**Universidade Estadual Paulista**

**Instituto de Biociências – Departamento de Farmacologia**

**Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas**

# "Avaliação da Atividade Antidepressiva e Ansiolítica do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L."

*Valéria Martins de Lima*

**Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, UNESP, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).**

**Orientadora: Profª. Drª. Mirtes Costa**

**Botucatu**
**2010**

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Lima, Valéria Martins de.
Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L / Valéria Martins de Lima. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.
Orientadora: Mirtes Costa
Assunto CAPES: 21000000

1. Produtos naturais 2. Plantas medicinais 3. Farmacologia

CDD 581.1

Palavras-chave: Ansiedade; Depressão; Modelos animais; *Rosmarinus officinalis* L

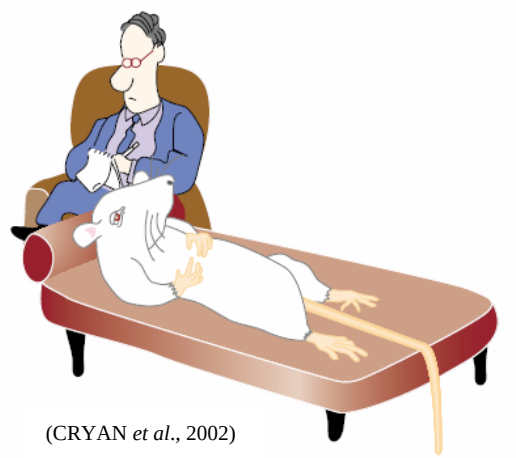
*Valéria Martins de Lima*

# "Avaliação da Atividade Antidepressiva e Ansiolítica do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L."

**Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, UNESP, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (AC: Farmacologia).**

**Comissão Examinadora:**
**1º Titular/ Presidente: Profª. Drª. Mirtes Costa (UNESP/Botucatu)**
**2º Titular: Profª. Drª. Maria Cristina Pereira Lima (UNESP/Botucatu)**
**3º Titular: Profª. Drª. Clélia AkiKo Hiruma – Lima (UNESP/Botucatu)**
**1º Suplente: Profª. Drª. Sandra Cordellini (UNESP/Botucatu)**
**2º Suplente: Profª. Drª. Albina Rodrigues Torres (UNESP/Botucatu)**

**Botucatu**
**2010**

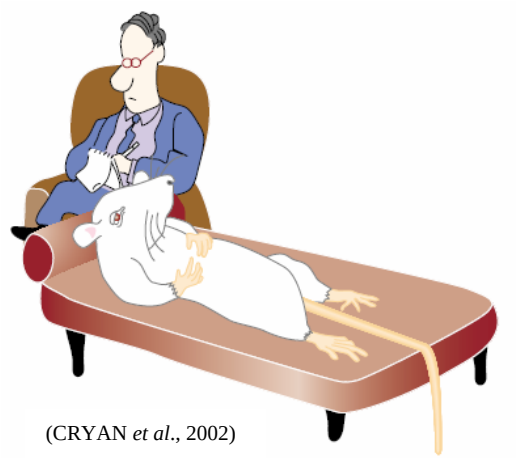


(CRYAN *et al*., 2002)

# Dedicatória

*A meu pai... pelos ensinamentos de vida que me deixou.*

*A minha mãe – essência de minha vida!*



(CRYAN *et al*., 2002)

# Agradecimentos

*Serei eternamente grata...*

*À Deus!*

*Ao professor e amigo Celso, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, pelas inúmeras sugestões que contribuíram imensamente ao meu trabalho e pelo apoio nos finais de semana no laboratório. Muito obrigado!*

*Aos amigos que tive a sorte de conhecer e conviver no laboratório: André, Filipe, Carlos Alberto, Daniele, Bruna, Leandro ... pela amizade e pelo apoio.*

*A Professora Drª. Clélia, pelos ensinamentos e por aceitar a fazer parte da banca desta dissertação.*

*A Professora Drª. Maria Cristina (Dra Kika), por aceitar, sem hesitar a fazer parte da banca desta dissertação.*

*Ao recente Prof. Dr. Leonardo Seito, pela amizade, pelo carinho e os ensinamentos.*

*A Professora Drª. Márcia Ortiz do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) que gentilmente fez a análise dos componentes do óleo essencial.*

*A todos os Professores do Departamento de Farmacologia.*

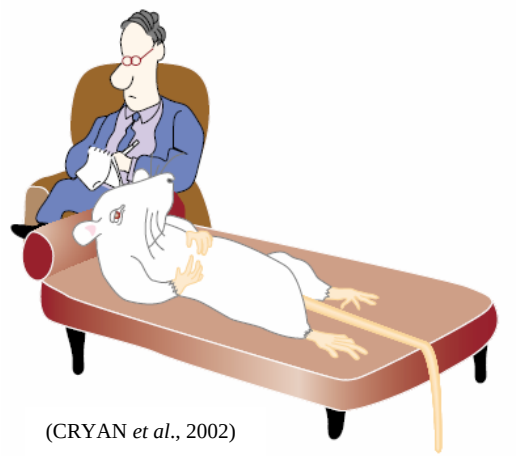
*Aos Funcionários do Departamento: Cris, Paulão, Luís, Janete, Flavia.*

*A sessão de Pós- graduação: Serginho, Luciene, Herivaldo.*

*Aos meus colegas de trabalho: Amanda e Anderson pelo apoio, pela amizade, pela convivência, pela paciência e pela ajuda nestes dois anos.*

*Em especial, agradeço a Professora Drª. Mirtes Costa pela orientação deste trabalho, por todos os ensinamentos, pela amizade, pela minha formação profissional e pessoal, pelo apoio e a confiança depositada em mim nestes anos. Muito obrigado!*

***"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto."***
***(Thomas Huxley)***

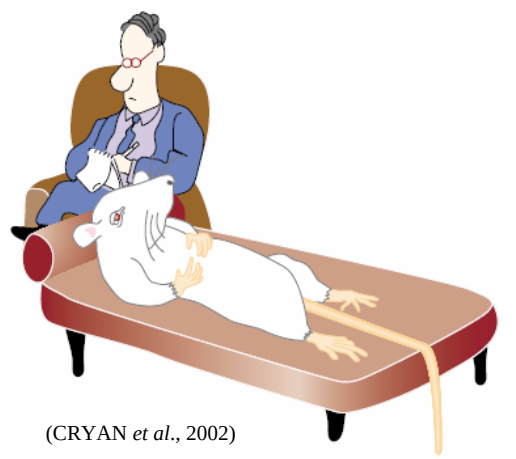


(CRYAN *et al*., 2002)

# Resumo

***Resumo***

A depressão e as desordens de ansiedade são distúrbios psiquiátricos de alta prevalência, cuja falta ou o tratamento inadequado acarretam um impacto negativo expressivo na vida social, física e mental do individuo. Historicamente, depressão e ansiedade são clinicamente consideradas desordens separadas e distintas, predominantemente devido aos diferentes tratamentos utilizados, usualmente os antidepressivos tricíclicos e os benzodiazepínicos, respectivamente. Entretanto, muitos estudos clínicos têm demonstrado uma grande sobreposição entre esses dois estados e vários antidepressivos são também utilizados no tratamento da ansiedade. Porém, mesmo com o arsenal terapêutico disponível, muitos portadores destes transtornos não respondem ao tratamento, a terapêutica efetiva leva algumas semanas para manifestar seus efeitos e estes são muitas vezes acompanhados por efeitos adversos. Neste contexto, as plantas medicinais desempenham um importante papel na busca de novos compostos, mais eficazes e seguros para o tratamento dessas desordens. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade do óleo essencial obtido da espécie *Rosmarinus officinalis* L. em modelos experimentais clássicos de depressão (Teste do Nado Forçado), transtorno de ansiedade generalizada (Labirinto em Cruz Elevado) e Transtorno obsessivo compulsivo (Teste de Esconder Esferas). Os resultados são promissores, pois o óleo essencial demonstrou ser ativo na dose de 500 mg/kg no Teste do Nado Forçado e no Teste de Esconder Esferas, sem apresentar indícios de alterações sobre o sistema motor no Teste da Barra Giratória. Não foi observada atividade no modelo de ansiedade generalizada. O conjunto de resultados sugere a presença de efeito compatível com atividade sobre a depressão e sobre o transtorno obsessivo compulsivo. A continuidade deste estudo objetivará o esclarecimento do mecanismo de ação, de parâmetros farmacocinéticos e da toxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

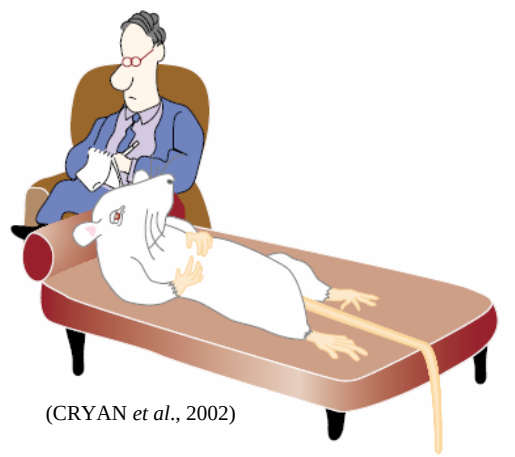


(CRYAN *et al*., 2002)

# Abstract

**Abstract**

Depression and anxiety are psychiatric disorders of high prevalence. Lack or inappropriate treatment has a significant negative impact on person's social and physical life as well as on mental well-being. Historically, depression and anxiety were considered separated and distinct disorders in the medical concept, due to different approaches usually used for their treatment, such as tricyclic antidepressants and benzodiazepines, respectively. However, many clinical studies have shown a great overlapping between these two states and many antidepressants are also used for the treatment of anxiety. Although a wide range of therapeutic drugs is available, many patients do not respond to the antidepressant treatment. Some weeks are required for an effective therapeutic response and treatment effects are usually accompanied by unwanted side-effects. Thus, attempts in order to find new, more effective and safe treatment options are necessary. In this perspective, medicinal plants play an important role on the research of new drugs for treatment of these disorders. The objective of this paper was to evaluate the effect of essential oil obtained from *Rosmarinus officinalis* L. in classical experimental models of depression (Forced Swimming Test), generalized anxiety disorder (Elevated Plus Maze) and obsessive-compulsive disorder (Marble Burying Test). Our results are promising, such essential oil was active at 500 mg/kg in the Forced Swimming Test and in the Marble Burying Test, without impairment upon the motor system, evaluated in the Rota-rod Test. There was no observed activity in the experimental procedure to generalized anxiety. Data analysis suggests the presence of depression and obsessive-compulsive disorder-like effects. The continuity of this study will intend the elucidation of action mechanisms, pharmacokinetic parameters and toxicity of essential oil form *Rosmarinus officinalis* L.

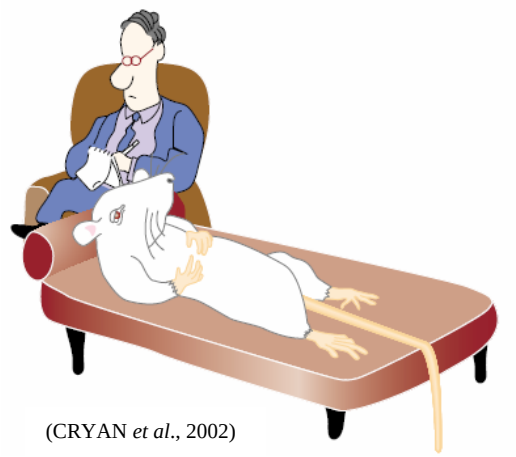


(CRYAN *et al*., 2002)

# *Sumário*

**SUMÁRIO**

Dedicatória
Agradecimentos
Resumo
Abstract
Sumário
I.) Introdução.....01
II.) Objetivo.....08
III.) Material e Métodos.....09
3.1) A Planta.....09
3.2) Extração do óleo essencial.....10
3.3) Análise da composição do óleo essencial.....10
3.4) Animais e procedimentos gerais.....11
3.5) Drogas e Tratamentos.....11
3.6) Avaliação da atividade antidepressiva e atividade motora.....12
3.6.1) Teste do Nado Forçado.....12
3.6.2) Teste da Barra Giratória.....14
3.7) Avaliação da atividade ansiolítica.....15
3.7.1) Labirinto em Cruz Elevado.....15
3.7.2) Teste de Esconder Esferas.....17
3.8) Análise estatística.....18
IV.) Resultados e Discussão.....19
4.1) Rendimento do óleo essencial.....20
4.2) Composição do óleo essencial.....20
4.3) Avaliação da atividade antidepressiva e atividade motora.....22
4.4) Avaliação da atividade ansiolítica.....26
4.4.1) Labirinto em Cruz Elevado.....26
4.4.2) Teste de Esconder Esferas.....30
V.) Conclusão.....34
VI.) Referências Bibliográficas.....35
VII.) Anexos.....43



(CRYAN *et al*., 2002)

# *Introdução*

## *I. Introdução:*

O transtorno depressivo é uma doença comum, associada a sintomas severos e amplamente distribuída na população (KESSLER *et al*., 2003). A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais freqüentes no mundo ocidental, com estimativas prevalentes de aproximadamente 21% da população geral em países desenvolvidos (WONG & LICINIO, 2001). Projeções indicam que esta será a primeira causa de incapacitação na população mundial em 2030, pois atualmente, ocupa o terceiro lugar, atrás apenas das infecções das vias aéreas inferiores e da diarréia (DEMYTTENAERE *et al.*, 2004). Numerosos estudos demonstram que sintomas de ansiedade são freqüentes em pacientes depressivos e, em geral, quando isso ocorre estão relacionados a um pior prognóstico (CLAYTON *et al*., 1991; ZIMMERMAN *et al*., 2000; KESSLER & GREENBERG, 2002 ).

Nos últimos anos, a depressão tornou-se prioridade para a saúde pública, devido sua alta prevalência e as suas conseqüências como morbidade, mortalidade, custos sociais e econômicos (VALLADARES *et al*., 2009). Nos Estados Unidos, o total gasto com o tratamento da depressão foi de aproximadamente de US$ 83,1 bilhões em 2000 (GREENBERG *et al*., 2003), e que a quantia de US$ 42,3 bilhões foram gastos em 1990 com as desordens de ansiedade (GREENBERG *et al*., 1999).

Historicamente, ansiedade e depressão são consideradas na clínica desordens separadas e distintas, predominantemente devido aos diferentes tratamentos utilizados para essas desordens, usualmente os antidepressivos tricíclicos e os benzodiazepínicos. Entretanto, muitos estudos clínicos têm demonstrado uma grande sobreposição entre esses dois estados (ANDREATINI & BACELLAR, 1999; CRYAN & HOLMES, 2005).

A depressão é biológica e geneticamente uma desordem heterogênea caracterizada por alterações do humor geralmente acompanhadas de sintomas cognitivos, comportamentais e somáticos (CRYAN & HOLMES, 2005). Queixas de ansiedade,

irritabilidade, preocupação, desinteresse ou perda da capacidade de sentir prazer nas atividades habituais, bem como sentimentos de culpa e baixa auto-estima se fazem entre os principais sintomas dos transtornos depressivos (GUERRA & CALIL, 2004). O quadro é geralmente acompanhado de alterações físicas como perda de peso, amenorréia, perda do interesse sexual e distúrbios do sono (JESBERGER & RICHARDSON, 1985; MILLAN, 2006). Além disso, os índices de suicídio são cerca de vinte vezes maiores em pacientes deprimidos quando comparados a população geral (HARRIS & BARRACLOUGH, 1998).

Já a ansiedade é caracterizada pela presença do medo persistente, excessivo e irracional. As desordens de ansiedade são classificadas, segundo o DSM-IV (Manual de Estatística e Diagnóstico das Desordens Mentais), em desordens de ansiedade generalizada, distúrbio do pânico, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo compulsivo e desordem do estresse pós-traumático. Essas desordens são diferenciadas devido à natureza dos sintomas envolvidos (American Psychiatric Association, 1994 *apud* CRYAN & HOLMES, 2005).

Dentre as desordens de ansiedade, o transtorno obsessivo compulsivo apresenta-se como uma desordem extremamente complexa que envolve diversas manifestações neurológicas, incluindo sintomas neuropsicológicos, tais como, déficit cognitivo e não-cognitivo, estereotipia e sintomas proeminentes de ansiedade (KORFF & HARVEY, 2006).

Uma série de teorias psicológicas e biológicas foram desenvolvidas para se entender o substrato neuroquímico na etiologia da depressão. A hipótese que sugere que o déficit funcional de um ou mais sistemas de neurotransmissores (noradrenalina, dopamina e serotonina) em certas sinapses envolve o processo patológico da depressão tem sido de grande interesse e investigação (JESBERGER & RICHARDSON, 1985; BERTON & NESTLER, 2006).

Como conseqüência, a depressão tem seu tratamento fundamentado no aumento da disponibilidade de serotonina ou noradrenalina, mecanismo comum às principais drogas disponíveis para a terapêutica, como os inibidores da monoamina-oxidase e os antidepressivos tricíclicos. Um grupo de drogas mais recentemente disponibilizado é o dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, que atuam com menor intensidade sobre as outras monoaminas, inclusive a noradrenalina (TAYLOR *et al*., 2005). Este grupo de drogas apresenta eficácia razoável e um índice de efeito adverso relativamente baixo. Porém, isso não ocorre com os inibidores da monoamina-oxidase e os antidepressivos tricíclicos, que embora efetivos, são associados a efeitos colaterais cardíacos, anticolinérgicos e hipotensivos, bem como potencial para severa toxicidade (HALFIN, 2007).

Várias classes de antidepressivos, principalmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, desempenham um importante papel no tratamento das desordens de ansiedade (BALLENGER, 2000, ARGYROPOULOS *et al.*, 2000). No transtorno obsessivo compulsivo, os antidepressivos que aumentam a transmissão serotonérgica, sejam eles seletivos ou não, apresentam uma excelente resposta, enquanto os que agem preferencialmente sobre a noradrenalina são pouco ou nada eficazes (BLIER & MONTIGNY, 1999; MARQUES, 2001; KORFF *et al*., 2006 ).

Entretanto, mesmo com a existência de múltiplas classes farmacológicas, menos de 50% dos pacientes apresentam remissão total após o tratamento inicial da depressão, a terapêutica efetiva leva algumas semanas para manifestar seus efeitos e estes são muitas vezes acompanhados por efeitos não desejados (WONG & LICINIO, 2004; TAYLOR *et al*., 2005; BERTON & NESTLER, 2006; HALFIN, 2007).

Parâmetros como segurança da droga, efeitos colaterais, tolerabilidade e potencial para interação entre drogas devem ser levados em consideração, pelo fato dessas variáveis afetarem a aderência ao tratamento (HALFIN, 2007). Estes aspectos endossam a

procura de novas moléculas com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança e/ou reduzir os efeitos adversos e a latência para o efeito antidepressivo.

Para esta finalidade destaca-se a pesquisa com produtos naturais que ainda guarda grande potencial para fornecer compostos ativos sobre o Sistema Nervoso Central. Atualmente, o uso de plantas medicinais na terapêutica tem ganhado crescente aceitação tanto por profissionais médicos, como por pacientes (CARLINI, 2003). A busca de novas terapias farmacológicas a partir de plantas medicinais para doenças psiquiátricas tem progredido significantemente na última década. Isto é refletido num grande número de preparações de plantas para as quais o potencial psicoterapêutico tem sido avaliado em uma variedade de modelos animais (ZHANG, 2004).

Dentre as espécies de plantas estudadas para depressão, destaca-se o *Hypericum perforatum* L. A eficácia desta espécie foi avaliada em vários estudos clínicos realizados com pacientes com depressão de leve a moderada, e os resultados destes estudos têm demonstrado seu efeito antidepressivo e o baixo índice de reações adversas (DI CARLO *et al*., 2001). Em estudos pré-clínicos, em camundongos, doses de extrato de *Hypericum perforatum* L. efetivas em modelo de depressão também mostraram atividade em modelo de ansiedade relacionado ao transtorno obsessivo compulsivo (SKALISZ *et al.*, 2004).

A espécie vegetal avaliada no presente estudo foi selecionada com base em dados etnofarmacológicos, cujos registros indicam o uso de diferentes preparações de *Rosmarinus officinalis* L. por sua atividade sobre o Sistema Nervoso Central, para ações que vão da sedação à estimulação.

O uso do pó obtido das folhas secas, na forma de cigarro, foi registrado para "acalmar nervosos e desesperados" (CAMARGO, 1985), e a infusão das folhas é citada como "sedativa e calmante para crianças" por comunidades estabelecidas na Mata Atlântica, no Estado de São Paulo (DI STASI *et al*., 2002). No Rio Grande do Sul, a espécie é utilizada

para “alívio da tensão nervosa” (SIMÕES, 1989), com citações como “narcótica” (MATOS & GRAÇAS, 1980), útil para “doenças nervosas” (GRIEVE, 1994) ou como “estimulante físico e mental” (VIERA, 1992). Na aromaterapia, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. mostrou uma melhora significativa no desempenho cognitivo e no humor em pacientes saudáveis (MOSS *et al*., 2003) e em estudo etnobotânico e etnofarmacológico recente, a espécie é citada para dores de cabeça e epilepsia na região do México; como sedativo, relaxante e para a depressão na Espanha (HEINRICH *et al*., 2006).

A análise fitoquímica registrou para suas folhas a presença de óleo essencial constituído de uma mistura de componentes voláteis que é responsável pelo seu odor típico, dentre os quais os principais são cineol, alfa-pineno e cânfora e entre os compostos não voláteis, o ácido caféico, diterpenos amargos, flavonóides e triterpenóides (LORENZI & MATOS, 2002). Estudos prévios com o óleo essencial, realizados em nosso laboratório, forneceram indícios experimentais tanto de atividade estimulante quanto depressora do Sistema Nervoso Central (SENA, 1999), com moderada atividade sobre episódios convulsivos (RICARDO, 2002).

Recentemente o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico das folhas e caules desta planta foi investigado em dois modelos animais: o Teste do Nado Forçado e o Teste da Suspensão pela Cauda. Os resultados sugerem que a atividade antidepressiva do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* L. é mediada por interações do sistema monoaminérgico (MACHADO *et al*., 2009).

Os modelos animais representam uma ferramenta imprescindível na busca de novas drogas, já que o estudo pré-clínico indispensavelmente precede o teste de novas substâncias em humanos. No entanto, para o estudo da ansiedade e da depressão os modelos animais representam um fator limitante, já que estas patologias não podem ser reproduzidas plenamente em animais, pois são estados característicos da espécie humana. Assim, a

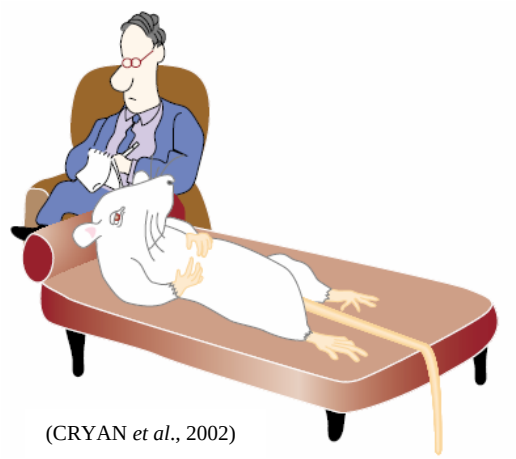
ansiedade e a depressão são apenas modeladas e não reproduzidas em procedimentos utilizando animais de experimentação (GEYER & MARKOU, 2000; ANDREATINI *et al*., 2001).

Alguns critérios devem ser estabelecidos para que um modelo animal seja aceito como modelo de uma desordem psiquiátrica, ou seja, os modelos animais devem ter validade preditiva, validade de face e validade de construção (CRYAN & HOLMES, 2005; PETIT-DEMOULIERE *et al.*, 2005). A validade preditiva refere-se à sensibilidade do modelo em reconhecer drogas com ou sem valor terapêutico em humanos (isomorfismo farmacológico) na patologia em que está sendo estudada. A validade de face refere-se à semelhança entre o comportamento exibido pelo animal e os sintomas específicos da condição humana. A validade de construção implica em homologia, ou correspondência direta, entre o modelo animal e os processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos (GEYER & MARKOU, 2000; PETIT-DEMOULIERE *et al.*, 2005). No estudo da ansiedade e depressão, os modelos animais possuem alto grau de validade preditiva, ou seja, identifica-se como um modelo o procedimento que é sensível a drogas utilizadas na clínica para o tratamento do transtorno a ser modelado. O grau de validade de face e de construção é bastante limitado e não é facilmente identificável.

Dentre os procedimentos para o estudo da depressão, o Teste do Nado Forçado é o modelo mais freqüentemente utilizado. É um modelo de baixo custo, rápido e que possui uma grande sensibilidade a todas as classes de antidepressivos. O procedimento foi descrito para ratos por PORSOLT e colaboradores (1977a, b) e posteriormente adaptado para camundongos (PORSOLT *et al*., 1977c), o animal de experimentação utilizado no presente estudo.

Por outro lado, as desordens de ansiedade podem ser representadas em mais de trinta modelos animais (RODGERS *et al*., 1997*)*, muitos deles baseados no comportamento exploratório dos roedores, com procedimentos que exploram a tendência ao conflito entre se aproximar e se esquivar de uma área potencialmente perigosa (CRYAN & HOLMES, 2005). Dentre os diferentes procedimentos experimentais para o estudo da ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado parece ser adequado para detecção de substâncias ativas no tratamento dos transtornos de ansiedade generalizada (FILE, 1990), enquanto o Teste de Esconder Esferas parece ser mais sensível a substâncias utilizadas para o tratamento do transtorno obsessivo compulsivo (NJUNG'E & HANDLEY, 1991).

Assim, considerando a necessidade de novas alternativas para o tratamento da ansiedade e depressão, a importância de espécies vegetais como fonte de novos compostos com atividade biológica, as indicações populares para a espécie em estudo e nossos resultados preliminares, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar a potencial atividade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre modelos experimentais de depressão e ansiedade.



(CRYAN *et al*., 2002)

# *Objetivos*

## *II. Objetivo Geral:*

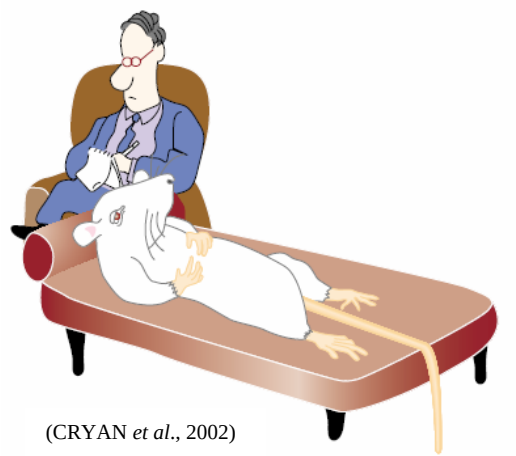
Considerando as indicações populares para o uso da espécie vegetal, o presente trabalho teve como objetivo geral proceder à avaliação, em camundongos, do efeito do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre modelos experimentais sensíveis a drogas antidepressivas e ansiolíticas.

### *Objetivos específicos*

Submeter animais pré-tratados com o óleo essencial à avaliação da presença de atividade antidepressiva, utilizando como modelo experimental o Teste do Nado Forçado;

Submeter animais pré-tratados com o óleo essencial à avaliação da presença de atividade ansiolítica, utilizando como modelos experimentais procedimentos relacionados com o transtorno de ansiedade generalizada (Labirinto em Cruz Elevado) e o transtorno obsessivo compulsivo (Teste de Esconder Esferas);

Em animais pré-tratados com o óleo essencial, avaliar a integridade do sistema motor, indispensável para o bom desempenho nos modelos de depressão e ansiedade.



(CRYAN *et al*., 2002)

# Material e Métodos

## *III. Material e Métodos*

### *3.1) A Planta*

A espécie *Rosmarinus officinalis*, pertencente à família Lamiaceae, é nativa da região do Mediterrâneo e amplamente utilizada na medicina popular no México, Guatemala e outros países da América (HEINRICH *et al*., 2006). É conhecida popularmente como alecrim, alecrim-de-casa, alecrim-comum, alecrim-de-jardim, alecrim-de-horta, rosmarinho, rosmarino. É uma planta de porte subarbustivo lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5 m de altura (Fig. 01). Suas folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Suas flores são azuladas, pequenas e de aroma forte e muito agradável (LORENZI & MATOS, 2002).

O material vegetal foi coletado de exemplares cultivados no *campus* da UNESP de Botucatu e uma exsicata depositada no herbário "Irina D. Gemtchujnicov" – BOTU, Depto. de Botânica, IBB, UNESP, sob o número 25906.

***Figura 01. Rosmarinus officinalis* L.**
Lorenzi e Matos, 2002

### *3.2) Extração do óleo essencial (OE)*

Imediatamente após a coleta, as folhas frescas de *Rosmarinus officinalis L.* foram submetidas à extração do OE por hidrodestilação, com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger. O material vegetal foi colocado dentro de um balão volumétrico contendo água destilada acoplado a uma manta aquecedora. O recipiente e seu conteúdo foram aquecidos até ebulição da água e o vapor resultante, ao passar por um condensador, retornou ao estado líquido. Esse líquido foi coletado em um novo recipiente onde, por princípio de densidade, a água foi separada do OE, o qual foi armazenado ao abrigo da luz e a baixa temperatura até o momento da utilização nos experimentos. Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas duas coletas de material vegetal para extração de quantidade suficiente de OE.

### *3.3) Análise da composição do óleo essencial*

A identificação dos principais componentes do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (Equipamento da marca Shimadzy, QP-5000) cujos picos dos espectros foram comparados com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 lib.), literatura (McLAFFERTY & SAUFFER, 1989) e dos índices de retenção (ADAMS, 2001). A análise da composição dos OE foi feita no Instituto Agronômico de Campinas, sob coordenação da Profª. Drª. Márcia Ortiz .

### *3.4) Animais e procedimentos gerais*

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (suíço) machos, com aproximadamente 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos por no mínimo uma semana antes dos procedimentos experimentais no Biotério do Departamento de Farmacologia reunidos em grupos de 15 animais por gaiola, em salas com temperatura (21 ± 2 ºC) e ciclo claro/escuro (12h) controlados, com água fresca e comida *ad libitum* até duas horas antes do início dos procedimentos experimentais.

No dia do teste os animais foram transportados do Biotério do Departamento de Farmacologia para o Laboratório de Comportamento, onde permaneceram por 2 horas para adaptação. O laboratório de comportamento é uma sala isolada com controle de temperatura, luminosidade e exaustão de ar, onde nenhuma outra atividade é realizada durante os experimentos. Todos os experimentos foram realizados no período da tarde, para evitar variações do ciclo circadiano, exceto o Teste de Esconder Esferas que foi realizado no período da manhã.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), cujos protocolos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu.

### *3.5) Drogas e tratamentos*

Todas as soluções foram preparadas momentos antes do início de cada procedimento experimental. O óleo essencial (OE) foi solubilizado em Tween 80®

(polioxietileno-sorbitan monooleato) a 2%, e este veículo foi utilizado nos procedimentos experimentais para tratamento do grupo controle negativo (TW). O OE foi avaliado nas doses de 125mg/kg, 250mg/kg ou 500mg/kg, e assim como para o Tween, o volume foi fixado em 10ml/kg.

Para a validação do procedimento, cada sessão experimental foi complementada por um grupo de animais tratado com uma droga-padrão ativa no modelo em execução (controle positivo). O Diazepam (DZ) 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo no Labirinto em Cruz Elevado e a Imipramina (IM) 30 mg/kg foi utilizada no Teste do Nado Forçado e no Teste de Esconder Esferas. As drogas-padrão foram dissolvidas em solução fisiológica (NaCl 0,9%), administradas por via intraperitoneal no volume final de 10 ml/kg em animais submetidos exatamente ao mesmo procedimento que aqueles tratados com OE ou TW.

### *3.6) Avaliação da atividade antidepressiva e atividade motora.*

#### *3.6.1) Teste do Nado Forçado ("Forced Swimming Test")*

O Teste do Nado Forçado é o modelo farmacológico "*in vivo*" mais utilizado para avaliação da atividade antidepressiva, cuja imobilidade reflete o estado de baixo humor relacionado com a impossibilidade de escape durante a situação experimental (PORSOLT *et al.*, 1977).

O comportamento avaliado se baseia na resposta de "desamparo aprendido" (GEYER & MARKOU, 2000) na qual o animal é submetido a um estresse incontrolável representado pela natação em um ambiente confinado. Os animais inicialmente nadam e tentam encontrar uma saída, e não obtendo êxito assumem uma postura imóvel que ocorre cada vez mais precocemente com a repetição do procedimento. Assim, a sessão de treino,

realizada 24 horas antes, representa o período de estresse incontrolável e inescapável que determina a ocorrência precoce de imobilidade na sessão de teste.

O protocolo é realizado em um recipiente cilíndrico com 21 cm de altura e 20,5 cm de diâmetro, com uma coluna d´água de 13 cm, à temperatura de 23 ºC (± 1 ºC). Durante o treino cada animal permanece na água durante 15 minutos e na sessão de teste por 5 minutos, durante os quais tem seu comportamento registrado em fita de vídeo para análise posterior. Os comportamentos executados são classificados a cada 10 segundos em: natação, escalada ou imobilidade.

O comportamento de natação é caracterizado por movimentos, usualmente horizontais, através do recipiente; o comportamento de escalada é caracterizado por movimentos ascendentes das patas dianteiras, geralmente, ao longo das paredes do recipiente; a imobilidade é definida quando nenhuma atividade adicional é realizada, com os animais executando movimentos mínimos para manter suas cabeças acima da água (CRYAN *et al.*, 2002). Estes comportamentos estão ilustrados na figura 02.

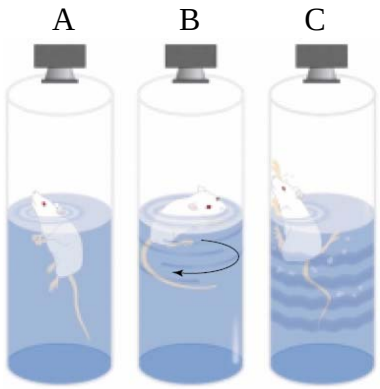



***Figura 02.*** Ilustração dos comportamentos avaliados no Teste do Nado Forçado
A) Comportamento de Imobilidade
B) Comportamento de Nadar
C) Comportamento de Escalar
(Adaptado de Cryan *et al.*, 2002)

A este procedimento experimental foram submetidos animais pré-tratados com o OE nas doses 125mg/kg, 250mg/kg ou 500mg/kg. O OE, o TW e a IM (controle positivo) foram administrados 23 h, 5 h e 1 h antes da sessão de teste.

Ao término do período de natação os animais foram retirados cuidadosamente do recipiente, secos com um papel toalha e colocados de volta nas suas respectivas caixas.

### *3.6.2) Teste da Barra Giratória ("Rota-rod")*

Trinta minutos antes do Teste do Nado Forçado, os mesmos animais foram avaliados quanto a integridade do sistema motor, já que alterações motoras podem dificultar a execução dos comportamentos esperados (nadar, escalar ou imobilidade).

O procedimento da barra giratória, descrito por Dunham e Miya (1957), é capaz de detectar prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade e é executado em um aparelho composto por uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e de 50 cm de comprimento localizada a cerca de 30 cm de altura a partir da bancada (Fig. 03).

***Figura 03.*** Barra giratória ("Rota-rod")

O procedimento consiste na avaliação da capacidade do animal de se manter sobre uma barra que gira a uma velocidade constante (5 rpm), permitindo-se até três reconduções após queda, durante o período de avaliação que é de 1 minuto. Considerando que uma parcela dos animais pode não ser naturalmente aptos a se manter sobre a barra giratória, procedeu-se a uma pré-seleção na qual foram descartados de todo o procedimento os animais não-aptos. Esta pré-seleção consistiu de uma sessão experimental como a descrita anteriormente, realizada no dia anterior ao do teste. A figura 04 ilustra o procedimento completo.

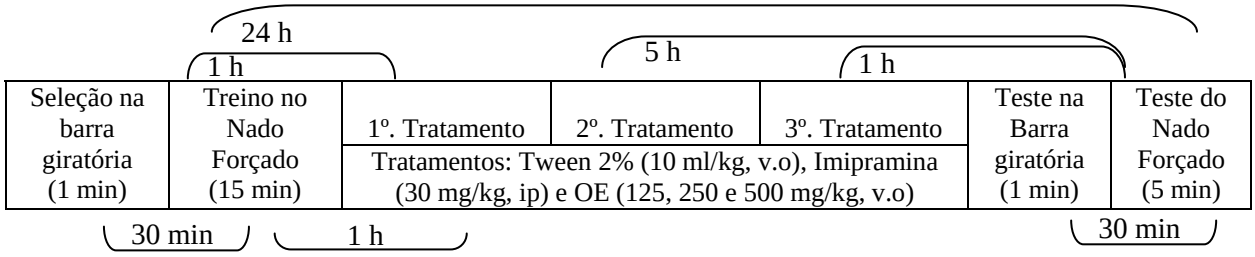



***Figura 04.*** Protocolo completo do Teste do Nado Forçado e da Barra Giratória.

### *3.7) Avaliação da atividade ansiolítica.*

#### *3.7.1) Labirinto em cruz elevado ("Elevated Plus-Maze")*

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow e colaboradores (1985) e validado por Lister (1987) para camundongos, e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O suporte é confeccionado em madeira e as paredes laterais dos braços fechados e o

chão são confeccionados em acrílico recoberto com papel Contact® preto. O aparelho fica elevado a uma altura de 50 cm do nível do chão (Fig. 05).

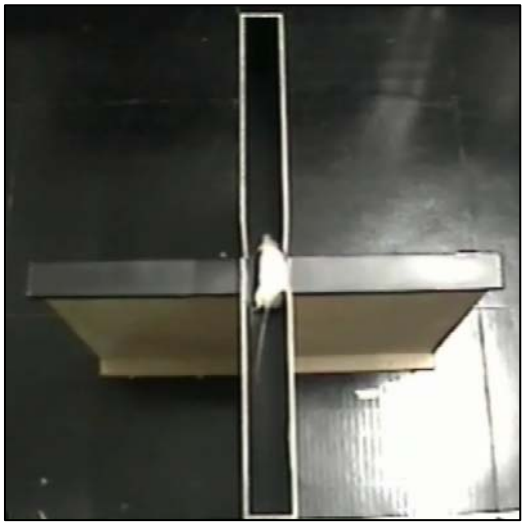


***Figura 05***. Labirinto em Cruz Elevado.

A funcionalidade deste teste como modelo animal de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural dos roedores por espaços abertos. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são indicadores inversamente relacionados à ansiedade (PELLOW *et al*., 1985). Assim, animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a aumentar o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto animais tratados com drogas ansiogênicas tendem a ficar mais tempo nos braços fechados.

Meia hora após o tratamento, os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços abertos e os seus comportamentos registrados por 5 minutos por uma câmera para análise posterior.

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: freqüência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados; tempo no centro e números de vezes que executou o comportamento de levantar (“rearing”). Este comportamento é representado pela postura em que o animal se apóia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima, tocando ou não com as patas anteriores as paredes do Labirinto.

### *3.7.2) Teste de Esconder Esferas ("Marble Burying Test")*

Este procedimento foi descrito para ratos por Poling e colaboradores (1981) e posteriormente validado para camundongos (BROEKKAMP *et al*., 1986) visto que os roedores exibem o comportamento de esconder (enterrar) objetos aversivos como uma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados como as esferas de vidro.

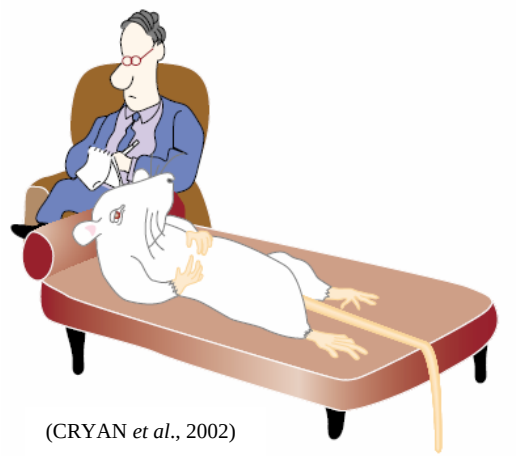
Para o procedimento experimental foram utilizadas caixas de policarbonato de 27 x 16 x 13 cm as quais foram forradas com uma camada de 5 cm de maravalha sobre a qual foram distribuídas ao acaso 25 esferas de vidro com 1,5 cm de diâmetro (Fig. 06). Essas caixas foram cobertas com uma placa de acrílico transparente com pequenos furos para ventilação. Após 30 minutos do tratamento cada animal foi colocado em uma caixa individual e ao término de 30 minutos ele foi retirado e o número de esferas de vidro escondidas pelos animais foi registrado. Foram consideradas escondidas as esferas que foram completamente cobertas pela maravalha (PULTRINI *et al.*, 2006).

Considerando a grande variabilidade no número de esferas escondidas entre um animal e outro, foram submetidos ao procedimento experimental apenas aqueles que esconderam durante os três dias consecutivos anteriores ao teste, pelo menos 13 das 25 esferas (BROEKKAMP *et al*., 1986; NJUNG´E & HANDLEY, 1991).

***Figura 06***. Teste de Esconder Esferas

### *3.8) Análise estatística*

Os resultados quantitativos foram comparados por análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de testes de contraste *a posteriori*, quando necessário. As proporções referentes aos resultados qualitativos foram comparadas pelo teste exato de Fischer. Foram consideradas significantes as probabilidades associadas a $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.



(CRYAN *et al*., 2002)

# Resultados e Discussão

## *IV. Resultados e Discussão:*

Apesar dos avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas produtos originados de plantas têm contribuído de forma importante como uma fonte de novos agentes terapêuticos (CALIXTO, 2000). Muitos produtos de origem natural com potencial psicoterapêutico foram introduzidos na clínica nos últimos anos, como: Ginseng, Ginko Biloba, St. John's Wort e Kava-Kava (ZHANG, 2004).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste na coleta de dados de espécies utilizadas pela população. Esta estratégia é considerada como uma pré-triagem para a descoberta de sua utilidade terapêutica, sendo mais eficaz do que a escolha ao acaso (ELISABETSKY & SOUZA, 2004).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. é aromática, ou seja, produz óleo essencial, e nativa da Europa. É amplamente cultivada no Brasil e apresenta varias aplicações terapêuticas na medicina popular, inclusive para a depressão (HEINRICH *et al*., 2006).

Os óleos essenciais são definidos pela ISO (*Internacional Standard Organization*), como compostos orgânicos obtidos de partes de plantas por destilação por arraste de vapor d'água. Em geral são misturas complexas de substâncias lipofílicas, odoríferas e líquidas, com aparência oleosa à temperatura ambiente, com solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas (hidrolatos). Seus constituintes variam, mas os derivados terpenóides estão presentes com freqüência, sendo acoplados a funções orgânicas, como álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, entre outros, com potencial para atividade biológica (SPITZER, 2004).

### *4.1) Rendimento do óleo essencial (OE)*

A tabela 1 mostra o período das coletas, a massa total de amostra vegetal fresca obtida, os respectivos volumes de OE obtidos e o rendimento médio de cada extração.

***Tabela 01.*** Dados da extração do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

| Período das coletas | Massa da amostra | Volume de OE extraído | Rendimento (v/p) |
|---|---|---|---|
| ago/06 | 824 g | 4,6 ml | 0,56% |
| jul/08 | 615 g | 5,5 ml | 0,89% |

### *4.2) Composição do óleo essencial*

A análise dos principais componentes do óleo essenciais (OE) foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas pela Profa. Dra. Márcia Ortiz do Instituto Agronômico de Campinas. A tabela 02 mostra os resultados da composição do OE, cujo cromatograma está reproduzido na figura 07 na qual se observa que 82% é formado por 1,8 cineol, canfora, mirceno e $\alpha$-pineno.

Embora possam ser observadas variações significativas na composição química do óleo essencial obtido de *Rosmarinus officinalis*, de acordo com a origem geográfica, época de coleta e técnica de extração, os compostos majoritários encontrados estão de acordo com a maioria dos trabalhos relacionados na literatura (ATTI-SANTOS *et al.*, 2005; MIRESMAILLI *et al.*, 2006).

***Tabela 02.*** Composição do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

| Pico | Substância | [%] |
|---|---|---|
| 1 | tricicleno | 0,40 |
| 2 | α-pineno | 10,59 |
| 3 | α-fencheno | 4,62 |
| 4 | β-pineno | 5,60 |
| 5 | mirceno | 12,39 |
| 6 | α-terpineno | 0,51 |
| 7 | orto-cimeno | 0,82 |
| 8 | 1,8-cineol | 29,72 |
| 9 | γ-terpineno | 1,28 |
| 10 | terpinoleno | 0,32 |
| 11 | linalol | 0,86 |
| 12 | canfora | 29,45 |
| 13 | borneol | 1,08 |
| 14 | 4-terpineol | 0,79 |
| 15 | α-terpineol | 0,91 |
| 16 | verbenona | 0,67 |
| **TOTAL** | | **100** |

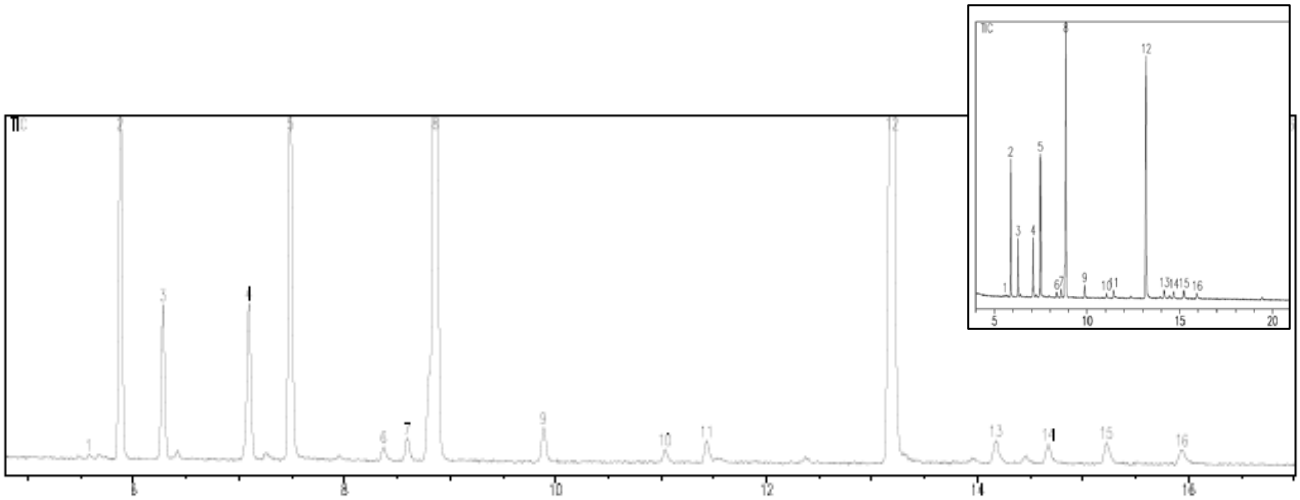


***Figura 07***. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

### *4.3) Avaliação da atividade antidepressiva e atividade motora*

O resultado do principal parâmetro observado no Teste do Nado Forçado é apresentado na figura 08, na qual pode-se observar que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. na dose de 500mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, quando comparado ao grupo Tween. Os grupos tratados com as doses de 125mg/kg, 250mg/kg não apresentaram alterações neste parâmetro.

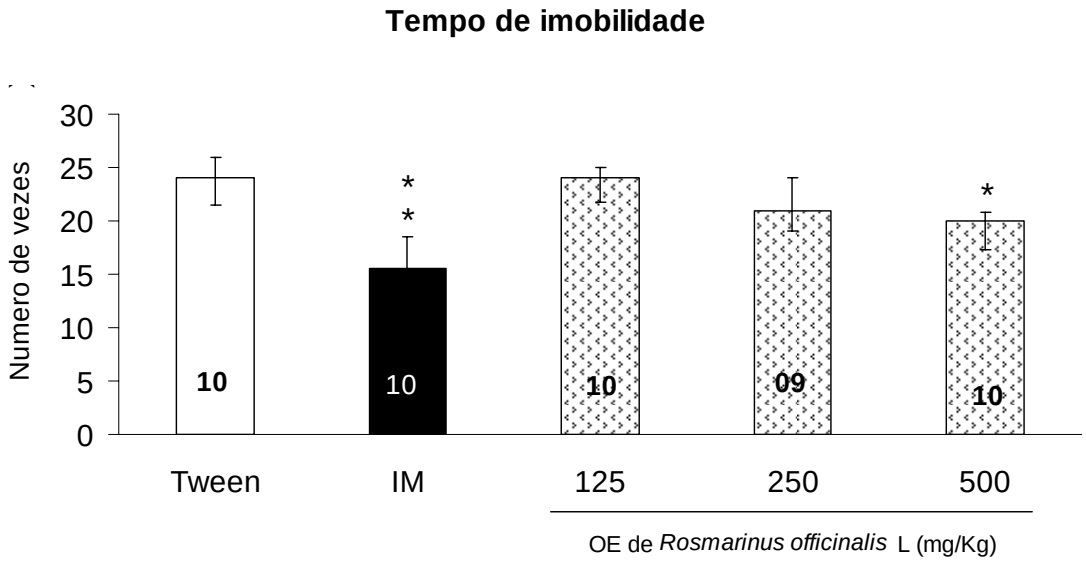



***Figura 08.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem do comportamento de imobilidade registrado a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no Teste do Nado Forçado em camundongos machos tratados 23h, 5h e 1 hora com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Imipramina 30mg/kg (i. p.). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo.
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney).

O Teste do Nado Forçado é baseado na observação de que quando roedores são colocados em um cilindro com água na qual não exista a possibilidade de escape, inicialmente realizam vários movimentos na tentativa de sair desta situação e após alguns minutos exibem um comportamento de imobilidade. Neste contexto, é importante enfatizar que a imobilidade

neste teste parece ser o resultado de uma incapacidade ou relutância em manter o esforço, em vez de uma hipoatividade generalizada (CRYAN & HOLMES, 2005). O tempo de imobilidade é sem dúvida o principal parâmetro avaliado no Teste do Nado Forçado e é utilizado como um indicador de desespero comportamental (GUTIÉRREZ-GARCIA & CONTRERAS, 2009).

Deste modo, a diminuição do tempo de imobilidade observado na dose de 500mg/kg do OE de *Rosmarinus officinalis* L., parece indicar a presença da atividade compatível com a redução do desespero comportamental, parâmetro experimental associado à atividade antidepressiva.

Este procedimento experimental tem grande sensibilidade para todas as classes de antidepressivos, independentemente do mecanismo de ação (PETIT-DEMOULIERE *et al.*, 2005). No entanto, na descrição do modelo, Porsolt e colaboradores (1977a, c) alertam para a possibilidade de resultado falso positivo em animais tratados com drogas psicoestimulantes como derivados anfetamínicos e cafeína, situações nas quais a redução da imobilidade é acompanhada de aumento de atividade geral medida no campo aberto.

As indicações populares da espécie incluem efeito estimulante (VIERA, 1992) motivo pelo qual os animais foram submetidos ao teste da barra giratória, sensível a alterações motoras resultantes da ação de psicoestimulantes. Como pode ser observado na figura 09, o tratamento com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não alterou a atividade motora dos animais nas mesmas doses utilizadas no Teste do Nado Forçado, indicando que a redução no tempo de imobilidade do animal não é conseqüência de possível efeito estimulante presente no OE. Tanto os animais tratados com imipramina (controle positivo) quanto com as diferentes doses de OE mostraram desempenho na barra giratória similar ao do grupo Tween.

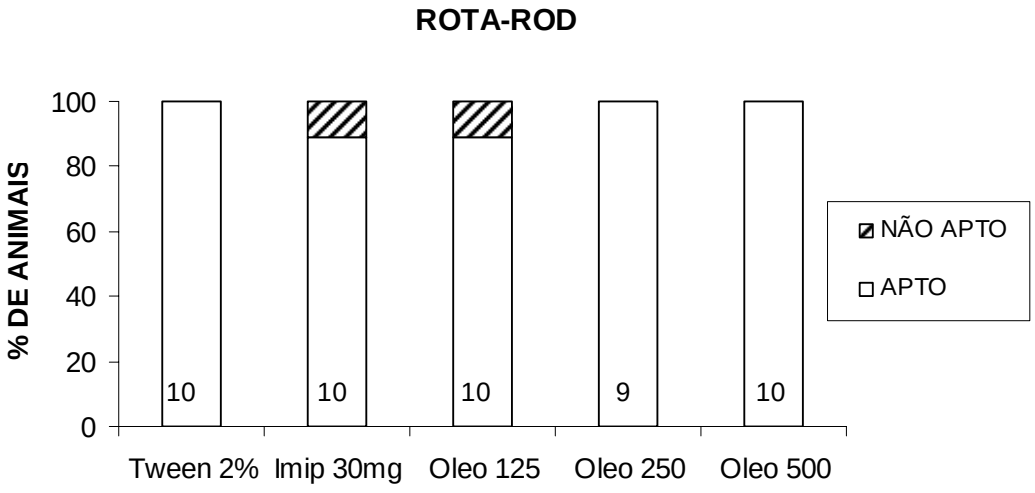



***Figura 09.*** Desempenho dos camundongos no Teste da Barra Giratória após 30 minutos do último tratamento com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Imipramina 30mg/kg (i. p.). Dados apresentados em porcentagem de animais classificados como Aptos ou Não-Aptos na Barra Giratória (5 r.p.m). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo.

Cryan e colaboradores (2002) classificam os comportamentos observados durante o teste do nado forçado em três categorias: escalar, nadar e imobilidade, e sugere que esta categorização parece também ser adequada para distinguir o mecanismo de ação dos diferentes antidepressivos. Assim, a redução do tempo de imobilidade por drogas que atuam sobre as catecolaminas (especialmente noradrenalina) é acompanhada de aumento no comportamento de escalar, enquanto drogas que atuam sobre o sistema serotonérgico reduzem a imobilidade e aumentam o comportamento de nadar.

Os resultados dos comportamentos de escalar e nadar estão expostos nas figuras 10 e 11, respectivamente.

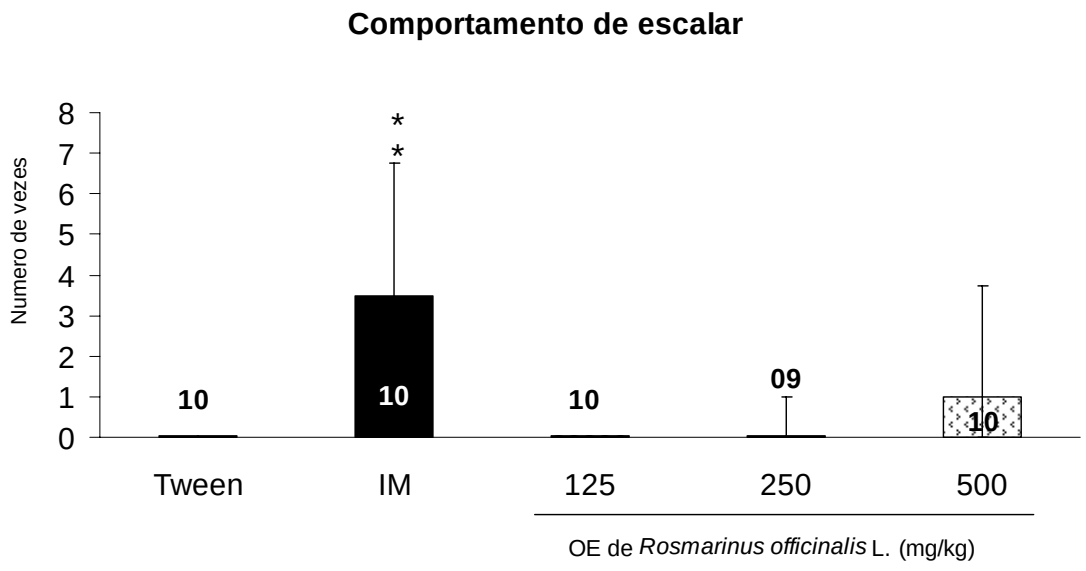



***Figura 10.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem do comportamento de escalar registrados a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no Teste do Nado Forçado em camundongos machos tratados 23h, 5h e 1 hora com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Imipramina 30mg/kg (i. p.).
** $p \leq 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo.

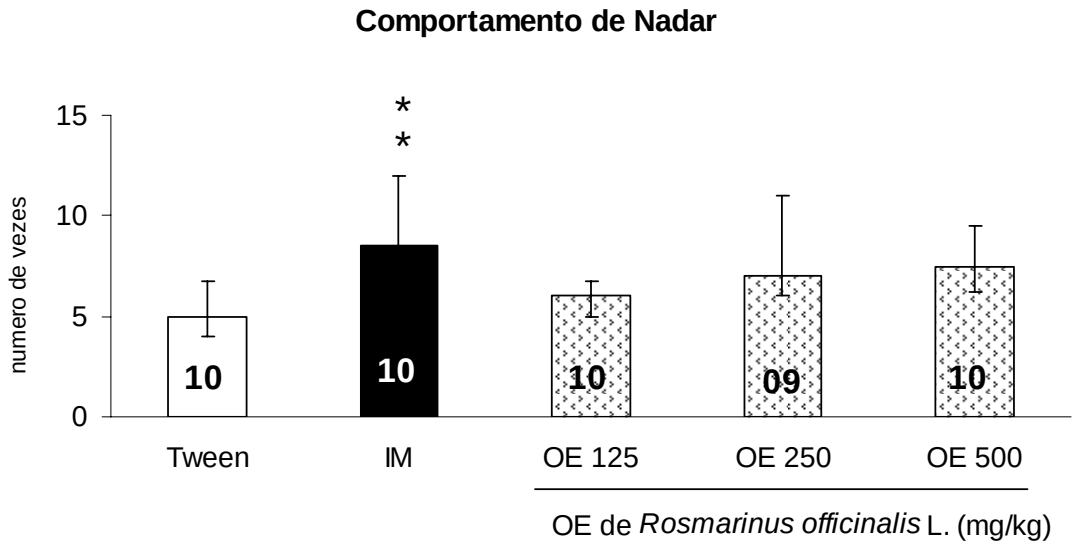



***Figura 11.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem do comportamento de nadar registrados a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no Teste do Nado Forçado em camundongos machos tratados 23h, 5h e 1 hora com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Imipramina 30mg/kg (i. p.).
** $p \leq 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo.

Em nosso estudo não foi possível diferenciar uma predominância do comportamento de escalar e nadar nos animais tratados com o OE, que se comportaram de modo similar ao grupo Tween.

A Imipramina, utilizado como controle positivo, é um inibidor não seletivo de recaptação de noradrenalina e serotonina, então o esperado, de acordo com o proposto por Cryan e colaboradores (2002) em ratos, era que interferisse de modo indistinto em ambos os comportamentos ativos (escalar e nadar), como de fato ocorreu (Fig. 10 e 11).

Drogas que atuam de modo seletivo sobre a recaptação de noradrenalina ou serotonina mostram o predomínio de um dos comportamentos ativos em ratos (CRYAN et *al*., 2002), e pudemos observar este predomínio também em camundongos. Os detalhes desta observação compõem o Anexo 1.

Assim, a não observância da diferenciação entre os comportamentos ativos após o tratamento com OE de *Rosmarinus officinalis* L. não permite qualquer consideração a respeito do possível mecanismo de ação.

### *4.4) Avaliação da atividade ansiolítica.*

#### 4.4.1) *Labirinto em Cruz Elevado*

Os diferentes parâmetros avaliados no Labirinto em Cruz Elevado são correlacionados tanto com a atividade ansiolítica quanto com a atividade motora e exploratória, com a possibilidade de diferentes interpretações dos comportamentos (RODGERS *et al.*, 1997: ESPEJO, 1997). Este é um modelo baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, e os roedores tendem a evitar locais desprotegidos e elevados (GRAEFF & GUIMARÃES, 2000), aqui representados pelos braços abertos. Drogas que na clínica são ativas no tratamento dos transtornos de ansiedade

generalizada, em especial os derivados benzodiazepínicos, aumentam a interação dos animais com estes ambientes aversivos, enquanto o oposto ocorre em animais tratados com drogas ansiogênicas como, por exemplo, a cafeína. (LISTER, 1987).

Assim, segundo Rodgers e colaboradores (1997), os principais parâmetros no Labirinto em Cruz Elevado associados à ansiedade são a freqüência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, considerados de modo relativo ao total de entradas e ao tempo total de permanência no Labirinto.

Os resultados obtidos após o tratamento com OE estão representados das figuras 12 a 14, nas quais não se observam diferenças significantes entre os grupos tratados com OE e o grupo Tween.

A figura 12 mostra a porcentagem do tempo de permanência em cada compartimento do labirinto (TBA: braços abertos; TBF: braços fechados; TC área central), e a não observação de diferenças decorrentes do tratamento com OE sugere a ausência de atividade ansiolítica semelhante à observada com os derivados benzodiazepínicos, padrão para o tratamento de transtorno de ansiedade generalizada. Este perfil de atividade é reforçado pelo outro parâmetro avaliado, o número de entradas nos braços abertos, apresentado na figura 13, no qual também apenas a droga padrão mostrou atividade.

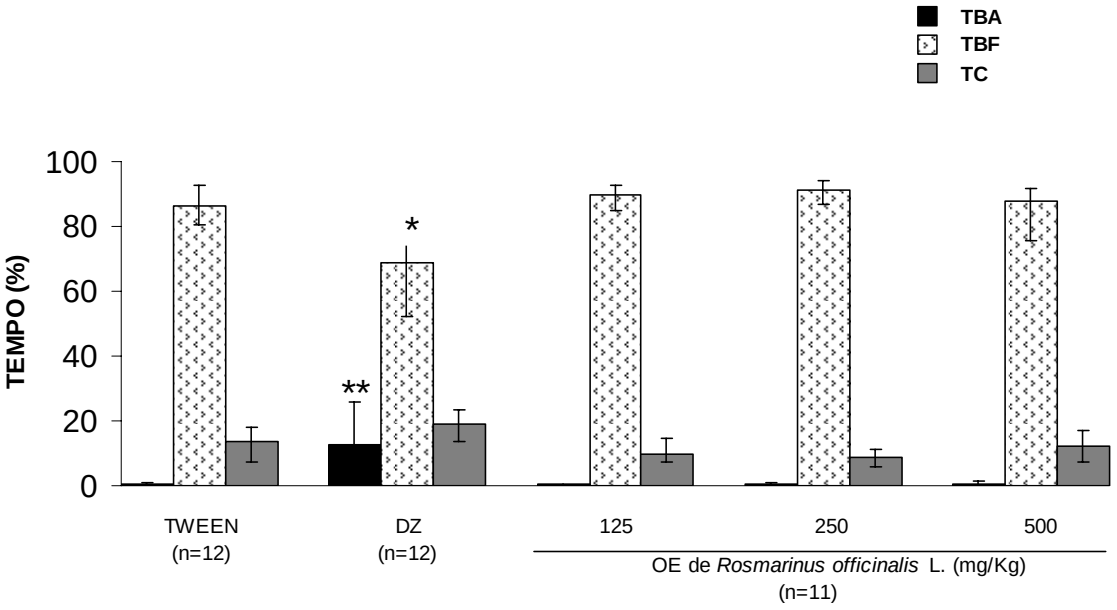



***Figura 12.*** Tempo de permanência nos braços abertos (TBA), nos braços fechados (TBF) ou no centro (TC) apresentado em porcentagem em relação ao tempo total de permanência no Labirinto, após 30 minutos do tratamento com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou diazepam 1 mg/kg (i. p.).
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney). n = número de animais por grupo.

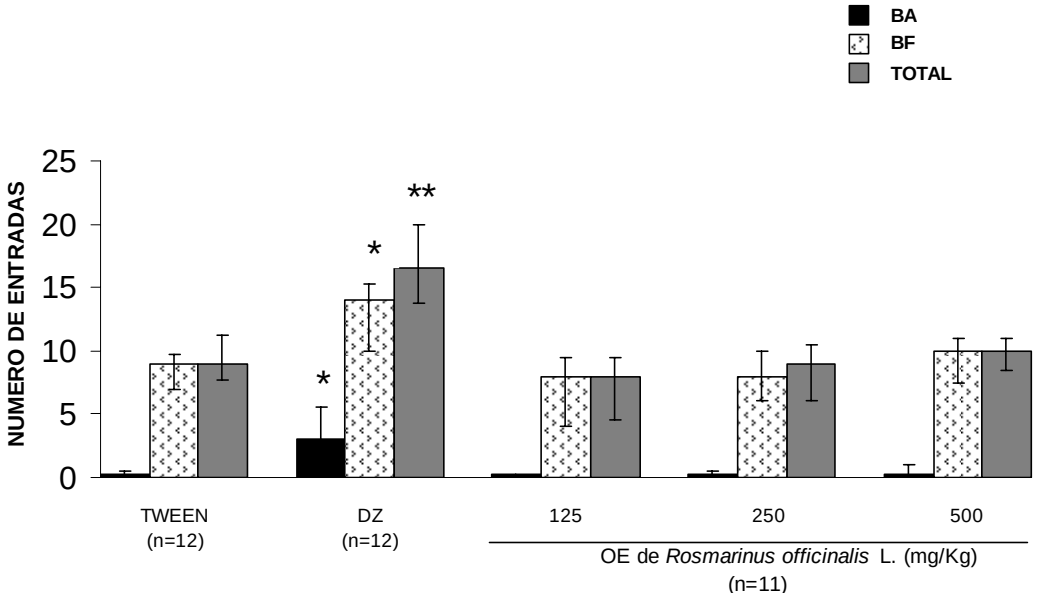



***Figura 13.*** Número de entradas nos braços abertos (BA), nos braços fechados (BF) e o Total de entradas (TOTAL), após 30 minutos do tratamento com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou diazepam 1 mg/kg (i. p.).
* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney). n = número de animais por grupo.

O número de entrada nos braços fechados, por outro lado, é definido por Rodgers e colaboradores (1997) como um parâmetro de avaliação de atividade locomotora que, quando alterado, pode perturbar a análise dos resultados da atividade ansiolítica. Os resultados deste parâmetro, também apresentados na figura 13, mostram que o tratamento com OE não interferiu com a atividade locomotora, confirmando a ausência de atividade sobre o sistema motor já observada anteriormente no teste da barra giratória (Fig. 09).

A integridade do sistema motor é importante também para a execução do comportamento de levantar, relacionado com atividade exploratória (ESPEJO, 1997; RODGERS *et al*., 1997). O tratamento com OE não promoveu qualquer alteração neste parâmetro (Fig. 14).

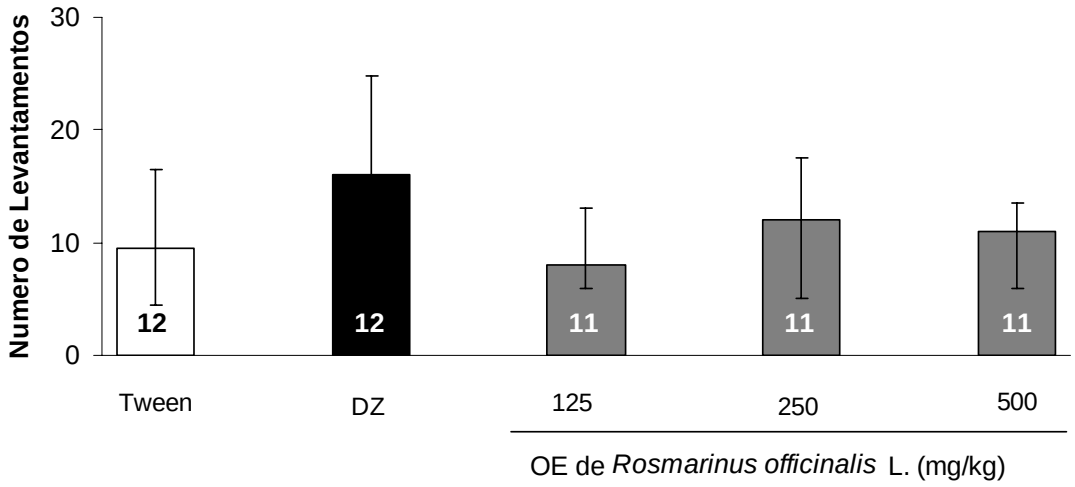



***Figura 14.*** Número Levantamentos ("Rearing") registrados no Labirinto em Cruz Elevado em camundongos machos, após 30 minutos do tratamento com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Diazepam 1mg/kg (i. p.). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo. (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney)

Deste modo, é possível afirmar que o tratamento com OE de *Rosmarinus officinalis* L., nas doses testadas, não modificou os parâmetros avaliados para ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado.

Um resultado importante, porém, é a ausência de efeito deletério sobre a atividade motora ou exploratória (Fig. 14), pois, drogas psicoestimulantes ou depressoras do sistema nervoso central podem promover alterações nos parâmetros avaliados no Labirinto em Cruz Elevado não por seu efeito estimulante ou ansiolítico, mas por alterar a capacidade dos animais exercerem os comportamentos esperados, segundo as mesmas considerações feitas em relação ao resultado da barra giratória.

### *4.4.2) Teste de Esconder Esferas*

O Teste de Esconder Esferas parece estar mais relacionado com o transtorno obsessivo compulsivo do que com o transtorno de ansiedade generalizada, como é o Labirinto em Cruz Elevado. Os resultados obtidos neste procedimento, após o tratamento com OE, estão apresentados na figura 15 na qual é possível observar a redução no número de esferas escondidas pelo grupo de animais tratados com 500mg/kg de OE, quando comparado com o grupo controle..

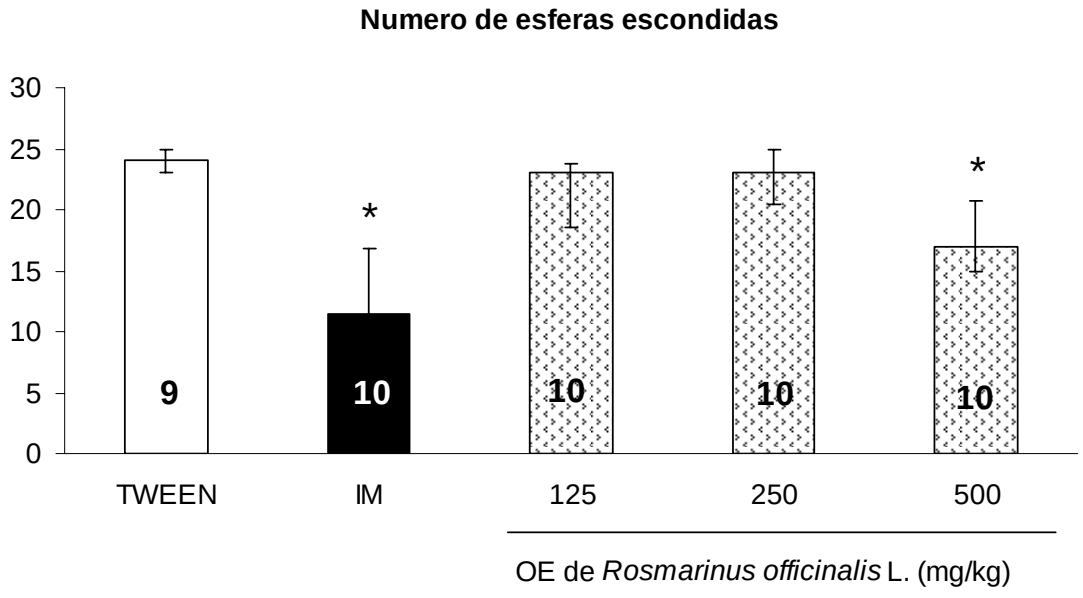



***Figura 15.*** Número de esferas escondidas por **c**amundongos machos tratados após meia hora do tratamento com 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg de OE, Tween 2% (v. o.) ou Imipramina 30mg/kg (i. p.).
* $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann Whitney). Os algarismos dentro da barra indicam o número de animais em cada grupo.

O procedimento experimental do Teste de Esconder Esferas se baseia no comportamento dos animais em esconder objetos que representam ou são associados a estímulos aversivos, sendo considerado um comportamento defensivo. Tal comportamento é observado em ratos e camundongos quando estes enterram alguma fonte de choque, alimentos nocivos ou objetos inanimados sobre uma camada de material (BROEKKAMP *et al*., 1986).

Este teste parece estar mais relacionado com o transtorno obsessivo compulsivo já que alguns fármacos como a clomipramina e os inibidores seletivos da serotonina, efetivos na clínica para esta desordem, diminuem o número de esferas escondidas pelos animais (ICHIMARU *et al*., 1995). Outra evidência de que o procedimento está relacionado a este transtorno diz respeito à habituação. Os animais submetidos a tal procedimento experimental não apresentam comportamento de habituação quando expostos as esferas de vidro, ou seja, continuam a enterrá-las quando reexpostos em dias consecutivos. Tal comportamento de esconder está intimamente relacionado às compulsões (NJUNGE'E & HANDLEY, 1991), diferente de modelos clássicos de transtorno de ansiedade generalizada como o Labirinto em Cruz Elevado, no qual os animais expostos por uma segunda vez já demonstram comportamentos de habituação (LISTER, 1987; FILE, 1990; RODGERS & SHEPHERD, 1993).

Uma visão panorâmica sobre este conjunto de experimentos mostra, de modo sintético, que o tratamento com OE de *Rosmarinus officinalis* L. mostrou atividade sobre o procedimento experimental associado à depressão e ao transtorno obsessivo compulsivo, sem ter tido qualquer indício de atividade sobre o procedimento que avalia o transtorno de ansiedade generalizada ou que mostra interferência sobre a atividade locomotora ou exploratória.

Se por um lado, a visão clássica da atividade antidepressiva e ansiolítica era claramente associada, respectivamente, aos derivados tricíclicos e aos benzodiazepínicos,

atualmente esta dicotomia não é absoluta. Conseqüentemente, os modelos animais para estudo destas desordens eram classificados de acordo com a sua sensibilidade para tais classes de fármacos, mostrando validade preditiva associada aos antidepressivos e benzodiazepínicos. Porém, após a introdução dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) na prática clínica este conceito tradicional foi reformulado (BORSINI *et al*., 2002).

As evidências do envolvimento do sistema serotonérgico na patogênese da ansiedade e da depressão (TAYLOR *et al*., 2005) são apoiadas pela experimentação animal (CRYAN & HOLMES, 2005) e pela experiência clínica (BALLENGER, 2000).

Há mais de duas décadas a literatura agrupa estudos multicêntricos que estabelecem a eficácia de inibidores – seletivos ou não – da recaptação de serotonina no tratamento clínico do Transtorno obsessivo compulsivo (KAPLAN & HOLLANDER, 2003), embora raramente os pacientes fiquem assintomáticos (MARQUES, 2001).

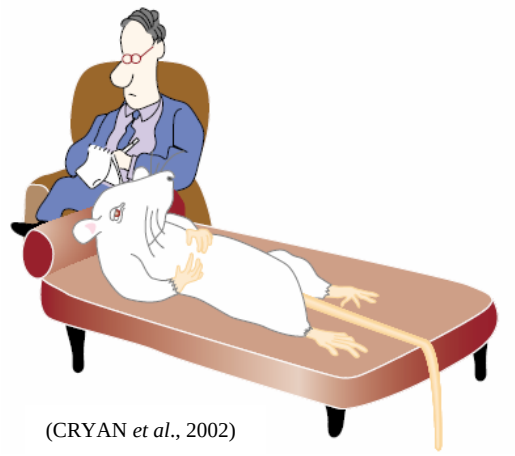
O procedimento experimental que modela, em roedores, o Transtorno obsessivo compulsivo é o Teste de Esconder Esferas. O tratamento agudo com a maioria dos antidepressivos reduz a quantidade de esferas escondidas pelos camundongos, mostrando a alta sensibilidade do teste (BORSINI *et al*., 2002; ICHIMARU *et al*., 1995). Esta sensibilidade é mais evidente para os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, já em doses equivalentes a Clomipramina (inibidor de recaptação não seletivo para serotonina e noradrenalina) é menos efetiva e a Desipramina (inibidor de recaptação com maior seletividade para noradrenalina) não apresentou efeito (ICHIMARU *et al.,* 1995). Estes resultados experimentais são endossados pela terapêutica do transtorno obsessivo compulsivo, que privilegia os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e a clomipramina (KAPLAN & HOLLANDER, 2003).

A atividade observada no OE de *Rosmarinus officinalis* L. não parece ser inespecífica, já que não se observou interferência nas abordagens para verificar alterações

motoras ou de comportamento exploratório. O procedimento do Labirinto em Cruz Elevado é altamente sensível aos derivados benzodiazepínicos, que atuam modulando a neurotransmissão inibitória mediada por GABA. As drogas antidepressivas não apresentam qualquer atividade neste modelo experimental (BORSINI *et al.*, 2002).

Assim, é possível sugerir que a atividade anti-imobilidade no Teste do Nado Forçado, e a redução do comportamento defensivo no Teste de Esconder Esferas presentes no OE de *Rosmarinus officinalis* L. tem o perfil semelhante ao de drogas antidepressivas. A tentativa de identificação de qual sistema de neurotransmissão estaria envolvido, por meio da avaliação do comportamento ativo (nadar ou escalar) realizado no Teste do Nado Forçado não foi bem sucedida. Esta tentativa de distinção também não foi possível em investigação recente do envolvimento do sistema monoaminérgico na atividade antidepressiva do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* (MACHADO *et al.*, 2009).

O estudo detalhado do mecanismo de ação envolvido na atividade do OE de *Rosmarinus officinalis* L. é, certamente, o próximo passo nesta investigação que deverá, ainda, abordar aspectos farmacocinéticos e de toxicidade da planta, com o objetivo de disponibilizar uma nova alternativa para terapêutica da depressão.



(CRYAN *et al*., 2002)

# Conclusão

## *V. Conclusão:*

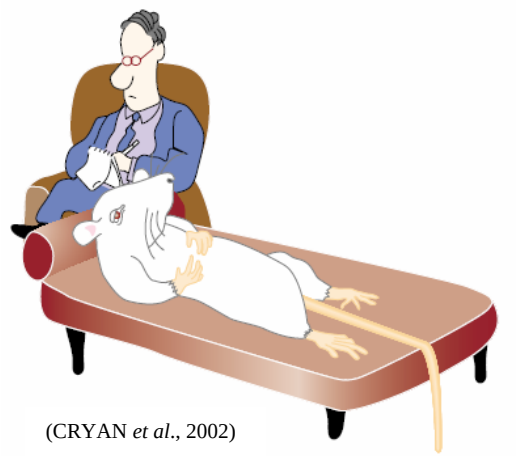
- O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., na dose de 500 mg/kg, apresentou efeito anti-imobilidade no Teste do Nado Forçado, o que pode ser indicativo de atividade antidepressiva;

- Não foi possível, com a metodologia utilizada, fazer a identificação do sistema de neurotransmissão envolvido na atividade anti-imobilidade;

- Na mesma dose, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. levou a redução do comportamento defensivo no Teste de Esconder Esferas, preditivo de atividade sobre o Transtorno Obsessivo Compulsivo;

- Nas doses avaliadas, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não apresentou atividade no Labirinto em Cruz Elevado, procedimento experimental sensível a drogas semelhantes aos benzodiazepínicos;

- A avaliação da integridade do sistema motor não identificou comprometimento, sugerindo a especificidade dos efeitos observados nos outros testes.



(CRYAN *et al*., 2002)

# Referências Bibliográficas

## *VI. Referências:*

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, 2001.

ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. S. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 32 (9), p.1121-1126, 1999.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** v. 23(4), p. 233- 242, 2001.

ARGYROPOULOS, S. V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J.; The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacology & Therapeutics** v. 88, p. 213- 227, 2000.

ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D. *et al*., Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology in International Journal.** v. 48(6), p. 1035-1039, 2005.

BALLENGER, J. C. Anxiety and Depression: Optimizing Treatments**. Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry.** v. 2(3), p. 71-79, 2000.

BERTON, O.; NESTLER, E. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 7, p. 137- 151, 2006.

BLIER, P.; MONTIGNY, C. Serotonin and Drug-Induced Therapeutic Responses in Major Depression, Obsessive-compulsive and Panic Disorders. **Neuropsychopharmacology.** v. 21, p. 91S-98S, 1999.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITTI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**. v. 163, p. 121-141, 2002.

BROEKKAMP, C.L.; RIJK, H.W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K.L. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology.** v. 126 (3), p. 223-229, 1986.

CALIXTO, J. B. Efficacy, sefety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMARGO, M.T.L.A. **Medicina Popular**: **aspectos metodológicos para pesquisa, garrafada, objeto de pesquisa, componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral.** São Paulo: Almed, 1985.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 75, p. 501-512, 2003.

CLAYTON, P. J.; GROVE, W. M.; CORYELL, W.; KELLER, M.; HIRSCHFELD, R.; FAWCETT, J. Follow-up and Family Study of Anxious Depression. **American Journal Psychiatry.** v. 148, p. 1512-1517, 1991.

CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advantaces in modeling human depression and anxiety. **Natature Reviews Drug Discovery.** v.4(9), p. 775-790, 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences.** v. 23(5), p. 238-245, 2002.

DEMYTTENAERE, K.; BRUFFAERTS, R.; POSADA-VILLA, J.; GASQUET, I. *et al.* Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the world heath organization, world mental health surveys. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, p. 2581-2590, 2004.

DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST, E.; IZZO, A. A. St. John's wort: Prozac from the plant Kingdom. **Pharmacological Sciences**. v. 22, p. 292-297, 2001.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS,M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest, **Fitoterapia,** São Paulo, Brazil, v.73, p.69-91, 2002.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacy.** v. 46, p. 208-209, 1957.

ELIZABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In:_ **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre/ Florianópolis. Editora da UFSC, p. 179-189, 2004.

ESPEJO, E. F. Structure on the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research.** v. 86, p. 105-112, 1997.

FILE, S. E. New strategies in the search for anxiolytics. **Drug Design and Delivery.** v. 5, p. 195-201, 1990.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal Models of Psychiatric Disorders. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.** 2000.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Medicamentos Ansiolíticos. In:_. **Fundamentos de Psicofarmacologia.** São Paulo: Atheneu, p. 123-160, 2000.

GREENBERG, P.E.; KESSLER, R.C.; BIRNBAUM, H.G.; LEONG, S.A.; LOWE, S.W.; BERGLUND, P.A.; COREY- LISLE, P.K. The Economic Burden of Depression in the United States: How Did It Change Between 1990 and 2000? **Journal of Clinical Psychiatric.** v. 64:12, p. 1465-1475, 2003.

GREENBERG, P.E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R.C.; FINKELSTEIN, S.N.; BERNDT, E.R.; DAVIDSON, J.R.; BALLENGER, J.C.; FYER, A.J. The economic Burden of Anxiety disorders in the 1990s. **Journal of Clinical Psychiatric.** v. 60 (7), p. 427-435, 1999.

GRIEVE, M. **A Modern Herbal London**: The Books International, 1994.

GUERRA, A. B. G.; CALIL, H. M. Depressão. In:_. **Transtornos de Ansiedade.** São Paulo: Atheneu. p.371-388, 2004.

GUTIERRÉZ-GARCIA, A. G.; CONTRERAS, C.M. Stressors can affect imobility time and response to imipramine in rat forced swim test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 91, p. 542-548, 2009.

HALFIN, A. Depression: The Benefits of Early and Appropriate Treatment. **The American Journal of Managed Care.** v. 13, p. S92-S97, 2007.

HARRIS, E. C.; BARRACLOUGH, B. Excess mortality of mental disorder. **The British Journal of Psychiatry.** v. 173, p. 11- 53, 1998.

HEINRICH, M.; KUFER, J.; LEONTI, M.; PARDO-DE-SANTAYANA, M. Ethnobotany and ethnopharmacology- Interdisciplinary links with the historical sciences. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 107, p. 157-160, 2006.

ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT 1A- Receptor Subtype Mediates the Effect of Fluvoxamine, a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, on Marble-Burying Behavior in Mice. **The Japanese Journal of Pharmacology.** v. 68, p. 65-70, 1995.

JESBERGER, J. A.; RICHARDSON, J. S. Neurochemical aspects of depression: the past and the future? **International Journal Neuroscience**. v. 27, p. 19-47, 1985.

KAPLAN, A.; HOLLANDER, E. A Review of Pharmacologic Treatments for Obsessive-Compulsive Disorder. **American Psychiatric Association**. v. 54, p. 1111- 1118, 2003.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O., JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. The epidemiology of Major Depressive Disorder. **The Journal of the American Medical Association.** v. 289 (23), p. 3095-3105, 2003.

KESSLER, R. C.; GREENBERG, P. E. The economic burden of anxiety and stress disorders. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.** v. 67, p. 982-992, 2002.

KORFF, S.; HARVEY, B. Animal Models of Obsessive- Compulsive Disorder: Rationale to Understanding Psychobiology and Pharmacology. **Psychiatric Clinics of North America.** v. 29, p. 371-390, 2006.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180- 185, 1987.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.** p. 223, 2002.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. B.; CUNHA, M. P.; CAPRA, J. C.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** v. 33, p. 642-650, 2009.

MARQUES, C. Tratamento farmacológico do Transtorno Obsessivo-compulsivo. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** v. 23 (Supl II), p. 49-51, 2001.

MATTOS, J.K.A.; GRAÇAS, M.A. Coleção viva de ervas medicinais na Universidade de Brasília: primeiro ano de observação. Em: Ciência e Cultura: VI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza, 1980.

McLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. The wiley / NBS registry of mass spectral data. **John Wiley Sons**, New York, 1989.

MILLAN, M. J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 110, p. 135-370, 2006.

MIRESMAILLI, S.; BRADBURY, R; ISMAN, M. B.; Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. **Pest Management Science.** v. 62, p. 366-371, 2006.

MOSS, M.; COOK, J.; WESNES, K.; DUCKETT, P. Aromas of Rosemary and Lavender essencial oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. **International Journal of Neuroscience.** v. 113, p. 15- 38, 2003.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 38, p.63-67, 1991.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Journal Neuroscience Methods, v. 14, p. 149, 1985.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology.** v. 177, p. 245-255, 2005.

POLING, A.; CLEARY, J.; MONACHAN, M. Burying by rats in response to aversive and non-aversive stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior.** v. 35, p. 31-44, 1981.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant tretments. **European Journal of Pharmacology.** v. 47(4), p. 379- 391, 1977a.

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

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

PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essencial oil from Citrus aurantium L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences.** v. 78(15), p. 1720-1725, 2006.

RICARDO, V.P. **Efeitos de diferentes extratos de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) sobre o sistema nervoso central**. 2002. Monografia – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology.** v. 113, p. 237-242, 1993.

SENA, L.M. **Efeitos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) sobre o sistema nervoso central**. 1999. Monografia – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SIMÕES, C.M.O. **Plantas na medicina popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Ed. Da Universidade/UFRGS, 1989.

SKALISZ, L. L.; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. Effect of *Hypericum perforatum* on Marble- Burying by Mice. **Phytotherapy Research**. v. 18, p. 399-402, 2004.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In:_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC, p. 467-496, 2004.

TAYLOR, C.; FRICKER, A. D.; DEVI, L. A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cellular Signalling.** v. 17, p. 549-557, 2005.

VALLADARES, A.; DILLA, T.; SACRISTAN, J. A. Depression : a social mortgage. Latest advances in knowledge of the cost of the disease. **Actas Espanolas de Psiquiatria.** v. 37 (1), p. 49-53, 2009.

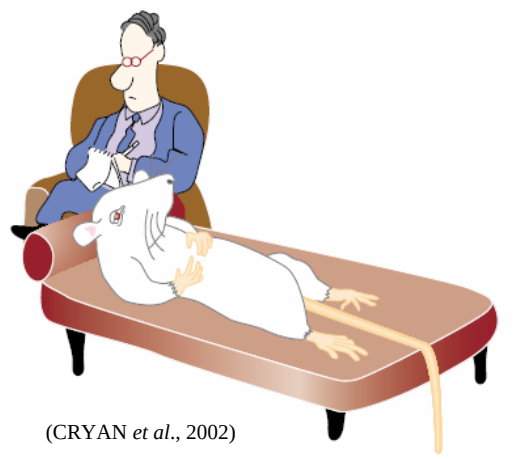
VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais.** 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

WONG, M.L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Natures Reviews Neuroscience.** v.2, p. 342-351, 2001.

WONG, M.L.; LICINIO, J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 3, p. 136-151, 2004.

ZHANG, Z.J. Therapeutic effects of herbal extracts and contitents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**. v. 75, p.1659-1699, 2004.

ZIMMERMAN, M.; MC DERMUT, W.; MATTIA, J. I. Frequency of Anxiety Disorder in Psychiatric Outpatients with Major Depressive Disorder. **American Journal Psychiatry.** v. 157, p. 1337-1340, 2000.



(CRYAN *et al*., 2002)

# Anexo

***Anexo 1***

***Diferenciação dos comportamentos apresentados por camundongos no Teste do Nado Forçado após tratamento com Imipramina, Nortriptilina ou Fluoxetina.***

Uma das condições essenciais para a consistência nos resultados originados da utilização de modelos experimentais é a sua adequada padronização sob as condições laboratoriais disponíveis. Deste modo, resultados da avaliação de drogas desconhecidas só apresentarão confiabilidade após a cuidadosa padronização das condições experimentais, reproduzindo de maneira consistente e fidedigna os resultados de drogas-padrão encontrados na literatura especializada.

O Teste do Nado Forçado é o modelo experimental mais utilizado para avaliar a atividade antidepressiva e associa essa atividade à redução no tempo de imobilidade (I), em ratos, a execução dos comportamentos de escalar (E) ou nadar (N) a drogas que atuam sobre os sistemas de neurotransmissão mediados por noradrenalina (NOR) ou serotonina (5-HT), respectivamente (CRYAN e*t al.*, 2002).

Nas figuras a seguir são apresentados os resultados obtidos com Imipramina (Fig. 1), Nortriptilina (Fig. 2) e Fluoxetina (Fig. 3). Para cada animal foi feita a contagem dos comportamentos em cada categoria (E: escalar, N: nadar e I: imobilidade), e os resultados são apresentados como a mediana e intervalo interquartil do conjunto de animais que compõe o grupo tratado com cada droga, em cada dose testada. Os resultados obtidos com os animais do grupo controle (tratados com salina) que acompanhou cada procedimento experimental foram reunidos e apresentados em conjunto nas figuras, o que explica o número maior de animais nestes grupos, quando se compara com o número de animais dos grupos tratados com as drogas.

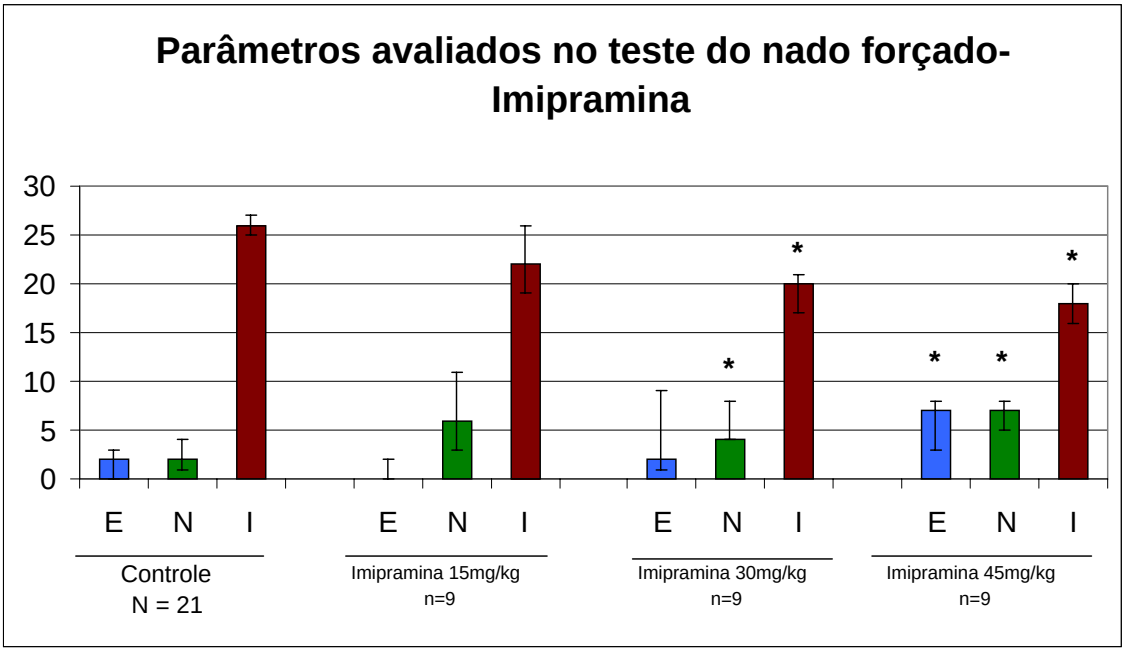



***Figura 1.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem dos comportamentos registrados a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no teste do nado forçado em camundongos machos tratados (i.p.) 23h, 5h e 1 hora com 15 mg/kg, 30 mg/kg ou 45 mg/kg de Imipramina. Escalar (E), Nadar (N), Imobilidade (I).
* $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

A Imipramina é um inibidor não seletivo de recaptação de noradrenalina e serotonina, então o esperado, de acordo com o proposto por Cryan e colaboradores (2002) em ratos, era que interferisse de modo indistinto em ambos os comportamentos ativos (escalar e nadar). De fato, com a maior dose avaliada foi detectado um aumento significante na contagem destes comportamentos, em relação ao respectivo grupo controle, ao mesmo tempo em que se observa a redução da contagem de comportamento de imobilidade. Com a dose intermediária (30 mg/kg) observa-se uma tendência a este mesmo perfil de atividade, no entanto, sem significância estatística.

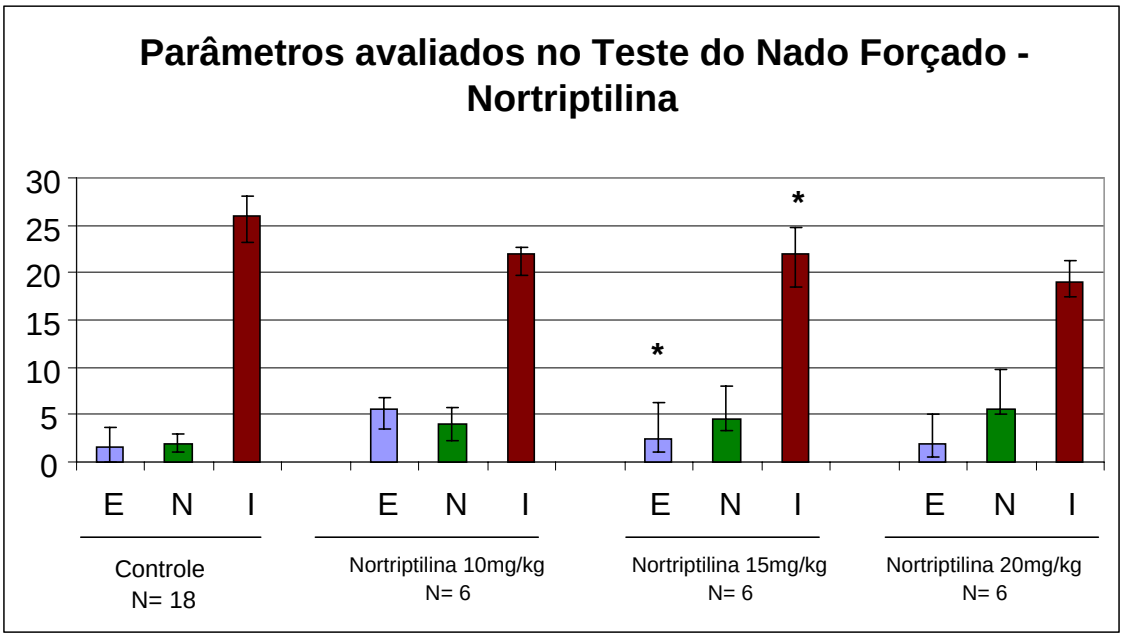



***Figura 2.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem dos comportamentos registrados a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no teste do nado forçado em camundongos machos tratados (i.p.) 23h, 5h e 1 hora com 10 mg/kg, 15 mg/kg ou 20 mg/kg de Nortriptilina. Escalar (E), Nadar (N), Imobilidade (I).
* $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

A Nortriptilina é um inibidor de recaptação que apresenta seletividade maior para a noradrenalina do que para a serotonina. Com a dose intermediária (15 mg/kg) foi possível observar o resultado esperado, ou seja, redução do tempo de imobilidade acompanhado de aumento no comportamento de escalar. Nas outras doses utilizadas o perfil de resposta esperado não ficou evidenciado, embora possa ser observada uma tendência à redução do comportamento de imobilidade, o que pode ser devido ao insuficiente número de animais em cada grupo (n = 6).

Deve-se salientar também, que a não observação de efeito com a maior dose administrada não é de todo inesperada, considerando-se que os antidepressivos utilizados na clínica freqüentemente apresentam uma curva de atividade em "U" invertido, ou seja, a partir de uma determinada dose ideal a atividade tende a ser reduzida.

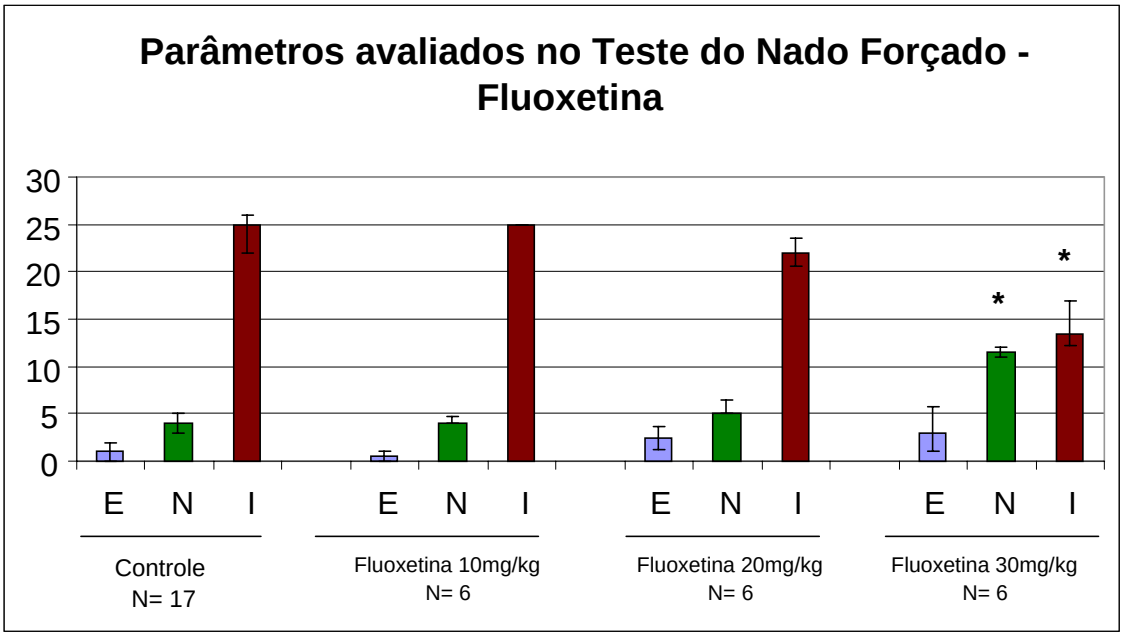



***Figura 3.*** Mediana e intervalo interquartil da contagem dos comportamentos registrados a cada 10 segundos, durante 5 minutos, no teste do nado forçado em camundongos machos tratados (i.p.) 23h, 5h e 1 hora com 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 30 mg/kg de Fluoxetina. Escalar (E), Nadar (N), Imobilidade (I).
* $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

A Fluoxetina é um inibidor de recaptação que apresenta maior seletividade para a serotonina do que para a noradrenalina. Apenas na maior dose avaliada foi possível observar, de modo significante, o perfil de resultado esperado, ou seja, redução na contagem do comportamento de imobilidade acompanhado de aumento na contagem do comportamento de nadar.

O desenvolvimento deste estudo possibilitou o estabelecimento detalhado do protocolo experimental para avaliação de atividade antidepressiva com o uso do Teste do Nado Forçado. Os resultados obtidos com as drogas-padrão reproduzem, em nossas condições experimentais e com camundongos, o que é preconizado na literatura para ratos. Deste modo, estão estabelecidas as condições adequadas para a avaliação da atividade antidepressiva em preparações de origem vegetal.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo