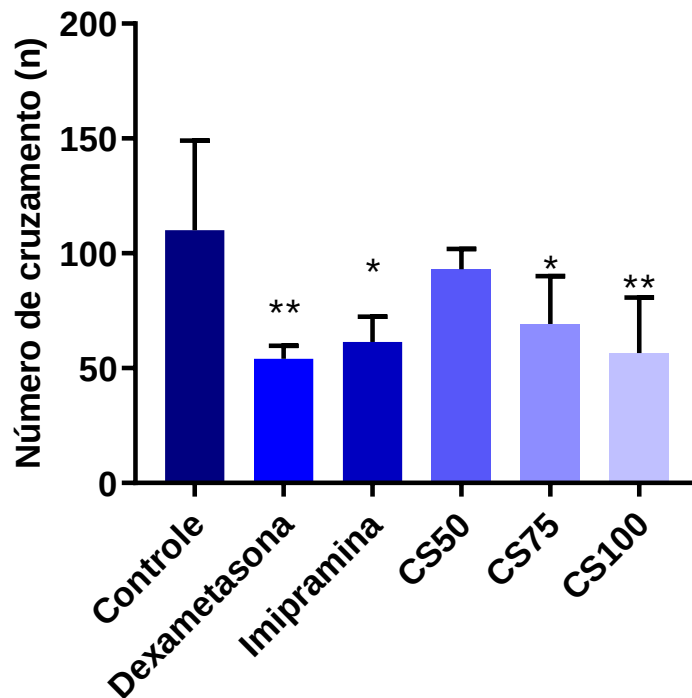


Gráfico 3: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no número de cruzamentos dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ em relação ao grupo controle.

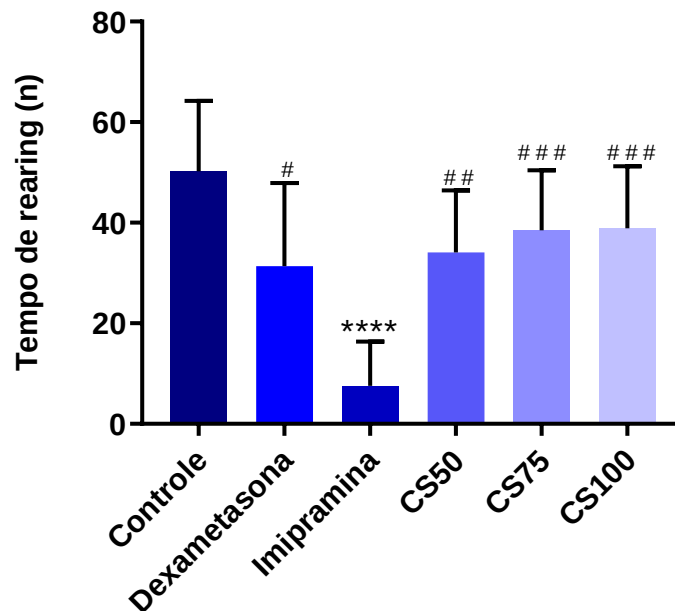


Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no tempo de rearing dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, **** $p < 0,0005$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina, ## $p < 0,005$ vs imipramina, ### $p < 0,0005$ vs imipramina.

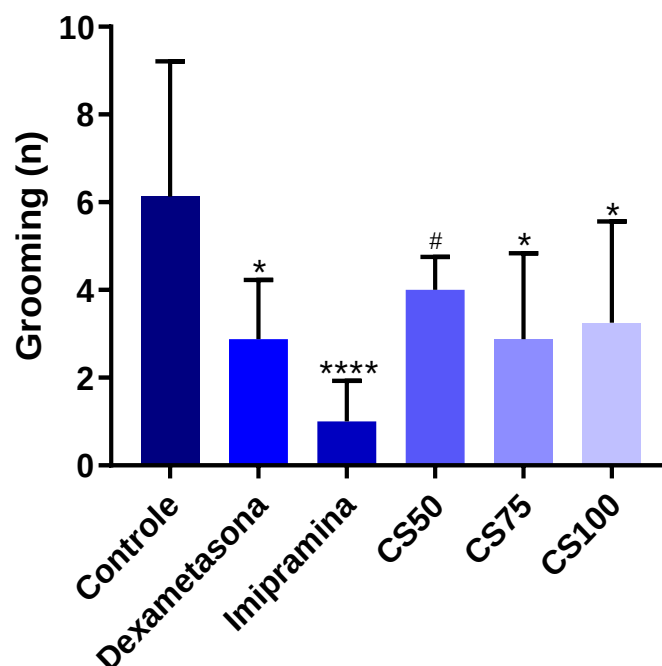


Gráfico 5: Efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg via i.p. no número de grooming, dos camundongos submetidos ao teste de campo aberto. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle; **** $p < 0,0005$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina.

5.3 Estudo antioxidante *in vivo*

5.3.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

De acordo com o gráfico 6, os resultados obtidos mostram que houve aumento significativo na concentração de GSH no grupo tratado CS 75 ($40,50 \pm 2,27$), quando comparado ao grupo tratado com imipramina ($20,31 \pm 3,29$) e com relação ao grupo controle ($21,39 \pm 4,90$).

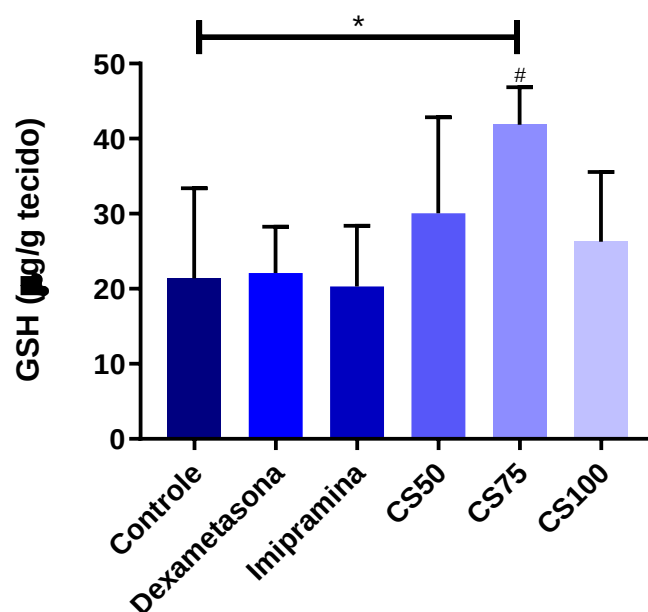


Gráfico 6: Avaliação do efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) em relação aos níveis de glutathione em camundongos. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs imipramina.

