



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
***CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA***  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso  
Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**

**LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPÊLO**

Teresina – Piauí

2011

**LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPÊLO**

**Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2011

**LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPÊLO**

**Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no Sistema Nervoso  
Central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador)**

Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí

---

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**

Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

**Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa**

Universidade Federal da Bahia – UFPI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

**PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

*Sonhe com aquilo que você quiser.  
Seja o que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que se quer.  
(Clarisse Lispector)*

*“Só existe uma pessoa capaz de limitar seu crescimento: VOCÊ MESMO! Você é a única pessoa que pode fazer a revolução de sua vida. Você é a única pessoa que pode prejudicar a sua vida. Você é a única pessoa que pode ajudar a si mesmo.”  
(Luis Fernando Veríssimo)*

### *Dedicatória*

*À Deus que me deu o dom da vida e da sabedoria.*

*Aos meus Pais que superaram todos os obstáculos impostos pela vida e me deram a oportunidade de estudar e crescer como pessoa e profissional.*

*Ao meu Orientador pelo incentivo, força e disponibilidade nas horas que mais precisei.*

*À minha irmã Lianna pelos conselhos e idéias que muito me ajudaram no decorrer deste trabalho.*

*Às minhas amigas e familiares pelos momentos de companhia e alegria que me proporcionaram e continuam me proporcionando.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a:

**Deus**, a fonte de todas as conquistas e o maior responsável por toda sabedoria e discernimento que adquiri durante o Mestrado e em minha vida.

Minha família (**Iris, Josias, Lianna, Guilherme e Lise**), meu porto seguro, meus verdadeiros incentivadores e os mais desejosos por esta conquista.

Minha segunda família, **Ieda, Bagdá, Elton e Juliana** pelos momentos de apoio.

Ao meu Orientador, **Prof. Rivelilson** que realmente soube cumprir, com todo o dom e responsabilidade que possuí, o verdadeiro papel de orientar e ensinar.

Aos Profs. Drs. **Reinaldo Nóbrega de Almeida** e **Juceni Pereira de Lima David** pela disposição em se fazerem presentes e ajudarem na correção da dissertação

Aos Professores que contribuíram com a produção desta Dissertação, Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Chistiane Mendes Feitosa** pela coleta das folhas e análise do óleo essencial, Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Adriana da Rocha Tomé** pelas análises histológicas e Prof<sup>ª</sup>. **Geane Félix de Souza** pelas análises hematológicas e bioquímicas.

Ao **Prof. Lamartine** e **Prof. Lívio** pela seriedade, organização e fidelidade que conduzem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

A todos os meus eternos e maravilhosos amigos, em especial a **Lianna, Alline, Micheline, Yara**, presenças indispensáveis e necessárias em minha vida.

As minhas queridas amigas e companheiras de trabalho do Hospital São Marcos, **Roberta, Marcelle, Vivi, Nataniella, Neylany, Gislene, Janaína, Alana, Elza**, sempre presentes e grandes responsáveis por elevar minha auto-estima nos momentos mais difíceis.

Aos meus companheiros de Mestrado, **Ana Paula, Fernanda, Marcelo, Lina, Eliamara, Maria, Mirna, Márcio, Ilka, Mônica, Ana Karina, Cícera, Manoel** e em especial ao **Ciro** por sua dedicação e disponibilidade em sempre querer ajudar, e, ainda, por fazer parte da minha vida.

Aos colegas do LAPNEX pela ajuda quando necessário e em especial a **Paola, Paula, Maria e Jéssica** pelas conversas jogadas fora.

Ao NPPM pela disponibilidade em fornecer seus aparelhos quando necessários.

Ao CNPq, FAPEPI e CAPES pelo incentivo financeiro dispensado durante a pesquisa.

Ao **Lima Neto**, meu maior incentivador pela Pesquisa meu eterno modelo de pesquisador dedicado e responsável.

Aos meus afilhados, **Felipe Gabriel, Lise Maria, Lucian, Guilherme e Carol** que, demonstram, com muita inocência, o verdadeiro significado das palavras amor, felicidade e paciência.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xv
<b>RESUMO</b>	xvii
<b>ABSTRACT</b>	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
3.1 Estudos sobre <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.....	20
3.1.1 Aspectos botânicos de <i>C. limon</i> (L.) Burm.....	20
3.1.2 Usos populares de <i>C. limon</i> (L.) Burm.....	21
3.1.3 Estudos fitoquímicos de <i>C. limon</i> (L.) Burm.....	22
3.1.4 Estudos farmacológicos de <i>C. limon</i> (L.) Burm.....	23
3.1.5 Estudos Toxicológicos de <i>C. limon</i> (L.) Burm.....	24
Referências.....	25
<b>3. CAPÍTULO I: Constituintes Químicos e aspectos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de <i>C. limon</i> (L.) Burm (Rutaceae)</b> .....	32
Resumo .....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Objetivos.....	35
Procedimento Experimental.....	35
Resultados e Discussão.....	37
Conclusão.....	44
Referências.....	45
<b>4. CAPÍTULO II: Avaliação do efeito do óleo essencial <i>C. limon</i> sobre o Sistema Nervoso Central de camundongos</b> .....	51
Resumo .....	51
Abstract.....	52
Introdução.....	53

Objetivos.....	53
Materiais e Métodos.....	54
Resultados e Discussão.....	57
Referências.....	63
<b>5. CAPÍTULO III: Atividade antioxidante do óleo essencial do <i>C. limon</i> no hipocampo de camundongos.....</b>	<b>69</b>
Resumo .....	69
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Objetivos.....	71
Materiais e Métodos.....	72
Resultados.....	74
Discussão .....	79
Conclusão.....	81
Referências .....	82
<b>6. CAPÍTULO IV: Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de <i>C. limon</i> no hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina.....</b>	<b>89</b>
Resumo .....	89
Abstract.....	90
Introdução.....	91
Objetivos.....	92
Materiais e Métodos.....	92
Resultados.....	93
Discussão .....	100
Conclusão.....	102
Referências.....	103
<b>7. CAPÍTULO V: Efeito antioxidante e antinociceptivo do óleo essencial de <i>C. limon</i> em camundongos.....</b>	<b>109</b>
Resumo .....	109
Abstract.....	110
Introdução.....	111
Objetivos.....	111

Materiais e Métodos.....	112
Resultados.....	115
Discussão .....	121
Referências.....	123
<b>8. CAPÍTULO VI: Efeito do óleo essencial do <i>C. limon</i> em camundongos.</b>	
Avaliação das atividades sedativa, ansiolítica e antidepressiva.....	130
Resumo .....	130
Abstract.....	131
Introdução.....	132
Objetivos.....	133
Materiais e Métodos.....	133
Resultados .....	138
Discussão .....	143
Referências.....	145
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>APENDICE</b>	

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-Azobis (2-Amidinopropano)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação com Animais
CL	<i>Citrus limon</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EME	Estado de mal epiléptico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
i.p.	Via intraperitoneal
LAPNEX	Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
ME	Movimentos esterotipados
mg/Kg	Miligrama por Kilograma
NEBA	Número de Entrada nos Braços Abertos
NEBF	Número de Entrada nos Braços Fechados
°C	Graus Centígrados
OECL	Óleo Essencial do <i>Citrus limon</i>
s.c.	Via Subcutânea
SCP	Sinais colinérgicos periféricos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas com Ácido Tiobarbitúrico
TPBA	Tempo de Permanência nos Braços abertos
TPBF	Tempo de Permanência nos Braços Fechados
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	Via oral

## LISTA DE FIGURAS

### **Introdução**

Figura 1 – Folha do *C. limon*..... 21

Figura 2 – Fruto do *C. limon*..... 22

### **Capítulo I**

Figura 1 – Estrutura química dos constituintes identificados do óleo essencial de *C. limon*..... 38

Figura 2 – Cromatograma do óleo essencial das de *C. limon* obtido em equipamento CG/EM Hewlett-Packard (Modelo 5971). ..... 39

### **Capítulo II**

Figura 1 – Equipamento *rota-rod*..... 56

Figura 2 – Efeitos do óleo essencial do *C. limon* (OE, 50, 100 e 150 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2.0 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de camundongos..... 58

Figura 3 – Tempo (s) de permanência na barra giratória do *Rota-rod* em camundongos depois do tratamento via oral com Veiculo (Controle), óleo essencial do *C. limon* (OE, 50, 100 and 150 mg/kg, v.o.) ou DZP (2.0 mg/kg, i.p.)..... 59

### **Capítulo III**

Figura 1 – Efeitos do óleo essencial de *C. limon* no nível de peroxidação lípidica, conteúdo de nitrito e níveis de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos..... 76

Figura 2 – Efeitos do oleo essencial do *C. limon* na atividade de superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no hipocampo de camundongos..... 78

### **Capítulo IV**

Figura 1 – Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina..... 98

Figura 2 – Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no hipocampo de ratos após convulsão induzida por pilocarpina..... 99

### **Capítulo V**

Figura 1 – Mistura de monoterpenos constituintes do óleo essencial das folhas do

<i>C. limon</i> por meio da análise do cromatograma obtido por CG/EM.....	116
Figura 2 – Atividade sequestrante contra a produção de substâncias reativas com o ácido Tiobarbiturico (TBARS) <i>in vitro</i> .....	116
Figura 3 – Atividade sequestrante contra o óxido nítrico (NO) <i>in vitro</i> .....	117
Figura 4 – Atividade sequestrante contra radical hidroxila (OH) <i>in vitro</i> .....	118
<b>Capítulo VI</b>	
Figura 1 - Equipamento para teste do labirinto em cruz elevado.....	135
Figura 2 - Equipamento para teste do campo-aberto.....	136
Figura 3 - Equipamento para teste do nado-forçado.....	137
Figura 4 – Efeitos do OE de <i>C. limon</i> no número de cruzamentos, <i>rearing</i> e <i>grooming</i> no teste do campo aberto em camundongos.....	139

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 – Rendimento da composição química do óleo essencial extraído das folhas de <i>C. limon</i> . .....	39
Tabela 2 – Análise morfológica macroscópica de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com óleo essencial de <i>C. limon</i> por via oral durante 30 dias.....	40
Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com óleo essencial de <i>C. limon</i> por via oral durante 30 dias.....	42
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com óleo essencial de <i>C. limon</i> por via oral durante 30 dias.....	44

### Capítulo II

Tabela 1 – Composição química e índices de retenção dos constituintes do Óleo Essencial do <i>C. limon</i> .....	57
Tabela 2 – Efeitos do óleo essencial do <i>C. limon</i> (OE) nas convulsões induzidas por pentilenstatrozol (PTZ) em camundongos.....	60
Tabela 3 – Efeitos do óleo essencial do <i>C. limon</i> (OE) nas convulsões induzidas por PIC em camundongos.....	61

### Capítulo III

Tabela 1 – Composição química e índices de retenção dos constituintes do óleo essencial de <i>C. limon</i> .....	75
--	----

### Capítulo IV

Tabela 1 – Rendimento da composição química do óleo essencial extraído das folhas de <i>C. limon</i> .....	94
Tabela 2 – Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de <i>C. limon</i> em ratos durante as convulsões límbicas. ....	94
Tabela 3 – Efeitos de pré-tratamento com óleo essencial de <i>C. limon</i> nas alterações histopatológicas estriatais observadas em ratos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.....	96
Tabela 4 – Efeitos de pré-tratamento com óleo essencial de <i>C. limon</i> nas alterações histopatológicas hipocampais observadas em ratos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.....	97

## Capítulo V

Tabela 1 – Efeitos do óleo essencial de (OE) de <i>C. limon</i> , morfina (MOR) e naloxona (NAL) nas contrações induzidas por ácido acético.....	119
Tabela 2 – Efeitos do óleo essencial de (OE) de <i>C. limon</i> , morfina (MOR) e ácido acetilsalicílico nas contorções induzidas por formalina.....	120
Tabela 3 – Efeitos do óleo essencial de (OE) de <i>C. limon</i> , morfina (MOR) no teste da placa quente na ausência e presença de naloxona em camundongos.....	120

## Capítulo VI

Tabela 1 – Composição química e índices de retenção dos constituintes do Óleo Essencial do <i>C. limon</i> .....	138
Tabela 2 – Efeitos do OE de <i>C. limon</i> no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos.....	140
Tabela 3 – Efeitos do OE de <i>C. limon</i> no teste do tempo de sono induzido por barbitúrico.....	141
Tabela 4 – Efeitos do OE de <i>C. limon</i> no modelo do nado forçado em camundongos.....	141
Tabela 5 – Efeitos do OE de <i>C. limon</i> no teste de <i>rota rod</i> em camundongos.....	142
Tabela 6 – Temperatura retal de camundongos depois da administração do OE de <i>C. limon</i> .....	143

**Avaliação farmacológica do óleo essencial de *Citrus limon* (Burm) no sistema nervoso central: Um estudo comportamental, histológico e neuroquímico. LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPÊLO.** Orientador: Rivelilson Mendes de Freitas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2011.

## RESUMO

A família Rutaceae consiste em aproximadamente 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família é representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, de importância medicinal, ecológica e econômica. O *Citrus* é um gênero que compreende 70 espécies de subarbustos e arbustos que podem ser cultivadas ou encontradas espontaneamente na Alemanha, Espanha, México, Venezuela, Cuba, Jamaica, Equador, Norte e Nordeste do Brasil. As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. No primeiro capítulo, houve a caracterização química do óleo essencial de folhas de *Citrus limon* (OECL), e avaliação dos efeitos da administração aguda por via oral do óleo essencial de folhas de *C. limon* e, ainda, investigação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* machos. O tratamento não causou nenhuma morte ou toxicidade nos animais. A administração aguda em doses repetidas de óleo essencial não induziu nenhum efeito adverso na maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados em camundongos *Swiss* machos. No segundo capítulo foram investigados os efeitos anticonvulsivantes e depressores do Sistema Nervoso Central (SNC) do óleo essencial de *C. limon* em modelos animais, no qual foi verificado resultados que sugerem um efeito depressor do SNC e anticonvulsivante do óleo essencial de *C. limon* em camundongos que precisa ser melhor investigado. No terceiro capítulo objetivou-se investigar o efeito do óleo essencial de *C. limon* nos níveis de peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito, concentração de glutatona reduzida e atividades antioxidantes das enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) em hipocampo de camundongos. Os resultados demonstram que o estresse oxidativo no hipocampo de camundongos pode ocorrer durante o estabelecimento de doenças neurodegenerativas, promovendo dano hipocampal e implica, ainda, que é possível conseguir efeito protetor utilizando o OECL como antioxidante. O quarto capítulo visou investigar o potencial efeito neuroprotetor do OECL nas modificações histopatológicas observadas no hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina. A partir dos resultados encontrados é possível sugerir que o OECL pode modular a epileptogênese promovendo um efeito neuroprotetor no modelo investigado. O quinto capítulo avaliou as atividades antioxidantes *in vitro* e antinociceptiva do óleo essencial de *C. limon* em camundongos. O OECL foi capaz de produzir efeito antioxidante *in vitro* nos três testes usados. No teste *in vivo*, houve uma redução significativa no número de contorções e em doses mais elevadas, reduziu o número de lambida da pata. Considerando que a naloxona antagonizou o efeito antinociceptivo do OECL, é possível sugerir, pelo menos a participação do sistema opióide, no entanto, outros estudos deverão ser realizados para entender os mecanismos de ação do OECL. No sexto capítulo analisou-se o efeito sedativo, antidepressivo e ansiolítico do OECL por meio dos testes comportamentais, sugerindo um possível efeito sedativo e ansiolítico do OECL que pode envolver os receptores benzodiazepínicos e também um efeito antidepressivo possivelmente envolvendo os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos.

**Palavras-chave:** Ansiolítico, Antioxidante, Antidepressivo, *Citrus limon*, Convulsão.

**Pharmacological assessment of the essential oil of *Citrus limon* (Burm) Central Nervous System: A behavioral study, histological and neurochemical.** LIDIANNE MAYRA LOPES CAMPELO. Advisor: Rivelilson Mendes de Freitas. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2011.

### ABSTRACT

The Rutaceae family consists of approximately 150 genera e 1.600 species, widely distributed in tropical, subtropical and temperate word, being more abundant in tropical America, South Africa and Australia. In Brazil, the family is represented by approximately 29 genera and 182 species, with some important medicinal, ecological and economic. Citrus is a genus that comprises 70 species of subshurbs and shrubs can be grown or found spontaneously in Germany, Spain, Mexico, Venezuela, Cuba, Jamaica, Ecuador, northern and northeastern Brazil. The species of the genus Citrus are rich in flavonoids, volatile oils, coumarins and pectin. In the first chapter was the chemical characterization of essential oil leaves of *Citrus limon* (Rutaceae), and assessing the effects of acute administration in repeated doses per oral route of essential oil leaves from *C. limon* were investigated on biochemical and hematological parameters in male Swiss mice. The treatment caused no one deaths or toxicity in animals. It was observed that acute administration in repeated doses of essential oil did not induce any adverse effect in most biochemical and hematological parameters studied in male Swiss mice. In the second chapter, we investigated the anticonvulsant and depressor effects on Central Nervous System CNS of essential oil from *C. limon* in animal models, in which was found results suggest an effect depressant and anticonvulsant of essential oil from *C. limon* in mice that needs to be further investigated. The third chapter aims to investigate the effect of essential oil from *C. limon* of lipid peroxidation levels, nitrite content, reduced glutathione concentration and antioxidant enzymatic activities (superoxide dismutase, catalase and peroxidase glutathione) in hippocampus of mice. The results show hypothesized that oxidative stress in hippocampus of mice can occur during development of neurodegenerative diseases and promoting hippocampal damage also implies that the protective effect can be achieved using the essential oil from *C. limon* as an antioxidant. The fourth chapter aims to investigate the potential neuroprotective effect of essential oil from *C. limon* in the histological changes observed in the hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures. From the results it is possible to suggest that it may modulate the epileptogenesis promoting a neuroprotective effect during crisis in the model investigated. The fifth chapter evaluated the antinociceptive an antioxidant of the oil from *Citrus* in mice or *in vitro* test. The EOCL showed activity against all catalysts in vitro tests. In the *in vivo* test, there was a significant reduction in the number of contortions and at higher doses, reduced the number of paw licking. Given that naloxone antagonized the antinociceptive effects of EOCL (higher doses), it is possible to suggest at least the participation of the opioid's system. However, further studies should be conducted to understand the mechanisms of action of ethylene oxide. In the sixth chapter examined whether the sedative, antidepressant and anxiolytic effects EOCL through behavioral test, starting from there we could see that this work showed anxiolytic and sedative effects of EOCL that may involve of benzodiazepine receptors and also an antidepressant effect possibly where the noradrenergic and serotonergic mechanisms may be involved.

**Keywords:** Anxiolytic, Antioxidant, Antidepressant, *Citrus limon*, Seizures.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as plantas medicinais tornaram-se um foco crescente de importância global, apresentando repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional (MAHADY, 2001). O alto custo, os efeitos colaterais e as limitações terapêuticas dos medicamentos convencionais têm sido fatores relevantes para o aumento do uso das plantas medicinais no Brasil e no mundo (GO *et al.*, 2001).

A planta medicinal é todo vegetal que contém em um ou vários de seus órgãos substâncias que podem ser empregadas para usos terapêuticos ou precursores de compostos para esses fins (OLIVEIRA; AKISUE, 1988). O uso das plantas medicinais no Brasil foi disseminado principalmente pela cultura indígena. Em todo o planeta, o Brasil é o país que tem maior número de espécies vegetais, dentre as estudadas, uma grande parte tem importância nutricional, econômica e medicinal (ANDRADE *et al.*, 2001). Por ser um país rico, cujo território possui cinco principais biomas, a floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga, é considerada uma rica fonte de produtos terapêuticos. Mesmo com uma vasta diversidade, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas continua pouco explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha e Estados Unidos (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

A família Rutaceae está compreendida por cerca de 150 gêneros, 1.600 espécies, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo mais abundante na América Tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (MELO, 2004). O *Citrus limon* é uma das espécies da família Rutaceae mais comumente utilizadas para fins terapêuticos, são consideradas plantas arbustivas ou arbóreas, de folhas compostas, geralmente de disposição alternada, sem estípulas, providas de glândulas oleíferas. Dentre os gêneros cultivados destaca-se o *Citrus* com os vários tipos de laranja, limão, lima-da-pérsia, cidra, tangerina e outras que também fornecem óleo da casca (JOLY, 1993).

O gênero *Citrus* apresenta as mais importantes árvores frutíferas do mundo, com uma produção anual de 102 milhões de toneladas de frutas (GONZALEZ-MOLINA, 2010). *C. limon* é popularmente conhecido como limoeiro, cujas folhas e frutos são aproveitados pela medicina popular como terapia, essa planta também é conhecida como limão verdadeiro, e é originária

da Região Sudeste da Ásia (PENIDON; SILVA, 2007). O limão é a terceira fruta mais importante dentro do gênero depois da laranja e da tangerina (GONZALEZ-MOLINA, 2010). Esta espécie possui várias ações terapêuticas na medicina popular, a saber: adstringente, antianêmico, antibiótico, antisséptico, antiemético, antidepressivo, antiinflamatório, antiespasmódico, bactericida, antireumático, antidisentérico, (PENIDON; SILVA, 2007; AGRA *et al.*, 2007; FENNER *et al.*, 2006; REZENDE; COCCO, 2002; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; VIEIRA, 1992) e ainda para tratamento da febre e da tosse (LIEBSTEIN, 1927; GRAY; FLATT, 1997; DE FEO *et al.*, 1992).

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (KUSTER *et al.*, 2003). A maioria dos compostos flavônicos são heterosídeos de flavononas (hesperidosídeo, neohesperidosídeo, naringosídeo, eriodictiosídeo), bem como são encontrados também outros flavonóides, como a diosmina e o rutosídeo (BRUNETON, 1993; ARRIAGA, 1990). O limão [*Citrus limon* (L.) Burm] exhibe muitos compostos naturais importantes, incluindo ácido cítrico, ácido ascórbico, minerais e componentes fenólicos, como flavonóides. As propriedades biológicas têm sido sempre associadas com o conteúdo de ácido ascórbico, mas, recentemente, tem se mostrado que flavonóides e outros nutrientes e não-nutrientes, como vitaminas, minerais, óleos essenciais e carotenóides estão envolvidos nestas propriedades (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; ELANGO VAN *et al.*, 1994).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e segurança do óleo essencial, para, futuramente, desenvolver uma formulação farmacêutica. Para isso foi necessário investigar os parâmetros hematológicos e bioquímicos do óleo essencial de *C. limon*, identificar os constituintes deste óleo através da Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa, avaliar as atividades ansiolítica, antioxidante, antidepressiva, antinociceptiva, sedativa, anticonvulsivante e neuroprotetora do óleo essencial do *C. limon* em camundongos.

Esta dissertação foi elaborada em capítulos oriundos dos artigos científicos submetidos e publicados a partir dos resultados decorrentes da realização de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Vários equipamentos foram utilizados para os testes desenvolvidos *in vivo*, (campo-aberto, claro-escuro, labirinto em cruz elevada, nado forçado, suspensão pela cauda, temperatura retal), bem como para os testes *in vitro*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Estudos sobre *Citrus limon* (L.) Burm

##### 3.1.1 Aspectos botânicos de *C. limon* (L.) Burm

O *C. limon* (L.) Burm (**Figura 1**) pertence à família Rutaceae que possui 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo.

O *C. Limon* (L.) Burm, planta aromática, é uma árvore perenifólia, pequena de 3 a 6 metros de altura, com numerosos ramos e espinhos. As folhas unifolioladas são de cor verde com formato lanceolados, elíptica-ovada de 6 a 12.5 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura; apresentam a ponta obtusa; margem serrada-dentada; pecíolo curto e extensamente alado; as folhas jovens são avermelhadas apresentam flores solitárias ou em ráculos axilares, avermelhadas em forma de botão com pétalas brancas na parte superior e púrpura abaixo. Apresentam de 20 a 40 estames com fruto oblongo ou oval, 7 a 12 cm de comprimento, amarelo claro ou dourado a casca é mais ou menos grossa e com presença de glândulas, dependendo das variedades, as sementes são pequenas, ovais e pontiagudas (Em <<http://www.institutohorus.org.br>>. Acesso em 14 de agosto de 2011).



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 1-** Folha do *C. limon* (L.) Burm conhecido popularmente como limoeiro.

### 3.1.2 Usos populares de *C. limon* (L.) Burm

O fruto (**Figura 2**) é conhecido popularmente como limão, e essa, é de fato, a fruta mais conhecida do mundo, utilizada há centenas de anos com inúmeras propriedades medicinais e nutricionais. O fruto apresenta outros sinônimos como, limão-verde, limão-verdadeiro, limão-eureka ou limão-gênova. Desde a época das colonizações, essa fruta era utilizada para combater e prevenir o escorbuto uma doença causada pela carência de vitamina C. Na culinária, o fruto é utilizado no tempero de frutos do mar, aves e suínos, além de servir para o preparo de sucos, refrigerantes, doces e drinques, entre estes a popular “caipirinha”. As sementes são usadas para fazer óleo de cozinha e óleos para plásticos e sabões (MONAGEMI *et al.*, 2010)

De acordo com Ortencio (1997), o limão também é usado para controlar altas taxas de ácido úrico, anemia, arteriosclerose, gripes, diabetes, reumatismo, varíola, pressão alta. Da casca extraem-se essências aromáticas usadas na indústria de perfumes, farmacêutica, de produtos de limpeza e higiene pessoal e no preparo de licores (MONAGEMI *et al.*, 2010). Uma dieta rica em legumes, vegetais, grãos, frutas frescas (como as frutas cítricas) e sucos têm efeitos benéficos na saúde humana (TRIPOLI *et al.*, 2007).



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 2** - Fruto do *C. limon* (L.) Burm.

### 3.1.3 Estudos fitoquímicos do gênero *Citrus*

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (KUSTER *et al.* 2003). As plantas dos gêneros *Citrus* apresentam ainda compostos

fenólicos da classe das flavonas (sinensetina, nobiletina), glicosídeos flavonóides (hesperidina, neohesperidina, narirutina, naringina, eriocitrina) e cumarinas (umbeliferona, aesculetina e scopolina). A casca do limão é mais rica em flavonóides que as sementes (TRIPOLI *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por interpretação automatizada de espectros de massa para identificar os compostos voláteis do óleo essencial de *C. limon* mostrou um total de nove compostos, exclusivamente monoterpenos, que correspondeu a 93,38% dos derivados identificados. O constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *C. limon* foi o limoneno (52,77%), seguido por acetato de geraniol (9,92%), *trans*-óxido limoneno (7,13%), Neral (6,85%), Geraniol (5,49%), Nerol (4,04%), Citronelol (2,77%), *cis*-óxido limoneno (2,68%) e Linalol (1,73%) (CAMPÊLO *et al.*, 2010).

O óleo essencial das espécies de *C. limon* contém derivados de terpenos, sesquiterpenos alifáticos, derivados oxigenados e hidrocarbonetos aromáticos. A composição das várias misturas de terpenos depende da tipologia da espécie examinada. No entanto, a mistura de cada tipologia está em proporções feitas de: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, linalol e terpineno (MONAGEMI *et al.*, 2010)

### 3.1.4 Estudos farmacológicos do gênero *Citrus* e seus constituintes

As atividades dos flavonóides tem sido mostradas *in vitro* (BOCCO *et al.*, 1998; RAPISARDA *et al.*, 2000; BURDA; OLESZEK, 2001) e *in vivo*. Os flavonóides tem importantes propriedades relacionadas à saúde, como antimicrobiana (BYLKA *et al.*, 2004), anticarcinogênica (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; KOHNO *et al.*, 2004), antiagregante plaquetário (MIDDLETON *et al.*, 2000) e são conhecidos ainda por proteger contra doenças cardiovasculares (HOLLMAN *et al.*, 1996).

Os flavonóides antioxidantes do limão têm sido estudados e identificados como eriocitrina e flavonas de c-glucosil, 6,8-di-c- $\beta$ -glucosil-diosmina e 6-c- $\beta$ -glucosil-diosmina. O flavonóide eriocitrina e seus metabólitos foram poderosos antioxidantes quando testados no modelo de oxidação *in vitro* para doenças cardíacas (MYAKE *et al.*, 1997).

Monoterpenos são importantes constituídos do óleo essencial dos frutos do gênero *Citrus* e outras plantas. Uma parte destes monoterpenos tem atividades antitumorais (MONAGEMI *et al.*, 2010) Por exemplo, d-limoneno, que compreende mais de 90% do óleo da casca da laranja tem atividade quimiopreventiva nos roedores contra câncer de mama, pele,

fígado, pulmão e estômago (CROWEL, 1999) e tem sido mostrado a indução de apoptose nas células tumorais (HATA, 2003 )

O óleo volátil da casca do fruto apresentou atividade sedativa, hipnótica, não corroborando com o extrato etanólico das folhas, que não apresentou essa atividade (CARVALHO-FREITAS, 2002). O extrato alcoólico da casca dos frutos mostrou efeito antiespasmódico (FOSTER *et al.*, 1980). Testes farmacológicos *in vitro*, com os frutos demonstraram potente efeito inibidor contra a atividade do rotavírus (HYUN *et al.*, 2000). O suco dos frutos apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*. (CACERES *et al.*, 1987).

O extrato do fruto, em ratos, produziu uma redução do consumo de alimento e do ganho de peso corporal e um índice significativo de mortalidade. Este efeito foi atribuído à atividade  $\beta$ -adrenérgica da sinefrina, substância presente na casca do fruto (CALAPAI *et al.*, 1999). Esta substância também está correlacionada com uma ação redutora da pressão portal, possivelmente por meio da vasoconstrição arterial, detectada por meio da infusão da casca do fruto (HUANG *et al.*, 1995). A  $\rho$ -sinefrina apresenta atividade simpaticomimética que tem sido associada à oxidação de gorduras através do aumento da termogênese e estimulação lipolítica, presumivelmente pelo  $\beta_3$ -adrenoceptores (FUGH-BERGMAN; MYERS, 2004).

O *C. limon* contém um grande número de componentes funcionais fisiológicos como ácido cítrico, ácido ascórbico, minerais, cumarinas, limonóides e flavonóides. O ácido ascórbico é um antioxidante registrado para prevenir espécies reativa derivadas do oxigênio (EROS) mediadas pela peroxidação lipídica microsomal e degradação de proteína *in vivo* e *in vitro*, e, ainda, previne contra a oxidação de colágeno e protege o tecido mamário contra dano oxidativo em níveis intracelulares e extracelulares (CHATTERJEE *et al.*, 1995).

A fruta do *C. limon* (L.) Burm é usada para tratar doenças hepáticas, reumatismo, febre, (LIEBSTEIN, 1927) e diabetes (GRAY; FLATT, 1997). O fruto também é usado para o preparo de bebidas, como suplemento alimentar, antidiarreico, antiespasmódico e tosse (DE FEO *et al.*, 1992). É também usado para o tratamento do escorbuto, cólicas intestinais e artrite (VAZQUEZ *et al.*, 1997).

### 3.1.5 Estudos Toxicológicos do gênero *Citrus* e seus constituintes

Em um estudo realizado em 2008, o extrato das folhas e frutos do *C. limon* (L.) Burm, foram submetidos à avaliação quantitativa e qualitativa de  $\rho$ -sinefrina, um constituinte das espécies *Citrus*, por meio do método de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foi verificada a presença de 0,010% desta substância nas folhas e 0,045% nos frutos. Nos animais

tratados com  $\rho$ -sinefrina foi observada uma diminuição da atividade locomotora, piloereção, salivação, exoftalmia e fadiga (ARBO *et al.*, 2008; BLANCO *et al.*, 2009).

Em algumas espécies, que apresentam em sua composição os monoterpenos citral, geranial e neral, foram observados efeitos depressores como redução da atividade geral, dos reflexos auriculares e de endireitamento, equilíbrio e respostas ao toque (BLANCO *et al.*, 2009). Um estudo realizado com o óleo essencial da casca de *C. limon* (L.) Burm e o *C. sinensis* (L.) Osbeck mostrou um efeito citotóxico sobre células MCF-7 (carcinoma de mama em humanos) e Hela (carcinoma de colo de útero) (MONAGEMI *et al.*, 2010).

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-40, 2007.

ANDRADE, A.F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. **Toxicologia na prática clínica**, p. 263, 2001.

ARBO, M.D.; LARENTIS, E.R.; LINCK, V.M.; ABOY, A.L.; PIMENTEL, A.L.; HENRIQUES, A.T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S.C.; LEAL, M.B.; LIMBERGER, R.P. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and p-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2770-2775, 2008.

ARRIAGA, E.J.; RUMBERO, A. Naringin, hesperidin and neohesperidin content in juices from thirteen *Citrus* spp. **Fitoterapia**, v. 51, p. 31-36, 1990.

BENAVENTE-GARCIA O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BLANCO, M.M.; COSTA, C.A.R.A.; FREIRE, A.O.; SANTOS JR, J.G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 265-270, 2009.

BOCCO, A.; CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2123-2129, 1998.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2<sup>a</sup> ed. Paris: Lavoisier, 1993.

BURDA, S; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I; PILEWSKY, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of the America Nutraceutical Association**, v. 7, p. 2431-2439, 2004.

CACERES, A.; GIRON, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 223-237, 1987.

CALAPAI, G. FIRENZUOLI, F.; SAITTA, A. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: a preliminary report. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 586-592, 1999.

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

CAMPELO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 116-126, 2010.

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

CHATTERGEE, I.B.; MUKHOPADHYAY, C.K.; GHOSH, M.K. Vitamin C: A potential savior against free radical-induced oxidative damage. **Current Science**, v. 69, p. 747-751, 1995.

CROWEL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 775-778, 1999.

DE FEO, V.; AQUINO, R.; MENGHINI, A.; RAMUNDO, E.; SENATORE, F. Traditional phytotherapy in the Peninsula Sorrentina, Campania, Southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 113-125, 1992.

ELANGOVAN, V; SEKAR, N; GOVINDASAMY, S. Chemoprotective potential of dietary bioflavonoids against 20-methyl-chloranthrene-induced tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 87, p. 107-113, 1994.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-94, 2006.

FOSTER, H.B; NIKLAS, S.; LUTZ, S. Antispasmodic effects of some medicinal plants. **Planta Medica**, v. 40 p. 309-319, 1980

FUGH-BERGMAN, A.; MYERS, A. *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Experimental Biology Medicine**, v. 299, p. 698-704, 2004.

GO, V.L.W; WONG, D. A; RESNICK, M. S; HEBER, D. Evaluation of botanicals and dietary supplements therapy in cancer patients. **Journal Nutrition**, v. 131, p. 179-180, 2001.

GONZALEZ-MOLINA, E.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 327-345, 2010.

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Nature's own pharmacy: the diabetes perspective. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 56, n.1B, p. 507-517, 1997.

HATA, T.; SARAGUCHI, I.; MORI, M.; IKEDA, N. Induction of apoptosis by *Citrus paradise* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. **In vivo**, v. 17, p. 553-559, 2003.

HYUN, K.D.; JEONG, S.M.; AH, B.E; JOO, H.M. Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 356-358, 2000.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, p. 673-751, 1996.

HUANG, Y.; WANG, G.F.; CHEN, C.F.; CHEN, C.C.; HONG, C.Y.; YANG, M.C. Fructus aurantii reduced portal pressure in portal hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 57, n. 22, p. 2011-2020, 1995.

**Instituto Horus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental.** Disponível em ([http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/citrus\\_limon.html](http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/citrus_limon.html), acessado em 14 de agosto de 2011)

JOLY, A.B. Botânica: **Introdução à taxonomia vegetal.** 1993, 11ª edição.

KOHNO, H., TAIMA, M.; SUMIDA, T.; YOSHIRO, A.; OGAWA, H.; TANAKA, T. Inhibitory effect of mandarin juice rich in  $\beta$ -cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. **Cancer letters**, v. 174, p. 141-150, 2001.

KUSTER, R.M; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: C.M.O. SIMÕES, E.P. SHENKEL, G. GOSMANN, J.C.P. MELLO, L.A. MENTZ, P.R. PETROVICK (org.)

**Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2003.

LIEBSTEIN, A.M. Therapeutic effects of various food articles. **American Medicine**, v. 33, p. 33-38, 1927.

MAHADY, G.B. Global Harmonization of herbal health claims. **Journal Nutritionn Philadelphia**, v.131, p.1120S-1123S, 2001

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-675, 2000.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSWA, T. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. **Journal of Agriculture Food and Chemistr**, v. 45, p. 4619 - 4623, 1997.

MONAGEMI, R.; SHAHRBANOO, O.; HAERI-ROOHANI, A.; GHANNADI, A.; JAFARIAN, A. Cytotoxic effects oils of some Iranian *Citrus* peels Iranian. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 183-187, 2010.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998.

ORTENCIO, B. **Medicina Popular do Centro-Oeste**. 2ª edição. Brasília, Thesaurus, 1997.

PENIDON, A. B.; SILVA, M. W. B. Guia Fitoterápico, **Facimp**, 2007.

RAPISARDA, P.; FANELLA, F.; MACCARONE, E. Reliability of Analytical Methods for Determining Anthocyanins in Blood Orange Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2249-2252, 2000.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S.; MAJO, D.D.; GIAMMANCO, M. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, p. 466-479, 2007

VAZQUEZ, F.M.; SUAREZ, M.A.; PEREZ, A. Medicinal plants used in the Barros area, Badajoz Province (Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 81-85, 1997.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 4, p. 361-72, 2005.

VIEIRA, L.S. Fitoterapia da Amazônia. Manual de plantas medicinais. **A farmácia de Deus**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

**CAPÍTULO I: Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das  
folhas de *Citrus limon* (L.) Burm (Rutaceae)**

**(Artigo Submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais )**

**Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de  
*Citrus limon* (L.) Burm (Rutaceae)**

**CAMPELO, LML<sup>1</sup>; SÁ, CG; LIMA, SG<sup>1</sup>; FEITOSA, CM<sup>2</sup>; SOUSA, GF<sup>3</sup>; FREITAS,  
RM<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPI. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>3</sup>Aluna de Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Ceará, Brasil

**RESUMO**

A caracterização química do óleo essencial de folhas de *Citrus limon* (OECL), resultou na identificação de uma mistura de monoterpenos (limoneno, linalol, cis-óxido de limoneno, trans-óxido de limoneno, citronelal, neral, geranial, nerol e acetato de geranil). As estruturas dos compostos do óleo essencial foram identificadas por CG/EM, por comparação com dados da literatura. Os efeitos da administração aguda com doses repetidas do OECL foram investigados sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* machos. Os animais (n=10/grupo) foram tratados por via oral diariamente durante 30 dias com OECL, nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg e os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados. O tratamento não causou nenhuma morte ou toxicidade nos animais. A administração do OECL não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos e o peso de órgãos, exceto por uma diminuição de 21 e 11% em uréia e ácido úrico, respectivamente, e 9%, em nos níveis plasmáticos de aspartato transaminase (AST). Para os parâmetros hematológicos, houve pequenas mudanças nas contagens de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos, mas estes não foram diferentes dos valores de referência. Além disso, houve uma diminuição significativa nos triglicerídeos a qual foi detectada nos animais tratados com uma dose de 150 mg/kg de OECL. A administração aguda com doses repetidas de OECL não induziu nenhum efeito de risco na maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados em camundongos *Swiss* machos. No entanto, a redução dos níveis de uréia e ácido úrico em doses elevadas, sugere um possível efeito sob a insuficiência renal que deve ser melhor investigada.

**PALAVRAS-CHAVE:** bioquímica, *C. limon*, hematologia, óleo essencial, tratamento agudo.

**ABSTRACT: Chemical constituents and toxicological studies of the extracted essential oil of *Citrus limon* (L.) Burm.**

The chemical characterization of the essential oil of leaves from *C. limon* (Rutaceae) resulted in identification of a mixture of monoterpenes (limonene, linalool, *cis*-limonene-oxide, *trans*-limonene-oxide, citronellal, neral, geranial, nerol e geranyl acetate). The structures of the compounds of essential oil were identified by GC/MS by comparison with literature data. The effects of the acute treatment with repeated doses of the EOCL from were investigated on biochemical and hematological parameters in male adult Swiss mice. Male rats (n=10/group) were orally treated daily for 30 days with EOCL at the doses of 50, 100 or 150 mg/kg body weight and the biochemical and hematological parameters evaluated. The treatment did not cause any deaths or toxicity in the animals. The administration of essential oil failed to change biochemical and hematological parameters and organ weight, except for decreases of 21 and 11% in blood urea nitrogen and uric acid respectively, and 9%, in aspartate transaminase (AST) plasma level. For the hematological parameters, there were slight changes in which neutrophil, lymphocytes, eosinophils and monocyte counts were not different from the reference values. In addition, with respect to serum triglyceride a significant decrease was detected in mice treated with a dose of 150 mg/kg of EOCL. In conclusion, the acute treatment with repeated doses of the EOCL did not induce any harzadous effects on most of the biochemical and hematological parameters studied in male adult Swiss mice. However, the decrease in the levels in blood urea nitrogen and uric acid in high doses, suggests a possible effect against renal insufficiency which should be investigated in more detail.

**KEYWORDS:** biochemistry, *C. limon*, hematology, essential oil, Acute treatment.

## INTRODUÇÃO

A família Rutaceae consiste de cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (MELO, 2004). O *Citrus* é um gênero que compreende cerca de 70 espécies de subarbustos e arbustos que podem ser cultivadas ou encontradas espontaneamente na Alemanha, Espanha, México, Venezuela, Cuba, Jamaica, Equador, e no Norte e Nordeste do Brasil (KUSTER *et al.*, 2003).

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonóides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (KUSTER *et al.*, 2003). A maioria dos compostos flavônicos são heterosídeos de flavononas (hesperidosídeo, neohesperidosídeo, naringosídeo, eriodictiosídeo). Ocorrem também outros flavonóides, como a diosmina e o rutosídeo (BRUNETON, 1993; ARRIAGA, 1990). O fruto imaturo contém sinefrina e n-metiltiramina (HUANG *et al.*, 1995). O óleo volátil da casca do fruto apresentou atividade sedativa, hipnótica, contrastando com o extrato etanólico das folhas, que não apresentou esta atividade (CARVALHO-FREITAS, 2002). O extrato alcoólico da casca dos frutos mostrou efeito antiespasmódico (FOSTER *et al.*, 1980). Testes farmacológicos *in vitro*, com os frutos demonstraram potente efeito inibidor contra a atividade do rotavírus (HYUN *et al.*, 2000). O suco dos frutos apresentou, *in vitro*, atividade antimicrobiana (CACERES *et al.*, 1987) O extrato do fruto, em ratos, produziu uma redução do consumo de alimento e do ganho de peso corporal e um índice significativo de mortalidade. Este efeito foi atribuído à atividade  $\beta$ -adrenérgica da sinefrina (CALAPAI *et al.*, 1999). Esta substância também está correlacionada com uma ação redutora da pressão portal, possivelmente por meio da vasoconstrição arterial, detectada por meio da infusão da casca do fruto. (HUANG *et al.*, 1995).

*Citrus limon* é popularmente conhecido como limoeiro, cujas folhas e frutos são aproveitados pela medicina popular para fins terapêuticos, essa planta também é conhecida como limão verdadeiro, e é originária da Região Sudeste da Ásia (PENIDON; SILVA, 2007). O *C. limon* possui várias ações terapêuticas na medicina popular, a saber: adstringente, antianêmico, antibiótico, antisséptico, antiemético, antidepressivo, antiinflamatório, antiespasmódico, bactericida, antireumático, antidisentérico (PENIDON; SILVA, 2007; AGRA *et al.*, 2007; FENNER *et al.*, 2006; REZENDE; COCCO, 2002; VENDRUSCOLO *et*

*al.*, 2005; VIEIRA, 1992) e ainda para tratamento da febre e da tosse (LIEBSTEIN, 1927; GRAY; FLATT, 1997; DE FEO *et al.*, 1992).

No presente estudo, foi extraído o óleo essencial das folhas de *Citrus limon*. A extração do óleo e análise por CG possibilitou a identificação de nove monoterpenos, limoneno, linalol, citrionelol, neral, nerol, *cis*-óxido-limoneno, *trans*-óxido-limoneno, geraniol e acetato de geraniol. Após a extração do óleo essencial foram avaliados os seus efeitos após administração subcrônica em parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos, além de seu efeito sobre a massa das principais vísceras.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### *Material vegetal*

As folhas de *C. limon* para o referido estudo foram coletadas às 8 horas da manhã durante o mês de Fevereiro de 2010 de hortas medicinais existentes nas proximidades do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí no município de Picos, Piauí. As exsiccatas da espécie (Número 26.453) foram depositadas no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí. Após a pesquisa de materiais estranhos, a matéria-prima vegetal foi usada para extrair o óleo essencial.

### *Extração do Óleo Volátil*

O óleo essencial de *C. limon* foi obtido, partindo-se de 1.100 g de folhas frescas trituradas e utilizando-se o sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (MATOS, 1999) durante o período de quatro horas. O óleo coletado foi subsequentemente seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e mantido sob refrigeração até a realização da análise. O rendimento do óleo foi de 0,29%, calculados com base nos volumes de óleo obtido e do peso do material vegetal fresco.

### *Análise do Óleo Volátil e Identificação dos Constituintes*

A análise dos constituintes voláteis foi realizada em equipamento CG/EM Hewlett-Packard, Modelo 5971 usando-se coluna capilar apolar DB-1, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25  $\mu\text{m}$ ); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 0,8 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35 °C para 180 °C em 4 °C/min e em seguida 180 °C para 250 °C em 10 °C/min. Os espectros de massas foram gravados a

partir de 30-450 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro Wiley e outros dois computadores (ALENCAR *et al.*, 1984) utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR *et al.*, 1990) bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN *et al.*, 1974; ADAMS, 2001).

### **Estudos dos efeitos do óleo essencial de *C. limon* em parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos**

#### *Animais e Tratamento*

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina<sup>®</sup>) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ( $26 \pm 2$  °C).

Quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados durante 30 dias consecutivos, por via oral, com o óleo essencial de *Citrus limon* nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg dissolvido em Tween 80 0,05% (grupos OECL 50, OECL 100 e OECL 150), Tween 80 0,05% (grupo Tween 80) ou solução salina 0,9% (grupo controle).

Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e os animais avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e ração. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 h e anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida, foi feita à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab<sup>®</sup>) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

#### *Análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos*

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina

(ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®.

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células serão analisadas e contadas.

#### *Análises estatísticas*

Os valores serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos serão determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t-Student-Newman-Keuls*. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5 %.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Resultados do rendimento e identificação da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *C. limon*.**

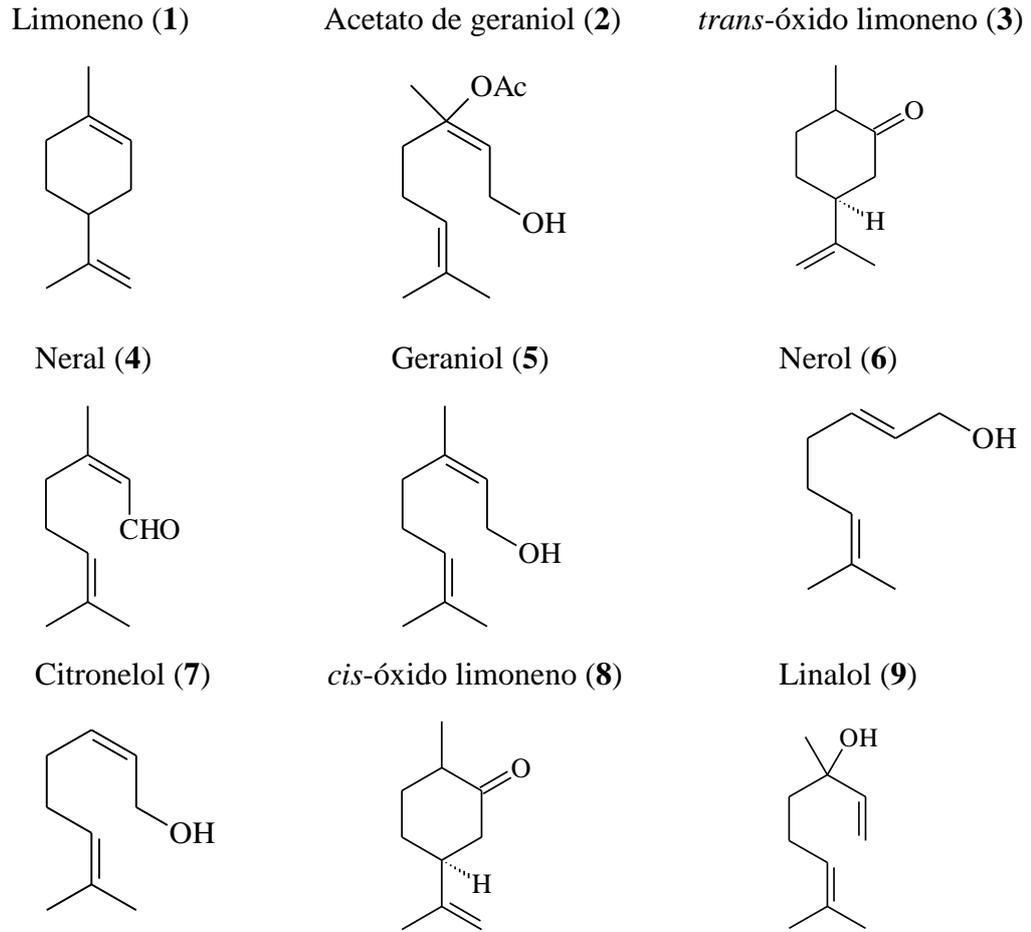
Os rendimentos, a composição química e as percentagens relativas dos constituintes encontrados no óleo volátil da amostra obtida a partir das folhas de *C. limon* estão apresentados na Tabela 1. O rendimento calculado com base no peso das folhas frescas foi determinado como sendo 0,29%, similar ao óleo volátil obtido com as folhas de *Citrus* (TU, 2002).

O constituinte mais abundante encontrado nas folhas de *C. limon* foi o limoneno (52,77%) (A) (**Tabela 1**) assim como descrito na literatura para outras espécies de *Citrus* (TU, 2002). Em seguida obtiveram-se acetato de geraniol (9,92%)(D), *trans*-óxido limoneno (7,13%) (F), Neral (6,85%) (E), Geraniol (5,49%) (C), Nerol (4,04%) (B), Citronelol (2,77%) (G), *cis*-óxido limoneno (2,68%) (H) e Linalol (1,73%) (I). Todos estes compostos são citados na literatura como constituintes químicos de outras espécies de *Citrus* (GONZALEZ-MOLINA *et al.*, 2010; JAHN; GÜNZEL, 1997 ).

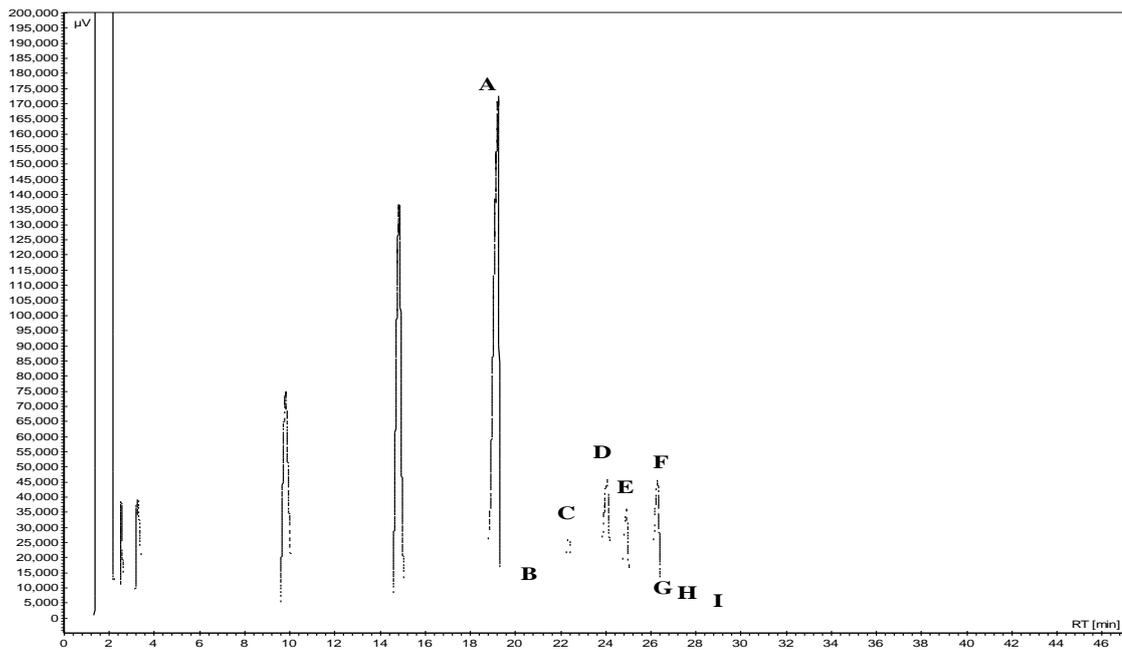
**Tabela 1.** Rendimento da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *C. limon.*

Constituintes	Área (%)	IK Calc.
<b>Limoneno</b>	52,77	1025.5
<b>Linalol</b>	1,73	1100
<i>cis</i> -óxido-limoneno	2,68	1129.3
<i>trans</i> -óxido-limoneno	7,13	1133.7
<b>Citronelol</b>	2,77	1150
<b>Neral</b>	6,85	1238.5
<b>Geraniol</b>	5,49	1268.9
<b>Nerol</b>	4,04	1363.3
<b>Acetato de Geraniol</b>	9,92	1384.2
<b>Total</b>	93,38	-
<b>Rendimento (%)</b>	0,29	-

A identificação de derivados voláteis foi realizada por interpretação automatizada de espectros de massa dos constituintes na amostra de óleo e ainda pelo índice de retenção. Um total de nove derivados, exclusivamente monoterpenos, foi caracterizado, correspondendo a 93,38% dos derivados identificados (**Figura 2**). Os constituintes encontrados tiveram suas estruturas químicas registradas como demonstra a Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química dos constituintes identificados do óleo essencial das folhas de *C. limon*.



**Figura 2.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. limon* obtido em equipamento CG/EM Hewlett-Packard (Modelo 5971).

## Resultados da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com óleo essencial de *C. limon* por via oral durante 30 dias

O óleo essencial de *C. limon* não alterou de forma significativa o peso corpóreo dos animais. Durante o tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada. Não houve alteração no consumo de água e ração dos animais (**Tabela 2**). Nossos resultados são contrários aos efeitos do extrato do fruto, em ratos, que produziu uma redução do consumo de alimento e do ganho de peso corporal e um índice significativo de mortalidade dos animais.

**Tabela 2.** Análise morfológica macroscópica de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *C. limon* por via oral durante 30 dias.

Órgãos	Controle (n=10)	OECL 50 (n=10)	OECL 100 (n=10)	OECL 150 (n=10)
<b>Coração</b>	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<b>Fígado</b>	0,81 ± 0,05	0,79 ± 0,02	0,80 ± 0,03	0,81 ± 0,05
<b>Baço</b>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
<b>Rim</b>	0,09 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01
<b>Cérebro</b>	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02
<b>Pulmão</b>	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>Adrenal</b>	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001

**Legenda:** Análise morfológica macroscópica de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle,  $n = 10$ ) e com óleo essencial de *C. limon* nas doses 50 mg/kg (OECL 50,  $n = 10$ ), 100 mg/kg (OECL 100,  $n = 10$ ) e 150 mg/kg (OECL 150,  $n = 10$ ) durante 30 dias. Os valores foram expressos como a média ± E.P.M dos valores expressos em termos de massa relativa g/100g do número de animais usados nos experimentos.  $n$  – representa o número de animais em cada grupo. As vísceras foram cuidadosamente removidas após a eutanásia. Em seguida, dissecadas e determinada suas massas úmidas em balança analítica. <sup>a</sup> $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste);

Os resultados mostram que a administração oral por 30 dias com óleo essencial extraído de *C. limon*, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. Em adição, a atividade geral dos camundongos não foi alterada, assim como seu consumo de ração e água.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (IATSYNO, 1978; JAHN & GÜNZEL, 1997). O óleo OECL não alterou o ganho de massa corporal dos camundongos. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos realizados com roedores tratados com compostos extraídos de plantas medicinais (SPINELLA, 2001; CAVALINI *et al.*, 2005; HARKNESS; WAGNER, 1993), os quais também não demonstraram sinais de toxicidade.

O tratamento agudo com doses repetidas com OECL em camundongos nas doses de 50 e 100 mg/kg, de forma geral, não induziu modificações no perfil bioquímico (**Tabela 3**). Entretanto, os camundongos tratados com a dose de 150 mg/kg OECL apresentaram a maioria dos parâmetros dentro da faixa de referência (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2000). No entanto, para o valor da uréia, ácido úrico, triglicerídeos no grupo tratado com a maior dose houve uma diminuição significativa em 21, 11 e 8% quando comparados ao grupo controle, respectivamente ( $p < 0,05$ ), assim, como a AST que reduziu, respectivamente, em 9% ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (**Tabela 3**). Quando comparados os grupos controle e os grupos tratados com OECL com grupo tratado somente com Tween 80 0,05% não foram observadas mudanças significativas em nenhum dos parâmetros bioquímicos.

De fato, resultados do nosso laboratório (dados não apresentados) mostram que o óleo essencial extraído de *C. limon* nas doses de 150 mg/kg por via oral não produziram mortalidade em camundongos de ambos os sexos, por um período de observação de 30 dias. Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência, (DOYAMA *et al.*, 2005) houve exceções para a uréia, ácido úrico, triglicerídeos e AST. A alteração significativa verificada nos níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico apenas no grupo tratado com a dose de 150 mg/kg do OECL pode ser inicialmente interpretada como uma alteração renal. E a redução nos níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico fornece indícios de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda ou uma diminuição do catabolismo protéico (DANTAS *et al.*, 2006)

**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *C. limon* por via oral durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n=10)	OECL 50 (n=10)	OECL 100 (n=10)	OECL 150 (n=10)
<b>Glicose</b> (mg/dL)	88,74 ± 8,10	88,03 ± 8,06	88,25 ± 8,05	88,32 ± 8,04
<b>Uréia</b> (mg/dL)	54,67 ± 0,22	54,37 ± 0,19	54,23 ± 0,03	43,32 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,02
<b>Ácido úrico</b> (mg/dL)	2,61 ± 0,04	2,68 ± 0,17	2,69 ± 0,02	2,32 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	106,7 ± 0,05	105,10 ± 0,13	105,67 ± 1,28	98,12 ± 0,49 <sup>a</sup>
<b>CT</b> (mg/dL)	86,07 ± 0,57	86,09 ± 0,24	86,05 ± 0,68	86,02 ± 0,82
<b>Proteínas totais</b> (mg/dL)	6,64 ± 1,03	6,28 ± 0,92	6,23 ± 0,94	6,32 ± 0,84
<b>AST</b> (U/mL)	91,40 ± 1,81	91,71 ± 0,73	92,91 ± 0,21	82,82 ± 0,38 <sup>a</sup>
<b>ALT</b> (U/mL)	57,83 ± 0,81	58,27 ± 0,11	57,29 ± 0,07	58,35 ± 0,04
<b>Fosfatase alcalina</b> (U/I)	157,6 ± 0,97	158,2 ± 0,09	157,4 ± 0,17	158,3 ± 0,04
<b>Bilirrubina total</b> (mg/dL)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,03
<b>Bilirrubina direta</b> (mg/dL)	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02

**Legenda:** Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle,  $n = 10$ ) e com óleo essencial de *C. limon* (OECL) nas doses 50 mg/kg (OECL 50,  $n = 10$ ), 100 mg/kg (OECL 100,  $n = 10$ ) e 150 mg/kg (OECL 150,  $n = 10$ ) durante 30 dias. Os valores foram expressos como a média ± E.P.M do número de animais usados nos experimentos ( $n = 10$ ). <sup>a</sup> $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t-Student–Newman–Keuls* como *post hoc* teste).

Com relação aos níveis séricos dos triglicerídeos foi detectada uma diminuição significativa nos camundongos tratados com a dose de 150 mg/kg do óleo essencial extraído de *C. limon*. Os dados da literatura para os valores de triglicerídeos (**Tabela 3**) são inferiores aos nossos (DOYAMA *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 1981). Diante dos

efeitos na redução sérica dos triglicerídeos pode ser sugerido o uso do OECL no tratamento das dislipidemias.

As análises das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões de hepatócitos (WRIGHT; PLUMMER, 1974). Uma droga não provoca dano no fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2000). A fosfatase alcalina é um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático (MARTIN *et al.*, 1981) e muitas vezes são usadas para avaliar a integridade da membrana (AKANJI *et al.*, 1993). A diminuição nos níveis plasmáticos de AST observado neste estudo, além de ser estatisticamente significante em relação ao grupo controle, foi maior que os níveis de referência para roedores (COIMBRA *et al.*, 1955; MITRUKA; RAMSLEY, 1977). Estes dados não fornecem indícios de alterações na função hepática, uma vez que segundo Kaneko e colaboradores (1997) os níveis séricos de ALT aumentam quando ocorrem alterações na permeabilidade ou lesões nos hepatócitos. A AST tem uma isoenzima mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é essencialmente citoplasmática. Isto pode justificar o fato de ter-se registrado alterações significativas apenas nos níveis de AST. Além disso, a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, uma vez enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em concentrações elevadas em outros órgãos, como rins, pulmões e coração (AL-HABORI *et al.*, 2002).

De maneira semelhante, observou-se que o tratamento oral dos animais com o OECL não alterou significativamente o perfil hematológico (**Tabela 4**), embora tenham sido observadas mudanças nos leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos revelou, embora, dentro dos limites de referência (HARKNESS; WAGNER, 1993), pequenas flutuações, porém sem indicativo de importância clínica. Quando comparados os grupos controle e tratados com o óleo essencial extraído de *C. limon* com grupo tratado com Tween 80 0,05% não foram observadas mudanças significativas em nenhum dos parâmetros hematológicos.

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, tratados com óleo essencial de *C. limon* por via oral durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n=10)	OECL 50 (n=10)	OECL 100 (n=10)	OECL 150 (n=10)
<b>Hemácias</b> (mm <sup>3</sup> )	8,64 ± 0,03	8,68 ± 0,02	8,60 ± 0,01	8,61 ± 0,04
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	14,37 ± 0,15	14,36 ± 0,09	14,33 ± 0,03	14,35 ± 0,04
<b>Hematócrito</b> (%)	44,15 ± 0,30	44,11 ± 0,13	44,16 ± 0,33	44,32 ± 0,04
<b>VCM</b> (fL)	49,67 ± 0,04	49,61 ± 0,51	49,55 ± 0,05	49,62 ± 0,04
<b>HCM</b> (pg)	16,64 ± 0,03	16,68 ± 0,11	16,63 ± 0,32	16,62 ± 0,49
<b>CHCM</b> (g/dL)	36,50 ± 0,14	36,86 ± 0,36	36,17 ± 0,45	36,12 ± 0,45
<b>RDW</b> (%)	13,67 ± 0,04	13,29 ± 0,11	13,51 ± 0,02	13,52 ± 0,04
<b>Plaquetas</b> (mm <sup>3</sup> )	292,40 ± 0,83	294,7 ± 2.28	292,90 ± 0,21	291,8 ± 1,75
<b>Leucócitos totais</b> (mm <sup>3</sup> )	8,63 ± 0,03	8,60 ± 0,08	8,69 ± 0,06	8,44 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Neutrófilos</b> (%)	18,66 ± 0,04	18,67 ± 0,09	18,63 ± 0,09	18,15 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos</b> (%)	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,31 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos</b> (%)	78,12 ± 0,31	78,41 ± 0,28	78,17 ± 0,15	74,33 ± 0,26 <sup>a</sup>

**Legenda:** Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos *Swiss*, tratados por via oral com solução salina 0,9% (Controle,  $n = 10$ ) e com óleo essencial de *C. limon* (OECL) nas doses 50 mg/kg (OECL 50,  $n = 10$ ), 100 mg/kg (OECL 100,  $n = 10$ ) e 150 mg/kg (OECL 150,  $n = 10$ ) durante 30 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. ( $n = 10$ ). <sup>a</sup> $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t-Student–Newman–Keuls* como *post hoc* test);

## CONCLUSÃO

A extração do óleo essencial de *C. limon* resultou na identificação predominante de monoterpenos. Baseados nos resultados obtidos a partir dos estudos hematológicos e bioquímicos do sangue dos camundongos adultos, sugere-se que a administração aguda em doses repetidas do óleo essencial de *C. limon* não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados de camundongos *Swiss* adultos.

Entretanto, uma diminuição dos níveis séricos de uréia e ácido úrico em camundongos tratados com o óleo essencial de *C. limon* na dose de 150 mg/kg apontam para uma possível melhora da função renal, bem como a redução dos níveis de triglicerídeos sugerem para seu uso no tratamento das dislipidemias. Além disso, nossos resultados sugerem para um possível uso deste óleo no tratamento das dislipidemias. Dessa forma, os efeitos farmacológicos e toxicológicos do óleo essencial de *C. limon* precisam ser investigados de forma mais detalhada e durante um maior período de tratamento dos animais.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida à L.M.L.C. e pelas bolsas de produtividade em pesquisa aos professores R.M.F. e a C.M.F.

### **REFERÊNCIAS**

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AKANJI, M.A.; OLAGOKE, O.A.; OLOYEDE, O.B. Effect of chronic consumption of metabisulphite the integrity of the kidney cellular system. **Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 173-179, 1993.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L. Kovats índices simulation in essencial oil analysis. **Quimica Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Product**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.

ARRIAGA, E.J.; RUMBERO, A. Naringin, hesperidin and neohesperidin content in juices from thirteen *Citrus* spp. **Fitoterapia**, v. 51, 31-36, 1990.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2<sup>a</sup> ed. Paris: Lavoisier, 1993.

CACERES, A.; GIRON, L.M.; ALVARADO, S.R.; TORRES, M.F. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 223-237, 1987.

CALAPAI, G. FIRENZUOLI, F.; SAITTA, A. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: a preliminary report. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 586-592, 1999.

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

CAVALINI, M.; FOLIS, G.P.; RESENER, M.C.; ALEXANDRE, R.F.; ZANNIN, M.; SIMÕES, C.M.O. Serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 2, p. 1-11, 2005.

COIMBRA, I.K.S. KOSEMJAKIN, D.A., DINIZ, J.M.F.; CÍRIO, S.M.; LEITE, L.C. Perfil bioquímico sérico de provas funcionais hepática e renal após intoxicação experimental com extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* L. em ratos albinos (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 8, p. 258-264, 1955.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K. N.; BARONI, S.; AMADO, C.A.B. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade

Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DE FEO, V.; AQUINO, R.; MENGHINI, A.; RAMUNDO, E.; SENATORE, F. Traditional phytotherapy in the Peninsula Sorrentina, Campania, Southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 113-125, 1992.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.; CEREDA, W.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-74, 2005.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L. A.; RATES, S.M.H. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FORSTER, H.B.; NIKLAS, H.; LUTZ, S. Antispasmodic effects of some medicinal plants. **Planta Medica**, v. 40, n. 4, p. 309-319, 1980.

GONZALEZ-MOLINA, E.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 327-345, 2010.

GRAY, A.M.; FLATT, P.R. Nature's own pharmacy: the diabetes perspective. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 56, n. 1B, p. 507-517, 1997.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos roedores**. São Paulo: Livraria Roca, 1993.

HUANG, Y.; WANG, G. F.; CHEN, C. F.; CHEN, C. C.; HONG, C. Y.; YANG, M. C. *Fructus aurantii* reduced portal pressure in portal hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 57, n. 22, p. 2011-2020, 1995.

KIM, D.H.; SONG, M.J.; BAE, E.A.; HAN, M.J. Inhibitory effect of herbal medicines on rotavirus infectivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n.3, p. 356-358, 2000.

IATSYNO, A.I.; BELOVA, L.F.; LIPKINA, G.S.; SOKOLOV, S.Y.A.; TRUTNEVA, E.A. Pharmacology of Calendulose B – A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakologiya i Toksikologiya**, v. 41, p. 550-560, 1978.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 2-3, p. 171-78, 1997.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: C.M.O. SIMÕES, E.P. SHENKEL, G. GOSMANN, J. C. P. MELLO, L. A. MENTZ, P. R. PETROVICK (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2003.

LIEBSTEIN, A.M. Therapeutic effects of various food articles. **American Medicine**, v. 33, p. 33-38, 1927.

MARTIN, D.W.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. In: **HARPER'S Review of Biochemistry**. California: Lange Medical, 1981.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L.; HIRUMA, C. A. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MITRUKA, B.M.; RAMSLEY, H.M. **Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals**. New York: Masson Publishing, 1977.

PENIDON, A.B.; SILVA, M.W.B. Guia Fitoterápico. **Facimp**, 2007.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

SPINELLA, M. **Psychopharmacology of herbal medicine: plants that alter mind, brain, and behavior**. Massachusetts: The MIT, 2001.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSSON, S.; MCLAFFERTY, F.W. **Registry of Mass Spectra Data**. J. Wiley & Sons: New York, 1974.

TU, N.T.; THANH, L.X.; UNE, A.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and peels oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 3, p.169-174, 2002.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VIEIRA, L.S. Fitoterapia da Amazônia. Manual de plantas medicinais. **A farmácia de Deus**. 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 9-15, 2000.

WAYNFORTH, B.H. **Injection techniques**. In: experimental and Surgical Techniques in the Rat. London: Academic Press. 1980.

WRIGHT, P.J.; PLUMMER, D.T. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 65-73, 1974.

**CAPÍTULO II: Avaliação do efeito do óleo essencial do *Citrus limon* (L.) (Burm) no sistema nervoso central de camundongos**

**(Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia)**

## **Avaliação do efeito do óleo essencial do *Citrus limon* (L.) Burm no sistema nervoso central em camundongos**

**CAMPELO, LML<sup>1</sup>; FEITOSA, CM<sup>2</sup>; FREITAS, RM<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), Teresina - Piauí, Brazil. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

### **RESUMO**

Os efeitos anticonvulsivantes e depressores do Sistema Nervoso Central (SNC) do óleo essencial de *C. limon* foram investigados em modelos animais. A administração subcrônica do óleo essencial de *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg) por via oral (v.o.) durante 30 dias em camundongos, produziu uma redução significativa da atividade locomotora dos camundongos no teste da atividade locomotora espontânea, quando comparados com o grupo controle. O óleo essencial de *C. limon*, administrado diariamente durante 30 dias na dose de 150 mg/kg (v.o.), produziu um déficit na coordenação motora dos animais e reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo de permanência na barra giratória do aparelho de “*rota-rod*”. Na avaliação da atividade anticonvulsivante o óleo essencial de *C. limon* (100 e 150 mg/kg, v.o.) administrado durante 30 dias aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) a latência e reduziu as crises convulsivas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ). Estes efeitos foram revertidos pela administração do flumazenil, um antagonista seletivo dos receptores GABAérgicos. Adicionalmente, o óleo essencial de *C. limon*, na maior dose administrada durante 30 dias, foi capaz de promover um aumento ( $p < 0,001$ ) da latência para o desenvolvimento de convulsões induzidas pela picrotoxina (PIC). A partir destes resultados pode-se sugerir que o OECL exerce um efeito depressor sob o SNC e anticonvulsivante em camundongos que precisam ser mais bem investigado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anticonvulsivante, Camundongos, *C. limon*, GABA, Óleo essencial.

**ABSTRACT**

The central nervous system (CNS) depressant and anticonvulsant activities of *C. limon* essential oil (EO) were investigated in animal models. The EO (50, 100 and 150 mg/kg) injected by oral route (p.o.) during 30 days in mice caused a significant decrease in the motor activity of animals when compared with the control group, and the dose of 150 mg/kg administered during 30 days significantly reduced the remaining time of the animals on the Rota-rod apparatus. Additionally, *C. limon* essential oil was also capable to promote an increase of latency for development of convulsions induced by pentylenetetrazole (PTZ). The administration of FLU (10 mg/kg, i.p.), GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine (GABA-BZD) receptor antagonist, antagonized the effect of *C. limon* essential oil at higher dose administered during 30 days. This *C. limon* essential oil administered during 30 days was also capable to promote an increase of latency for development of convulsions induced by picrotoxin (PIC) at higher dose. In the same way, the anticonvulsant effect of the EO was affected by pretreatment with flumazenil, a selective antagonist of benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptor. These results suggest a possible CNS depressant and anticonvulsant activities in mice that needs further investigation.

**KEYWORDS:** Anticonvulsant, Mice, *C. limon*, GABA, Essential oil.

## INTRODUÇÃO

O limão [*Citrus limon* (L.) Burm] exibe muitas substâncias químicas importantes como ácido cítrico, ácido ascórbico, minerais e compostos fenólicos, como flavonóides. Além disso, suas propriedades biológicas têm sido sempre associadas ao seu conteúdo de vitamina C, e foi recentemente demonstrado que os flavonóides e outros nutrientes e não-nutrientes (vitaminas, minerais, fibras alimentares, óleos essenciais e carotenóides) desempenham um papel fundamental nestas propriedades (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; ELANGO VAN *et al.*, 1944). Portanto, seus efeitos na promoção da saúde, como obesidade, diabetes, redução de lipídios no sangue, doenças cardiovasculares, distúrbios cerebrais e certos tipos de cânceres, têm sido associados com seu conteúdo, especialmente a vitamina C e flavonóides, devido às suas características antioxidantes naturais (MONFORTE *et al.*, 1995; MIYAKE *et al.*, 1997; MIYAKE *et al.*, 1998; RICE-EVANS *et al.*, 1997; TANAKA *et al.*, 1996).

Algumas plantas medicinais são reconhecidas por causarem atividades no Sistema Nervoso Central (SNC), e, para isso, são utilizadas para afecções crônicas ligadas a este Sistema, como a ansiedade, a depressão ou a epilepsia, que não reagem bem aos tratamentos convencionais (CARLINI, 2003). Assim, o óleo essencial do *C. limon* pode possuir um papel modulador no tratamento de doenças neurodegenerativas, uma vez que seus compostos fenólicos podem interromper processos oxidativos celulares no SNC (RICE-EVANS *et al.*, 1997). Os efeitos do óleo essencial das folhas do *C. limon* no SNC ainda não foram determinados, portanto, seria importante a realização destes estudos para esclarecer seu mecanismo de ação cerebral.

Preliminarmente, foi realizada uma triagem comportamental com o fruto de limão que demonstrou que o mesmo promove o sono na demência (WOLFE; HERZBERG, 1996), aumentando o comportamento motivacional e melhorando o comportamento perturbado (BROOKER *et al.*, 1997). Além disso, Nguyen e Paton (2008) demonstraram um efeito antinociceptivo do limão em testes inespecíficos e específicos, uma vez que o envolvimento do *C. limon* nas propriedades do SNC ainda não são compreendidas, decidimos avaliar as atividades de óleo essencial do *C. limon* (OE) em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Drogas*

As drogas utilizadas foram: pentilenotetrazol (PTZ), picrotoxina (PIC), monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) adquiridos pela Sigma (EUA), flumazenil (FLU) e diazepam (DZP) de cristália (Brasil). Os agentes foram administrados oralmente (v.o.) ou intraperitonealmente (i.p.) e administrados em uma dose de 0,1 ml/10 g.

### *Material vegetal e extração do óleo essencial*

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 2010, na cidade de Picos, Estado do Piauí, Brasil, e depositado no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí com o número 26.453. Amostras de óleos essenciais das folhas da *C. limon* foram preparadas pelo Laboratório de Química, UFPI (MATOS *et al.*, 1999).

As folhas de *C. limon* foram secas em estufa com renovação e circulação de ar (modelo MA-037/18) a 40 °C até a completa desidratação. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger utilizando 1.100 g de folhas secas. O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, produzindo rendimentos de 0,32% (v/w). A análise por GC-MS foi realizada em um sistema GC-17A / MS QP5050A - GC/MS (Modo EI de 70 eV, com temperatura da fonte de 270 °C, e massa variando entre 43-350 amu). As condições de operação foram as seguintes: DB-5HT (J & W Scientific, 30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,10 espessura mm); hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e com taxa de divisão de 1:30, a partir de 60 °C (2 min.) a 180°C em 4 °C/min e depois de 180 °C (4 min) a 260 °C em 10°C/min, com uma retenção final de 10 min a 260 °C. A identificação de cada composto foi determinada pela comparação entre o seu índice de retenção em relação ao C<sub>8</sub>–C<sub>20</sub> n-alcanos (Fluka Analítica, 1,0 mL da Solução Padrão de Alcano), bem como de seus espectros com a base de dados Wiley 275 L (ALENCAR *et al.*, 1984; 1990). A retenção de dados (índices de retenção) foi comparada com os da literatura (ADAMS, 2007; STENHAGEN *et al.*, 1974).

### *Animais*

Foram usados camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), com idade de dois meses. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e alojados em gaiolas apropriadas a 26 ± 1 °C até 12h de ciclo claro/escuro com acesso à alimentação (Purina®) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados às 8h00 da manhã em uma sala silenciosa. Os protocolos

experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (CEEA / UFPI # 44/09)

#### *Efeitos comportamentais*

A triagem comportamental dos camundongos (n = 7 por grupo) foi realizada seguindo os parâmetros descritos por Almeida e colaboradores (1999). Os camundongos foram tratados durante 30 dias por via oral com o óleo essencial *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg). Após a última dose do tratamento de 30 dias, foi observada a presença dos seguintes sinais gerais de toxicidade: prostração, piloereção, contorções, aumento da evacuação, grooming, sedação, dispnéia, analgesia e ptose palpebral.

#### *Atividade locomotora*

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de sete animais cada e foram tratados por via oral durante 30 dias com veículo (salina / Tween 80 0,05%; grupo controle) ou OE (50, 100 e 150 mg/kg). A atividade locomotora espontânea dos animais foi observada em uma gaiola (50 cm × 50 cm × 50 cm) após a última dose do tratamento durante 30 dias (ASAKURA *et al.*, 1993).

#### *Teste de Coordenação Motora (Teste do rota-rod)*

O dispositivo de *Rota-rod* (AVS ®, Brasil) (**Figura 1**) foi utilizado para a avaliação da coordenação motora (PEREZ *et al.*, 1998). Inicialmente, os camundongos capazes de permanecer sobre a barra giratória do *Rota-rod* por mais de 180 s (9 rpm) foram selecionados 24 h antes do teste. Trinta minutos depois da última dose do tratamento de 30 dias com o óleo essencial do *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg, v.o.), veículo (salina/Tween 80 0,05%; grupo controle) ou diazepam (DZP, 2.0 mg/kg, i.p), cada animal foi testado no aparelho de “*rota-rod*” e registrado o tempo que cada um permaneceu na barra até um tempo final de 180 segundos.

#### *Convulsões induzida por Pentilenotetrazol (PTZ)*

PTZ (60 mg/kg, i.p.) foi usado para induzir convulsões clônicas (SMITH *et al.*, 2007). Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n=7 por grupo), o primeiro grupo correspondeu ao controle e recebeu veículo (salina/Tween 80 0,5%), enquanto o segundo grupo foi tratado com diazepam (DZP, 2,0 mg/kg, ip). Os demais grupos foram tratados diariamente, durante 30 dias, com óleo essencial de *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg, v.o.).

Após a última dose do tratamento de 30 dias com OE, estes camundongos foram tratados com PTZ (i.p.) em uma dose única de 60 mg/kg (i.p.). A latência e a porcentagem de inibição de convulsões clônicas de inibição foram registradas durante 24 h. A taxa de mortalidade foi observada durante o período de 24 h após a administração de PTZ.



**Figura 1** – Equipamento de *rota-rod*

#### *Efeitos do flumazenil nas convulsões induzidas por PTZ*

Foi investigado o efeito do flumazenil, um antagonista do receptor seletivo benzodiazepínico GABA<sub>A</sub> (GABA-BZD), na atividade anticonvulsivante do óleo essencial de *C. limon*. Nos grupos experimentais, os camundongos foram pré-tratados com flumazenil (FLU) (10 mg/kg, i.p.), 30 min antes da última dose do tratamento de 30 dias com OE (150 mg/kg, v.o.) ou drogas padrão (DZP, 2,0 mg/kg, i.p.). Após esses tratamentos, os camundongos foram tratados com uma dose única de 60 mg/kg (i.p.) de PTZ (FILE; PELLOW, 1986). A atividade anticonvulsivante do OE e DZP em camundongos pré-tratados com FLU foi avaliada em modelo de PTZ.

#### *Convulsão induzida por Picrotoxina (PIC)*

Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n = 7 por grupo), o grupo controle recebeu veículo (salina/Tween 80 0,05%) e o grupo padrão foi tratado com diazepam (DZP, 2 mg/kg, i.p.). Os demais grupos foram tratados diariamente, durante 30 dias com 50, 100 e 150 mg/kg de óleo essencial (v.o.). Os camundongos foram tratados com uma dose única de PIC (8 mg/kg; i.p.), 30 min depois da última dose do tratamento com OE durante 30 dias. Imediatamente após a administração do agente convulsivante, os camundongos foram

colocados individualmente em caixas plásticas e observados durante 24 h de acordo com o tempo de início da convulsão clônica (latência), porcentagem de convulsões clônicas e mortes. A incidência de mortes foi observada até 24 h após a injeção de PIC (LEHMANN *et al.*, 1988; BUM NGO *et al.*, 2001).

#### *Análise Estatística*

Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t-Student-Neuman-Keuls*. A incidência (%) de convulsões clônicas ou tônico-clônicas, assim como a taxa de mortalidade foi avaliada pelo Teste de Fisher's. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

#### *Constituintes do óleo essencial de C. limon*

A análise por GC-MS mostrou uma mistura de monoterpenos, sendo limoneno (52,77%), acetato de geranil (9,92%) e trans-limoneno-óxido (7,13%) os principais constituintes do óleo essencial do *C. limon* (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Substâncias químicas e índices de retenção dos constituintes do óleo essencial de *C. limon*.

RT (min) <sup>a</sup>	Compostos <sup>b</sup>	(%)	IK <sup>c</sup>
4.785	Limoneno	52,77	1025.5
6.365	Linalool	1,73	1100
7.137	<i>cis</i> -óxido-limoneno	2,68	1129.3
7.253	<i>trans</i> -óxido-limoneno	7,13	1133.7
7.686	Citronellal	2,77	1150
10.141	Neral	6,85	1238.5
11.030	Geranial	5,49	1268.9
13.062	NI	6,62	1337.8
13.857	Nerol	4,04	1363.3
14.441	Acetato de geranil	9,92	1384.2
	Total identificado	93,38	

NI=Não identificado.

<sup>a</sup> Tempo de Retenção.

<sup>b</sup> Compostos listados de acordo com ordem de eluição de uma coluna DB-5MS.

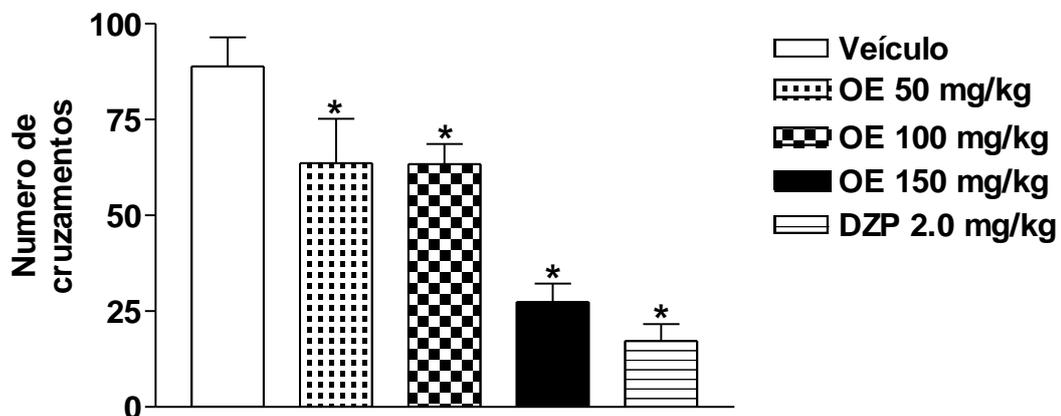
<sup>c</sup> Índices de Kovats foram calculados contra n-alcenos (C9-C18) em uma coluna DB-5MS.

### *Efeitos Comportamentais*

O óleo essencial do *C. limon* nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (v.o.) mostrou mudanças comportamentais em animais durante 30 dias de tratamento: diminui a atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia e sedação. As mudanças comportamentais foram mais evidentes no segundo dia de tratamento.

### *Atividade locomotora*

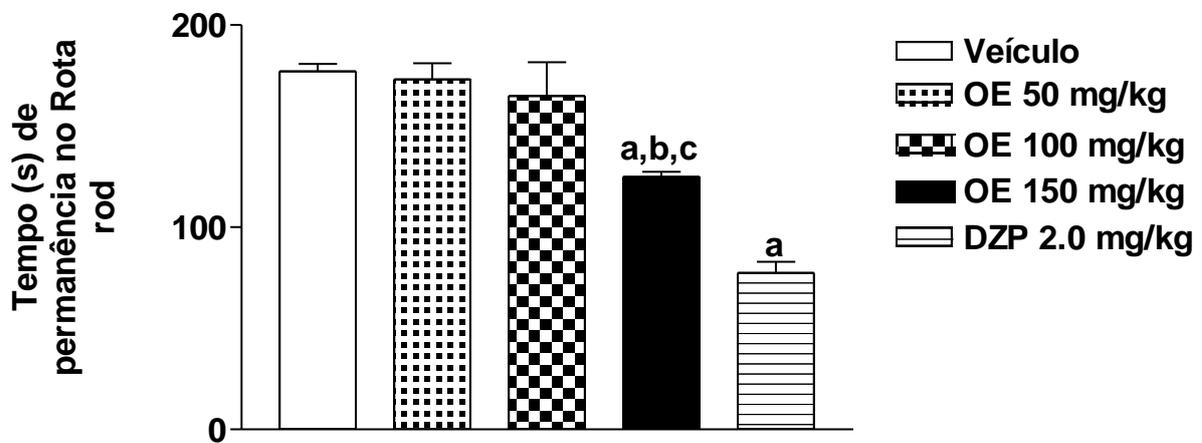
Nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg de óleo essencial de *C. limon* administrado durante 30 dias houve uma diminuição significativa de 28, 29 e 79% na atividade locomotora (número de cruzamentos), quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), respectivamente (**Figura 2**). A dose de 150 mg/kg de óleo essencial de *C. limon* administrado durante 30 dias causou diminuição significativa de 57 e 56% na atividade locomotora, quando comparado com OE 50 ( $p < 0,001$ ) e OE 100 ( $p < 0,001$ ), respectivamente (**Figura 2**). Diazepam (2 mg/kg, i.p.) causou diminuição significativa de 81% na atividade locomotora (número de cruzamentos), quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2** – Efeitos do óleo essencial de *C. limon* (OE, 50, 100 e 150 mg/kg, v.o.) ou diazepam (DZP, 2,0 mg/kg, i.p.) na atividade locomotora de camundongos. Os parâmetros avaliados foram o número total de atividades de cruzamentos na gaiola. Os valores foram expressos como a média ± E.P.M do número de camundongos usados nos experimentos ( $n = 7$  por grupo). <sup>a</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fisher) comparado com o controle; <sup>b</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fisher) comparado com o grupo OE 50; <sup>c</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fisher) comparado com grupo OE 100.

### Coordenação motora (Teste Rota-rod)

Após administração da dose de 150 mg/kg (v.o.) de óleo essencial de *C. limon* durante 30 dias, foi realizado o teste de coordenação motora, no qual, o tempo que os animais permaneceram sobre o aparelho *Rota-rod* foi significativamente reduzido em 30% (**Figura 3**). Na dose de 150 mg/kg de OE administrado durante 30 dias causou diminuição significativa de 28 e 27% do tempo de permanência dos animais sobre o aparelho *Rota-rod*, quando comparado com OE 50 ( $p < 0,001$ ) e OE 100 ( $p < 0,001$ ), respectivamente (**Figura 3**). O diazepam (2 mg/kg, i.p.) causou diminuição significativa de 56% do tempo de permanência dos animais sobre o aparelho *Rota-rod*, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 3** – Tempo (s) observado sobre a barra giratória no teste do *Rota-rod* em camundongos após o tratamento via oral com veículo (controle), óleo essencial de *C. limon* (OE, 50, 100 e 150 mg/kg, v.o.) ou DZP (2,0 mg/kg, i.p.). A resposta motora foi registrada para os 180 s seguintes após o tratamento com a droga. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M do número de camundongos usados nos experimentos ( $n = 7$  por grupo). <sup>a</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fischer) em relação ao controle; <sup>b</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fischer) em comparação ao grupo OE 50; <sup>c</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fischer) em comparação com OE grupo 100.

### Atividade anticonvulsivante

A tabela 2 demonstra que PTZ induziu convulsões clônicas em 100% dos camundongos no grupo controle. O óleo essencial de *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg, v.o.) administrado durante 30 dias retardou de forma significativa o início das convulsões tônicas induzida por PTZ. O óleo essencial *C. limon* (150 mg/kg, v.o.) administrado durante 30 dias protegeu 85% ( $p < 0,001$ ) de camundongos contra a convulsão e reduziu em 60% a taxa de

mortalidade induzida por PTZ ( $p < 0,001$ ). O diazepam (2 mg/kg, i.p.) protegeu completamente os animais contra a convulsão tônica induzida por PTZ.

Como pode ser visto na Tabela 2, a administração de FLU (10 mg/kg, i.p.) antagonizou o efeito do óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, v.o.) administrada durante 30 dias e DZP (2 mg/kg, i.p.) no prolongamento da latência da convulsão.

**Tabela 2** - Efeitos do óleo essencial de *C. limon* (OECL) nas convulsões induzidas por PTZ em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Latência (s)	% Inibição de Convulsão	% Inibição de Morte
Veículo	-	126,3 ± 11,9	0	0
OE 50	50	229,0 ± 22,6 <sup>a</sup>	0	0
OE 100	100	345,8 ± 38,0 <sup>b</sup>	10	20 <sup>e</sup>
OE 150	150	552,5 ± 33,5 <sup>c</sup>	85 <sup>d</sup>	40 <sup>d</sup>
OE + FLU	150 + 10	241,8 ± 38,9	0	15 <sup>e</sup>
DZP	2	852,9 ± 10,0 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>
DZP + FLU	2 + 10	161,2 ± 15,2	0	15

Os valores foram expressos com a média ± E.P.M do número de camundongos (n = 7 por grupo). <sup>a</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de Testes *t-Student-Neuman-Keuls*) em relação ao controle; <sup>b</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de Testes *t-Student-Neuman-Keuls*) em relação ao controle; <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de Testes *t-Student-Neuman-Keuls*) em relação ao controle; <sup>d</sup> $p < 0,001$  (Teste de Fisher) em relação ao controle; <sup>e</sup> $p < 0,05$  (Teste de Fisher) em relação ao controle.

Quando administrado, somente em altas doses, por via oral, o óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, v.o.), aumentou a latência para convulsões e reduziu a taxa da mortalidade induzida pela PIC quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Efeitos do óleo essencial de *C. limon* (OE) nas convulsões induzidas por PIC em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg)	Latência (s)	% Inibição de Convulsão	% Inibição de Morte
Veículo	-	596,2 ± 14.5	0	0
DZP	2	1436,0 ± 10.0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
OE 50	50	598,5 ± 21.01	0	0
OE 100	100	597,5 ± 45.9	10	10
OE 150	150	1205,9 ± 29.3 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>

Os valores foram expressos como a média ± E.P.M do número de camundongos usados nos experimentos (n = 7 por grupo). <sup>a</sup>p<0,05 (ANOVA seguido de Teste *t-Student-Neuman-Keuls*) em relação ao controle; <sup>b</sup>p<0,001 (Teste de Fischer) em relação ao controle.

## DISCUSSÃO

Na medicina brasileira popular do Nordeste, *C. limon* ("Limoeiro") é usado para o tratamento de demência e danos oxidativos. No presente estudo, as atividades depressoras e anticonvulsivantes do óleo essencial das folhas de *C. limon* foram investigadas em diferentes modelos animais. Na triagem farmacológica comportamental, os animais tratados com OE mostraram uma diminuição da resposta ao toque, ptose palpebral, ataxia, analgesia, sedação e redução da atividade motora. Essas mudanças comportamentais sugerem um possível efeito depressor sobre o SNC e são semelhantes aos das drogas que reduzem a atividade do SNC. (MORAIS *et al.*, 2004; NETTO *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 1999).

O óleo essencial das folhas de *C. limon* em altas doses (150 mg/kg) causou uma redução significativa da atividade locomotora dos animais, corroborando com a hipótese de que os óleos essenciais de *C. limon* reduzem a atividade do SNC (FREIRE *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2008; CARLINI, 2003; QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2008).

A redução da atividade locomotora pode ser sugerida devido ao efeito inibitório do óleo essencial de *C. limon* no SNC ou devido a uma atividade relaxante muscular. Assim, este resultado indica que OE pode exibir uma atividade sedativa. Nossa análise por GC-MS revelou uma mistura de monoterpenos (limoneno, acetato de geranyl e trans-óxido-limoneno) como principais compostos no OE e que estes podem causar efeitos inibitórios no SNC de

camundongos observados durante a triagem farmacológica comportamental após 30 dias de tratamento com OE (PASSOS *et al.*, 2009).

Neste contexto, para avaliar se o óleo essencial de *C. limon* produz incoordenação motora foi realizado um teste no aparelho de *rota-rod*. Mais uma vez, os resultados mostram que a dose mais alta produz incoordenação motora em camundongos. Assim, a incoordenação motora no teste do *rota-rod* é característica de uma droga que reduz a atividade do SNC, como ansiolíticos, sedativos e hipnóticos (ALMEIDA *et al.*, 1999; OLAYIWOLA *et al.*, 2007; DALLMEIER; CARLINI, 1981).

O início de convulsão tônico-clônicas produzidas por PTZ foi significativamente retardada pelo óleo essencial de *C. limon* e a incidência de mortalidade foi reduzida. De acordo com Sarro e colaboradores (1999), PTZ pode estar exercendo seu efeito convulsivante inibindo a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA) nos receptores GABA<sub>A</sub>. GABA é o principal neurotransmissor inibitório da epilepsia. O aumento da inibição da neurotransmissão do GABA freqüentemente atenua e melhora a convulsão, respectivamente (WESTMORELAND *et al.*, 1994). Por isso, o óleo essencial de *C. limon* impediu e retardou a ocorrência de convulsões, e provavelmente, isso tenha sido causado pela ativação da neurotransmissão gabaérgica (NICOLL, 2001; RANG *et al.*, 2003).

A fim de determinar o papel do receptor GABA-BZD no efeito anticonvulsivante do óleo essencial de *C. limon*, foi utilizado flumazenil (FLU), um antagonista específico dos receptores benzodiazepínicos no complexo receptor GABA-BZD (FILE; PELLOW, 1986). Camundongos pré-tratados com FLU no modelo de convulsão induzida por PTZ sugerem que o OECL pode facilitar a atividade inibitória do sistema GABAérgico, provavelmente por meio de uma ação agonista competitiva nos receptores GABA. O efeito significativo na coordenação motora, em doses mais elevadas, pode apoiar esta teoria, uma vez que as drogas GABAérgicas geralmente são sedativas (PEDERSEN *et al.*, 2009).

De acordo com Nicoll (2001), a picrotoxina, um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, produz convulsões, bloqueando os canais de íons-cloro ligados a receptores GABA<sub>A</sub>, impedindo, assim, a entrada de íons cloreto no cérebro inibindo, conseqüentemente, a transmissão do cérebro (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Portanto, os achados do presente estudo sugerem que o óleo essencial do *C. limon* (150 mg/kg, v.o.) inibiu e/ou atenuou as convulsões induzidas pelo PIC de camundongos por interferir com a neurotransmissão GABAérgica (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Resumindo os nossos dados, os resultados sugerem um possível efeito depressor do SNC e anticonvulsivante do óleo essencial de *C. limon*. Os mecanismos precisos de possíveis

efeitos comportamentais do óleo essencial de *C. limon* ainda não foram completamente esclarecidos, no entanto, o sistema neurotransmissor GABAérgico pode estar envolvido. Assim, outras investigações estão em andamento para a elucidação desse efeito no sistema nervoso central.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) [número de concessão 503354/2009-0] e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI/Brasil) pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS**

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/massa spectroscopy**. Baylor University. Allured. 2001.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Product**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L. Kovats índices simulation in essential oil analysis. **Quimica Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

ALMEIDA R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ASAKUR, W.; MATSUMOTO, K.; OHTA, H.; WATANABE, H. Effects of alpha 2-adrenergic drugs on REM sleep deprivation-induced increase in swimming activity. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 46; p. 111-115, 1993.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BROOKER, D.J.R.; SNAPE, M.; JONHSON, E.; WARD, D.; PAYNE, M. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia **British Journal of Clinical Psychology**, v. 36, p. 287-296, 1997.

BUM, E.N.; SCHMUTZ, M.; MEYER, C.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELET, M.; PORTET, C.; JEKER, A.; RAKOTONIRINA, S.V.; OLPE, H. R.; HERRLING, P. Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 145-150, 2001.

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

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DE SARRO, A.; CECCHETTI, V.; FRAVOLINI, V.; NACCARI, F.; TABARRINI, O.; DE SARRO, G. Effects of novel 6-desfluoroquinolones and classic quinolones on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1729-1736, 1999.

ELANGOVAN, V.; SEKAR, N.; GOVINDASAMY, S. Chemoprotective potential of dietary bioflavonoids against 20-methyl-chloranthrene-induced tumorigenesis. **Cancer Letters**. v. 87, p. 107-113, 1994.

FILE, S.E; PELLOW, S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. **Psychopharmacology**, v. 88, p. 1-11, 1986.

FREIRE, C.M.M.; MARQUES, M.O.M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.

LEITE, M.P.; FASSIN JR, J.; BAZILONI, E. M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 661-666, 2008.

LEHMANN, J.; HUTCHISON, A.J.; MCPHERSON, S.; MONDADORI, C.; SCHMUTZ, M.; SINTON, C.M.; CGS 19755 a selective and competitive *N*-Metil-*D*-aspartate-type excitatory amino acid receptor antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, p. 65-75, 1998.

LÖSCHER, W; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183 - 272, 2006.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L.; HIRUMA, C.A. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSWA, T. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 45, p. 4619-4623, 1997.

MIYAKE Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. Characterization of antioxidative flavonoids glycosides in lemon fruit. **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 48-53, 1998.

MONFORTE, M.T.; TROVATO, A.; KIRIAVAINEN, S.; FORESTIERI, A.M.; GALATI, E. M.; LO CURTO, R.B. Biological effects of hesperidin a Citrus flavonoid. (Note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. **Farmaco**, v. 9, p. 595-599, 1995.

MORAIS, L.C.S.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; FRANCO, C.I.; ALMEIDA, J.R.; ALMEIDA, R.N. Antiparkinsonian-like effects of *Plumbago scandens* on tremorine-induced tremors methodology. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 745-749, 2004.

NETTO, S.M. Anxiolytic-like effect of *Rauvolfia ligustrina* Willd. Ex Roem. & Schult. Apocynaceae, in the elevated plus-maze and hole-board tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 888-892, 2009.

NICOLL, R.A. **Introduction to the pharmacology of the central nervous system (CNS)**. In Katzung BG (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, 8. ed. New York: McGraw-Hill, p. 351-363, 2001.

NGUYEN, Q.A.; PATON, C. The use of aromatherapy to treat behavioral problems in dementia. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 23, p. 337-346, 2008.

OLAYIWOLA, G.; OBAFEMI, C.A.; TAIWO, F.O. Synthesis and neuropharmacological activity of some quinoxalinone derivatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 777-786, 2007.

OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, R.N.; SOUSA, M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, S.A.; MEDEIROS, I.A. Anticonvulsant properties of *N*-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 199-202, 2001.

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

PEREZ, G. R. M.; PEREZ, L. J. A.; GARCIA, D. L. M.; SOSSA, M. H.. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PEDERSEN, M. E.; VESTERGAARD, H. T.; HANSEN, S. L.; BAH, S.; DIALLO, D.; JÄGER, A. K. Pharmacological screening of Malian medicinal plants used against epilepsy and convulsions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 472-475, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Pharmacology, fifth ed. Churchill Livingstone, **Edinburgh**, pp. 585-587, 2003.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; SOUZA, T.T.; LEITE, B.S.; LESSA, N.M.; BONJARDIM, L.R.; SANTOS, M.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ANTONIOLLI, A.R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, p. 619-624, 2008.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANDA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H.S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F.W. Registry of Mass Spectra Data Base, Washington DC: **Government Printing Office**, 1974.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; MORI, H. Chemoprotection of 4-NOO-induced oral carcinogenesis by dietary flavonoids diosmin and hesperidin. **Recent Advanced Gastroenterology Carcinogenic**. v. 1, p. 1167-1170, 1996.

WESTMORELAND, B.F.; BENARROCH, E.E.; DUBE, J.R.; REGAN, T.J.; SANDOK, B.A. Medical Neurosciences. Mayo Foundation, **Rochester**, p. 307-312, 1996.

WOLFE, N.; HERZBERG, J. The study protocol of a blinded randomized-controlled cross-over trial of lavender oil as a treatment of behavioural symptoms in dementia. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 11, p. 926-927, 1996.

**CAPÍTULO III: Atividade antioxidante do óleo essencial do *Citrus limon* em hipocampo de camundongos.**

**(Artigo publicado na Revista Pharmaceutical Biology)**

**Atividade antioxidante do óleo essencial do *Citrus limon* em hipocampo de camundongos.**

**CAMPÊLO, LML<sup>1</sup>; GONÇALVES, FCM<sup>2</sup>; FEITOSA, CM<sup>2</sup>; FREITAS, RM<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), Teresina - Piauí, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

**RESUMO**

Estudos anteriores demonstraram que o *Citrus limon* (L.) Burm (Rutaceae) tem várias funções biológicas (antiinflamatório, antialérgico, antiviral, antimutagênica e anticarcinogênica). No entanto, o estudo do *C. limon* sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) foi providenciado com base nos usos tradicionais da medicina popular. Este estudo investigou os efeitos do óleo essencial de *C. limon* (OE) nos níveis de peroxidação lipídica, teor de nitrito, concentração de glutathiona reduzida (GSH), e atividades das enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx)] em hipocampus de camundongos. Camundongos *Swiss* foram tratados com a suspensão de Tween 80 0,05% em água destilada utilizada como veículo (i.p. grupo controle) e com OE em três doses diferentes (50, 100, 150 mg/kg, i.p., grupos de OE 50, OE 100 e OE 150, respectivamente). Após os tratamentos, todos os grupos foram observados durante 24 h. A atividade enzimática, bem como a peroxidação lipídica, concentrações de nitrito e GSH no hipocampo dos camundongos foram medidos através de métodos espectrofotométricos e os resultados comparados com os valores obtidos do grupo controle. O tratamento com OE de *C. limon* reduziu significativamente o nível de peroxidação lipídica e conteúdo de nitrito, mas aumentou os níveis de GSH e SOD, e atividades de catalase e GPx no hipocampo de camundongos. Nossos resultados apoiam fortemente a hipótese de que o estresse oxidativo no hipocampo pode ocorrer durante doenças neurodegenerativas, provando que o dano hipocampal induzida pelo processo oxidativo desempenha um papel crucial em distúrbios cerebrais, e ainda implica que um forte efeito protetor pode ser conseguido usando óleo essencial de *C. limon* como um antioxidante.

**Palavras-chave:** Camundongos, *C. limon*, Estresse oxidativo; Hipocampo; Óleo essencial.

**ABSTRACT: Antioxidant activity of essential oil of *Citrus limon* hippocampo in mice.**

*Citrus limon* (L.) Burm (Rutaceae) has been shown in previous studies to have various biological functions (antiinflammatory, antiallergic, antiviral, antimutagenic, and anticarcinogenic). However, *C. limon* study on Central Nervous System (CNS) were provided based on the traditional uses in folk medicinal. This study investigated the effects of *C. limon* essential oil (EO) on lipid peroxidation level, nitrite content, glutathione reduced (GSH) concentration, and antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx)] activities in mice hippocampus. *Swiss* mice were treated with the suspension of 0.05% Tween 80, in distilled water used as vehicle (i.p., control group) and with EO in three different doses (EO 50, EO 100 and EO 150 groups, respectively). After the treatments, all groups were observed for 24 h. The enzyme activities as well as the lipid peroxidation, nitrite and GSH concentrations in mice hippocampus were measured using spectrophotometric methods and the results compared to values obtained from control group. EO of *C. limon* treatment significantly reduced the lipid peroxidation level and nitrite content but increased the GSH levels and the SOD, catalase and GPx activities in mice hippocampus. Our findings strongly support the hypothesis that oxidative stress in hippocampus can occur during neurodegenerative diseases, proving that hippocampal damage induced by the oxidative process plays a crucial role in brain disorders, and also imply that a strong protective effect could be achieved using essential oil of *C. limon* as an antioxidant.

**Key words:** Mice; *C. limon*; Oxidative stress; Hippocampus; Essential oil.

## INTRODUÇÃO

O limão [*Citrus limon* (L.) Burm (Rutaceae)] tem muitos componentes químicos naturais, incluindo ácido cítrico, ácido ascórbico, minerais, flavonóides e terpenóides. Embora as propriedades relacionadas à saúde sempre fossem associados ao teor de vitamina C, recentemente foi demonstrado que os flavonóides também desempenham um papel fundamental a este respeito. Alguns autores sugerem que os flavonóides têm diferentes funções biológicas, incluindo atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais, antiproliferativas, antimutagênicas e anticarcinogênicas (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997.; ELANGO VAN *et al.*, 1994). Portanto, embora os novos cultivares de Citrus tem sido selecionados e desenvolvidos principalmente para consumo fresco, as características particulares do seu conteúdo de flavonóides levaram à sua utilização em áreas de tecnologia farmacológica e de alimentos (DEL RÍO *et al.*, 1998; ORTUÑO *et al.*, 1997).

O fruto do limoeiro contém muito componentes químicos naturais importantes, incluindo compostos fenólicos (flavonóides) e outros nutrientes e não-nutrientes (vitaminas, minerais, fibras alimentares, óleos essenciais, e carotenóides). Os efeitos de promoção da saúde e suas propriedades têm sido associados com o conteúdo de vitamina C e flavonóides, devido às suas características antioxidantes naturais (RICE-EVANS *et al.*, 1997.; TANAKA *et al.*, 1996). No geral, os limões, rico em flavonóides e terpenóides, são uma parte muito importante de uma dieta equilibrada, especialmente pelo seu papel na prevenção de doenças (MIYAKE *et al.*, 1998), tais como obesidade, diabetes, redução de lipídios no sangue, doenças cardiovasculares, e certos tipos de câncer (MIYAKE *et al.*, 1997.; MONFORTE *et al.*, 1995). Assim, o óleo essencial do *C. limon* (OE) pode possuir um papel modulador no tratamento de doenças neurodegenerativas, devido seus compostos fenólicos terem o poder de interromper processos oxidativos celulares no sistema nervoso central (SNC). Os efeitos da OE de *C. limon* no SNC ainda não foram determinados, portanto, seria importante a realização destes estudos, a fim de esclarecer seu mecanismo de ação cerebral.

Estudos farmacológicos com OE de *C. limon* podem revelar os seus efeitos sobre o nível de peroxidação lipídica, teor de nitrito, a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e atividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase). Caso estes efeitos sejam estabelecidos, é possível justificar o uso deste óleo essencial em estudos pré-clínicos e clínicos no tratamento de doenças neurodegenerativas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do óleo essencial de *C. limon* sobre o nível de

peroxidação lipídica, teor de nitrito, a concentração de GSH e atividades de enzimas antioxidantes em hipocampo de camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

*C. limon* foi identificado e coletado por Chistiane Mendes Feitosa, em fevereiro de 2010, na cidade de Picos, Estado do Piauí, Brasil, e a sua exsicata depositada no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí sob o número do voucher 26.453. Amostras de óleo essencial das folhas de *C. limon* foram preparadas pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade (MATOS *et al.*, 1996).

### *Extração vegetal do óleo essencial de C. limon*

Folhas (0,3 kg) de “limoeiro” foram coletadas no mesmo dia e hora, a partir de plantas com flores. As amostras de folhas coletadas foram destiladas no vapor por 1 h. E os óleos obtidos a partir destas folhas foram analisados (Matos *et al.*, 1996) por GC/MS usando um instrumento GC-17 A/MS-QP505A (Shimadzu), sob as seguintes condições: coluna dimetilpolisiloxano DB-1 coluna capilar de sílica fundida (30 mx 0,25 mm); hélio como gás de arraste, (1 ml/min), temperatura do injetor, 35-180 °C a 4 °C/min, em seguida, 180-250 °C a 10 °C/min; impacto de espectros de massa de elétrons, 70 eV. Componentes individuais foram identificados por análises de espectrometria usando dois computadores de pesquisa em biblioteca MS, e os índices de Kovacs como um auxiliar de pré-selecção. Dados de espectros de comparação de massa da literatura foram usados para confirmação.

### *Procedimentos animais*

Foram utilizados Camundongos *Swiss* machos (25-30 g). Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada ( $26 \pm 1$  °C) e um ciclo de 12 h claro/escuro. O óleo essencial foi emulsificado com Tween 80 0,05%. Animais do grupo controle foram tratados com suspensão de Tween 80 0,05%, em água destilada usada como veículo. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, do Departamento dos EUA de Saúde e Serviços Humanos, Washington DC, 1985. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais, da Universidade Federal do Piauí. Todas as doses são expressas em miligramas por quilograma e foram administrados em um volume de 10 ml/kg injetados via intraperitoneal

(i.p.). Em um conjunto de experimentos, o tratamento com óleo essencial ((50 mg/kg (OE 50), 100 mg/kg (OE 100) ou 150 mg/kg (OE 150)) foi realizado oralmente por gavagem, após suspensão em Monooleato de polioxietilenosorbitan (Tween 80 - 0,05% v/v em solução salina, Synth, Brasil) em um volume constante de 10 ml/kg. Os camundongos foram tratados durante 30 dias consecutivos e 24 horas após a administração da droga, os animais foram sacrificados por decapitação, e o hipocampo foi dissecado. Após a dissecação, a área foi usada nas determinações do nível de peroxidação lipídica, teor de nitrito, concentração de glutathiona reduzida (GSH) e atividade das enzimas antioxidantes. Os testes foram executados entre 08h00 e 18h00 em um quarto iluminado com temperatura controlada e som atenuado.

#### *Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e teor de nitrito*

Para todos os procedimentos experimentais, 10% (w/v) dos homogenatos da área do cérebro investigados estavam preparados para todos os grupos. Níveis de peroxidação lipídica nos grupos de OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) foram analisadas por método previamente descrito por Draper & Hadley (1990). Os resultados acima foram expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/g de tecido.

Para determinar o conteúdo de nitrito nos grupos OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) grupos, os 10% (w/v) foi determinada com base na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981). Os resultados acima foram expressos em nM.

#### *Determinação da atividade de superóxido dismutase*

O hipocampo foi homogeneizado em 1 mL 0.05 M de tampão fosfato de sódio, pH 7,0. Concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os 10% de homogenatos foram centrifugados (800×g, 20 min), e os sobrenadantes usados para ensaio de atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase. Atividade da SOD nos grupos de OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) foi testada usando xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido (FLOHE; OTTING, 1984). Atividade de SOD nas amostras foi determinada a partir desta curva, e os resultados expressos em U/mg de proteína.

#### *Determinação de atividade de catalase*

Atividade de catalase foi medida nos grupos de OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) pelo método que usa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (CHANCE; MAEHLI, 1955). A Concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry e

colaboradores (1951). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína (MAEHLY; CHANCE, 1954).

#### *Determinação da atividade de glutathione peroxidase e concentração de glutathione reduzida*

Glutathione peroxidase foi medida nos grupos OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) utilizando o método descrito por Sinet e colaboradores (1975) e a concentração de proteína foi medida de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como mU por mg de proteína.

Concentração de GSH foi medida nos grupos OE 50 (n=7), OE 100 (n=7), OE 150 (n=7) e controle (n=10) utilizando o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). O hipocampo foi homogeneizado em 0,02 M EDTA. Resultados são expressos em µg por g de tecido.

#### *Análise Estatísticas*

Os resultados das determinações neuroquímicas foram comparados usando ANOVA e Teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste, porque esses resultados mostram uma distribuição paramétrica. Em todas as situações de significância estatística foi alcançado  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows, GraphPad Software (SAN DIEGO, CA, EUA).

## RESULTADOS

Análise por GCMS mostrou uma mistura de monoterpenos, entre os quais limoneno (52,77%), acetato de geranil (9,92%) e trans-limoneno-óxido (7,13%) que foram os principais compostos do óleo essencial do *C. limon* (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Composição química e índices de retenção dos constituintes do óleo essencial de *C. limon*.

RT (min) <sup>a</sup>	Componentes <sup>b</sup>	(%)	IK <sup>c</sup>
4.785	Limoneno	52,77	1025.5
6.365	Linalool	1,73	1100
7.137	cis-óxido-Limoneno	2,68	1129.3
7.253	trans-óxido-limoneno	7,13	1133.7
7.686	Citronellal	2,77	1150
10.141	Neral	6,85	1238.5
11.030	Geranial	5,49	1268.9
13.062	NI	6,62	1337.8
13.857	Nerol	4,04	1363.3
14.441	Acetato de Geranil	9,92	1384.2
	<b>Total identificado</b>	<b>93,38</b>	

NI=Não Identificado

<sup>a</sup>Tempo de Retenção.

<sup>b</sup>Compostos listados por ordem de eluição em uma coluna de DB-5MS

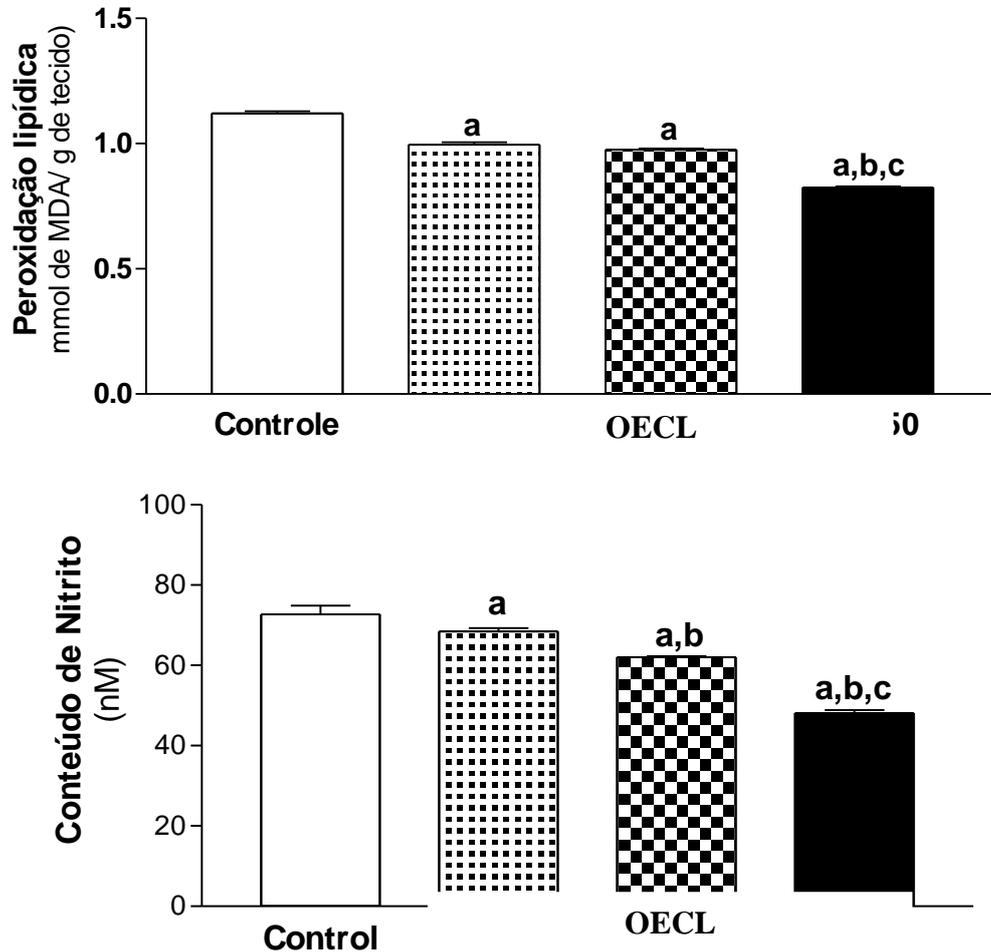
<sup>c</sup> Índices Kovats foram calculados contra *n*-alcanos (C9-C18) em uma coluna de DB-5MS.

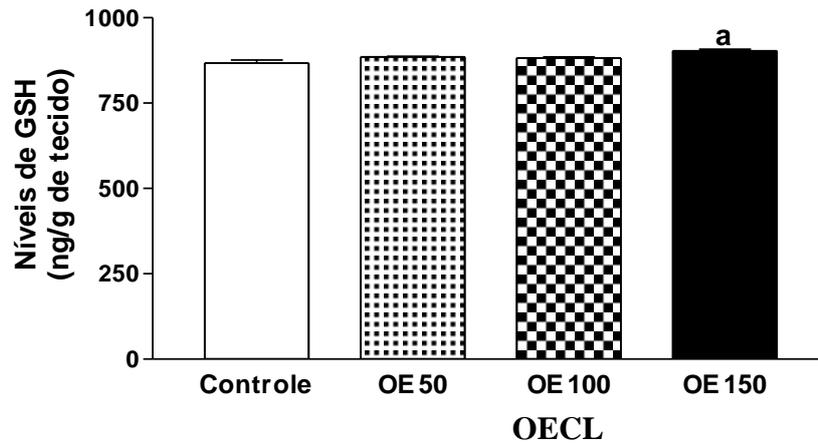
Os efeitos do óleo essencial de *C. limon* sobre os níveis de peroxidação lipídica, concentrações de nitrito e concentração de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos estão apresentados na Figura 1. A peroxidação lipídica foi significativamente diminuída 12, 13 e 27% nos grupos OE 50 [ $p < 0,01$ ], OE 100 [ $p < 0,01$ ] e OE 150 [ $p < 0,01$ ], quando comparados com os valores correspondentes para o grupo controle, respectivamente (**Figura 1**). Nenhum animal que recebeu a dose de OE 100 mg/kg [ $p > 0,05$ ] apresentou alterações em nível de peroxidação lipídica, quando comparado com o grupo OE 50. Por sua

vez, o grupo tratado com OE (150 mg/kg) mostrou reduções de 17 e 15% no nível de peroxidação lipídica, quando comparado com os grupos OE 50 [ $p < 0,01$ ] e OE 100 [ $p < 0,01$ ], respectivamente.

Comparação *Post hoc* das médias indicaram uma redução significativa de 34, 30 e 23% no teor de nitrito de hipocampos de camundongos pré-tratados com EO 150 [ $p < 0,01$ ], quando comparado ao controle e aos grupos OE 50 e OE 100, respectivamente (**Figura 1**). Nos grupos tratados com OE 100 [ $p < 0,01$ ] e OE 50 [ $p < 0,05$ ], uma diminuição de 15 e 6% no teor de nitrito, foi observada no hipocampo de camundongos, quando comparado ao grupo controle, respectivamente. Além disso, no grupo OE 100 [ $p < 0,01$ ], observou-se uma diminuição significativa de 10% no teor de nitrito no hipocampo de camundongos, quando comparado ao grupo OE 50.

Concentração de GSH não foi acentuadamente diferente nos grupos OE 100 e OE 50, quando comparados com os valores correspondentes para o grupo controle [ $p > 0,05$ ] (**Figura 1**). No entanto, o grupo tratado com OE (150 mg/kg) mostrou um aumento de 4% na concentração de GSH no hipocampo de camundongos, quando comparado ao grupo controle [ $p < 0,01$ ].





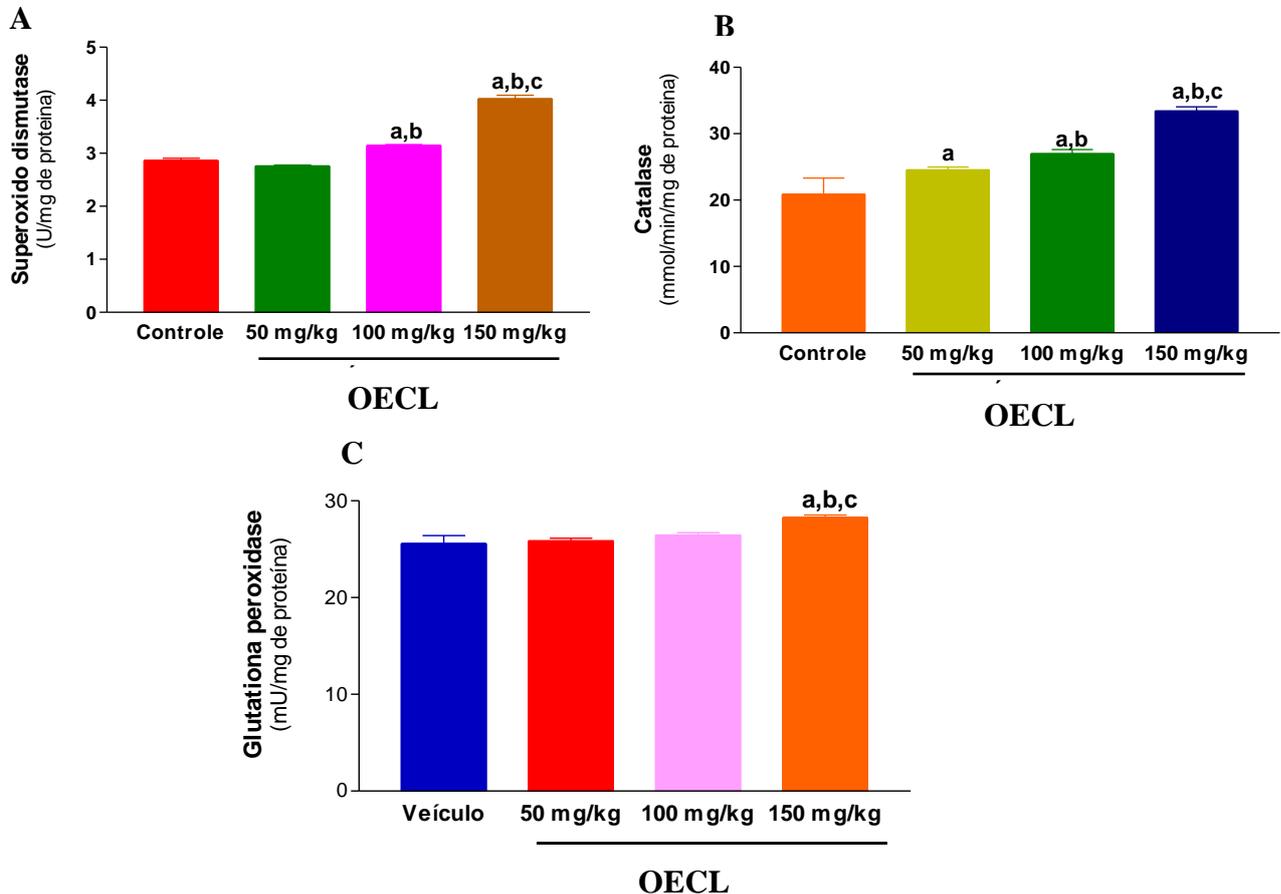
**Figura 1** - Efeitos do óleo essencial de *C. limon* no nível de peroxidação lípidica, conteúdo de nitrito e níveis de glutatona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos.

Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M do número de camundongos usados nos experimentos ( $n = 7$  por grupo). As diferenças de grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA). <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de animais (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo de OE (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); <sup>c</sup> $p < 0,05$  em relação ao OE 100 grupos (ANOVA e *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

A Figura 2 mostra os efeitos do óleo essencial de *C. limon* sobre atividades da superóxido dismutase (A), catalase (B) e glutatona peroxidase (GPx) (C) no hipocampo de camundongos. A atividade de SOD no hipocampo de camundongos não foi significativamente alterada no grupo OE 50 [ $p > 0,05$ ], quando comparado ao grupo controle (**Figura 2A**). Comparação das médias indicou um aumento significativo de 40, 46 e 28% em atividades de superóxido dismutase [ $p < 0,0001$ ] no hipocampo de camundongos pré-tratados com OE 150, em comparação com os grupos controle, OE 50 e OE 100, respectivamente (**Figura 2A**). Além disso, a comparação das médias indicou um aumento significativo (9 e 14%) na atividade de superóxido dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com OE 100 [ $p < 0,0001$ ], quando comparado ao grupo controle e OE 50, respectivamente.

Atividades da catalase no hipocampo camundongos foram significativamente aumentadas (18 e 29%) nos grupos OE 50 e OE 100 [ $p < 0,01$ ], quando comparado ao grupo controle, respectivamente (**Figura 2B**). Comparação das médias indicou um aumento significativo de 59, 36 e 24% na atividade de catalase no hipocampo de camundongos pré-

tratados com OE 150 em atividades de catalase [ $p < 0,01$ ], quando comparado ao grupo controle, OE 50 e OE 100, respectivamente (**Figura 2B**)



**Figura 2** – Efeitos do óleo essencial do *C. limon* nas atividades de superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase em hipocampo de camundongos.

Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M do número de camundongos usados nos experimentos ( $n = 7$  por grupo). As diferenças de grupos experimentais foram determinadas por análise de variância (ANOVA). <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de animais (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo de OE (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>c</sup> $p < 0,05$  em relação ao OE 100 grupos (ANOVA e *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Atividades de glutathiona peroxidase no hipocampo de camundongos não foram significativamente diferentes nos grupos OE 50 e OE 100 [ $p > 0,05$ ], quando comparado com o grupo controle (**Figura 2C**). A comparação das médias indicou um aumento significativo de

10, 9 e 7% em atividades de glutathiona peroxidase no hipocampo de camundongos pré-tratados com OE 150 [ $p < 0,01$ ], quando comparado ao grupo controle, OE 50 e OE 100 grupos, respectivamente (**Figura 2C**).

## DISCUSSÃO

A maioria dos estudos com o óleo essencial foi realizado em outros órgãos e sistemas diferentes do SNC (GOTTLIEB *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2000). No presente trabalho, o nível de peroxidação lipídica, teor de nitrito, a concentração de GSH e as enzimas antioxidantes foram determinados no hipocampo de camundongos após administração de OE de *C. limon*. Foi examinado se o tratamento com OE (150 mg/kg) diminuiu o nível de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos. O cérebro produz continuamente EROS (CASTAGNE *et al.*, 1999), na ausência de um mecanismo de defesa eficiente, estes EROS causam a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O cérebro é particularmente suscetível à peroxidação devido à presença simultânea de elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados e de ferro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989), que é o alvo de danos dos radicais livres. Neste estudo foi registrada uma redução do nível de peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos, após 24 h de tratamento com OE. Isto reflete a diminuição no nível de TBARS, que pode estar relacionado com *sequestrante* de radicais livres pelo OE de *C. limon*.

Tem sido demonstrado que as doenças neurodegenerativas produzem mudanças no metabolismo do óxido nítrico e interagem com receptores glutamatérgicos para produzir parte de sua ação estimulante sobre o SNC (DYMOND; CRANDALL, 1976; FREITAS, 2009; XAVIER *et al.*, 2007). A diminuição no conteúdo de nitrito, após pré-tratamento com OE de *C. limon*, é mais facilmente explicado como uma consequência da inibição da formação de radicais, *scavenges* de espécies reativas derivadas do oxigênio e produtos de peroxidação lipídica (XAVIER *et al.*, 2007). Aumento de radicais livres e os níveis de nitrito elevados observado na doença neurodegenerativa pode ser causado pela peroxidação lipídica (FERREIRA *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2005).

As atividades de SOD, catalase e glutathiona peroxidase pode proteger contra danos neuronais envolvidos na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas. Tem sido demonstrado que o tratamento prévio com OE de *C. limon* (150 mg/kg) produziu um aumento nas atividades de enzimas antioxidantes no hipocampo camundongos. Este aumento nas atividades das enzimas antioxidantes, após tratamento com OE de *C. limon*, é mais facilmente

explicado como uma consequência necessária da inibição de formação de EROS e pode induzir a GSH (KUDIN *et al.*, 2004; Michiels *et al.*, 1994).

Resultados de estudos em animais demonstram que o óleo essencial de plantas medicinais pode reduzir os danos neuronais causados pelos radicais livres que são produzidos por processo inflamatório em doenças neurodegenerativas. Um crescente grupo de evidências sugere que a geração de EROS podem ser a base dos efeitos neurotóxicos de doenças neurodegenerativas (BARROS *et al.*, 2007;. LIANG *et al.*, 2007;. MILITÃO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Diversos derivados de produtos vegetais que apresentam atividade antioxidante direta também estão sendo mostrados por ter atividade anticonvulsivante (HSIEH *et al.*, 1999;. MCCORD, 1989). Recentemente, nosso grupo detectou propriedades antioxidantes do ácido lipóico,  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico em convulsões induzidas por pilocarpina em ratos (BARROS *et al.*, 2007;. MILITÃO *et al.*, 2010;. SANTOS *et al.*, 2008;. XAVIER *et al.*, 2007). Diante destes resultados, o presente estudo também investigou se as ações antioxidantes do OE de *C. limon* estariam envolvidas no estresse oxidativo em hipocampo de camundongos. Para isso, as atividades de enzimas antioxidantes, bem como os níveis de GSH, nitrito e peroxidação lipídica foram medidas no hipocampo de camundongos.

Doenças neurodegenerativas desencadeiam a ativação de fosfolipases, proteases e nucleases de membrana, que causam a degradação de fosfolipídios de membrana, proteólise de proteínas do citosqueleto e fosforilação de proteína (AKBAS *et al.*, 2005;. FREITAS *et al.*, 2003;. OBAY *et al.*., 2008; ONO *et al.*, 2000). Na verdade, de acordo com esses estudos, um trabalho recente mostrou que as doenças neurodegenerativas levam a um aumento na peroxidação lipídica e nos níveis de nitrito (FREITAS, 2009;. SANTOS *et al.*, 2010). O tratamento de animais com (50, 100 e 150 mg/kg) de OE de *C. limon* preveniu significativamente a elevação da peroxidação lipídica e dos níveis nitrito. Sabe-se também que as doenças neurodegenerativas seguido por um aumento na peroxidação lipídica e nitrito no tecido cerebral pode ser diminuída por substâncias com propriedades antioxidantes (BARROS *et al.*, 2007;. OLIVEIRA *et al.*, 2007;. WALZ *et al.*, 2000). Assim, nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte, as atividades neuroprotetoras do OE de *C. limon* são, provavelmente, também relacionadas com o seu efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica em hipocampo de camundongos.

Espécies reativas derivadas do oxigênio, como superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são normalmente produzidas no cérebro. A conversão do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  pode ser feita por catalase e glutathione peroxidase, que envolve a glutathione reduzida, um co-fator dessa enzima. Quando produzida em excesso, EROS também podem

causar a inativação das enzimas (SHARMA *et al.*, 2007). Na verdade, o presente estudo mostrou que a atividade da catalase no grupo OE 150 foi significativamente maior que no grupo controle, demonstrando uma alteração nas defesas neuroprotetoras do cérebro. O tratamento com OE em baixas doses (50 e 100 mg/kg) preservou a atividade de catalase em níveis normais. Estes achados sugerem que OE de *C. limon* pode ajudar as células cerebrais a neutralizar a neurodegeneração induzida pelo excesso de produção de EROS e pelo dano oxidativo.

GSH é um tripeptídeo essencial e um antioxidante endógeno encontrado em todas as células animais. Ele reage com os radicais livres e pode proteger o cérebro dos radicais hidróxidos e dos danos dos radicais superóxido (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram que o tratamento de camundongos com OE de *C. limon* resultou na diminuição dos níveis de GSH no hipocampo. Curiosamente, o tratamento com OE em doses mais baixas (50 e 100 mg/kg), não produziu alterações no conteúdo de GSH, mas a dose mais elevada (OE 150) promoveu aumento dos níveis de GSH, sugerindo que OE de *C. limon* poderia, possivelmente, induzir um aumento da GSH níveis no hipocampo de camundongos. De maneira semelhante, em estudos anteriores realizados por nosso grupo (FREITAS *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010), descobrimos que compostos antioxidantes foram capazes de induzir um aumento nos níveis de GSH no hipocampus de camundongos.

No entanto, o fato do OE de *C. limon* aumentar os níveis de GSH, evitando a depleção ou induzir sua síntese requer uma investigação mais aprofundada. Assim, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que indicam aumento do estresse oxidativo durante distúrbios cerebrais (FERREIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2007), mas em contraste com os ensaios que mostram aumento do estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante durante terapia anticonvulsivante (DE SOUSA *et al.*, 2007; ONO *et al.*, 2000; VINSON *et al.*, 2001).

## CONCLUSÕES

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi observado atividade farmacológica do OE de *C. limon*, em doses de 50, 100 e 150 mg/kg. No presente estudo, a maior dose de OE de *C. limon* foi necessária para a efetiva ações neuroprotetoras contra o estresse oxidativo. A toxicidade aguda oral do OE de *C. limon* já foi avaliada em camundongos. Os resultados obtidos e a DL50 ( $\sim 1.732 \pm 0,1$  mg/kg) representaram uma toxicidade relativamente baixa de OE de *C. limon*, que foi particularmente relacionados com a

sua possível propriedades depressora do sistema nervoso central. Apesar do conhecimento que a constituição de monoterpenos do óleo essencial são muitas vezes considerados como tendo baixa toxicidade (DE SOUSA *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 1996), sugerimos que estudos adicionais são recomendados para investigar ainda mais a segurança do uso do OE de *C. limon* em humanos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil) [número de concessão 503354/2009-0] ea Fundação de Apoio Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI/Brasil) pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS**

AKBAS, S.; YEGIN, A.; OZBEN, T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1009-1014, 2005.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; FREITAS, R.L.M.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; TAKAHASHI, R.N. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G.H. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 397-423, 1999.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-75, 1995.

DE SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007.

DEL RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; ORTUÑO, A. *Citrus* polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4423-4428, 1998.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DYMOND, A.M.; CRANDALL, P.H. Oxygen availability and blood flow in the temporal lobes during spontaneous epileptic seizures in man. **Brain Research**, v. 102, p. 191-196, 1976.

ELANGOVAN, V.; SEKAR, N.; GOVINDASAMY, S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumor genesis. **Cancer Letters**, v. 87, p. 107-113, 1994.

FERREIRA, P.M.P.; MILITÃO, G.C.G.; FREITAS, R. M. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 464, p. 131-134, 2009.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**, 105, 93-104, 1984.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140-144, 2009.

FREITAS, R.M.; BEZERRA FELIPE, C.F.; NASCIMENTO, V.S.; OLIVEIRA, A.A.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: monoamine content and muscarinic and dopaminergic receptor changes in the striatum. **Comparative biochemistry and physiology C Toxicology pharmacology**, v. 136, p. 103-108, 2003.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M.R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; DELGADO-GARCÍA, J.M.; GRUART, A.; MATUTE, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. **Neurobiology of Disease**, v. 23, p. 374-386, 2006.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 5658, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: A Radical Chain Reaction. **Free Radical in Biology and Medicine**, 2 nd: Oxford: Clarendon Press, p. 188-276, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**, 3 nd. London: Oxford Science Publications, 935-938, 1999.

HSIEH, C.L.; TANG, N.Y.; CHIANG, S.Y.; HSIEH, C.T.; LIN, J.G. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria rhynchophylla* (MIQ) Jack and *Gastrodia elata* Bl in kainic acid-treated rats. **Life Science**, v. 65, p. 2071-2082, 1999.

KUDIN, A.P.; BIMPONG-BUTA, N.Y.B.; VIELHABER, S.; ELGER, C.E.; KUNZ, W.S. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4127-4135, 2004.

LIANG, L.P.; BEAUDOIN, M.E.; FRITZ, M.J.; FULTON, R.; PATEL, M. Kainate-induced seizures, oxidative stress and neuronal loss in aging rats. **Neuroscience**, v. 147, p. 1114-1118, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAEHLY, A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods Biochemical Analysis**, v. 1, p. 357-359, 1954.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 695-698, 1996.

MCCORD, J.M. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 209, p. 1120-117, 1989.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, p. 235-248, 1994.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; DE FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4619-4623, 1997.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. Characteristics of antioxidative flavonoid glycosides in lemon fruit. **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 48-53, 1998.

MONFORTE, M.T.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A. M.; GALATI, E. M.; LO, C. Biological effects of hesperidin, a *Citrus* flavonoid. (note II) hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. **Il Farmaco**, v. 50, p. 595-599, 1995.

OBAY, B.D.; TASDEMIR, E.; TÜMER, C.I.; BILGIN, H.I.M.; ATMACA, M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. **Peptides**, v. 29, p. 448-455, 2008.

OLIVEIRA, A.; ALMEIDA, J.P.C.; FREITAS, R.M.; NASCIMENTO, V.S.; AGUIAR, L.M. V.; JÚNIOR, H.V.N.; FONSECA, F.N.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 27, p. 395-406, 2007.

ONO, H.; SAKAMOTO, A.; SAKURA, N. Plasma total glutathione concentrations in epileptic patients taking anticonvulsants. **Clinica Chimica Acta**, v. 298, p. 135-143, 2000.

ORTUÑO, A.; REYNALDO, I.; FUSTER, M.D.; BOTÍA, J.; PUIG, D.G.; SABATER, F.; LIDÓN, A.G.; PORRAS, I.; DEL RÍO, J.A. Citrus cultivars with high flavonoid contents in the fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 68, p. 231-236, 1997.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

SANTOS, I.M.S.; TOME, A.R.; FEITOSA, C.M.; SOUZA, G.F.; FENG, D.; FREITAS, R.M.; JORDÁN, J. Lipoic acid blocks seizures induced by pilocarpine via increases in  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, p. 88-91, 2010.

SANTOS, L.F.L.; FREITAS, R.L.M.; XAVIER, S.M.L.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 1-5, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHARMA, A.B.; SUN, J.; HOWARD, L.L.; WILLIAMS JR, A.G.; MALLET, R.T. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest. **American Journal Physiology**, v. 292, p. H198-H206, 2007.

SINET, P.M.; MICHELSON, A.M.; BAZIN, A.; LEJEUNE, J.; JEROME, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 910-915, 1975.

TANAKA, T.; MAKITA, H.; KAWABATA, K.; MORI, H. Chemoprotection of 4-NOO-induced oral carcinogenesis by dietary flavonoids diosmin and hesperidin. **Recent Advanced Gastroenterology Carcinogen**. v. 1, p. 1167-1170, 1996.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; SILVA, C.M.; DE ABREU MATOS, F.J. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.

VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 103-114, 2001.

WALZ, R.; DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.M.R.; SCHRÖDER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M.S.; MOREIRA, J.C.F. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 179-182, 2000.

XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

**Capitulo IV: Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina**

**(Artigo publicado no Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas)**

**Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* (L.) Burm em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina**

**CAMPELO, LML<sup>1</sup>; FEITOSA, CM<sup>1</sup>; TOMÉ, AR<sup>2</sup>; FREITAS, RM<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), Teresina - Piauí, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Avenida Parajana 1700, Fortaleza, Ceará, Brazil.

**RESUMO**

As convulsões podem produzir danos neuronais em diversas estruturas cerebrais. O objetivo desse estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* (OECL) nas alterações histopatológicas observadas no hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina. Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos com 2 meses de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos. O primeiro grupo foi tratado com Tween 80 0,05% (grupo controle) e o segundo com pilocarpina (400 mg/kg, grupo P400). Já o terceiro e quarto grupo foram tratados com OECL (150 mg/kg), e 30 min depois receberam P400 (grupo OECL + P400) ou Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (grupo OECL), respectivamente. Após os tratamentos, todos os grupos foram observados durante 24 h e em seguida sacrificados e seus cérebros removidos para as análises histopatológicas. O grupo P400, apresentou convulsões que progrediram para o estado epiléptico em 75% dos animais. O pré-tratamento com OECL produziu uma redução de 25% nesse índice. Os grupos P400 e OECL + P400 apresentaram 83,33% e 25% de animais com lesão cerebral no hipocampo, respectivamente. No corpo estriado dos animais do grupo P400 houve um comprometimento de 75%. Por sua vez, na região estriatal dos animais do grupo OECL + P400 foi visto uma redução de 58,34% nesse comprometimento. As convulsões induzidas pela pilocarpina são instaladas pelo sistema colinérgico e produzem dano cerebral. De acordo com nossos resultados podemos sugerir que o OECL pode modular a epileptogênese e promover ação neuroprotetora durante as convulsões no modelo investigado.

**Palavras chave:** *C. limon*; Convulsão; Corpo Estriado; Histopatologia; Pilocarpina.

**ABSTRACT: Evaluation of neuroprotective potential of *Citrus limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures.** The seizures can produce neuronal damage in several brain structures. The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effect of essential oil of *Citrus limon* (EOCL) on the histopathological changes observed in the hippocampus and striatum of mice after seizures induced by pilocarpine. Adult Swiss mice were 2 months old. The animals were divided into four groups. The first group was treated with 0.05% Tween 80 (control group) and the second with pilocarpine (400 mg/kg group P400). The third and fourth group were treated with EOCL (150 mg/kg) and 30 min after received P400 (P400 + EOCL group) or Tween 80 0.05% dissolved in saline solution 0,9% respectively. After treatment, all groups were observed for 24 h, then sacrificed and their brains removed for histopathological analysis. The group P400, presented with seizures that progressed to status epilepticus in 75% of animals. Pretreatment with OECL produced a 25% reduction in this index. Groups P400 and P400 + EOCL showed 83.33% and 25% of animals with brain damage in the hippocampus, respectively. In the striatum of group P400 was a compromise of 75%. In turn, in the striatal region of group EOCL P400 + was seen a decrease of 58.34% in this neuronal damage. The seizures induced by pilocarpine are installed by the cholinergic system and produce brain damage. According to our results we suggest that the EOCL may modulate epileptogenesis and promote neuroprotective effects during the seizures in the model investigated.

**Keywords:** *C. limon*; Seizures; Striatum; Histopathology; Pilocarpine.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* da família Rutaceae é uma das mais importantes culturas de frutas do mundo e é consumido principalmente na forma de fruto fresco ou suco devido ao seu valor nutricional e sabor especial (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Os benefícios para saúde das frutas cítricas têm sido atribuídos à presença de constituintes bioativos como compostos fenólicos, vitamina C e carotenóides (MARCHAND, 2002). Muitos autores têm verificado atividade biológica e as propriedades antioxidantes de óleos essenciais de plantas medicinais (SACCHETTI *et al.*, 2005; PROTEGGENTE *et al.*, 2002; VINSON *et al.*, 2001).

Há um considerável número de plantas aromáticas cujos resultados tem sido promissores no sentido de obter novos fitoterápicos. Como exemplos pode-se citar os efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos em modelos animais dos extratos das folhas de plantas medicinais (LIAN *et al.*, 2005; GRUNDMANN *et al.*, 2007; XIU-YAN *et al.*, 2007). Complementando os achados sobre ação farmacológica de plantas medicinais aromáticas, ensaios pré-clínicos realizados com *Thymus broussonetti* Boiss demonstraram atividade ansiolítica no teste da caixa claro e escura (ELHABAZI *et al.*, 2006). De forma semelhante, foi avaliada a atividade anticonvulsivante dos extratos hidroalcoólicos das cascas do caule de *Erythrina velutina* e *E. mulungu* (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A busca por novas farmacoterapias de plantas medicinais aromáticas para doenças psiquiátricas progrediu significativamente na década passada. Isto pode ser observado no grande número de medicamentos a base de ervas (MINH TU *et al.*, 2002; MORA *et al.*, 2005). Entre as plantas medicinais, o grupo das “aromáticas” tem despertado muito interesse. Essas espécies possuem substâncias odoríferas que tem várias funções (ENAN, 2001; BAKKALI *et al.*, 2008). Trabalhos têm relatado que os monoterpenos e seus derivados sintéticos como:  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona, limoneno, citronelol e o  $\alpha$ -terpineol apresentam várias propriedades farmacológicas, a saber antinociceptiva, anticonvulsivante e neuroprotetora (DE SOUSA *et al.*, 2007c; DE SOUSA *et al.*, 2007a; VIANA *et al.*, 2000; DE SOUSA *et al.*, 2006; DE SOUSA *et al.*, 2007b).

Diante disso, e devido ao crescente número de estudos com plantas medicinais aromáticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas; nós resolvemos investigar o efeito do óleo essencial extraído das folhas de *C. limon* no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico utilizado em modelos experimentais para reproduzir a fisiopatologia das crises convulsivas e que permite investigar e identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia refratária (JOPE *et al.*,

1986). Estudos anteriores demonstram que a administração de pilocarpina, induz o desenvolvimento de convulsões, estado de mal epiléptico e lesão cerebral em roedores (TURSKI *et al.*, 1989; MARINHO *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2003). O início das convulsões pode ser bloqueado por drogas anticolinérgicas e o bloqueio de receptores glutamatérgicos impede sua propagação e o desenvolvimento de danos cerebrais (JOPE *et al.*, 1986; MARINHO *et al.*, 1998; MORISETT *et al.*, 1987).

Fazendo uso desse modelo de convulsões tem-se estudado a severidade e as áreas cerebrais afetadas durante o desenvolvimento das lesões cerebrais em roedores. No entanto, o potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial extraído das folhas de *C. limon* durante a evolução temporal dessas lesões cerebrais ainda não foi completamente estabelecido. De uma maneira geral, as convulsões límbicas produzem danos neuronais em diversas áreas, causando perda neuronal em várias estruturas cerebrais (CLIFFORD *et al.*, 1987; HONCHAR *et al.*, 1990).

Dessa forma, fazendo uso desse modelo de convulsão nos decidimos avaliar se o potencial efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do óleo essencial das folhas de *C. limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, uma vez que, essas áreas têm sido sugeridas como responsáveis pela instalação e propagação e/ou manutenção da atividade convulsiva induzida por pilocarpina, respectivamente (TURSKI *et al.*, 1983).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Procedimento experimental*

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos (2 meses de idade; machos;  $n=48$ ), com peso variando de 20 a 25 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 x 17 cm<sup>3</sup> onde foram observados durante 24 h com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

Os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi tratado com Tween 80 0,05% (i.p.,  $n = 12$ , grupo controle). O segundo grupo foi tratado com pilocarpina na dose de 400 mg/kg (i.p.,  $n = 12$ ; P400). Já o terceiro e quarto grupo foram tratados com o óleo essencial na dose de 150 mg/kg por via intraperitoneal, e 30 min depois receberam

pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n = 12$ , grupo OECL + P400) ou Tween 80 0,05% (i.p.,  $n = 12$ , grupo OECL), respectivamente. Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos seguintes parâmetros (sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (ME), convulsões, estado de mal epilético (EME) e a taxa de mortalidade). O grupo P400 foi constituído pelos animais que apresentaram convulsão, estado epilético e que sobreviveram ao período de 24 h observação.

#### *Estudos histopatológicos*

Após o período de observação de 24 h, todos os grupos foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10  $\mu$  foram feitas, coradas em Hematoxilina - Eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos & Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (BUREAU *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1997). A lesão cerebral foi definida pela presença de pelo menos 50% de alteração histopatológica em cada hipocampo e corpo estriado.

#### *Análise estatística*

Para a análise estatística os resultados não paramétricos (percentagens) foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software utilizando o teste do qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A tabela 1 demonstra os rendimentos, a composição química e as percentagens relativas dos constituintes encontrados no óleo volátil das folhas de *C. limon*. Diante disso, nossos resultados permitiram calcular o rendimento com base na massa das folhas frescas usadas para extração, dessa forma nosso rendimento de 0,29% foi similar ao rendimento encontrado em trabalhos anteriores para o óleo volátil obtido das folhas de *Citrus* (MINH TU, 2002).

**Tabela 1:** Rendimento da composição química do OECL

Constituintes	Índice Kovats Calculado	Área (%)
<b>Limoneno</b>	1025.5	52,77
<b>Linalol</b>	1100	1,73
<i>cis</i> -óxido-limoneno	1129.3	2,68
<i>trans</i> -óxido-limoneno	1133.7	7,13
<b>Citronelol</b>	1150	2,77
<b>Neral</b>	1238.5	6,85
<b>Geraniol</b>	1268.9	5,49
<b>Nerol</b>	1363.3	4,04
<b>Acetato de Geraniol</b>	1384.2	9,92
<b>Total</b>	-	93,38
<b>Rendimento</b>	-	0,29

Por sua vez, a tabela 2 apresenta que todos os animais tratados com pilocarpina (grupo P400,  $n = 12$ ), apresentaram SCP, ME e tremores. As convulsões ocorreram em 75% (9) dos animais, que progrediram para o estado de mal epiléptico (EME) também em 75% (9) dos animais. A taxa de mortalidade desse grupo correspondeu a 66% (8).

**Tabela 2.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* em camundongos durante as convulsões límbicas.

Grupos	SCP (%)	ME (%)	Tremores (%)	Convulsões (%)	Estado epiléptico (%)	Taxa de mortalidade (%)	Número de Animais/grupo
<b>P400</b>	100	100	100	75	75	66	12
<b>OECL + P400</b>	100	100	100	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	12
<b>OECL</b>	00	00	00	00	00	00	12

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com o óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após o tratamento recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). E o grupo OECL foi tratado com o óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos os animais foram observados durante 24 h para a determinação dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores, convulsões, estado epiléptico e a taxa de mortalidade. Os resultados dos estudos comportamentais foram expressos em percentagem. <sup>a</sup>p<0,05. (quando comparado ao grupo P400. Teste do Qui-quadrado).

Os dados apresentados na tabela 2 sugerem que os efeitos produzidos pela estimulação colinérgica periférica não são bloqueados pelo óleo essencial de *C. limon* (OECL) na dose de 150 mg/kg. O pré-tratamento com o óleo essencial (grupo OECL + P400) não interfere nos SCP, ME e tremores induzidos pela pilocarpina. No entanto, produziu um aumento na latência da primeira convulsão e na latência da instalação do estado epiléptico (dados não mostrados). No mesmo grupo foi visto uma diminuição de 25% no número de animais que convulsionam e que evoluem para o EME (p<0,05). Foi verificada também uma redução na taxa de mortalidade de 41% (p<0,05). Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração comportamental (**Tabela 2**).

A tabela 3 descreve as principais alterações histopatológicas observadas no corpo estriado de camundongos adultos machos do grupo P400. Por sua vez, nos animais que foram pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina houve uma redução de 58,34% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no corpo estriado em apenas dois

animais (16,66%). Também foi detectada uma redução de 42,58% no grau de comprometimento do corpo estriado no grupo OECL + P400, quando comparado ao grupo P400. Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica (**Tabela 3**). Por sua vez, a Figura 1 demonstra os efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.

Já na tabela 4 as principais mudanças histopatológicas no hipocampo dos camundongos adultos do grupo P400 podem ser verificadas. Por sua vez, os animais pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina apresentaram uma redução de 58,33% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no hipocampo em três animais (25%). Também foi detectada uma redução de 49,76% no grau de comprometimento do hipocampo no grupo OECL + P400, quando comparado ao grupo P400. Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica no hipocampo (**Tabela 4**). Além disso, na Figura 2 os efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no hipocampo de camundongos pode ser verificado após convulsão induzida por pilocarpina.

**Tabela 3.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* nas alterações histopatológicas estriatais observadas em camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.

Grupos	Alterações histopatológicas no corpo estriado			
	Camundongos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais
<b>P400</b>	75	55,39 ± 0,52	09	12
<b>OECL + P400</b>	16,66 <sup>a</sup>	12,81 ± 0,22 <sup>b</sup>	02	12
<b>OECL</b>	00	00	00	12

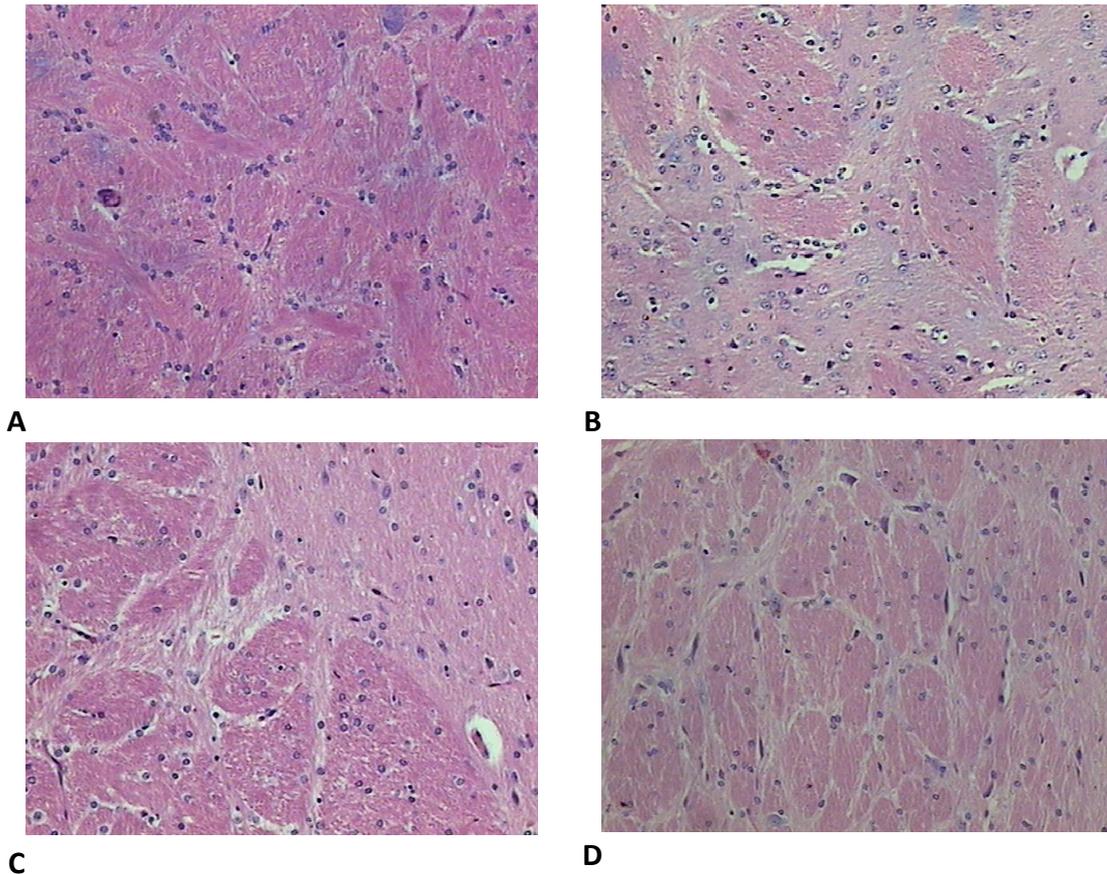
O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL foi tratado com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento estriatal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± E.P.M. dos

escores do dano cerebral do número de animais com lesão no corpo estriado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no corpo estriado. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup>p<0,05, quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste)

**Tabela 4.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* nas alterações histopatológicas hipocampais observadas em camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.

Grupos	Alterações histopatológicas no hipocampo			
	Camundongos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais
<b>P400</b>	83,33	59,92 ± 0,23	10	12
<b>OECL + P400</b>	25 <sup>a</sup>	10,16 ± 0,51 <sup>b</sup>	03	12
<b>OECL</b>	00	00	00	12

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL foi tratado com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento hipocampal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± E.P.M. dos escores do dano cerebral do número de animais com lesão hipocampal. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no hipocampo. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup>p<0,05, quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).



**Figura 1.** Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.

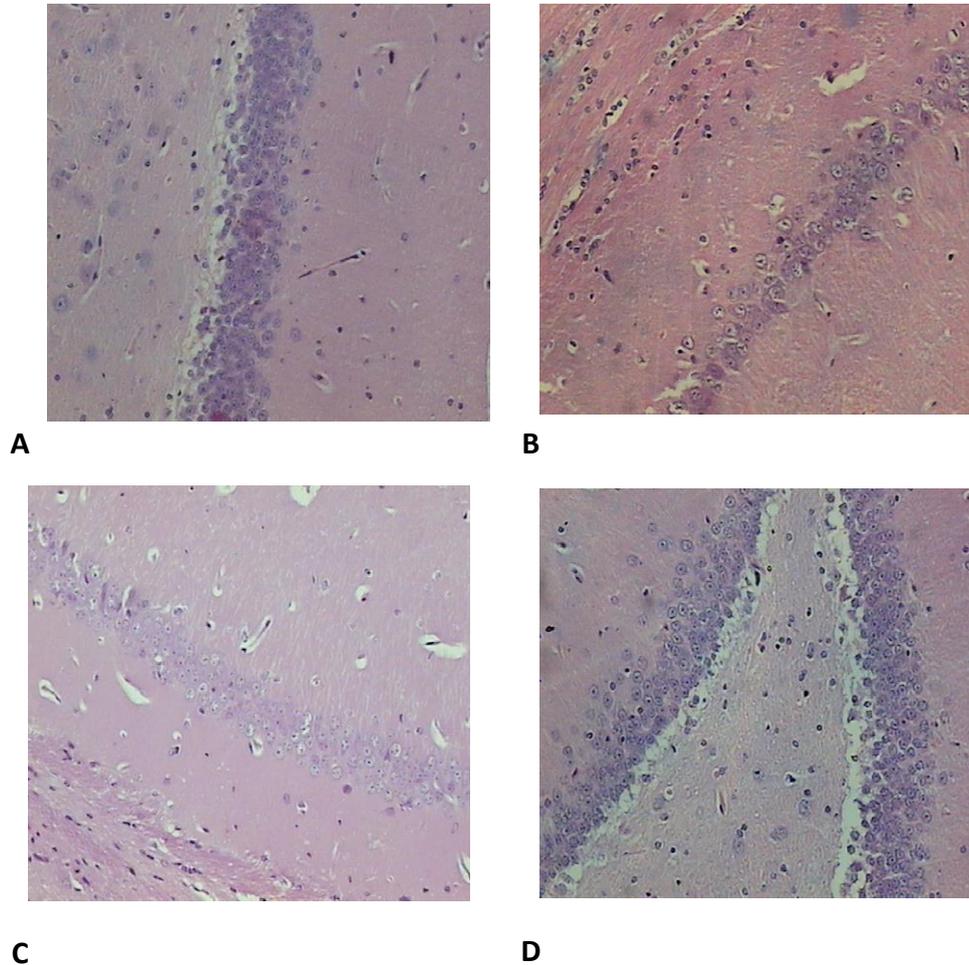
A - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.; n=12, controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

B - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no corpo estriado de camundongos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p., n=9) (HE X40);

C - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=2, OECL + P400) (HE X40).

D - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos observados por 24 h após administração de óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.; n=12, OECL) (HE X40);

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida eutanasiados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada corpo estriado examinado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no corpo estriado.



**Figura 2.** Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *C. limon* no hipocampo de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.

A - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.; n=12, controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

B - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no hipocampo de camundongos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p., n=10) (HE X40);

C - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=3, OECL + P400) (HE X40).

D - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos observados por 24 h após administração do óleo essencial de *C. limon* (150 mg/kg, i.p.; n=12, OECL) (HE X40).

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida eutanasiados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada corpo estriado examinado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no corpo estriado.

## DISCUSSÃO

Na literatura há diversos estudos que demonstram as ações de terpenos carbonilados sobre o SNC. Por exemplo, terpenos do tipo cetona (carvona), aldeído (citronelal), ácido carboxílico (ácido kaurenóico) e éster (jasmonato de metila) apresentam significativa atividade antinociceptiva em roedores (BLOCK *et al.*, 1998). Os terpenos de menor massa molecular (monoterpenos) são encontrados nos óleos essenciais de diversas plantas medicinais que exercem atividade farmacológica no SNC. Portanto, no presente estudo avaliamos os efeitos neuroprotetores e anticonvulsivantes do óleo essencial de *C. limon* constituído de diversos monoterpenos potencialmente psicoativos.

No presente estudo, nós demonstramos que o OECL reduz o número de animais que apresentam convulsões e EME induzido por pilocarpina, e também aumenta o índice de sobrevivência dos animais. Alguns estudos têm demonstrado que o *Citrus limon* apresenta atividade antioxidante devido à presença em sua composição do ácido ascórbico e flavonóides, sugerindo uma possível atividade neuroprotetora para o óleo essencial extraído de *Citrus limon* (VINSON *et al.*, 2001; PROTEGGENTE *et al.*, 2002).

Os resultados de muitos estudos demonstram que os antioxidantes exógenos podem remover os radicais livres produzidos durante as crises e pelo estado de mal epilético induzido por pilocarpina (BARROS *et al.*, 2007). Nossos resultados sugerem que OECL pode exercer atividade anticonvulsivante contra as crises e reduzir a frequência de instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina, como demonstrado pelo aumento na

latência do início das crises convulsivas e pela diminuição da taxa de mortalidade dos animais após a administração do estímulo convulsivo.

Dados anteriores evidenciaram que o aumento do conteúdo de radicais livres durante as convulsões leva a um aumento da concentração de glutamato e conseqüentemente há uma facilitação da propagação das convulsões, bem como do dano neuronal em várias regiões cerebrais (BARROS *et al.*, 2007). Com os resultados apresentados observa-se que o OECL pode participar do sistema de defesa celular contra as alterações histopatológicas induzidas por radicais livres, e conseqüentemente também pode promover alterações benéficas em parâmetros comportamentais modificados durante convulsões induzidas pela pilocarpina.

O modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina tem sido extensivamente analisado quanto às mudanças histopatológicas. As alterações observadas no hipocampo e corpo estriado reproduzem muitas destas alterações observadas em humanos epiléticos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; HOLMES *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 2005). A literatura registra danos morfológicos em diversas estruturas cerebrais após convulsão (KOK, 1997; HOLMES *et al.*, 2004;). As principais alterações são o alargamento dos ventrículos, a deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares e a perda neuronal em diversas áreas (hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado, córtex piriforme, amígdala, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso, córtex motor e área septal).

Esses danos neuronais, também foram observados no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra de camundongos convulsivos (HONCHAR *et al.*, 1983; CLIFFORD *et al.*, 1987) Neste trabalho, vários animais foram distribuídos para o estudo histopatológico, sendo detectada lesão cerebral, vacuolização e gliose no grupo P400. Esses dados sugerem que durante o estabelecimento das convulsões e o desenvolvimento de alterações histopatológicas há uma participação direta do sistema colinérgico e, provavelmente uma deficiência dos sistemas antioxidantes cerebrais, uma vez que foi visto um bloqueio dessas lesões por drogas anticolinérgicas e uma redução no número de animais com dano cerebral e na severidade da lesão em camundongos pré-tratados com compostos antioxidantes antes da administração do estímulo convulsivo (BARROS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; MILITÃO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010). Em nosso estudo as estruturas cerebrais mais afetadas com a administração de pilocarpina foram, em ordem decrescente de severidade da lesão, o hipocampo, córtex fronto-parietal e entorrinal, seguidos do córtex piriforme, corpo estriado e substância negra (dados não mostrados).

Nosso estudo mostrou uma alta percentagem de animais com lesão cerebral após administração de pilocarpina. Por sua vez, no grupo dos animais pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina foi verificado um menor número de animais com lesão cerebral. Além disso, naqueles animais que apresentaram convulsão e EME foi detectada alteração histopatológica no corpo estriado em apenas dois deles, sugerindo, assim, que as lesões decorrentes do processo convulsivo, podem ocorrer devido à produção de radicais livres. Portanto, esses resultados indicam que o uso de compostos antioxidantes extraídos de plantas medicinais pode apresentar ação neuroprotetora durante o tratamento das convulsões em humanos.

O corpo estriado foi descrito como sendo responsável pela propagação da atividade convulsiva induzida por pilocarpina. Estudos realizados com drogas antioxidantes demonstraram um menor índice de lesões estriatais em animais epiléticos (HONCHAR *et al.*, 1983; SANTOS *et al.*, 2008). As mudanças histopatológicas no hipocampo reproduzem muitas alterações vistas na epilepsia do lobo temporal em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC (HOLMES *et al.*, 2004). Nossos dados concordam com os anteriormente descritos, uma vez que observamos degeneração neuronal, gliose, atrofia e vacuolização no hipocampo e corpo estriado de camundongos após administração do estímulo convulsivo. Além disso, foram evidenciados efeitos neuroprotetores do OECL nas duas áreas cerebrais analisadas, por meio da diminuição do número de animais que apresentam dano cerebral e na redução da severidade da lesão.

As convulsões induzidas por pilocarpina são instaladas pelo sistema colinérgico, enquanto que, a propagação e o desenvolvimento do dano cerebral devem-se ao aumento da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) e pela estimulação do sistema glutamatérgico. Os compostos antioxidantes extraídos de plantas medicinais podem apresentar um potencial terapêutico para pacientes epiléticos na proteção contra as lesões cerebrais durante a atividade epilética, provavelmente, por meio da remoção de radicais livres, pelas mudanças nas propriedades da membrana celular e, ainda pela estabilização das funções sinápticas neuronais.

## CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que OECL pode influenciar a epileptogênese e promover ações anticonvulsivantes e neuroprotetoras durante as convulsões induzidas por pilocarpina. Entretanto, novos estudos devem ser realizados no intuito de fortalecer os mecanismos de ação do OECL que justifiquem o seu uso no tratamento clínico de pacientes epiléticos.

## REFERÊNCIAS

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; FREITAS, R.L.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; TAKAHASHI, R.N. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

BLOCK, L. C.; SANTOS, A.R.; DE SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONAVHE, F.D.; FILHO, V.C. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85-89, 1998.

BUREAU, Y.R.J.; PEREDERY, O.; PERSINGER, M.A. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380 mg/kg) or lithium (3 mEq/kg)/pilocarpine (30 mg/kg) induced seizures. **Brain Research**, v. 648, p. 265-269, 1994.

CLIFFORD, D.B. OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A., COLLINS, R.C., ZORUMSKI. C.F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, p. 953-968, 1987.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.; QUINTANS-JUNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.; DE ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha$ - $\beta$ -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; QUINTANS, J.L.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 69-70, 2007b.

DE SOUSA D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-Activity relationship. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 39-42, 2007c.

ELHABAZI, K.; DICKO, A.; DESOR, F.; DALAL, A.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R. Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss, an endemic species in Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 413-419, 2006.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comm Biochemical Physiology**, v. 30, p. 325-337, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 4, p. 61-68, 1997.

FREITAS, R.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Níveis dos neurotransmissores estriatais durante o estado epiléptico. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 30, p. 76-79, 2003.

GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J.A.; GOMES, E.L.; DEL BEL, E.A.; MELLO, L.E. Neuroethological and morphological (Neo-Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 177-192, 1996.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; BARREIRA, J.C.M.; SOUSA, M.J.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I.C.R.F. Targeting excessive free radicals with peels and juices of Citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange. **Food Chemical Toxicology**, v. 4, p. 99-106, 2010.

GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA J.I.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 406-411, 2007.

HOLMES, G.L.; CHA, B.H.; AKMAN, C.; SILVEIRA, D.C.; LIU, X. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. **Brain & Development**, v. 26, p. 394-397, 2004.

HONCHAR, M.P.; OLNEY, J.W.; SHERMAN, W.R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. **Science**, v. 220, p. 323-325, 1983.

HONCHAR, M.P.; VOGLER, G.P.; GISH, B.G.; SHERMAN, W.R. Evidence that phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex stimulated by pilocarpine, physostigmine, and pargyline in vivo is not changed by chronic lithium treatment. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, p. 172-180, 1990.

JOPE, R.S.; MORRISETT, R.A.; SNEAD, O.C. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Experimental Neurology**, v. 91, p. 471-480, 1986.

LIAN, X.Y.; ZHANG, Z.; STRINGER, J. L. Anticonvulsant activity of ginseng on seizures induced by chemical convulsants. **Epilepsia**, v. 46, p. 15-22, 2005.

KOK, A.B. Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Medical Hypotheses**, v. 48, p. 281-296, 1997.

MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids - a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 296-301, 2002.

MARCHETTI, R.L.; DE CASTRO, A.P.W.; KURCGANT, D.; CREMONESE, E.; NETO, J.G. Psychiatric disorders associated to epilepsy. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, p. 170-182, 2005.

MARINHO, M.M.F. DE BRUIN, V.M.S.; DE SOUSA, F.C.F.; AGUIAR, L.M.V.; PINHO, R.S.N.; VIANA, G.S.B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letter**, v. 235, p. 13-16, 1997.

MARINHO, M.M.F.; DE BRUIN, V.M.S.; DE SOUSA, F.C.F, VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizure-res. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

MINH TU, N.T. Volatile constituents of *Vietnamese pummelo*, orange, tangerine and peels oils. **Flavour Fragrance Journal**, v. 17, p. 169-174, 2002.

MORA, S.; DIAZ-VÉLIZ, G.; MILLÁN, R.; LUNGENSTRASS, H. QUIRÓS, S.; COTOMORALES, T.; HELLIÓN-IBARROTA, M.C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.82, p. 373-378, 2005.

MORRISETT, R.A.; JOPE, R.S.; SNEAD, O.C. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated in rats. **Experimental Neurology**, v. 97, p. 193-200, 1987.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 2<sup>nd</sup> ed, New York, p. 435-456, 1986.

PROTEGGENTE, A.R.; PANNALA, A.S.; PAGANGA, G.; VAN BUREN, L.; WAGNER, E.; WISEMAN, S.; VAN DE PIT, F.; DACOMBE, C.; RICE-EVANS, C.A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Research**, v. 36, p. 217-233, 2002.

SANTOS, L.F.L.; FREITAS, R.L.; XAVIER, S.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 1-5, 2008.

SANTOS, I.M.; DE FREITAS, R.L.; DA SILVA, E.P.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; TOMÉ, A.R.; FENG, D.; DE FREITAS, R.M. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures. **Brain Research**, v. 1315, p. 33-40, 2010.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEIROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315-335, 1983.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E. A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, p. 154-171, 1989.

VASCONCELOS, S.M.M. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, p. 271-274, 2007.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; SILVA, C.M.; MATOS, F.J. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1314-1317, 2000.

VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. **Methods Enzymology**, v. 335, p. 103-114, 2001.

XIU-YAN, W. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 613-618, 2007.

**Capítulo V: Efeitos antioxidante e antinociceptivo do óleo essencial do *Citrus limon* (L.)  
Burm em camundongos.**

**(Artigo publicado no Journal of Biomedicine and Biotechnology)**

**Efeito antioxidante e antinociceptivo do óleo essencial do *Citrus limon* (L.) Burm em camundongos.**

**CAMPÊLO, LML<sup>1</sup>; ALMEIDA, AAC<sup>1</sup>; FREITAS, RLM<sup>3</sup>; SOUSA, GF<sup>4</sup>; SALDANHA, GB<sup>3</sup>; FEITOSA, CM<sup>1,2</sup>; FREITAS, RM<sup>1,\*</sup>.**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), Teresina - Piauí, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, Teresina - Piauí, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Análises Clínicas, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará, Brazil.

## **RESUMO**

Algumas espécies *Citrus* tem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antioxidante, antiviral, antifúngica, analgésica e anti-inflamatório. Infusões preparadas com as folhas do *Citrus limon* são usadas na medicina popular para o tratamento da obesidade, diabetes, redução de lipídeos no sangue, doenças cardiovasculares, distúrbios cerebrais e certos tipos de câncer. O objetivo deste estudo é avaliar ações antioxidante e antinociceptiva em testes *in vitro* e *in vivo*. Para a atividade *in vitro* foi realizado ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade de *scavenging* contra os radicais do radical hidroxila e do óxido nítrico (NO) e, para a avaliação da atividade *in vivo* foi usado camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), com 2 meses de idade os quais foram pré-tratados com OE de *Citrus limon* e realizado os seguintes testes: Contorções induzidas por ácido acético, teste da formalina, possível antagonismo do efeito antinociceptivo do OE por meio do pré-tratamento com naloxona, teste da placa quente e Teste de *Rota-rod*. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), seguido por testes de Dunnett's e de Tukey. Observou-se que a quantificação de TBARS que demonstrou que OE exerce um efeito antioxidante significativo contra os radicais peróxidos, o OE demonstrou exercer um efeito significativo sequestrante contra o NO. Por outro lado, o OE tinha um forte efeito sequestrante contra os radicais hidroxila gerados *in vitro*, especialmente na maior

concentração. Nos experimentos *in vivo* pode-se observado que o OE de *Citrus limon* apresenta valores significativos nos testes realizados. Nossos resultados demonstram que o óleo essencial de *Citrus limon* exerce uma ação antioxidante na prevenção da peroxidação lipídica (provavelmente devido à atividade sequestrante do radical hidroxila) e uma atividade antinociceptiva.

**Palavras-chaves:** *C. limon*, Óleo Essencial, Plantas Medicinais, Antioxidante, Antinocicepção.

**ABSTRACT: Antioxidant and Antinociceptive Effects of *C. limon* Essential Oil in Mice.**

Some species of *Citrus* have a broad spectrum of biological activities, including antibacterial, antiviral, antioxidant, antifungic, analgesic and anti-inflammatory. Infusions prepared with the aerial (leaves) parts of *Citrus limon* are used in folk medicine for the treatment of obesity, diabetes, blood lipid lowering, cardiovascular diseases, brain disorders and certain types of cancer. The objective this study is evaluate the *in vitro* and *in vivo* antioxidant and antinociceptive actions. To activity *in vitro* was performed Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay, Hydroxyl radical-scavenging activity and Scavenging activity of nitric oxide (NO) e to evaluation of the activity *in vivo* was used Male Swiss mice (25-30 g), with 2 months of age and these were pretreated with essential oil of *Citrus limon* e performed the following test: Acetic acid-induced writhing, Formalin test, Possible antagonism of the EO antinociceptive effect by pretreatment with naloxone, Hot plate test and Rota-rod test. The statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's and Tukey's tests. Was observed that the quantification of TBARS demonstrated that EO exerts a significant antioxidant effect against peroxy radicals, the EO demonstrated to exert a significant scavenging effect against NO, but lower concentrations reversed this NO-inhibiting effect, on the other hand, EO had a strong scavenging effect against hydroxyl radicals generated *in vitro*, especially at the highest doses. In the experiments *in vivo* can be observed that the EO of *Citrus limon* presents values significatives in the test performed. Our results support that the essential oil of *C. limon* exhibits an antioxidant action in preventing lipoperoxidation (probably due to hydroxyl radical scavenging activity) and a clear antinociceptive activity.

**Keywords:** *Citrus limon*, Essential Oil, Medicinal Plants, Antioxidant, Antinociception.

## INTRODUÇÃO

As plantas da família Rutaceae compreendem 150 gêneros com aproximadamente 2.000 espécies, a maior das quais são *Citrus* (cerca de 70 espécies), e *Terminalia* (cerca de 200 espécies) (KUSTER *et al.*, 2003). Algumas espécies *Citrus* tem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antioxidante, antiviral, antifúngica, analgésica e anti-inflamatória (EZZAT, 2001; GUTKIND, 1981; LUZIA; JORGE, 2009).

Plantas medicinais com propriedades terapêuticas têm sido utilizadas desde o início da civilização humana para o tratamento de diferentes doenças, e o uso desta estratégia eficaz para a promoção da saúde humana tem aumentado significativamente nos últimos anos, progressos notáveis têm sido feitos sobre o desenvolvimento de terapias naturais. Portanto, há uma necessidade urgente de descobrir eficazes e potentes analgésicos e anti-inflamatórios (CALIXTO, 2000; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2010).

*Citrus limon* (L.) Burm é uma planta do norte e nordeste do Brasil, conhecida pelo nome popular de "Limoeiro" (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997; ELANGO VAN *et al.*, 1994). Infusões preparadas com as partes aéreas (folhas) de *Citrus limon* são usadas na medicina popular para o tratamento da obesidade, diabetes, dislipidemia, doenças cardiovasculares, distúrbios cerebrais e certos tipos de câncer (MIYAKE *et al.*, 1997; MIYAKE *et al.*, 1998; MONFORTE *et al.*, 1995; HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio relacionadas são fortemente envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo convulsões, câncer, morte celular, inflamação e dor (FREITAS *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2010). Muitos produtos naturais exercem atividades redox significativas, que estão relacionadas às suas propriedades terapêuticas ou mesmo efeito desses compostos (GUIMARÃES *et al.*, 2010) é essencial tanto para a compreensão dos mecanismos potenciais de suas ações biológicas como para determinar possíveis efeitos colaterais tóxicos ou nocivos. Considerando a falta de evidências experimentais e investigações científicas sobre possíveis propriedades terapêuticas e/ou redox de *C. limon*, o objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades antioxidantes e os possíveis efeitos antinociceptivos do óleo essencial obtido das folhas de *C. limon* (OECL).

Inicialmente, pretendemos avaliar as ações antioxidantes e antinociceptiva *in vitro* e *in vivo*, já que não existem estudos anteriores sobre elas. Mais estudos também estão em andamento para analisar e descoberta de prováveis mecanismos de ação do OECL.

## MATERIAS E MÉTODOS

### *Material vegetal*

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 2010, na cidade de Picos, Estado do Piauí, Brasil, e foi depositada no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o número do voucher 26.453. Amostras de óleos essenciais das folhas da *C. limon* foram preparadas pelo Laboratório de Química da UFPI (MATOS *et al.*, 1999).

### *Preparação do OE*

As folhas de *C. limon* foram secas em estufa com renovação e circulação de ar (modelo MA-037/18) a 40 °C até a completa desidratação ter sido alcançada. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger utilizando 1.100 g de folhas secas. O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, produzindo rendimentos de 0,32% (v/w). A análise por GC-MS foi realizada em um sistema GC-17A/MS QP5050A - GC/MS (70 eV, temperatura do injetor de 270 °C, 43-350 amu). As condições de operação foram as seguintes: DB-5HT (J & W Scientific, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,10 µm de espessura de filme); hélio como gás carreador, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e com razão de separação de 1:30, a partir de 60 °C (2 min.) a 180 °C em 4 °C/min e depois de 180 °C (4 min) a 260 °C em 10° C/min, com uma retenção final de 10 min a 260 °C. A identidade de cada composto foi determinada pela comparação entre o seu índice de retenção em relação ao C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub> n-alcanos (Fluka analítica, 1,0 mL da solução Alcano Standard), bem como de seus espectros da base de dados Wiley 275 L (ALENCAR *et al.*, 1984; ALENCAR *et al.*, 1990). A retenção de dados (índices de retenção) foi comparada com os da literatura (ADAMS, 2001; STENHAGEN *et al.*, 1974).

### *Ensaio de espécies reativas com o ácido Tiobarbitúrico*

Os ensaios TBARS (espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico) foram utilizados para quantificar a peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990) e este método TBARS foi usado para medir a capacidade antioxidante do OE usando gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídio (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Brevemente, a gema de ovo foi homogeneizado (1% w/v) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4), 1 ml de homogenato foi sonificado e homogeneizada com 0,1 ml de OE em diferentes concentrações. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 ml de solução AAPH (0,12 M). O controle foi apenas veículo de OE (etanol 0,1%). As reações foram realizadas por 30 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 ml) foram centrifugadas com 0,5 ml de ácido

tricloroacético (15%) a 1200g x por 10 min. Uma alíquota de 0,5 ml de sobrenadante foi misturada com 0,5 ml TBA (0,67%) e aquecida a 95 °C por 30 min. Após o resfriamento, absorvâncias da amostra foram medidas utilizando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas por AAPH sozinho (controle induzido).

#### *Atividade sequestrante contra o radical hidroxila*

A formação de OH (radical hidroxila) de reação de Fenton foi quantificada usando degradação oxidativa de 2-desoxirribose (LOPES *et al.*, 1999). O princípio do ensaio é a quantificação do produto de degradação de 2-desoxirribose, malondialdeído, por sua condensação com 2-ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, as reações típicas foram iniciados pela adição de  $\text{Fe}^{2+}$  (concentração final  $\text{FeSO}_4$  6 mM) para soluções contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2). Para medir a atividade antioxidante do OE contra o radical hidroxila, diferentes concentrações do OE foram adicionados ao sistema antes da adição  $\text{Fe}^{2+}$ . Reações foram realizadas por 15 min em temperatura ambiente e foram paradas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v), seguido por TBA 1% (w/v, em 50 mM NaOH). Soluções foram aquecidos em banho maria por 15 min a 95 °C, e depois resfriado à temperatura ambiente. A absorvância foi medida em 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes do MDA formada por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### *Atividade sequestrante contra o óxido nítrico (NO)*

O óxido nítrico foi gerado a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio em 20 mM tampão fosfato (pH 7,4). Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidos pela reação de Griess (FERREIRA *et al.*, 2008). A mistura de reação (1 ml) contendo 10 mM nitroprussiato de sódio (SNP) em tampão fosfato e OE em diferentes concentrações foram incubados a 37 °C por 1 h. Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada e homogeneizada com 0,5 ml de reagente de Griess. A absorvância do cromóforo foi medida a 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida através da comparação dos valores de absorvância dos controles negativos (apenas 10 mM de nitroprussiato de sódio e veículo) e preparações para ensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por SNP sozinho.

#### *Animais*

Camundongos *Swiss* machos (25-30 g), com 2 meses de idade, foram utilizados ao

longo deste estudo, divididos em grupos randomizados ( $n = 7$  por grupo). Os animais foram aleatoriamente alojadas em gaiolas apropriadas a  $26 \pm 1$  °C em um ciclo claro/escuro de 12 h (06:00-18:00 pm), com acesso livre à alimentação (Purina, São Paulo) e água de torneira. Protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEAA/UFPI N° 44/09).

#### *Contorções induzidas por ácido acético*

Este teste foi feito usando o método descrito anteriormente (KOSTER *et al.*, 1959; BROADBEAR *et al.*, 1994). Inicialmente, os camundongos foram divididos em cinco grupos ( $n = 7$ ). Posteriormente, OE (50, 100 e 150 mg/kg), veículo (salina/tween-80 0,05%; grupo controle) e morfina (MOR, 5 mg/kg) foram administrados por via oral (v.o.) 60 min antes de uma injeção de 0,85% de ácido acético (0,25 ml/animal). Cada animal foi isolado em uma câmara de observação individual e 15 min após a injeção de ácido acético o número cumulativo de contorções foi registrado durante 15 min.

#### *Teste de Formalina*

Os animais foram divididos em seis grupos ( $n = 7$ ) e tratados oralmente com veículo (controle), OE (50, 100 e 150 mg/kg), MOR (5 mg/kg), e 200 mg/kg de aspirina. Após 60 min, vinte microlitros de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) em um tampão fosfato (pH 7,2) foram injetadas na face dorsal da pata traseira esquerda, utilizando uma agulha de micro calibre 26 (HUNSKAR; HOLE, 1994). A duração do tempo que o animal passou lambendo a pata foi medida em 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a administração de formalina.

#### *Possível efeito antagonista antinociceptivo do OE pelo pré-tratamento com naloxona*

Camundongos foram pré-tratados intraperitonealmente. ( $n=7$ ) com 1,5 mg/kg de naloxona (NAL), um antagonista opióide não-seletivo, 15 min antes da administração oral do veículo (controle), OE (150 mg/kg) ou MOR (5 mg/kg). Posteriormente, o teste de contorções induzidas por ácido acético foi realizado como descrito acima.

#### *Teste da placa quente*

Neste teste, foi medida a reação de camundongos a estímulos dolorosos. Os animais foram colocados individualmente na placa de metal aquecida a  $52 \pm 0,5$  °C e cobertos com um cilindro de vidro (25 cm de altura, 15 cm de diâmetro). O tempo (s) que decorre a primeira

resposta de dor (lamber as patas dianteiras ou pular) foi determinado por um cronômetro e, em seguida, registrado (EDDY; LEIMBACH, 1953). Os experimentos foram conduzidos por 60 min após a administração oral do OE (50, 100 e 150 mg/kg). O efeito do pré-tratamento com naloxona (1,5 mg/kg, i.p) sobre a antinocicepção produzida pelo OE (150 mg/kg) e morfina (5 mg/kg, i.p.) foi determinada.

#### *Teste Rota-rod*

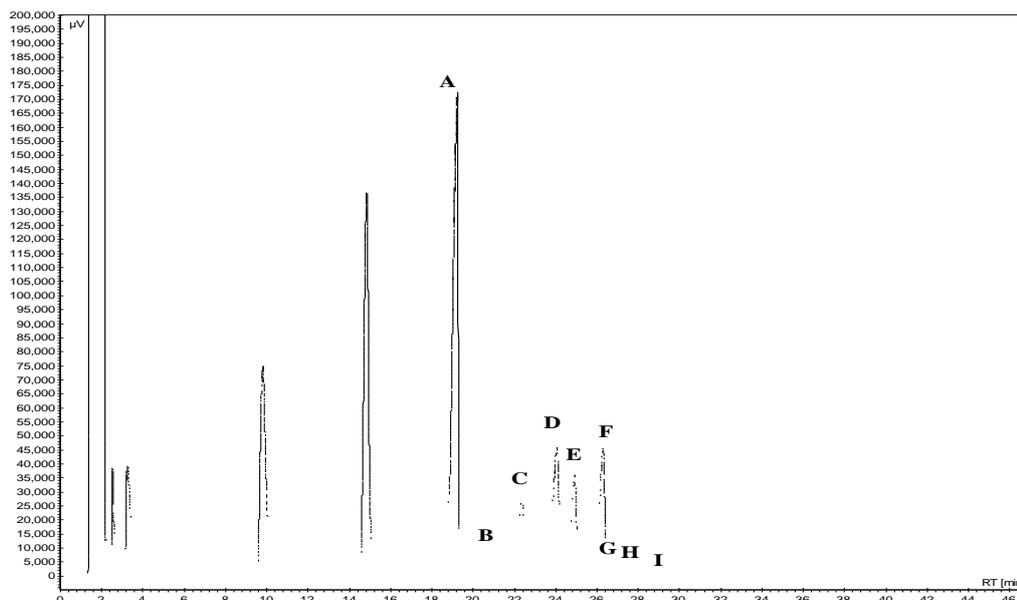
Inicialmente, foram selecionados 24 h antes do teste, os camundongos capazes de permanecer sobre o aparelho Rota-rod (AVS®, Brasil) mais de 180 s (9 rpm). (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Em seguida, os animais selecionados foram divididos em cinco grupos (n = 7) e tratados intraperitonealmente com veículo (controle), OE (50, 100 e 150 mg/kg) e diazepam (3 mg/kg). Trinta minutos depois, cada animal foi testado na *rota-rod* e o tempo (s) que cada um permaneceu na barra até 180 s foi registrado após 60 min.

#### *Análise Estatística*

Os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Dunnett e Tukey como *post hoc* testes. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . A porcentagem de inibição por um agente antinociceptivo foi determinada pelas contorções induzidas por ácido acético e testes de formalina usando a seguinte fórmula: Inibição % =  $100 \times (\text{controle experimental}) / \text{controle}$  (REANMONGKOL *et al.*, 1994).

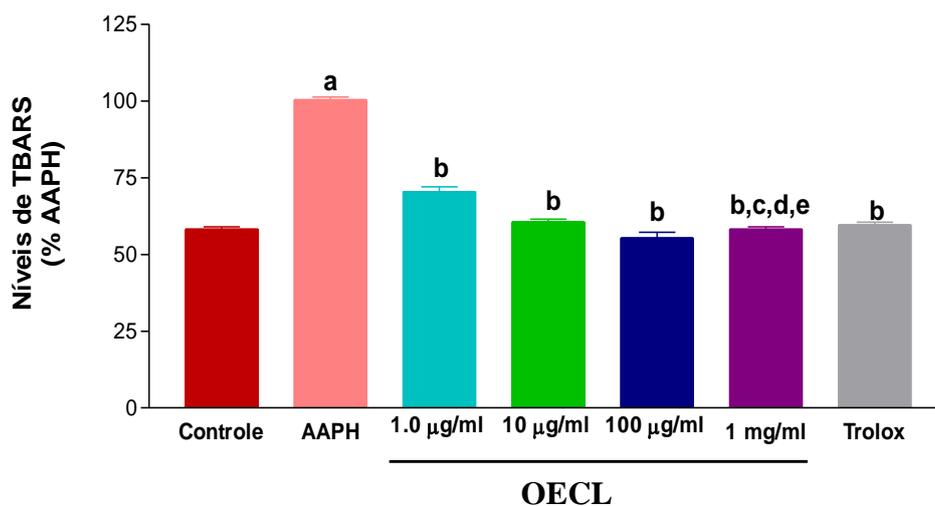
## **RESULTADOS**

A análise por GC-MS mostrou uma mistura de monoterpenos, sendo limoneno (A) (52,77%), acetato de geranyl (D) (9,92%) e trans-óxido-limoneno (F) (7,13%) os principais componentes do óleo essencial das folhas de *C. limon* (**Figura 1**).



**Figura 1** – Mistura de monoterpenos constituintes do óleo essencial das folhas do *C. limon* por meio da análise do cromatograma obtido por CG/EM.

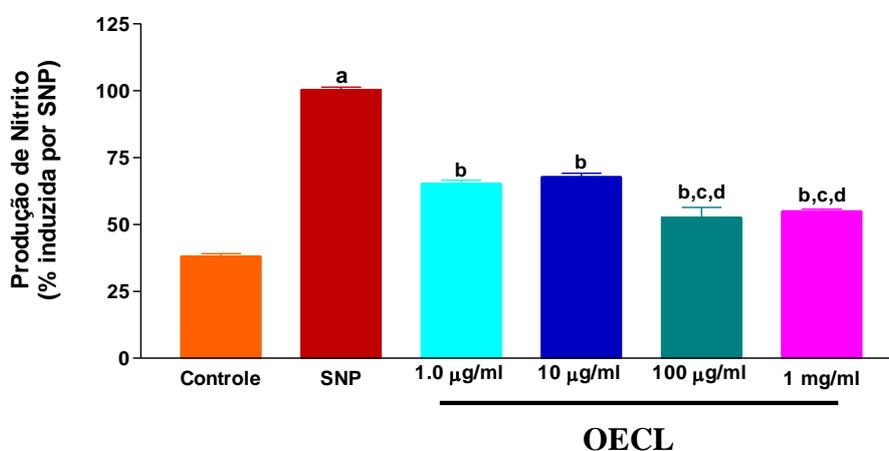
Quantificação de TBARS demonstrou que OECL exerce um efeito antioxidante significativo contra os radicais peroxil gerados pelo AAPH, protegendo os lipídios da oxidação, especialmente na maior dose (**Figura 2**). Trolox (300 µM), um análogo sintético da vitamina E, que protege membrana do dano oxidativo *in vivo*, foi usado como padrão antioxidante geral para comparação.



**Figura 2** – Atividade *sequestrante* contra a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbiturico (TBARS) *in vitro*.

Um sistema rico em lipídios foi incubado com uma fonte de radicais livres (AAPH) e o efeito de diferentes concentrações do OECL sobre a peroxidação lipídica foi medida pela quantificação de TBARS. O controle é o meio de incubação, sem AAPH; outros grupos contêm AAPH sozinho ou na presença de diferentes concentrações de OECL. Trolox foi usado como antioxidante padrão. As barras expressam média  $\pm$  E.P.M. <sup>a</sup> $p < 0,001$ , quando comparado ao controle; <sup>b</sup> $p < 0,001$ , quando comparado com 1  $\mu\text{g/ml}$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ , quando comparado a 10  $\mu\text{g/ml}$ ; <sup>d</sup> $p < 0,001$ , quando comparado a 100  $\mu\text{g/ml}$ ; <sup>e</sup> $p < 0,001$ , quando em comparação com 1  $\text{mg/ml}$ . Foi aplicado a todos os dados o teste one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Tukey *post hoc* teste.

A seguir, foi investigado o potencial antioxidante do OECL contra duas diferentes espécies reativas *in vitro*. OECL demonstrou exercer um efeito significativo de *scavenging* contra o NO, mas em concentrações mais baixas este efeito de inibição do NO foi revertido e levou a um pequeno aumento na produção de NO, em comparação com concentrações mais elevadas (**Figura 3**).

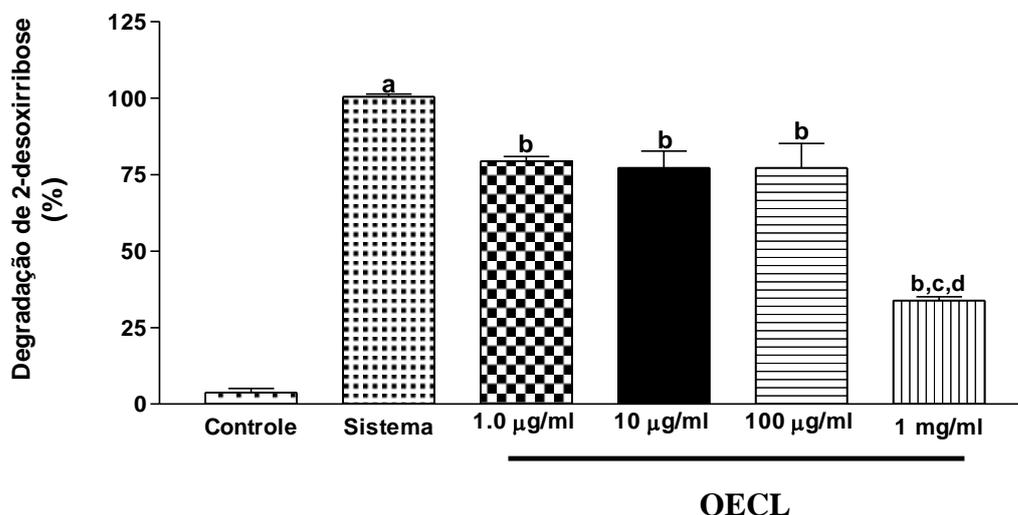


**Figura 3** – Atividade *sequestrante* contra o óxido nítrico (NO) *in vitro*

O óxido nítrico é gerado a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (SNP) e interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que são medidos pela reação de Griess. O grupo de NPS é o nitroprussiato de sódio sozinho, outros grupos denotam a produção de nitrito por SNP na presença de diferentes concentrações do OECL. As barras expressam média  $\pm$  E.P.M. <sup>a</sup> $p < 0,001$ , quando comparado ao controle; <sup>b</sup> $p < 0,001$ , quando comparado com 1  $\mu\text{g/ml}$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$ , quando comparado a 10  $\mu\text{g/ml}$ ; <sup>d</sup> $p < 0,001$ , quando

comparado a 100 µg/ml. Foi aplicado a todos os dados o teste one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Tukey *post hoc* teste.

Por outro lado, OECL teve um forte efeito *sequestrante* contra o radical hidroxila gerado *in vitro*, especialmente nas doses mais altas (**Figura 4**).



**Figura 4** – Atividade *sequestrante* contra radical hidroxila (OH) *in vitro*.

Atividade *sequestrante* contra o radical hidroxila foi quantificado usando degradação oxidativa *in vitro* da 2-desoxirribose, que produz malondialdeído por condensação com 2-ácido tiobarbitúrico (TBA). Sistema de produção de MDA é degradação de 2-desoxirribose com FeSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinhos. Outros grupos denotam produção MDA por FeSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de diferentes concentrações de OECL. As barras expressam média ± E.P.M. <sup>a</sup>p<0,001, quando comparado ao controle; <sup>b</sup>p<0,001, quando comparado com 1 µg/ml; <sup>c</sup>p<0,001, quando comparado a 10 µg/ml; <sup>d</sup>p<0,001, quando comparado a 100 µg/ml; <sup>e</sup>p<0,001, quando em comparação com 1 mg/ml. Foi aplicado a todos os dados o teste one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Tukey *post hoc*.

No teste de contorção induzido por ácido acético, o efeito antinociceptivo representado pela redução das contorções e demonstrado por OECL nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (3,7 ± 0,6, 3,5 ± 0,82 e 2,9 ± 0,9, respectivamente) em camundongos foi semelhante ao de morfina 5 mg/kg (1,6 ± 0,5), uma droga opióide padrão, quando os grupos foram comparados ao controle (14,6 ± 2,7) (**Tabela 1**). Foi observado que a naloxona (1,5 mg/kg, i.p.) antagonizou a resposta antinociceptiva da morfina de 1,6 ± 0,5 (apenas com o veículo) para 11,2 ± 1,9 (com o veículo mais naloxona) no teste de contorções induzidas por

ácido acético. Da mesma forma, a naloxona antagonizou o efeito do OECL (150 mg/kg) ( $10,5 \pm 1,7$ ) quando comparado ao grupo controle (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Efeitos do óleo essencial (OECL), morfina (MOR) e naloxona (NAL), em contorções induzidas por ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Numero de contorções*	% Inibicao
<b>Veiculo</b>	-	$14,6 \pm 2,7$	-
<b>OE</b>	50	$3,7 \pm 0,6^a$	75
<b>OE</b>	100	$3,6 \pm 0,82^a$	76
<b>OE</b>	150	$2,9 \pm 0,9^{a,b,c}$	81
<b>OE mais NAL</b>	150 + 1.5	$10,5 \pm 1,7^{a,d}$	27
<b>MOR</b>	5	$1,6 \pm 0,5^a$	91
<b>MOR mais NAL</b>	5 + 1.5	$11,2 \pm 1,9^{e,f}$	23

\*Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M do número de animais usados nos experimentos (n = 7).

<sup>a</sup>p<0,01, significativamente diferente do controle. <sup>b</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>c</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OECL 100. <sup>d</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OECL 150. <sup>e</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OECL mais NAL. <sup>f</sup>p<0,01, difere significativamente do grupo MOR. Foi aplicado a todos os dados o teste one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Dunnett.

OECL inibiu significativamente a resposta de lambedura para a pata injetada, quando 50, 100 ou 150 mg/kg foram administradas por via oral em camundongos, em comparação ao grupo controle ( $62,0 \pm 6,2$  s) na primeira fase do teste da formalina, de forma dose-dependente (Tabela 2). No entanto, OECL (100 e 150 mg/kg) inibiu significativamente (p<0,001) a segunda fase. Como esperado, a morfina (5 mg/kg) também reduziu o tempo de lambida em ambas as fases deste teste ( $2,95 \pm 0,9$  s;  $3,89 \pm 0,1$  s), enquanto o ácido acetil salicílico (200 mg/kg) reduziu-o somente durante a segunda fase ( $4,9 \pm 0,6$  s). OECL (50 mg/kg), não produziu alterações significativas na segunda fase do teste da formalina.

**Tabela 2** – Efeito do óleo essencial (OE) de *C. limon*, morfina (MOR) e ácido acetilsalicílico no teste de dor induzido por formalina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Numero de lambidas (s)			
		0-5 min		15-30 min	
		dor*	% Inibição	dor*	% Inibição
<b>Veículo</b>	-	62,0 ± 6,2	-	64,0 ± 11,2	-
<b>OECL</b>	50	55,1 ± 6,6 <sup>a</sup>	11	63,4 ± 9,1	11
<b>OECL</b>	100	39,9 ± 9,8 <sup>a,b</sup>	36	9,1 ± 4,4 <sup>a,b</sup>	85
<b>OECL</b>	150	11,8 ± 1,9 <sup>a,b,c</sup>	81	5,2 ± 0,4 <sup>a,b,c</sup>	92
<b>MOR</b>	5	2,95 ± 0,9 <sup>a</sup>	95	3,89 ± 0,1 <sup>a</sup>	94
<b>Ácido acetilsalicílico</b>	200	45,4 ± 9,8 <sup>a,d</sup>	27	4,9 ± 0,6 <sup>a,d</sup>	92

\*Os valores foram expressos como a média ± E.P.M do número de animais usados nos experimentos (n = 7).

<sup>a</sup>p<0,01, quando comparado ao controle. <sup>b</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>c</sup>p<0,01, quando comparado ao grupo OECL 100. <sup>d</sup>p<0,01, quando comparado ao grupo MOR. (ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Dunnett.)

Os resultados sugerem que OECL (50, 100 e 150 mg/kg, i.p.) tem um efeito analgésico central (**Tabela 3**), como evidenciado pelo prolongamento no tempo de resposta quando os camundongos foram submetidos a um estímulo nociceptivo durante o teste da placa quente.

No teste do *rota-rod*, camundongos tratados com OECL não mostraram alterações significativas de desempenho motor com as doses de 50 e 100 mg/kg (dados não mostrados). Como seria de esperar, o diazepam, depressor do SNC (2 mg/kg, i.p.) reduziu o tempo dos animais tratados no *rota-rod* depois de 60 min (77,43 ± 2,08 s), em comparação ao grupo controle (177,0 ± 1,45 s) (p<0,0001). Neste teste, após 30 dias consecutivos de tratamento com o óleo essencial de *C. limon* apenas no grupo de dose de 150 mg/kg (v.o.) (125,0 ± 0,96 s), o tempo de permanência dos animais sobre o aparelho *Rota-rod* foi significativamente reduzida em 30% (p<0,001).

**Tabela 3** – Efeitos do óleo essencial de *C. limon* ou morfina (MOR) no teste de placa quente na ausência e presença de naloxona em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Tempo de Reação (lambidas das patas traseiras) (s) <sup>*</sup>			
		Basal	0.5h	1h	1.5h
<b>Veículo</b>	-	8,5 ± 0,87	10,8 ± 0,89	10,9 ± 0,91	9,7 ± 1,6
<b>OECL</b>	50	7,8 ± 0,77 <sup>a</sup>	10,7 ± 0,68	19,7 ± 0,45 <sup>a</sup>	14,9 ± 1,4 <sup>a</sup>
<b>OECL</b>	100	7,1 ± 0,79 <sup>a,b</sup>	10,9 ± 0,38	13,6 ± 0,93 <sup>a,b</sup>	18,5 ± 1,8 <sup>a,b</sup>
<b>OECL</b>	150	6,5 ± 0,67 <sup>a,b,c</sup>	12,4 ± 0,34 <sup>a,b,c</sup>	12,2 ± 1,71 <sup>a,b,c</sup>	18,4 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>OECL + NAL</b>	150 + 1.5	9,2 ± 0,95 <sup>d</sup>	10,0 ± 0,85 <sup>d</sup>	11,5 ± 0,85	9,2 ± 1,1 <sup>d</sup>
<b>MOR</b>	5	8,1 ± 0,83	21,9 ± 0,65 <sup>a</sup>	25,4 ± 1,45 <sup>a</sup>	27,1 ± 1,9 <sup>a</sup>
<b>MOR + NAL</b>	5 + 1.5	6,8 ± 0,84	8,4 ± 1,1 <sup>e,f</sup>	12,4 ± 1,23 <sup>e</sup>	7,8 ± 1,9 <sup>e,f</sup>

\*Os valores foram expressos como a média ± E.P.M do número de animais usados nos experimentos (n = 7).

<sup>a</sup>p<0,01, significativamente diferente do controle. <sup>b</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OE 50. <sup>c</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OE 100. <sup>d</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo OE 150. <sup>e</sup>p<0,01, significativamente diferente do grupo MOR.. <sup>f</sup>p<0,01 significativamente diferente do grupo OE mais NAL. Foi aplicado a todos os dados o teste one-way ANOVA seguido de comparações múltiplas do Teste de Dunnett.

## DISCUSSÃO

Os lipídios da membrana são os alvos mais suscetíveis de ataque de radicais livres e propagação em sistemas biológicos (HALLIWELL, 2008). Além disso, os radicais livres e espécies reativas relacionadas estão fortemente envolvidas em vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo câncer, morte celular, inflamação e dor (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008). Assim, foi avaliado o potencial antioxidante do OECL testando sua capacidade de prevenir o dano oxidativo a lipídios induzidos por uma fonte de radicais livres *in vitro* (AAPH).

Portanto, é possível que o óleo essencial interaja mais fortemente com tipos específicos de lipídios, e em um sistema rico em lipídios, como os lipídios no ensaio TBARS com menor afinidade com óleo essencial e/ou porções hidrofílicas de lipídios anfipáticos são mais suscetíveis a ataque de radical, permitindo o início da reação em cadeia de peroxidação lipídica (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Estes resultados sugerem que a proteção contra reações em cadeia de lipoperoxidação observada em ensaio de TBARS é provavelmente devido à interação dos componentes do OECL com os radicais hidroxilas, que é uma espécie reativa derivada do oxigênio (EROS), em vez de NO, que é uma espécie reativa derivada do nitrogênio (ERNS). Embora OECL tenha demonstrado um efeito de *scavenging* no NO em determinadas concentrações, alguns de seus componentes, provavelmente, aumentam a produção de NO ou cancelam o efeito de *scavenging* contra o NO no OECL quando presentes em concentrações mais elevadas. Mudanças de antioxidante para efeitos pró-oxidantes contra radicais específicos são comuns quando misturas complexas são analisadas, como extratos de plantas, já que muitos componentes apresentam diferentes propriedades redox dependendo de suas concentrações (GUIMARÃES, *et al.*, 2010; FERREIRA, *et al.*, 2008; HALLIWELL, 2008).

Nossos resultados mostram que OECL produziu uma inibição dose-dependente do processo inflamatório em camundongos, conforme determinado por uma redução significativa nas contorções abdominais induzidas por ácido acético. A contorção abdominal induzida por ácido acético é um teste padrão, simples e sensível para medir analgesia induzida por ambos os opióides e analgésicos de ação periférica (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Este teste, além de ser o modelo de antinociceptivo mais adequado para opióides [HAYES *et al.*, 1987; SHAW *et al.*, 1988], também é comumente empregada como um modelo de dor visceral inflamatória (BARBER; GOTTSCHLICK, 1992). Nas contorções abdominais induzidas por ácido acético, a dor é provocada pela injeção de uma substância irritante, como ácido acético na cavidade peritoneal, que produz episódios com características de movimentos de alongamentos (contorcendo-se), e inibição do número de episódios por analgésicos é facilmente quantificável (GUIMARÃES *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2008). Ação analgésica central do óleo essencial foi sugerida pelo efeito de bloqueio de naloxona, um antagonista específico dos receptores opióides morfínomimético (BELVISI *et al.*, 1998).

A vantagem de usar o modelo de nociceção é que ele pode discriminar a dor em seus componentes central e periféricos (TJOLSE *et al.*, 1992; QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2010). O teste consiste em duas fases diferentes separadas no tempo: a primeira é gerada na periferia por meio da ativação de neurônios nociceptivos pela ação direta de formalina e a segunda fase ocorre através da ativação dos neurônios do corno ventral ao nível da medula espinhal. A morfina, inibe a nociceção em ambas as fases (SHIBATA *et al.*, 1989), mas as drogas com ação periférica, como a indometacina e os corticosteróides inibem apenas a segunda fase. Além disso, medicamentos como o ácido acetilsalicílico e paracetamol, que inibem a síntese das prostaglandinas, bloquear apenas a segunda fase do teste da formalina (HUNSKAR;

HOLE, 1987; ROSLAND *et al.*, 1990). A ação analgésica apresentada por OECL envolve componentes supra-espinhais, bem como da coluna vertebral, como demonstra a utilização do teste da placa quente (YAKSH; RUBI, 1976).

Nossos resultados sugerem que o óleo essencial de *C. limon* exibe uma ação antioxidante na prevenção da peroxidação lipídica (provavelmente devido à atividade *scavenging* do radical hidroxila) e uma evidente atividade antinociceptiva. Talvez, ele exerça o efeito antinociceptivo por mecanismos inibitórios centrais (sistema de opióides) e que pode ser devido às alterações na coordenação motora. Esta atividade anti-inflamatória do óleo essencial pode desempenhar um papel interferindo com a síntese de prostaglandinas, e também pode envolver mecanismos mediados por redox. Mais estudos estão em andamento a fim de permitir-nos a compreender os mecanismos de ação precisa de óleo essencial de *C. limon*.

## REFERENCIAS

ADAMS R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/massa spectroscopy**. Baylor University. Allured, 2001.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L. Kovats índices simulation in essencial oil analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

BARBER, A; GOTTSCHLICH, R. Opioid agonists and antagonists: An evaluation of their peripheral actions in inflammation. **Medice Research Revision**, v. 12, p. 525-562, 1992.

BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; DA CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.

BELVISI, M.G; CHUNG, D.M; BARNES, P.J. Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, p. 413-418, 1998.

BENAVENTE-GARCIA O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BROADBEAR, J.H.; NEGUS, S.S.; BUTELMAN, E.R.; DE COSTA, B.R.; WOODS, J.H. Differential effects of systemically administered nor-binaltorphimine (nor-BNI) on  $\kappa$ -opioid agonists in mouse writhing assay. **Psychopharmacology**, v. 15, p. 311-319, 1994.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Yunes, Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.107, p. 385-393, 1953.

ELANGOVAN, V; SEKAR, N; GOVINDASAMY, S. Chemoprotective potential of dietary bioflavonoids against 20-methyl-chloranthrene-induced tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 87, p. 107-113, 1994.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

EZZAT, S.M. In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 757-759, 2001.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FREITAS, R.M. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience Letters**, v. 455, p. 140-144, 2009.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.; SOUZA, F.C.; VIANA, G.S.; FONTELES, M.M. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

FREITAS, R.M.; VIANA, G.S.B.; SOUZA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 327-332, 2004.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, C.F.; ARAÚJO, A.A.S.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

GUTKIND, G.O.; MARTINI, V.; GRAÑA, N.; COUSSIO, J.D.; TORRES, R.A. Screening of south American plants for biological activities: Antibacterial and antifungal activity. **Fitoterapia**, v. 1, p. 213-218, 1981.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 107-112, 2008.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 4 th ed. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HAYES, A.G.; SHEEHAN, M.J.; TYERS, T.B. Differential sensitivity of models of antinociception in the rat, mouse and guinea-pig to *mu*- and *kappa*-opioid receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 91, p. 823-832, 1987.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2003.

LOPES, G.K.B; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimistry Biophysics Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, p. 946-949, 2009.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L.; HIRUMA, C.A. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MELO, M.G.; ARAUJO, A.A. ROCHA, C.P.; ALMEIDA, E.M.; SIQUEIRA, R.S.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladina kalbii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1977-1980, 2008.

MELO, M.S.; SENA, L.C.; BARRETO, F.J.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; DE SOUSA, D.P.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 411-416, 2010.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSWA, T. Characterization of antioxidative flavonoids glycosides in lemon fruit. **Food Science and Technology International**, Tokyo, v. 4, p. 48-53, 1998.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; MORIMITSU, Y.; OSWA, T. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 45, p. 4619-4623, 1997.

MONFORTE, M.T.; TROVATO, A.; KIRJARAINEN, S.; FORESTIERI, A.M.; GALATI, E. M.; LO CURTO, R.B. Biological effects of hesperidin a *Citrus* flavonoid. (Note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. **Farmaco**, v. 9, p. 595-599, 1995.

OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, R.N.; SOUSA, M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, S.A.; MEDEIROS, I.A. Anticonvulsant properties of *N*-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 199-202, 2001.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P. ARAUJO, A.A.S.; ONOFRE, A.C.S.; GELAIN, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; ARAUJO, D.A.M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BONJARDIM, L.R. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial nociception pain in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, p. 305-312, 2010.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeds**, v. 18, p. 412-416, 1959.

REANMONGKOL, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1345-1350, 1994.

ROSLAND, J.H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

SANTOS, I.M.S.; FREITAS, R.L.M.; SILVA, E.P.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; SOUZA, G.F.; TOMÉ, A.R.; FENG, D.; FREITAS, R.M. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus during pilocarpine-induced seizures. **Brain Research**, v. 1315, p. 33-40, 2010.

SHAW, J.S.; ROURKE, J.D.; BURNS, K.M. Differential sensitivity of antinociceptive tests to opioid agonists and partial agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, p. 578-584, 1988.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F.W. **Registry of Mass Spectra Data Base**, Washington DC: Government Printing Office, 1974.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: An evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 15-17, 1992.

XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R. M. Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2010.

YAKSH, T.L.; RUBI, T.A. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. **Science**, v. 192, p. 1357-1358, 1976.

**Capítulo VI: Efeito do óleo essencial do *C. limon* (L.) Burm em camundongos: Avaliação das atividades sedativa, ansiolítica e antidepressiva**

**(Artigo publicado na Revista Die Pharmazie)**

**Efeito do óleo essencial do *C. limon* (L.) Burm em camundongos: Avaliação das atividades sedativa, ansiolítica e antidepressiva**

**CAMPELO, LML<sup>1</sup>; ALMEIDA, AAC<sup>2</sup>; COSTA, JP<sup>1</sup>; FEITOSA, CM<sup>1,2</sup>; FREITAS, RM<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

**RESUMO**

Foi examinado os efeitos sedativo, ansiolítico e antidepressivo de óleo essencial (OECL) das folhas de *Citrus limon*, que tem sido usado como uma das plantas de maior uso da medicina popular brasileira. Os efeitos do OECL foram demonstrados pelos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, *rota-rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital, nado forçado em camundongos. No teste de campo aberto, realizado após a administração oral de OECL nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, diminuiu significativamente o número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*. No teste do labirinto em cruz elevado (LCE), OECL aumentou o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos. Pelo contrário, o tempo de permanência e o número de entradas nos braços fechados diminuíram. No teste do *rota rod*, OECL não alterou a coordenação motora e, portanto, foi desprovido de efeitos quando relacionado ao controle. No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, o OECL, nas mesmas doses aumentou significativamente o tempo de duração do sono nos animais. O OECL, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, não mostrou efeito sedativo no teste do campo aberto, no entanto, estas três doses foram utilizadas no teste do nado forçado, produzindo uma diminuição no tempo de imobilidade da mesma forma que a imipramina (controle positivo). Os efeitos antidepressivos de OECL não foram alterados pela administração prévia de paroxetina. Além disso, os efeitos da OECL no teste do nado forçado foram totalmente bloqueados pelo tratamento prévio com reserpina. Em conclusão, o presente trabalho evidenciou efeitos sedativos e ansiolíticos do OECL que pode envolver uma ação em

receptores do tipo benzodiazepínicos, e também um efeito antidepressivo, onde mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos provavelmente estão envolvidos.

**Palavras-chave:** Ansiolíticos; Antidepressivo; *C. limon*; Óleo essencial; Sedativo.

**ABSTRACT: Evaluation the sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil from *Citrus limon* (Lemon) in mice.** We examined the sedative, anxiolytic and antidepressant effects of essential oil (EO) of leaves from *Citrus limon*, which has been used as one of the most popular compounds in Brazilian traditional herbal medicine. The effects of EO were demonstrated by the open-field, elevated-plus-maze, *rota rod*, pentobarbital-induced sleeping time, and forced swimming tests in mice. In the open-field test, EO at the doses of 50, 100 and 150 mg/kg, after oral administration, significantly decreased the number of crossings, grooming, and rearing. In the elevated-plus-maze (EPM) test, EO increased the time of permanence and the number of entrances in the open arms. On the contrary, the time of permanence and the number of entrances in the closed arms were decreased. In the *rota rod* test, EO did not alter motor coordination and, thus, was devoid of effects, as related to controls. In the pentobarbital-induced sleeping time test, EO at the same doses significantly increased the animals sleeping time duration. Since EO, at the doses of 50, 100 and 150 mg/kg, did not show a sedative effect in the open field test, these three doses were used in the forced swimming test, producing a decrease in the immobility time, similarly to that of imipramine (positive control). However, the antidepressant effects of EO were not altered by the previous administration of paroxetine. In addition, effects of EO in the forced swimming test were totally blocked by reserpine pretreatment. In conclusion, the present work evidenced sedative and anxiolytic effects of EO that might involve an action on benzodiazepine-type receptors, and also an antidepressant effect where noradrenergic and serotonergic mechanisms will probably play a role.

**Keywords:** Anxiolytic; Antidepressant; *C. limon*; Essential oil; Sedative.

## INTRODUÇÃO

Pessoas de diferentes regiões do mundo têm usado plantas medicinais para aliviar distúrbios emocionais por muitos anos. Além disso, a busca de novas farmacoterapias de plantas medicinais para doenças psiquiátricas tem progredido significativamente na última década (ZHANG, 2004, SANTOS *et al.*, 2008). Um número crescente de produtos à base de plantas tem sido introduzido na prática psiquiátrica, como medicinas alternativas ou complementares, e também há um grande número de medicamentos fitoterápicos, cuja terapêutica potencial tem sido avaliada em uma variedade de modelos animais (ZHANG, 2004, XAVIER *et al.*, 2007).

Na verdade, esses modelos têm contribuído para a triagem de novas ferramentas psicofarmacológicas e para a compreensão de suas atividades biológicas (BULLER; LEGRAND, 2001). Muitas dessas ferramentas são comumente usadas para avaliar os efeitos de plantas medicinais para a prevenção ou tratamento de doenças neurodegenerativas. Eles têm demonstrado eficácia e segurança não só em modelos animais, mas também em estudos clínicos (WONG *et al.*, 1998). No Brasil, várias plantas medicinais são utilizadas para aliviar a ansiedade, insônia e humor deprimido (GOMES *et al.*, 2008).

A análise por Cromatografia gasosa/espectrometria de massa de alta resolução do óleo essencial de *Citrus limon* resultou na identificação de 28 constituintes voláteis (CAMPÊLO *et al.*, 2011a). Entre eles, mono e sesquiterpenos, como limoneno, linalol, cis- óxido-limoneno, trans-óxido-limoneno, citronelal, neral, geranial, acetato de nerol e geranil foram componentes predominantes.

A elucidação dos componentes ativos encontrados em plantas e seus mecanismos de ação central têm sido um grande desafio para a química farmacêutica, bioquímica, farmacologia e indústria farmacêutica. As plantas medicinais contêm muitos constituintes e seus óleos essenciais, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes compostos ativos devido à presença de diferentes classes ou estruturas que contribuem para a mesma atividade. Neste estudo, realizado em nosso laboratório, de atividade biológica central de óleo essencial de *C. limon*, foram selecionados, bioensaios para detectar os efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Os bioensaios foram realizados em modelos animais, a fim de identificar possíveis efeitos farmacológicos do óleo essencial de *C. limon*, e a partir destes resultados iniciais, novos experimentos têm sido realizados em relação à neuroquímica e o desenho para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos à base de plantas com

aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas, já que eles afetam uma grande parte da população.

O presente estudo foi realizado para investigar as possíveis atividades do óleo essencial das folhas de *C. limon* sobre o Sistema Nervoso Central e se ele é capaz de induzir alterações comportamentais em camundongos. Respostas motoras espontâneas foram monitoradas e os efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos foram avaliados nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado (plus maze), *rota rod*, tempo de sono induzido por pentobarbital e nado forçado.

## MATERIAL E METODOS

### *Material vegetal*

*C. limon* foi identificado e coletado por Chistiane Mendes Feitosa, em fevereiro de 2010, na cidade de Picos, Estado do Piauí, Brasil, e a sua exsicata depositada no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí com o número do voucher 26.453. Amostra do óleo essencial das folhas de *C. limon* foi preparada pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade (MATOS *et al.*, 1996).

### *Extração vegetal do óleo essencial de Citrus limon.*

As folhas (300 g) de 'limoeiro' foram coletadas no mesmo dia e hora, a partir de plantas com flores. As amostras de folhas coletadas foram destiladas no vapor por 1 h e o óleo essencial obtido a partir destas folhas foram analisados por GC/MS usando um instrumento GC-17 A/MS-QP505A (Shimadzu), sob as seguintes condições: coluna: dimetilpolisiloxano DB-1 coluna capilar de sílica fundida (30 mx 0,25 mm); gás de arraste, hélio (1 ml/min), temperatura do injetor, 35-180 °C a 4 °C / min, em seguida, 180-250 °C a 10 °C / min; impacto de espectros de massa de elétrons, 70 eV. (MATOS *et al.*, 1996) Componentes individuais foram identificados por análises de espectrometria usando dois computadores de pesquisa em biblioteca MS, e os índices de Kovacs como um auxiliar de pré-seleção. Dados de espectros de comparação de massa da literatura foram usados para confirmação.

### *Animais e testes comportamentais*

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos (25-30 g). Todos os animais foram mantidos a uma temperatura controlada (26± 1° C) e um ciclo de 12 h claro / escuro. Animais tiveram acesso livre à água e alimentos. Todos os testes comportamentais foram conduzidos

em condições controladas de temperatura, sons e iluminação. Diferentes grupos de camundongos foram usados para cada tarefa comportamental. Para cada experimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (7 camundongos por grupo): um grupo controle tratado com o veículo, três grupos tratados com OECL nas doses 50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente, e um grupo de referência tratado com imipramina 25 ou 50 mg/kg, paroxetina 10 ou 20 mg/kg e reserpina 0,25 mg/kg (nado forçado) ou DZP 0,75 ou 2 mg/kg (campo aberto, *rota rod*, nado forçado). Tratamento com OECL ou veículo foi administrado por via oral (v.o.) através de gavagem gástrica (1 mL/kg) durante 30 dias.

A administração intraperitoneal (i.p.) com imipramina e tratamento oral com DZP foram feitos 30 e 60 min antes dos testes, respectivamente, seguindo os esquemas de outros autores (TADANO *et al*, 2000;. GRIEBEL *et al*, 2001;. KULKARNI; DHIR, 2007).

O cuidado dos animais seguiu as orientações oficiais governamentais em conformidade com a Política de Sociedade e foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí, Brasil. Todas as substâncias químicas foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todas as doses são expressas em miligramas por quilograma e foram administrados em um volume de 10 ml/kg injetados via intraperitoneal (i.p.).

#### *Drogas e reagentes*

O óleo essencial (OECL) foi emulsionado com monooleato de polioxi sorbitano (Tween 80 - 0,05% v/v em solução salina, Synth, Brasil) em água destilada. Diazepam (DZP) foi adquirido na (União Química, Brasil) e usado como padrão. Sulfato de reserpina (RESERP) foi adquirido da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Imipramina (IMI) e paroxetina (PAROX) foram comprados da Novartis Biociências S.A. (São Paulo, Brasil) e Glaxo Smith Kline Brasil Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente. Todas as outras drogas foram de grau analítico.

#### *Protocolo experimental e triagem comportamental*

Após o tratamento, cada animal foi submetido a uma série de testes na forma descrita abaixo. Em primeiro lugar, o animal foi observado em uma sala fechada, a temperatura constante ( $26 \pm 1$  °C). O animal foi então colocado dentro de um labirinto e observados por 5 min. Imediatamente após o teste de labirinto, ele foi colocado em uma área de campo aberto por 5 min. Depois disso, o animal foi removido para um *rota rod* onde foi avaliado por 1 min.

Finalmente, a temperatura foi medida com um termômetro digital. Todos os testes foram realizados entre 08:00-18:00.

A triagem comportamental dos camundongos foi realizada seguindo os parâmetros descritos por Almeida e colaboradores (1999) e os animais foram observados durante 24 h após 30 dias de tratamento com OECL de *C. limon* (50, 100 e 150 mg/kg, v.o.). Durante estes 30 dias foi observada a ocorrência dos seguintes sinais gerais de toxicidade: piloereção, prostração, contorções, aumento da evacuação, grooming, grupos distintos, dispnéia, sedação, analgesia e ptose palpebral.

#### *Teste do Labirinto em cruz elevado*

O teste de labirinto em cruz elevada (**Figura 1**) de camundongos de fabricação própria consistiu de dois braços abertos perpendicular (30 X 5 cm) e dois braços fechados (30 X 5 X 25 cm) também na posição perpendicular (LISTER, 1987). Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 X 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados foram feitas de acrílico transparente. O chão era feito de acrílico preto. O labirinto estava a 45 cm acima do chão. Após o tratamento, o animal foi colocado no centro do labirinto com o nariz em direção a um dos braços fechados, e observados por 5 min, de acordo com os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos e fechados e tempo de permanência em cada um deles. O tempo de permanência mede o tempo gasto pelo animal nos braços abertos e fechados. Compostos ansiolíticos reduzem a aversão natural do animal de ir para os braços abertos e promove a exploração dos mesmos. Por outro lado, as passagens forçada ou voluntária dos animais nos braços abertos do labirinto estão associados a alterações hormonais e comportamentais indicativos de aumento da ansiedade (HOGG, 1996). Estes testes foram feitos em lugares diferentes, justificando o uso deste aparelho.



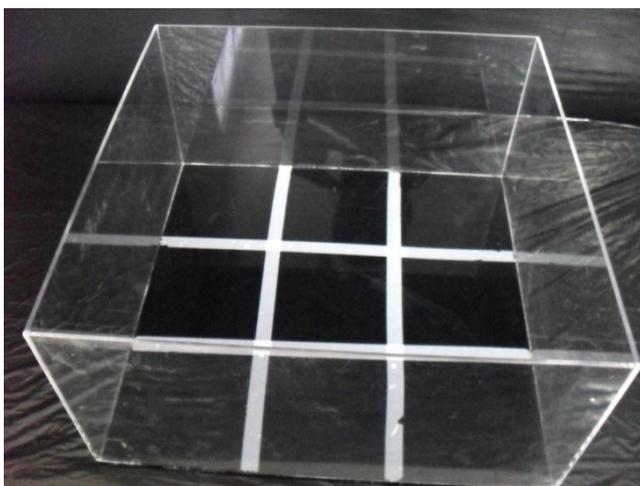
**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 1** - Equipamento para teste do labirinto em cruz elevado.

\

### *Teste do campo aberto*

A área do campo aberto foi feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 X 30 X 15 cm.), dividido em nove quadrados de área igual. O campo aberto (**Figura 2**) foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os parâmetros observados foram: número de cruzamentos de quadrantes (com as quatro patas) e números de *grooming* e de *rearing*.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 2** – Equipamento para teste do campo-aberto.

### *Teste do Rota rod*

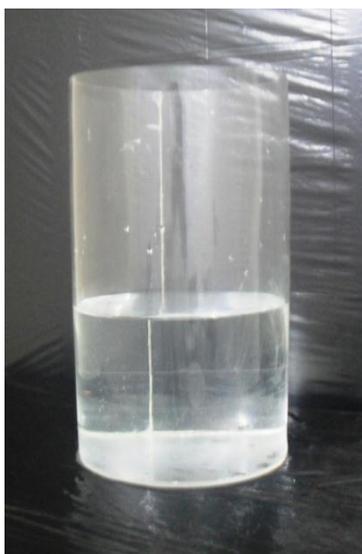
Para o teste de *rota rod*, o animal foi colocado com as quatro patas em uma barra de diâmetro de 2,5 cm, 25 cm acima do piso e que estava girando a 12 rpm. Para cada animal, o número de quedas (até três quedas) e o tempo de permanência na barra de 1 min foram registrados (DUNHAM; MIYA, 1957).

### *Tempo de sono induzido por Barbituricos*

Neste teste, realizado de acordo com o método de Ferrini e colaboradores (1974) o sono do camundongo foi induzida por uma administração de 40 mg/kg (i.p.) de pentobarbital sódico, e a duração do sono (min) de cada animal foi observado. O tempo de sono foi registrado como o período para o animal recuperar o reflexo de endireitamento.

### *Teste do nado forçado*

Este teste é o modelo farmacológico mais utilizado e reconhecido mundialmente, para avaliar as atividades antidepressivas (PORSOLT *et al.*, 1977a). No presente trabalho, empregamos o que foi descrito por Porsolt e colaboradores. (1977b; 1978). O tempo de imobilidade foi registrado quando os camundongos foram colocados dentro de um cilindro cheio de água sem possibilidade de escapar.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 3** – Equipamento para teste do nado-forçado.

#### *Temperatura retal*

A temperatura retal dos camundongos foi determinada com um termômetro digital Modelo HI 98501 (SP Labor Equipments, São Paulo, Brasil) a uma distância de 2,5 mm a partir do ânus. A medida foi realizada à temperatura ambiente de  $24,0 \pm 2,0$  °C. Camundongos com temperatura retal normal de 37,0 - 38,0 °C foram selecionados e utilizados no experimento.

#### *Análise estatística*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. e foram comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste ( $p < 0,05$ ) (Programa Graphpad Intuitive, Software for Science, San Diego, CA).

## RESULTADOS

A análise por GC/MS mostrou uma mistura de monoterpenos, entre os quais limoneno (52,77%), acetato de geranil (9,92%) e trans-limoneno-óxido (7,13%) foram os principais compostos do óleo essencial de *C. limon* (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Composição química e índices de retenção dos constituintes do óleo essencial de *C. limon*.

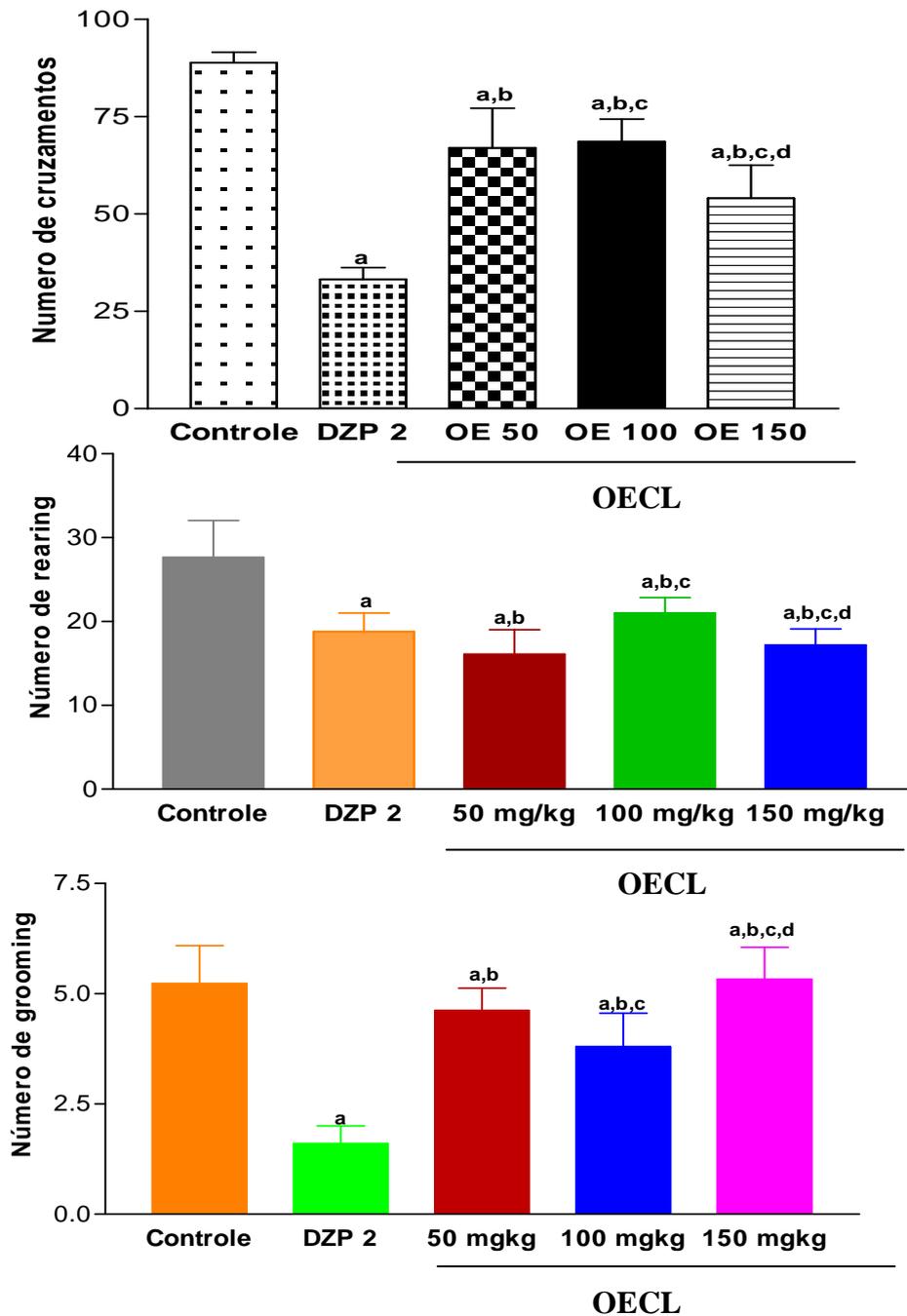
Componentes <sup>b</sup>	(%)	RT (min) <sup>a</sup>	IK <sup>c</sup>
Limoneno	52,77	4,8	1025,5
Linalool	1,73	6,4	1100
cis-oxido-limoneno	2,68	7,1	1129,3
trans-oxido-limoneno	7,13	7,2	1133,7
Citronellal	2,77	7,7	1150
Neral	6,85	10,1	1238,5
Geranial	5,49	11,0	1268,9
NI	6,62	13,0	1337,8
Nerol	4,04	13,8	1363,3
Acetato de Geranil	9,92	14,4	1384,2
<b>Total identificado</b>	93,38	-	-

NI = Não identificado. <sup>a</sup>Tempo de retenção; <sup>b</sup>Compostos listados conforme ordem de eluição em uma coluna de DB-5MS; <sup>c</sup>Índices Kovats foram calculados contra *n*-alcanos (C9-C18) em uma coluna de DB-5MS.

O óleo essencial de *C. limon*, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (v.o.) causou alterações comportamentais nos animais durante 30 dias de tratamento: diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral, ataxia, analgesia e sedação. Mudanças de comportamento foram mais evidentes no segundo dia de tratamentos.

No teste de campo aberto (**Figura 4**), OECL (50 mg/kg, v.o.) reduziu o número de *rearing* ( $16,09 \pm 2,91$ ) em relação ao controle ( $27,64 \pm 4,42$ ). Da mesma forma, OECL 100 (100 mg/kg, v.o.) e OECL 150 (150 mg/kg, v.o.) reduziu o número de *rearings* ( $21,00 \pm 1,86$  e  $17,17 \pm 1,95$ , respectivamente) e também do *grooming* ( $3,80 \pm 0,76$  e  $4,00 \pm 1,41$ , respectivamente), em relação ao controle (*rearing*,  $38,00 \pm 7,59$ ; *grooming*,  $5,33 \pm 0,72$ ). No

número de cruzamentos foi observado com OECL (50 mg/kg, v.o.) uma diminuição ( $67,00 \pm 10,20$ ) em relação ao controle ( $88,88 \pm 2,68$ ). Da mesma forma, OECL 100 (100 mg/kg, v.o.) e OECL 150 (150 mg/kg, po) reduziram o número de cruzamentos ( $68,60 \pm 5,80$  e  $54,08 \pm 8,47$ , respectivamente) em relação ao controle ( $88,88 \pm 2,68$ ). Diazepam, como esperado, mostrou efeito sedativo na dose utilizada (2 mg/kg, i.p.).



**Figura 4** – Efeitos do OECL de *C. limon* no número de cruzamentos, rearing and grooming no teste do campo aberto em camundongos.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. para o número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do DZP 2. <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>d</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100.

A Tabela 2 mostrou os efeitos do OECL de *C. limon* no teste de labirinto em cruz elevado. Entre os parâmetros usados para avaliação da atividade ansiolítica, o grupo controle (controle) apresentou os seguintes dados: número de entradas nos braços abertos (NEBA),  $6,75 \pm 0,90$ ; porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA),  $39,14 \pm 0,87\%$ , o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA),  $89,08 \pm 9,97$  s; e porcentagem de tempo de permanência (PTBA),  $29,68 \pm 3,32\%$ . O OECL na dose de 50 mg/kg (v.o.) não apenas diminuiu PEBA ( $38,39 \pm 2,86\%$ ), mas também aumentou TPBA ( $96,00 \pm 18,01$  s) e PTBA ( $31,99 \pm 6,00\%$ ). Da mesma forma, o OECL, em uma dose mais elevada (150 mg/kg, i.p.) reduziu PEBA ( $p < 0,01$ ), e aumentou TPBA ( $p < 0,01$ ) e PTBA ( $p < 0,01$ ). NEBA, PEBA, TPBA e PTBA foram diminuídos OECL, 100 mg/kg, i.p., com valores de  $4,50 \pm 0,47$ ,  $38,28 \pm 1,79\%$ ,  $70,83 \pm 8,15$  s e  $23,60 \pm 2,71\%$ , respectivamente, em comparação aos controles (NEBA,  $6,75 \pm 0,90$ ; PEBA,  $39,14 \pm 0,87\%$ ; TPBA,  $70,83 \pm 8,15$  s; PTBA,  $29,68 \pm 3,32\%$ ). Diazepam (0,75 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente todos estes parâmetros.

**Tabela 2:** Efeitos do OECL de *C. limon* no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos.

Grupos	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
<b>Controle</b>	$6,75 \pm 0,90$	$39,14 \pm 0,87$	$89,08 \pm 9,97$	$29,68 \pm 3,32$
<b>DZP 0.75</b>	$15,71 \pm 0,28^a$	$51,00 \pm 0,31^a$	$206,90 \pm 2,70^a$	$68,95 \pm 0,90^a$
<b>OECL 50</b>	$4,60 \pm 0,82^{a,b}$	$38,39 \pm 2,86^{a,b}$	$96,00 \pm 18,01^{a,b}$	$31,99 \pm 6,00^{a,b}$
<b>OECL 100</b>	$9,90 \pm 1,36^{a,b,c}$	$48,84 \pm 3,51^{a,b,c}$	$132,3 \pm 15,66^{a,b,c}$	$44,10 \pm 5,21^{a,b,c}$
<b>OECL 150</b>	$4,50 \pm 0,47^{a,b,c,d}$	$38,28 \pm 1,79^{a,b,c,d}$	$70,83 \pm 8,15^{a,b,c,d}$	$23,60 \pm 2,71^{a,b,c,d}$

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de NEBA, número de entradas nos braços abertos; PEBA, porcentagem de entradas nos braços abertos; TPBA, tempo de permanência nos braços abertos; PTBA, porcentagem de tempo nos braços abertos. <sup>a</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do DZP 2. <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>d</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100.

No teste do tempo de sono induzido por barbitúrico, a administração oral ( $p < 0,01$ ) de OECL (50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente) aumentou o de sono em 67, 22 e 94%, respectivamente, sugerindo um maior efeito do pentobarbital (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Efeitos do OECL de *C. limon* no teste de tempo de sono induzido por barbituricos.

Grupos	Tempo de sono (min)	Aumento (%)
Controle	40,55 $\pm$ 0,60	-
OECL 50	67,65 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	67
OECL 100	49,62 $\pm$ 1,36 <sup>a,b</sup>	22
OECL 150	78,82 $\pm$ 0,47 <sup>a,b,c</sup>	94

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de sono de 7 camundongos (por grupo) usados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do OECL 50. <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100.

**Tabela 4:** Efeitos do OECL de *C. limon* em camundongos no modelo do nado forçado.

Grupos	Tempo de imobilidade (s)
Controle	184,60 ± 26,15
OECL 50	103,70 ± 27,76 <sup>a</sup>
OECL 100	93,75 ± 20,65 <sup>a,b</sup>
OECL 150	54,83 ± 19,72 <sup>a,b,c</sup>
IMI 25	115,00 ± 0,58 <sup>a</sup>
IMI 50	75,00 ± 0,68 <sup>a</sup>
PAROX 10	82,67 ± 1,08 <sup>a</sup>
PAROX 20	133,00 ± 3,28 <sup>a</sup>
OECL 150 + IMI 50	52,00 ± 21,41 <sup>a,e</sup>
OECL 150 + PAROX 20	70,60 ± 15,24 <sup>a,f</sup>
RESERP 0.25	263,70 ± 2,16 <sup>a</sup>
RESERP 0.25 + OECL 150	16,00 ± 4,44 <sup>a,d,g</sup>

Os experimentos foram realizados, conforme descrito nos material e métodos. O óleo essencial (OECL) foi administrado por via oral. Os valores foram expressos como a média ± E.P.M. do tempo de imobilidade de 7 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup>p<0,01 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>c</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100. <sup>d</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 150. <sup>e</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo IMI 50. <sup>f</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo PAROX 20. <sup>g</sup>p<0,001 (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste, significativamente diferente do grupo RESERP 0,25. OECL = óleo essencial; IMI = imipramina; PAROX = paroxetina; RESERP = reserpina. As drogas foram administradas 10 min antes do OECL e do teste realizado 30 min depois.

No teste do *rota rod*, usado para avaliação da coordenação motora e presença de algum efeito relaxante muscular, não houve alteração no número de quedas após administração do OECL (50, 100 e 150 mg/kg, v.o), quando comparado aos controles (**Tabela 5**). Além disso, no *rota rod*, somente o OECL na dose de 150 mg/kg, v.o., diminuiu o tempo

de permanência na barra ( $44,80 \pm 0,88$  s) relacionados ao controle ( $52,71 \pm 0,42$  s). Diazepam ( $0,75$  mg/kg, i.p.), da mesma forma que o OECL 50 e 100, foi desprovido de efeito.

**Tabela 5:** Efeitos do OECL de *C. limon* no teste do *rota tod* em camundongos.

Grupos	Numero de quedas	Tempo de permanência (s)
Controle	$1,71 \pm 0,28$	$52,71 \pm 0,42$
DZP 0.75	$1,80 \pm 0,37$	$52,40 \pm 1,03$
OECL 50	$1,80 \pm 0,32$	$52,10 \pm 0,92$
OECL 100	$1,90 \pm 0,33$	$52,90 \pm 0,52$
OECL 150	$1,890 \pm 0,33$	$44,80 \pm 0,88^{a,b,c,d}$

Os valores foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de quedas e tempo de permanência de 7 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do DZP. <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>d</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100.

As temperaturas retais dos camundongos após administração de EO de *Citrus limon* são apresentadas na Tabela 6. A temperatura retal do grupo controle foi  $37,30 \pm 0,52$  °C. OECL na dose de 50 e 100 mg/kg, v.o., diminuiu a temperatura de  $35,32 \pm 0,70$  e  $34,29 \pm 0,36$  °C, respectivamente. Da mesma forma, OECL em uma dose mais elevada (150 mg/kg, i.p.) diminuiu a temperatura dos camundongos para  $34,14 \pm 0,35$  °C, de maneira dose-dependente. Por outro lado, diazepam ( $0,75$  mg/kg, i.p.) não apresentou nenhum efeito, quando comparado ao grupo controle.

**Tabela 6:** Temperatura retal de camundongos após administração do OECL de *Citrus limon*

Grupos	Temperatura retal (°C)
Controle	$37,30 \pm 0,52$
Diazepam 0.75	$37,60 \pm 0,37$
OECL 50	$35,32 \pm 0,70^{a,b}$
OECL 100	$34,29 \pm 0,36^{a,b,c}$
OECL 150	$34,14 \pm 0,35^{a,b,c,d}$

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. da temperatura retal por 7 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do DZP. <sup>c</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 50. <sup>d</sup> $p < 0,001$  (ANOVA seguido de teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo OECL 100.

## DISCUSSAO

No presente trabalho, os efeitos centrais do óleo essencial (OECL) das folhas de *C. limon*, foram estudados. OECL foi primeiramente avaliado no teste de campo aberto, que dá uma boa indicação do estado emocional do animal. Os resultados mostraram que OECL foi capaz de diminuir significativamente não só o número de cruzamentos, indicativo de um possível efeito sedativo, mas também o *grooming* e *rearing*.

Os laboratórios de fitoquímica são raramente preparados para realizar testes biológicos. Assim, além dos experimentos já realizados em nosso laboratório de farmacologia, pretendemos investigar a toxicidade geral em modelos animais de roedores para determinar a toxicidade potencial e sua atividade biológica benéfica ou prejudicial ao SNC. O desenvolvimento de novos medicamentos a partir de componentes do óleo essencial de *C. limon* precisa de modelos adequados para identificar alvos moleculares que são críticos ao cérebro *in vitro* ou *in vivo*. Entre o grande número de possíveis testes executados para obter os componentes ativos de óleo essencial de *C. limon*, selecionamos alguns testes *in vivo* para avaliação da atividade central, que constituem importantes alvos terapêuticos para doenças neurodegenerativas.

A fim de estudar o possível efeito ansiolítico do OECL, o teste de labirinto em cruz elevado foi usado, e os resultados demonstraram que OECL também foi capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência, bem como o número de entradas nos braços abertos, indicando uma resposta positiva. Nossos resultados apontam que os efeitos sedativos e ansiolíticos do OECL, possivelmente, envolve o complexo receptor GABA<sub>A</sub>. A ação sedativa já foi mostrado pelo óleo essencial de folhas de *C. limon* (CAMPÊLO *et al.*, 2011b), e *Lavandula angustifolia* P. Miller (LIS-BALCHIN; HART, 1999) que foi avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. Os componentes ativos de *C. limon* são

basicamente compostos monoterpenos e, portanto, quimicamente similares ao OECL. Estes monoterpenos demonstram atividade ansiolítica, que é devido a mecanismos GABAérgicos. Além disso, o óleo essencial de *C. limon* mostrou exercer um aumento dose-dependente nos parâmetros antioxidantes no hipocampo de camundongos (CAMPÊLO *et al.*, 2011a).

Em nosso estudo, o teste do nado forçado foi realizado para determinar o possível efeito antidepressivo do OECL após a administração oral. Nosso resultado sugere que os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico participam na ação antidepressiva do OECL.

No teste do *rota rod*, usado para avaliar a coordenação motora e presença de algum efeito de relaxamento muscular, não houve alteração no número de quedas após a administração do OECL. Além disso, no *rota rod*, apenas o OECL na dose de 150 mg/kg, diminuiu o tempo de permanência na barra.

Foi observado que o tratamento oral de camundongos com o óleo essencial obtido das folhas do *C. limon* teve efeito significativo sobre a temperatura corporal normal dos camundongos. Essas descobertas parecem estar em contraste com registros de outras plantas medicinais (WOODE *et al.*, 2009). Possíveis explicações para a aparente contradição pode ser os diferentes métodos de coleta das plantas usados em ambos os estudos para a extração de compostos bioativos, e o tempo e época em que as folhas foram colhidas. Estas variações têm sido relatadas por exercer diferenças nas atividades de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais (HOUGHTON; RAMAN, 1998).

Nossos resultados dão suporte à idéia de que OECL interage com o receptor GABA<sub>A</sub>, provavelmente nos subtipos de receptores que mediam os efeitos BDZ, para produzir atividades sedativas e hipnóticas, e também parece aumentar as atividades noradrenérgicas e serotoninérgicas que são os principais fatores responsáveis pela sua atividade antidepressiva. No entanto, estudos adicionais, devem ser realizados para esclarecer completamente o mecanismo do efeito ansiolítico e antidepressivo do óleo essencial das folhas de *C. limon*. Além disso, o OECL pode manifestar esses efeitos em algumas doses, sem demonstrar atividades sedativas ou hipnóticas, sendo, portanto, potencialmente útil na prática clínica.

## REFERENCIAS

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade

no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.

BULLER, R.; LEGRAND, V. Novel treatments for anxiety and depression: Hurdles in bringing them to the market. **Drug Discovery**, v. 6, p. 1220-1230, 2001.

CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of essential oil from *Citrus limon* (Burm) in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 668-673, 2011<sup>a</sup>.

CAMPÊLO, L.M.L.; GONÇALVES, F.C.; FEITOSA, C.M.; DE FREITAS, R.M. Antioxidant activity of Citrus limon essential oil in mice hippocampus. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 709-715, 2011b.

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

FERRINI, R.; MIRAGOLI, G.; TACCARDI, B. Neuropharmacological studies on SB 5833, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. **Arzneimittel-Forschung**, v. 24, p. 2029-2032, 1974.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SIMIAND, J.; COHEN, C.; GRANGER, P.; DECOBERT, M.; FRANÇON, D.; AVENET, P.; DEPOORTERE, H.; TAN, S.; OBLIN, A.; SCHOEMAKER H.; EVANNO, Y.; SEVRIN, M.; GEORGE, P.; SCATTON, S. SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for 2- and 3-containing  $\gamma$ -aminobutyric acidA (GABA<sub>A</sub>) receptors. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 298, p. 753-768, 2001.

GOMES, P.B.; NORONHA, E.C.; DE MELO, C.T.; BEZERRA, J.N.; NETO, M.A.; LINO, C.S.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Central effects of isolated

fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 209-214, 2008.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts**. Chapman and Hall, London, UK, p. 39-45, 1998.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. **Program Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1248-1253, 2007.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender *Lavandula angustifolia* P. Miller. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 540-542, 1999.

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

MATOS, F.J.A. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. **Journal of Essential Oil**, v. 8, p. 695-698, 1996.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archive International of Pharmacodynamics Therapy**, v. 229, p. 327-336, 1977a.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-722, 1977b.

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

SANTOS, L.F.L.; FREITAS, R.L.; XAVIER, S.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 89, p. 1-5, 2008.

TADANO, T.; NAKAGAWASAI, O.; NIIJIMA, F.; TAN-NO, K.; KISARA, K. The effects of traditional tonics on fatigue in mice differ from those of the antidepressant imipramine: a pharmacological and behavioral study. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 28, p. 97-104, 2000.

XAVIER S.M.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

WONG, A.H.C.; SMITH, M.; BOON, H. S. Herbal Remedies in Psychiatric Practice. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, p. 1033-1044, 1998.

WONDER, M.K.A.; WOODE, E.G.K.; AMAK, A.B.K.; AMO-BARIMAH AMA. K.; BOAKYE-GYASI, E.; AINOOSON, G.K. An evaluation of the anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive effects of *Ficus exasperata* (Vahl) leaf extracts. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, p. 138-151, 2009.

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

# PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- *Artigos Publicados*

CAMPELO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOME, A.R.; FREITAS, R.M. Evaluation of neuroprotective potential of *C.limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 116-126, 2011.

CAMPELO, L.M.L.; GONÇALVES, F.C.M.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mice hippocampus. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 709-715, 2011.

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M.; SÁ, C.G.; COSTA, J.P.; MARQUES, T.H. C. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. **Die Pharmazie**, v. 66, p. 1-5, 2011.

SANTOS, P.S.; CAMPELO, L.M.L. ; FREITAS, R.L.M ; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. . Lipoic acid effects on glutamate and taurine concentrations in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, p. 360-364, 2011.

CAMPELO, L.M.L.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of essential oil from *Citrus limon* (Burm) in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 21, p. 668-673, 2011.

- *Artigos Aceitos*

CAMPELO, L.M.L.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.L.M.; SOUZA, G.F.; SALDANHA, G.B.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

- *Artigos Submetidos*

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; SOUSA, G.F.; FREITAS, R.M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citruslimon* Burm (Rutaceae). Submetido a **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

SÁ, C.G.; CAMPELO, L.M.L.; GONÇALVES, F.C.M.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. **Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos swiss, tratados com óleo essencial de *Citrus limon***. Apresentação de Pôster no XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil realizado em João Pessoa, PB, no período de 14 a 17 de setembro de 2010.

CAMPELO, L.M.L.; SÁ, C.G.; GONÇALVES, F.C.M.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M.; FEITOSA, C.M. **Avaliação da Toxicidade Pré-Clínica de *Citrus limon* em Camundongos Machos: Uma análise Bioquímica**. Apresentação de Pôster no XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil realizado em João Pessoa, PB, no período de 14 a 17 de setembro de 2010.

LIMA NETO, J.S., CAMPELO, L.M.L., SÁ, C.G., FEITOSA, C.M., FREITAS, R.M. **Avaliação dos efeitos in vitro e in vivo do óleo essencial das folhas *C. limon* na atividade da enzima acetilcolinesterase.** In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

CAMPELO, L.M.L., SÁ, C.G., COSTA, J.P., FEITOSA, C.M., FREITAS, R.M. **Biosproteção do óleo essencial de *C. limon* com potencial anticonvulsivante.** Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

SÁ, C.G., CAMPELO, L.M.L., COSTA, J.P., FEITOSA, C.M., FREITAS, R.M. **Extrato etanólico de *C. limon*: perspectivas para biosproteção de compostos antidepressivos.** Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

CAMPELO, L.M.L., SÁ, C.G., COSTA, J.P., FEITOSA, C.M., FREITAS, R.M. **Óleo essencial de *C. limon*: um potencial neuroprotetor contra danos neuronais.** Apresentação de Pôster no *Workshop* Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica, realizado em Aracaju, SE, no período de 22 a 25 de março de 2011.

CAMPELO, L.M.L., COSTA, J.P., SABINO, E.B., FREITAS, R.M., ALMEIDA, A.A.C. **Antinociceptive effects of essential oil from *Citrus limon* in Mice.** XXVI Apresentação de Pôster na Reunião Anual da FESBE-2011, no período de 24 a 27 de agosto de 2011.