5.3.2 Determinação das concentrações de nitrito

De acordo com o gráfico 7, houve diferença entre os grupos CS 50 ($2399 \pm 232,7$) e Imipramina (2541 ± 322), em relação ao grupo controle ($829 \pm 133,6$).

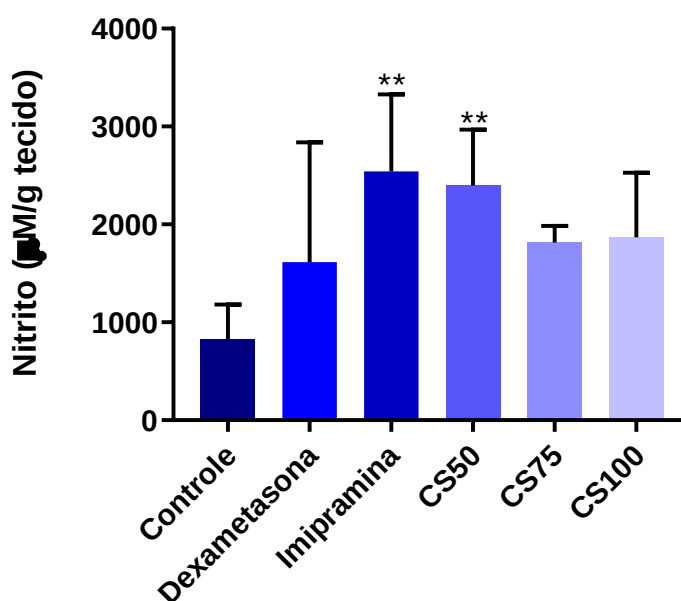


Gráfico 7: Avaliação do efeito do óleo essencial de *Citrus sinensis* (CS) em relação a concentração de nitrito em camundongos. Os valores foram expressos em média $\pm$ EPM (n= 6 a 8, por grupo). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparação entre os grupos. Valor significativo quando $p < 0,05$. Onde, ** $p < 0,005$ vs controle.

6. DISCUSSÃO

A análise química do OE revelou que do total de analitos observados, foram identificados apenas cinco diferentes compostos nas três amostras analisadas, incluindo monoterpenos já relatados na literatura para a espécie *Citrus sinensis*, quando comparados com a biblioteca NIST 2008. A análise de CG-EM indicou que o limoneno foi o composto mais abundante em todas as amostras do OE, seguido por beta mircenos e linalol, alguns compostos não conseguiram ser identificados, pois não foram encontrados no banco de dados utilizado. O conteúdo de cada composto pode variar dependendo de alguns fatores ambientais, como composição do solo, estresse hídrico, condições climáticas, nutrição, local de coleta e outros fatores abióticos (DINIZ; OLIVEIRA JÚNIOR; MEDEIROS; GAMA E SILVA *et al.*, 2019).

Esse resultado corrobora com estudos anteriores, sendo constatado que os componentes majoritários no gênero *Citrus* são o limoneno e linalol (ANAYA-GIL; CABARCAS-CARO; LEYVA-RICARDO; PARRA-GARRIDO *et al.*, 2021; GERACI; DI STEFANO; DI MARTINO; SCHILLACI *et al.*, 2017; NJOROGÉ; PHI; SAWAMURA, 2009). Além disso, um estudo realizado por ZHANG; YANG; FAN; REN *et al.*, (2019), identificou um total de oito compostos diferentes no óleo essencial de *Citrus sinensis* através de uma análise cromatográfica por CG-EM, onde o D-Limoneno que é um isômero do limoneno, conhecido quimicamente como o enantiômero-(R), também era o composto principal. Outros compostos principais foram α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, α -felandreno, 1,3,8-p-mentatrieno, ocimeno e 1,4-dimetileno ciclohexano.

A integração dos sinais, geralmente, é realizada usando-se a área do pico, a qual pode ser relacionada à concentração de uma dada substância na amostra através de métodos, como a calibração interna, a padronização externa. A quantificação dos componentes de uma amostra separada por cromatografia gasosa pode ser obtida através do próprio cromatograma utilizando a altura do pico, ou mais comumente, a área do pico. Consiste em comparar a área obtida no cromatograma com a porcentagem de composição da mistura. A razão entre a área e/ou a altura do pico do analito funcionam como parâmetro analítico. A área do pico permite determinar a concentração de cada componente separado na coluna, e as alturas dos picos são medidas mais facilmente, onde os picos estreitos, determinadas com maior precisão (SCHRODER, 2017). Dentre as três amostras analisadas, a amostra BIO foi a escolhida para ser utilizadas nos testes comportamentais, pois o sinal do composto

majoritário (limoneno) apresentou maior altura e porcentagem de altura em relação a amostra PYT e em relação a amostra NAT, apresentou maior área, porcentagem de área e altura.

A depressão e ansiedade são formas dominantes de desordens neuropsiquiátricas. A depressão é uma doença comumente associada a altas taxas de recorrência e mortalidade, nos últimos anos, muitas pessoas sofrem de transtornos depressivos devido ao aumento das pressões sociais e pessoais (ZHANG; YANG; FAN; REN *et al.*, 2019).

Já foi relatado na literatura a atividade ansiolítica do óleo essencial de *Citrus sinensis* (FATURI; LEITE; ALVES; CANTON *et al.*, 2010; MANNUCCI; CALAPAI; CARDIA; INFERRERA *et al.*, 2018). Mas não há comprovação da atividade antidepressiva, embora possa coexistir uma relação entre a depressão e ansiedade. Portanto, a identificação de medicamentos antidepressivos seguros, eficazes e de baixo custo ganhou atenção científica significativa. No presente trabalho, o óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce) foi testado para efeitos do tipo antidepressivo em camundongos.

A imipramina foi utilizada como a droga padrão, pois faz parte da classe dos antidepressivos tricíclicos. Esses fármacos além de bloquear a recaptação de monoaminas como NA e 5HT, também agem bloqueando os receptores α -adrenérgicos, histaminérgicos e muscarínicos (BRUNTON, *et al.*, 2012).

O protocolo de indução do comportamento do tipo depressivo por dexametasona é justificado na literatura, pois ele mimetiza sintomas associados à doença, desenvolve aspectos fisiopatológicas análogos à condição humano, e o tratamento com antidepressivos pode reverter as alterações do modelo (LI; FUJITA; ZHANG; REN *et al.*, 2014; WRÓBEL *et al.*, 2014, 2015). A dexametasona causa alterações comportamentais similares a depressão, através do aumento do nível de cortisol circulante, que se ligará aos receptores glicocorticoides, causando a inibição da secreção CRH e ACTH, levando a uma hiperestimulação do eixo HPA. A elevação dos níveis de cortisol provoca efeitos neurais excitotóxicos, que são observados em pacientes com transtorno depressivo (MARTINO, 2014). Wróbel e colaboradores (2014, 2015) observaram um aumento no tempo imobilidade dos camundongos machos submetidos a injeções em dose única de dexametasona (64 μ g/kg), no teste do nado forçado.

O teste de nado forçado foi utilizado para rastrear novas drogas antidepressivas em modelos animais de depressão. No presente estudo, investigamos os efeitos do OE de *Citrus sinensis* na duração da imobilidade em camundongos. Esse teste induz um estado de imobilidade que significa desespero comportamental em uma situação inevitável. Este "desespero comportamental" se assemelha a um estado de depressão que pode ser reduzido por medicamentos antidepressivos. Portanto, a atividade do tipo antidepressivo de um composto é expressa por uma diminuição do tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste de nado forçado (ABBASI-MALEKI; KADKHODA; TAGHIZAD-FARID, 2020; PORSOLT; ANTON; BLAVET; JALFRE, 1978; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

No entanto, os resultados mostraram que após o tratamento com o óleo essencial nas doses em estudo (25, 50 e 100 mg/kg) não houve diferença significativa, entre os grupos tratados e o grupo controle. Este resultado difere do estudo realizado por (ZHANG; YANG; FAN; REN *et al.*, 2019), que investigaram os efeitos do tipo antidepressivo do óleo essencial de laranja de umbigo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (OE) e seu principal componente (limoneno), usando o modelo de estresse crônico imprevisível (CUMS) em camundongos e explorou seus possíveis mecanismos. Os resultados indicaram que, no teste de nado forçado, o tempo de imobilidade foi prolongado em camundongos tratados com CUMS, em comparação com o grupo de controle, porém o tratamento com limoneno, ou fluoxetina diminuiu significativamente o tempo de imobilidade, consequentemente reduziu os comportamentos semelhantes à depressão de camundongos CUMS. Com base nisso, concluíram que o limoneno pode ser uma substância com grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos contra a depressão.

O teste da suspensão da cauda avalia o tempo de imobilidade do camundongo, quando suspenso pela cauda, por determinado período, onde o aumento do tempo de imobilidade está relacionado a uma ação de "desistência" do animal, indicando um comportamento depressivo. As substâncias antidepressivas revertem esse quadro, diminuindo assim o tempo de imobilidade. Sendo assim, o teste de suspensão da cauda é uma importante ferramenta comportamental utilizada na investigação de atividade antidepressiva de várias drogas (YI; XU; FENG; ZHAN *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi observado que CS 75 e CS 100 aumentaram o tempo de imobilidade, quando comparado com o grupo tratado com imipramina; no entanto, não houve diferença significativa do tempo de imobilidade entre as concentrações do

OE e o controle. Os resultados encontrados sugerem que os grupos tratados com o OE de *Citrus sinensis* não apresentou efeito antidepressivo, por via intraperitoneal, para as condições desse estudo.

Em um estudo realizado por Coelho et al., (2013) foi relatado que, os animais submetidos ao teste de suspensão da cauda que receberam linalol, nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram diminuição nos tempos de imobilidade, quando comparados ao grupo controle, evidenciando o efeito antidepressivo do linalol, e concluíram que esse efeito se deu através da interação com o sistema monoaminérgico. O (-) - Linalol é um monoterpene comumente encontrado como um dos principais componentes do óleo essencial de várias espécies aromáticas, inclusive está presente na espécie *Citrus sinensis* (GERACI, A; DI STEFANO, V; DI MARTINO, E; SCHILLACI, D et al., 2017; KASALI, A; ESHILOKUN; OLANIYAN et al., 2011).

Além do teste de nado forçado e suspensão da cauda, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, que é comumente utilizado como um complemento do teste de suspensão de cauda e do nado forçado para descartar ações inespecíficas de tratamentos antidepressivos (YI; XU; FENG; ZHAN *et al.*, 2011).

Através do teste de campo aberto, pode-se obter uma resposta semelhante aquelas relacionadas com depressão e ansiedade. Esse teste avalia a atividade locomotora espontânea dos animais (SHIEH; YANG, 2020). Dessa forma, o número de cruzamentos, número de levantamentos (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*), são os principais parâmetros comportamentais para descrever influências da administração de drogas no SNC. Algumas drogas com atividade antidepressiva como a imipramina, também têm sido empregada no tratamento de transtornos de ansiedade e se mostrou efetiva principalmente sobre os sintomas psíquicos (tensão, apreensão e preocupação) (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; FILHO, 2001; BRUNTON, 2012). No teste do campo aberto os compostos antidepressivos não alteram a atividade locomotora, enquanto psicoestimulantes aumentam a locomoção (VIEIRA et al., 2008).

Nos resultados obtidos no teste de campo aberto, a imipramina reduziu significativamente o número de cruzamentos e o número de *rearing*, quando comparada ao controle. A evidência de que a imipramina reduz o número de cruzamentos e levantamentos, no campo aberto, indica provável efeito ansiogênico

dessa droga, sendo possível a correlação direta com a dose utilizada. Pois, de acordo com um estudo realizado por (BRAVIN; VASCONCELOS; SILVA; PANDOSSIO, 2005), o tratamento agudo com essas drogas, em algumas doses, indica uma interferência da neurotransmissão serotoninérgica sobre comportamentos observados em um modelo para estudo da ansiedade, mas não para estudo da depressão.

Além disso, o grupo dexametasona diminuiu o número de cruzamentos em relação ao grupo controle, sugerindo o efeito ansiogênico da dexametasona, e consequentemente, evidenciando sua ligação com a atividade depressora, assim como os grupos tratados com as doses CS 75 e CS 100 do óleo essencial, também reduziram o número de cruzamentos quando comparados com o grupo de controle, esse comportamento é sugestivo de uma atividade depressora central (AMOS; AKAH; ENWEREM; CHINDO *et al.*, 2004; OYEMITAN; OLAYERA; ALABI; ABASS *et al.*, 2015), o que corrobora com um estudo realizado por (DINIZ; OLIVEIRA JÚNIOR; MEDEIROS; GAMA E SILVA *et al.*, 2019) que avaliaram o efeito antidepressivo da espécie *Annona vepretorum*. e observaram que todas as doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg de óleo complexado com β CD (beta-ciclodextrina) também diminuiram o número de cruzamentos, e levaram a conclusão que o óleo essencial possuía um efeito depressor sobre o SNC do animal estudado.

O parâmetro de *rearing* permite a avaliação da locomoção (vertical) do animal, de forma que o aumento do número de *rearing* indica uma possível atividade ansiolítica (KUNIISHI; ICHISAKA; YAMAMOTO; IKUBO *et al.*, 2017). Nos resultados obtidos, os grupos tratados com dexametasona, CS 50, CS 75 E CS 100, apresentaram um aumento do número de *rearing* quando comparados com o grupo imipramina, indicando assim que não houve o efeito antidepressivo do óleo essencial, nesse parâmetro.

O *grooming*, refere-se ao comportamento de autolimpeza, que consiste em movimentos repetidos dos membros anteriores do animal em direção à face, enquanto ele se apoia nos membros posteriores (WANG; ZHENG; SHI; DU *et al.*, 2017). A autolimpeza está envolvida em processos fisiológicos normais, e é controlado por um circuito neural complexo. Sendo característica de diversos distúrbios neuropsiquiátricos quando a autolimpeza é realizada de forma anormal (KALUEFF; STEWART; SONG; BERRIDGE *et al.*, 2016). Foi observado que houve uma redução na frequência de autolimpeza significativa entre o grupo dexametasona, imipramina, CS 75 e CS 100 em relação ao grupo controle, indicando que não houve efeito

antidepressivo. Diferentemente do nosso resultado, a administração de orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg e 100mg/kg aumentaram o tempo de *grooming*, apresentando um efeito equivalente ao da droga padrão imipramina, sugerindo atividade antidepressiva do orto-eugenol (ARAÚJO, 2018). Apenas o CS 50 apresentou aumento desse parâmetro em relação ao grupo imipramina, o que pode estar relacionado ao aumento da ansiedade dos animais.

O estresse oxidativo é um dos mecanismos associados à depressão. Para a avaliação do estresse oxidativo, foi realizada a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e concentrações de nitrito.

A glutathiona (L-γ-glutamil-L-cistenil-glicina) é um tripeptídeo composto por três aminoácidos, é um tiol não protéico que contém cisteína, muito abundante nas células dos mamíferos e está presente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e participam de diversos processos celulares, tais como a síntese de DNA, proteínas, leucotrienos e a modulação da função protéica (ZALACHORAS; HOLLIS; RAMOS-FERNÁNDEZ; TROVO *et al.*, 2020). A glutathiona reduzida (GSH) representa um importante agente endógeno com grande potencial antioxidante nas células, pois desempenha um papel importante na prevenção de lesões no tecido, através da eliminação de radicais livres (ROY; SAHA; SENGUPTA, 2004). De acordo com os dados obtidos, foi observado que houve aumento significativo na concentração de GSH no grupo tratado CS 75, quando comparado ao grupo tratado com imipramina e com o grupo controle. Portanto, o aumento da concentração de GSH observado neste estudo, apontaria para a ocorrência de aumento da resposta celular, em defesa contra espécies reativas, logo sugere que o óleo essencial da dose de 75 mg/kg pode agir protegendo contra o estresse oxidativo, apresentando um efeito antioxidante, corroborando assim com o estudo realizado por CAMPÊLO; GONÇALVES; FEITOSA; FREITAS (2011), que investigaram o efeito antioxidante do óleo essencial de *Citrus limon* (OE), através do teste *in vivo* de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo de camundongos, e observaram que o OE de *C. limon* aumentou os níveis de GSH no hipocampo de camundongos, o qual concluíram que o OE de *C. limon* possui um forte efeito protetor como antioxidante.

O nitrito é um potente radical livre conhecido por ser citotóxico para os neurônios e células da glia. Em condições normais, há um equilíbrio estável entre a produção de óxido nítrico e metabólitos (nitrito e nitrato) e sua destruição por sistemas antioxidantes (FREITAS; VASCONCELOS; SOUZA; VIANA *et al.*, 2005). No presente

estudo, foi observado um aumento significativo na concentração de nitrito no grupo tratado com imipramina e CS 50, em comparação com o grupo controle. O aumento da concentração de nitrito, após o pré-tratamento com OE de *C. sinensis*, sugere aumento da oxidação de lipídios celulares, formação de radicais livres e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). O que difere de um estudo realizado por CAMPÊLO; GONÇALVES; FEITOSA; FREITAS (2011) que observaram uma diminuição de 15 e 6% no teor de nitrito do hipocampo de camundongos, nos grupos tratados com OE 100 [$P < 0,001$] e OE 50 [$P < 0,05$], quando comparados ao grupo controle. A queda no conteúdo de nitrito, após o pré-tratamento com OE de *C. limon*, foi explicada como uma consequência da inibição da formação de radicais, eliminadores de ROS e produtos de peroxidação lipídica, diminuindo assim danos as células.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que através da análise cromatográfica por CG-EM, foi possível identificar o limoneno como o componente majoritário presente nas amostras do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce).

Neste estudo buscou-se avaliar o efeito do tipo antidepressivo-símile do óleo essencial de *Citrus sinensis* (laranja doce) em modelo animal induzido por dexametasona. Os resultados indicaram que, a administração aguda por via intraperitoneal do óleo de *Citrus sinensis* (laranja doce), nas condições experimentais empregadas, não apresentou efeito do tipo antidepressivo-símile no teste de nado forçado, suspensão da cauda e campo aberto.

Foram realizados ensaios antioxidantes, para determinar as atividades antioxidantes do óleo essencial de *C. sinensis*, e observou-se que o óleo essencial na dose de 75 mg/kg apresentou efeito antioxidante no teste *in vivo* de glutathiona reduzida (GSH). Entretanto não apresentou efeito antioxidante quando avaliado através do teste de concentração de nitrito.

Além disso, apenas os efeitos sobre o hipocampo foram usados para explorar o efeito antidepressivo no presente estudo. Diante disso, efeitos em outras regiões do cérebro, que também são afetadas pelo tratamento com corticosterona, também devem ser considerados mais detalhadamente, evidenciando assim, a necessidade de vincular o conhecimento proveniente de pesquisas à prática clínica e trazer novas perspectivas terapêuticas no futuro.

REFERÊNCIAS

- ABBASI-MALEKI, S.; KADKHODA, Z.; TAGHIZAD-FARID, R. The antidepressant-like effects of *Origanum majorana* essential oil on mice through monoaminergic modulation using the forced swimming test. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 10, n. 4, p. 327-335, 2020/07/01/ 2020
- ABBISS, H.; RAWLINSON, C.; MAKER, G.; TRENGOVE, R. Assessment of automated trimethylsilyl derivatization protocols for GC–MS-based untargeted metabolomic analysis of urine. **Metabolomics**, 11, 09/07 2015
- AHMAD, M. H.; RIZVI, M. A.; FATIMA, M.; CHANDRA MONDAL, A. Pathophysiological implications of neuroinflammation mediated HPA axis dysregulation in the prognosis of cancer and depression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 520, p. 111093, 2021/01/15/ 2021
- AHMAD, M. M.; SALIM-UR-REHMAN; IQBAL, Z.; ANJUM, f. M. *et al.* Genetic Variability to essential oil composition in four *Citrus* fruit species. **Pakistan Journal of Botany**, 38, p. 319-324, 2006
- AIDI WANNES, W.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; BEN JEMIA, M. *et al.* Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010/05/01/ 2010
- ALVES, A.C.S. *et al.* Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L.. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais [online]**. 2014, v. 16, n. 3 [Acessado 16 Setembro 2021] , pp. 593-606. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_149>. Epub 11 Set 2014. ISSN 1983-084X. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_149
- AKHLAGHI, M.; SHABANIAN, G.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; PARVIN, N. *et al.* *Citrus aurantium* Blossom and Preoperative Anxiety. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, 61, n. 6, p. 702-712, 2011. 10.1016/S0034-7094(11)70079-4
- AMOS, S.; AKAH, P. A.; ENWEREM, N.; CHINDO, B. A. *et al.* Behavioural effect of *Pavetta crassipes* extract on rodents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 77, n. 4, p. 751-759, 2004/04/01/ 2004
- ANAYA-GIL, J.; CABARCAS-CARO, A.; LEYVA-RICARDO, M.; PARRA-GARRIDO, J. *et al.* Artificial modification of the chemical composition of orange oil (*Citrus sinensis* L.) and its effect on larvicidal activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 28, n. 3, p. 1913-1918, 2021/03/01/ 2021
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Brazilian Journal of Psychiatry** 23, p. 233-242, 2001

ARAÚJO, A. N. V. Investigação da atividade antidepressiva do orto Eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona. **Dissertação [Mestrado]** - João Pessoa, 2018. 84 f.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. d. F. F. M.; BATISTA, L. M. *et al.* Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, p. 258-285, 2006

BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F. *et al.* METABOLÔMICA MICROBIANA: INOVAÇÕES E APLICAÇÕES. **Quim. Nova**, 42, p. 546-559, 27/02/2019 2019

BEREZKIN, V. G. Gas Chromatography | Gas–Solid Chromatography☆. In: WORSFOLD, P.; POOLE, C., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2019. p. 180-185

BIZZO, H. R. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, 32, p. 588-594, 02/04/2009 2009

BRAVIN, A.; VASCONCELOS, R.; SILVA, M.; PANDOSSIO, J. Efeito da administração aguda de imipramina, fluoxetina e buspirona no comportamento de roedores submetidos ao teste de campo aberto, labirinto em "t" elevado e nado forçado. 99, p. 37-42, 07/01 2005

BRUNTON, L. L. C., Bruce A.; Knollmann, Bjorn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. Rio de Janeiro (RJ): 2012. 2112 p

BUSATO DE FEIRIA, S. N.; SANTANA, P. d. L.; BONI, G. C.; ANIBAL, P. C. *et al.* Essential oil composition of *Mentha* spp. extracted seasonally and their effects against *Candida* yeast growth and biofilm formation. **Advancement in Medicinal Plant Research**, 4, p. 106-115, 10/2016 2016

CAMPÊLO, L. M. L.; GONÇALVES, F. C. M.; FEITOSA, C. M.; FREITAS, R. M. d. Antioxidant activity of Citrus limon essential oil in mouse hippocampus. **Pharmaceutical Biology**, 49, n. 7, p. 709-715, 2011/07/01 2011

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. d.; CRUZ, P. L. R. d.; SOUZA, A. R. L. d. *et al.* METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Quim. Nova**, 41, p. 75-91, 2018

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75, n. 3, p. 501-512, 2003/06/01/ 2003

CARMO, E. S.; LIMA, E. d. O.; SOUZA, E. L. d. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39, p. 362-367, 2008

CHEN, G.-T.; LU, Y.; YANG, M.; LI, J.-L. *et al.* Medicinal uses, pharmacology, and phytochemistry of Convolvulaceae plants with central nervous system efficacies: A systematic review. **Phytotherapy Research**, 32, n. 5, p. 823-864, 2018/05/01 2018

- CHUTIA, M.; DEKA BHUYAN, P.; PATHAK, M. G.; SARMA, T. C. *et al.* Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, 42, n. 3, p. 777-780, 2009/04/01/ 2009
- CITRARO, R.; NAVARRA, M.; LEO, A.; DONATO DI PAOLA, E. *et al.* The Anticonvulsant Activity of a Flavonoid-Rich Extract from Orange Juice Involves both NMDA and GABA-Benzodiazepine Receptor Complexes. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 21, n. 9, p. 1261, 2016
- COELHO, V.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; SANTOS, A. R. S. *et al.* Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (–)-linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**, 67, n. 4, p. 876-880, 2013/10/01 2013
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, p. 308-308, 2006
- CORTEZ, C. M; SILVA, D. **Fisiologia aplicada à psicologia** - 1. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 151
- COSTA, C.; CURY, T.; CASSETTARI, B.; TAKAHIRA, R. *et al.* Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC complementary and alternative medicine**, 13, p. 42, 02/23 2013
- COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; PEDRO, A. S.; DAVID, J. P. d. L. *et al.* Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20, p. 502-505, 2010
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013/06/01/ 2013
- CUMMINGS, C. M.; CAPORINO, N. E.; KENDALL, P. C. Comorbidity of anxiety and depression in children and adolescents: 20 years after. n. 1939-1455 (Electronic), 2014
- CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. d. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, 1, p. 175-181, 01/05/2016 2016
- CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia básica** - 2ª. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 272
- CZARNY, P., WIGNER, P., GALECKI, P., & SLIWINSKI, T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. 80, p. 309–321. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.06.036, 2018
- DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**. 27, p. 101–111, 2017

DEDA, O.; GIKA, H.; RAIKOS, N.; THEODORIDIS, G. Chapter 4 - GC-MS-Based Metabolic Phenotyping. *In*: LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K., *et al* (Ed.). **The Handbook of Metabolic Phenotyping**: Elsevier, 2019. p. 137-169

DE SOUSA, P. D.; SILVA, H. N. R.; SILVA, F. d. E.; GAVIOLI, C. E. Essential Oils and Their Constituents: An Alternative Source for Novel Antidepressants. **Molecules**, 22, n. 8, 2017

DETKA, J.; KUREK, A.; KUCHARCZYK, M.; GŁOMBIK, K. *et al*. Brain glucose metabolism in an animal model of depression. **Neuroscience**, 295, p. 198-208, 2015/06/04/ 2015

DING, Q.; LI, H.; TIAN, X.; SHEN, Z. *et al*. Zinc and imipramine reverse the depression-like behavior in mice induced by chronic restraint stress. **Journal of Affective Disorders**, 197, p. 100-106, 2016/06/01/ 2016

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*; 186:421–31, 1990

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. n. 0360-4012 (Print), 2005

DUAN, D.; CHEN, L.; YANG, X.; TU, Y. *et al*. Antidepressant-like effect of essential oil isolated from *Toona ciliata* Roem. var. *yunnanensis*. **Journal of Natural Medicines**, 69, n. 2, p. 191-197, 2015/04/01 2015

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 112, p. 4-29, 2016/10/01/ 2016

EFROM, C.; SOUZA, P. **Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas**. 2018. 978-85-54129-00-2

EZEJIOFOR, T. I. N.; EKE, N. V.; OKECHUKWU, R. I.; NWOGUIKPE, R. N. *et al*. Waste to wealth: Industrial raw materials potential of peels of Nigerian sweet orange (*Citrus sinensis*) **African Journal of Biotechnology**, 10, p. 6257-6264, 06/07/2011 2011

FAJEMIROYE, J. O.; SILVA, D. M. d.; OLIVEIRA, D. R. d.; COSTA, E. A. Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 30, p. 198-215, 2016

FATURI, C. B.; LEITE, J. R.; ALVES, P. B.; CANTON, A. C. *et al*. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 34, n. 4, p. 605-609, 2010/05/30/ 2010

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B. d.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria [online]**, 32, p. 429-436, 2010

FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M. J.; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O.; RAMÍREZ-CABRERA, M. A.; ESQUIVEL-FERRIÑO, P. C. *et al.* Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, 21, p. 247, 2016

FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUZA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. *et al.* Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **The FEBS Journal**, 272, n. 6, p. 1307-1312, 2005/03/01 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04537.x>

GERACI, A.; DI STEFANO, V.; DI MARTINO, E.; SCHILLACI, D. *et al.* Essential oil components of orange peels and antimicrobial activity. **Natural Product Research**, 31, n. 6, p. 653-659, 2017/03/19 2017.

GOES, T. C. G.; 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, 2012.

GUTIÉRREZ, S. L. G.; CHILPA, R. R.; JAIME, H. B. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24, n. 5, p. 591-608, 2014/09/01/ 2014

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB M FAU - JOHNSTON, G. A. R.; JOHNSTON, G. A. Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. n. 1476-5381 (Electronic), 2011

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. n. 1936-2293 (Electronic), 2015

HOCAYEN, P. d. A. S.; WENDLER, E.; VECCHIA, D. D.; KANAZAWA, L. K. S. *et al.* The nitergic neurotransmission contributes to the anxiolytic-like effect of *Citrus sinensis* essential oil in animal models. **Phytotherapy Research**, 33, n. 4, p. 901-909, 2019/04/01 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6281>

KAFER, P. S.; REX, F. E.; SANTOS, M.; SEBEM, E. CARACTERIZAÇÃO ESPECTRAL E NDVI DE ESPÉCIES FLORESTAIS DAS FAMÍLIAS FABACEAE, MYRTACEAE, RUTACEAE E SALICACEAE. **Enciclopédia Biosfera**, 13, p. 262-275, 20/06/2016 2016

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. n. 1471-0048 (Electronic), 2016

KESSLER, R. C.; NELSON, K. A. C. F. M.; MCGONAGLE, K.; LIU, J. *et al.* Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. n. 0960-5371 (Print), 1996

KUNIISHI, H.; ICHISAKA, S.; YAMAMOTO, M.; IKUBO, N. *et al.* Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neuroscience Research**, 123, p. 27-35, 2017/10/01/ 2017

LI, S.-X.; FUJITA, Y.; ZHANG, J.-C.; REN, Q. *et al.* Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice

after neonatal dexamethasone exposure. **Neurobiology of Disease**, 62, p. 124-134, 2014/02/01/ 2014

LUCENA, H. F. S. d. **Caracterização do perfil metabolômico dos biomarcadores presentes no hipocampo de ratos wistar tratados com riparina III**. 2016. 128 f. Tese - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba

MANNUCCI, C.; CALAPAI, F.; CARDIA, L.; INFERRERA, G. *et al.* Clinical Pharmacology of Citrus aurantium and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018, p. 1-18, 12/02 2018

MARTINO, P. Un análisis de las estrechas relaciones entre el estrés y la depresión desde la perspectiva psiconeuroendocrinológica. El rol central del cortisol. **Cuadernos de Neuropsicología / Panamerican Journal of Neuropsychology**, 8, n. 1, p. 60-75, 2014

MARTINS, J.; S, B. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 104, p. 343-365, 2018/08/01/ 2018

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCÍA, A. *et al.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, 900, p. 21-35, 2015/11/05/ 2015

MEDEIROS, H. H. B. R. d. **Fracionamento do Óleo de Laranja utilizando um Sistema Híbrido de Evaporação**. 2014. -, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

NEDIC ERJAVEC, G.; KONJEVOD, M.; NIKOLAC PERKOVIC, M.; SVOB STRAC, D. *et al.* Short overview on metabolomic approach and redox changes in psychiatric disorders. **Redox Biology**, 14, p. 178-186, 2018/04/01/ 2018

NEDIC ERJAVEC, G.; SAGUD, M.; NIKOLAC PERKOVIC, M.; SVOB STRAC, D. *et al.* Depression: Biological markers and treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 105, p. 110139, 2021/03/08/ 2021

NJOROGE, S. M.; PHI, N. T. L.; SAWAMURA, M. Chemical Composition of Peel Essential Oils of Sweet Oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 12, n. 1, p. 26-33, 2009/01/01 2009.

OLIVEIRA, D. M. d.; SILVA, I. V. d.; ROSSI, A. A. B. ESTUDO ANATÔMICO FOLIAR DE ESPÉCIES DE Citrus COM POTENCIAL MEDICINAL. **Enciclopédia Biosfera**, 10, p. 3280-3290, 01/07/2014 2014

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G. d.; FERRAZ, C. A. A.; SILVA, J. C.; DE ANDRADE TELES, R. B. *et al.* Neuropharmacological effects of essential oil from the leaves of Croton conduplicatus Kunth and possible mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, 221, p. 65-76, 2018/07/15/ 2018

ORLANDA, J. F. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. 2011. - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba

OYEMITAN, I. A.; OLAYERA, O. A.; ALABI, A.; ABASS, L. A. *et al.* Psychoneuropharmacological activities and chemical composition of essential oil of fresh fruits of *Piper guineense* (Piperaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 166, p. 240-249, 2015/05/26/ 2015

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G. L. V. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19, p. 140-149, 08/03/2009 2009

PATRIQUIN, M.; MATHEW, S. The neurobiological mechanisms of generalized anxiety disorder and chronic stress. **Chronic Stress**, v.1, 2018

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, 31, p. 2190-2193, 2008

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. d. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 3, p. 146-152, 2012

PESSOA, G. d. P.; SANTOS, A. B. d.; SOUZA, N. C. d.; ALVES, J. A. C. *et al.* Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos **Química Nova**, 35, n. 5, p. 968-973, 31/01/2012 2012

PINTO, M.; FRENA, M.; DOS SANTOS MADUREIRA, L. A. Solvent-free method for the determination of lignin-derived phenols in sediments. **Journal of Separation Science**, 40, n. 9, p. 2002-2008, 2017/05/01 2017
<https://doi.org/10.1002/jssc.201601405>.

POOLE, C. F. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1296, p. 2-14, 2013/06/28/ 2013

PONTES, J. G. M.; BRASIL, A. J. M.; CRUZ, G. C. F.; DE SOUZA, R. N. *et al.* NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. **Analytical Methods**, 9, n. 7, p. 1078-1096, 2017. 10.1039/C6AY03102A

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, 47, n. 4, p. 379-391, 1978/02/15/ 1978

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266, n. 5604, p. 730-732, 1977/04/01 1977

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roem. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 13, n. 2, p. 107-109, 2010/06/01/ 2010

RASPO, M. A.; VIGNOLA, M. B.; ANDREATTA, A. E.; JULIANI, H. R. Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. **Food Bioscience**, 36, p. 100651, 2020/08/01/ 2020

ROBERTSON, B.-J. W.; KIM, Y.-M.; ZINK, E. M.; HALLAIAN, K. A. *et al.* A Statistical Analysis of the Effects of Urease Pre-treatment on the Measurement of the Urinary Metabolome by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **NIH Public Access Author Manuscript**, 10, p. 897-908, 2014

ROSA, M. R. D. d. **Interferência do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. sobre a ansiedade de trabalhadores expostos ao ruído ocupacional**. 2011. 103 f. (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

SALAKO, K. S.; SILVA, B. O.; AZUBUIKE, C. P.; SALAKO, O. A. Evaluation of the anti-candidal activity of the ointment formulation containing the admixture of *Allium sativum* (Liliaceae) and *Citrus sinensis* (Rutaceae). **Nigerian Journal of Pharmaceutical and Applied Science Research**, 7, p. 1-7, 2018

SCHRÖDER, CLÁUDIA HOFFMANN KOWALSKI. Análise instrumental aplicada à farmácia. Londrina. **Editora e Distribuidora Educacional S.A.**, 224 p., 2017. ISBN 978-85-522-0128-1

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 24:192–205, 1968

SHIEH, K. R.; YANG, S. C. Formosan wood mice (*Apodemus semotus*) exhibit more exploratory behaviors and central dopaminergic activities than C57BL/6 mice in the open field test. n. 0304-4920 (Print), 2020

SILVA, S. L. d.; CHAAR, J. d. S.; FIGUEIREDO, P. d. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, 38, p. 107-112, 2008

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. d.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Edição digital ed. 2017 502 p. 978-85-8271-359-4

SOHI, S.; SHRI, R. Neuropharmacological potential of the genus *Citrus*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 7, p. 1538-1548, 18/02/2018 2018

SOUSA, D. P. 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**, 20, p. 18620-18660, 14/10/2015 2015

SOUZA, I.; MACHADO-DE-SOUZA, J. Brazil: world leader in anxiety and depression rates. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.39, n.4, p.384, 2017

SPIERS, J. G.; CHEN, H. J.; SERNIA, C.; LAVIDIS, N. A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Front Neurosci.** 8, p. 456, 2015

STEHL, S. M. Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações e aplicações práticas; tradução Patricia Lydie Voeux; **revisão técnica Irismar Reis de Oliveira.** - 4. ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, 85, n. 3, p. 367-370, 1985/03/01 1985

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B. M. R.; WENNIG, R. *et al.* Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, 77, n. 1873-3573 (Electronic), 2009

TUBBS, J. D.; DING, J.; BAUM, L.; SHAM, P. C. Systemic neuro-dysregulation in depression: Evidence from genome-wide association. **European Neuropsychopharmacology**, 39, p. 1-18, 2020/10/01/ 2020

VALVASSORI, S.; VARELA, R.; QUEVEDO, J. Animal Models of Mood Disorders: Focus on Bipolar Disorder and Depression. **Academic Press**, p. 991-1002. Londres, 2017

VEIGA JUNIOR, V., F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, 28, n. 28/02/2005, p. 519-528, 2005

VERMA, V. C.; PATHAK, P. H. Effect of *Citrus sinensis* oil volatiles on EGG hatchability of rice moth (*Corcyra cephalonica*) and its (GC-MS) analysis. **World Journal of Pharmaceutical Research**, 4, n. 6, p. 1461-1473, 28/03/2015 2015

VIANA, M. D. M.; VIEIRA, A. C. S.; SILVA-NETO, G. J. d.; PÓVOAS, F. T. X. *et al.* Potencial ansiolítico do gênero *Citrus*: Revisão integrativa da literatura. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, 20, p. 73-79, 2016

WANG, Y.-J.; LIU, L.; WANG, Y.; WANG, J.-L. *et al.* Imipramine exerts antidepressant-like effects in chronic stress models of depression by promoting CRTC1 expression in the mPFC. **Brain Research Bulletin**, 164, p. 257-268, 2020/11/01/ 2020

WANG, B.; ZHENG, Y.; SHI, H.; DU, X. *et al.* Zfp462 deficiency causes anxiety-like behaviors with excessive self-grooming in mice. **Genes, Brain and Behavior**, 16, n. 2, p. 296-307, 2017/02/01 2017. <https://doi.org/10.1111/gbb.12339>

WITTENBORN, A. K.; NATAMBA, B. K.; RAINEY, M.; ZLOTNICK, C. *et al.* Suitability of the multidimensional scale of perceived social support as a measure of functional social support among incarcerated adults with major depressive disorder. **Journal of Community Psychology**, 48, n. 3, p. 960-976, 2020/04/01 2020. <https://doi.org/10.1002/jcop.22315>.

WORLD HEALTH, O. **Depression and other common mental disorders: global health estimates.** World Health Organization. Geneva: 2017. 2017

YI, L.-T.; XU, H.-L.; FENG, J.; ZHAN, X. *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of nobiletin. **Physiology & Behavior**, 102, n. 1, p. 1-6, 2011/01/10/ 2011

YUAN, Z.; CHEN, Z.; XUE, M.; ZHANG, J. *et al.* Application of antidepressants in depression: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Neuroscience**, 80, p. 169-181, 2020/10/01/ 2020

ZALACHORAS, I.; HOLLIS, F.; RAMOS-FERNÁNDEZ, E.; TROVO, L. *et al.* Therapeutic potential of glutathione-enhancers in stress-related psychopathologies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 114, p. 134-155, 2020/07/01/ 2020

ZHANG, L.-L.; YANG, Z.-Y.; FAN, G.; REN, J.-N. *et al.* Antidepressant-like Effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Essential Oil and Its Main Component Limonene on Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, n. 50, p. 13817-13828, 2019/12/18 2019

ZHAO, J.; JUNG, Y.-H.; JANG, C.-G.; CHUN, K.-H. *et al.* Metabolomic identification of biochemical changes induced by fluoxetine and imipramine in a chronic mild stress mouse model of depression. **Scientific Reports**, 5, n. 1, p. 8890, 2015/03/09 2015

ANEXO I

Certidão de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba-UFPB



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação comportamental, metabolômica e antioxidante in vivo de óleos essenciais em modelo de depressão", protocolada sob o CEUA nº 8690120320 (ID 001134), sob a responsabilidade de **Sócrates Golzio dos Santos e equipe; José Maria Barbosa Filho; Kimberly Stefanny da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 19/06/2020.

We certify that the proposal "Behavioral, metabolomic and antioxidant assessment in vivo of essential oils in a depression model", utilizing 192 Heterogenics mice (192 males), protocol number CEUA 8690120320 (ID 001134), under the responsibility of **Sócrates Golzio dos Santos and team; José Maria Barbosa Filho; Kimberly Stefanny da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 06/19/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2020** a **03/2021**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 meses**

N: **192**

Linagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **30 a 40 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia**

João Pessoa, 10 de agosto de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba