



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA (DEFAR)



VIRGÍNIA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANSIOLÍTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
EXTRAÍDOS DE CAMOMILA ROMANA (*Anthemis nobilis*) E
TANGERINA (*Citrus reticulata*) NO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)
ADULTO**

**OURO PRETO - MG
2022**

VIRGÍNIA SILVEIRA
virginia.silveira@aluno.ufop.edu.br

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANSIOLÍTICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE CAMOMILA ROMANA (*Anthemis
nobilis*) E TANGERINA (*Citrus reticulata*) NO ZEBRAFISH (*Danio
rerio*) ADULTO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentando ao curso de
Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Ouro
Preto como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Maria Elvira Poleti Martucci

**OURO PRETO – MG
2022**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S587a Silveira, Virginia.

Avaliação da ação ansiolítica dos óleos essenciais extraídos de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) no zebrafish (*Danio rerio*) adulto. [manuscrito] / Virginia Silveira. - 2022. 52 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elvira Martucci.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Essências e óleos essenciais. 2. Aromaterapia. 3. Ansiedade. I. Martucci, Maria Elvira. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 665.52



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Virginia Silveira

Avaliação da atividade ansiolítica dos óleos essenciais de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) no zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico generalista

Aprovada em 07 de janeiro de 2022

Membros da banca

Profª. Drª Maria Elvira Poleti Martucci - Orientadora (UFOP)
Prof. Dr. - Cristiano Schetini de Azevedo (UFOP)
Mestranda Mariana Laiz Silva (UFOP)

Maria Elvira Poleti Martucci, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 07/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elvira Poleti Martucci, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/01/2022, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0265823** e o código CRC **359E3A2F**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.000278/2022-98

SEI nº 0265823

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

DEDICATÓRIA

À Deus, por todas as bênçãos
derramadas em minha vida.

Aos meus pais, Maurício e Maria das
Dores, por não medirem esforços
para me verem realizando meus
sonhos. Vocês são minha vida!

À minha irmã Vitória, por estar
comigo em todos os momentos. Amo
você!

Ao Pedro, pelo carinho e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim.

Aos meus amigos de Guimarães, por mostrarem que a distância só fortalece ainda mais nossa amizade.

Aos amigos de Ouro Preto, por terem feito os anos de graduação muito mais felizes.

À República Feitiço, por ser meu lar, onde aprendi e aprendo todos os dias.

À minha orientadora Prof.^a Maria Elvira Poleti Martucci, pelos ensinamentos, orientação e paciência. Obrigada pelo apoio para que esse trabalho pudesse ser concluído com êxito.

À UFOP e à Escola de Farmácia, pelo ensino de qualidade.

RESUMO

A ansiedade é um dos transtornos mais prevalentes atualmente e os benzodiazepínicos são uma classe de medicamentos muito usados para tratá-la. Entretanto, o uso crônico induz o desenvolvimento de tolerância, causa falta de coordenação psicomotora e efeitos na cognição. Nas últimas décadas, novas alternativas para o tratamento da ansiedade se tornaram conhecidas, sendo a aromaterapia uma delas. É realizada por meio do uso de óleos essenciais (o.e.), extraídos de plantas aromáticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação ansiolítica dos o.e. de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) no *Zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, por meio do teste claro/escuro. Foram usadas as concentrações de 1, 5 e 10mg/L dos o.e. e o controle positivo foi o clonazepam 0,75mg/L. Os resultados mostraram que o o.e. de camomila romana nas concentrações de 1mg/L, 5mg/L e 10mg/L e o o.e. de tangerina nas concentrações de 5mg/L e 10mg/L exerceram efeito ansiolítico significativo ($p < 0,05$). Foi realizada também a análise dos o.e. por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a fim de identificar e quantificar os compostos voláteis. No o.e. de camomila romana, os compostos majoritários encontrados foram: Éster pentadecílico (21,66%), Éster hexadecílico (19,94%), Éster dodecílico (19,87%), Ciclopentano (17,07%). Já no o.e. de tangerina os compostos majoritários encontrados foram: Limoneno (64,21%) e Gama-terpineno (33,2%). Assim, foi possível concluir que os o.e. nas concentrações citadas nos resultados podem ser alternativas promissoras no manejo da ansiedade e, possivelmente, a ação ansiolítica de ambos está associada à sinergia dos compostos químicos presentes.

Palavras-chave: Ansiedade; aromaterapia; óleo essencial; peixe-zebra.

ABSTRACT

Anxiety is one of the most prevalent disorders currently and benzodiazepines are a class of medications used to treat it. However, chronic use induces the development of tolerance, causes psychomotor incoordination and affects cognition. In recent decades, new alternatives for the treatment of anxiety became known, being aromatherapy one of them. It is performed using essential oil (e.o.), extracted from aromatic plants. The objective of this study was to evaluate an anxiolytic action of e.o. of roman chamomile (*Anthemis nobilis*) and tangerine (*Citrus reticulata*) on adult Zebrafish (*Danio rerio*), by means of the light/dark test. Were used concentrations of 1, 5 and 10mg/L of e.o. and the positive control was clonazepam 0.75mg/L. The results showed that e.o. of Roman chamomile in the concentrations of 1mg/L, 5mg/L and 10mg/L and e.o. of tangerine in the concentrations of 5mg/L and 10mg/L had a significant anxiolytic effect ($p < 0.05$). We also conducted analysis of the o.e. by gas chromatography coupled with mass spectrometry, to identify and quantify the volatile compounds. In the e.o. of Roman chamomile, the major compounds found were Dodecyl ester (19.87%), Cyclopentane (17.07%), Pentadecyl ester (21.66%), Hexadecyl ester (19.94%). In the e.o. of tangerine, the main compounds found were Limonene (64.21%) and Gamma-terpinene (33.2%). Thus, it was possible to conclude that the e.o. in the mentioned concentrations in the results can be promising alternatives in the management of anxiety and, possibly, the anxiolytic action of both e.o. is associated with the synergy of the chemical compounds present.

Key-words: Anxiety; Aromatherapy; essential oil; zebrafish.

LISTA DE SIGLAS

AMP c	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
ICP	Intervenção coronária percutânea
OE	Óleo essencial
PICs	Práticas integrativas e complementares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema único de saúde
UBS	Unidade básica de saúde
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aquário claro/escuro frontal.	9
Figura 2 - Aquário claro/escuro lateral	10
Figura 3 - Tempo total em segundos que o peixe ficou na parte clara do aquário nas soluções do óleo essencial de camomila romana, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo exerceram atividade ansiolítica. * p (5mg/L) = 0,0029 e **p (10mg/L) = 0,0002.	13
Figura 4 - Número de cruzamentos do peixe de um lado para outro do aquário nas soluções do óleo essencial de camomila romana, controle negativo e clonazepam. Esse número avalia se as soluções em estudo afetaram o sistema locomotor dos animais, prejudicando sua exploração por novos ambientes.....	14
Figura 5 - Tempo de latência em segundos para o peixe ir do lado claro para o lado escuro do aquário, nas soluções do óleo essencial de camomila romana, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo causaram sedação nos animais.	15
Figura 6 - Tempo total em segundos que o peixe ficou na parte clara do aquário nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo exerceram atividade ansiolítica. * p (1mg/L) = 0,001; **p (5mg/L) = 0,0048; ***p (10mg/L) = 0,0008.	16
Figura 7 - Número de cruzamentos do peixe de um lado para outro do aquário nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse número avalia se as soluções em estudo afetaram o sistema locomotor dos animais, prejudicando sua exploração por novos ambientes.....	17
Figura 8 - Tempo de latência em segundos para o peixe ir do lado claro para o lado escuro do aquário, nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo causaram sedação nos animais.....	17
Figura 9 - Cromatograma do óleo essencial de camomila romana.....	19
Figura 10 – Estrutura química do éster pentadecílico (C ₂₀ H ₃₈ O ₂)	20

Figura 11 - Estrutura química do éster hexadecílico ($C_{21}H_{40}O_2$)	20
Figura 12 - Estrutura química do éster dodecílico ($C_{17}H_{32}O_2$)	21
Figura 13 - Estrutura química do Ciclopentano, 1-etil-3-metil,-trans (C_8H_{16})	21
Figura 14 – Cromatograma do óleo essencial de tangerina	27
Figura 15 - Estrutura química do limoneno ($C_{10}H_{16}$).....	27
Figura 16 - Estrutura química do gamma-terpineno ($C_{10}H_{16}$)	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes químicos encontrados no óleo essencial de camomila romana doTerra por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.	22
Tabela 2 - Componentes químicos encontrados do óleo essencial de tangerina doTerra por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ansiedade.....	1
1.2	Aromaterapia	3
1.3	Zebrafish.....	5
2	OBJETIVOS	7
2.1	Geral.....	7
2.2	Específicos	7
3	METODOLOGIA.....	8
3.1	Óleos essenciais.....	8
3.2	Ética em Experimentação Animal	8
3.3	Manutenção e Cultivo dos Animais	8
3.4	Exposição dos peixes	8
3.5	Avaliação da ação ansiolítica: ensaio claro/escuro	9
3.6	Análise estatística	11
3.7	Preparo das amostras de óleos essenciais	11
3.8	Análise dos óleos essenciais por cromatografia acoplada à espectrometria de massas	11
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1	Avaliação da atividade ansiolítica por meio do teste claro/escuro	12
4.2	Composição química dos óleos essenciais de camomila romana e tangerina 19	
4.3	Avaliação da relação entre atividade ansiolítica dos óleos essenciais e a composição química	31
5	CONCLUSÃO	34
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

A ansiedade patológica vem de uma preocupação e inquietação que não é proporcional à situação e se origina com duração e intensidade consideráveis, o que traz sofrimento e prejuízos de ordem organizacional, social e funcional (DSM-5, 2014). Os transtornos de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais prevalentes, dentre eles estão: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico/agorafobia, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia específica e fobia social (Craske, et al., 2016).

Alguns estudos sugerem que os transtornos de ansiedade são crônicos, o que quer dizer que os pacientes podem ter o transtorno por anos ou mesmo décadas. Entretanto, isso não quer dizer que um transtorno de ansiedade dure a vida toda. Eles começam na infância, adolescência ou início da idade adulta, ou seja, entram em um pico na meia-idade e a tendência é que diminuam com a idade (Bandelow et al, 2015).

Cerca de uma em nove pessoas no mundo (11,6%) terá transtorno de ansiedade em algum momento da vida (Craske et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, no Brasil, a prevalência de pessoas com transtorno de ansiedade é de 9,3% e no mundo esse valor é de 3,6%, classificando o Brasil como um país que possui uma das populações mais ansiosas do mundo (OMS, 2017). O ritmo acelerado de vida e todas as mudanças que vêm acontecendo no mundo, fizeram esse número aumentar. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) realizou uma pesquisa que mostrou que 80% da população brasileira se tornou mais ansiosa devido a pandemia do novo coronavírus. A pesquisa foi feita nos meses de maio, junho e julho do ano de 2020, ouvindo 1.996 pessoas maiores de 18 anos (Goularte, 2021). No Brasil o consumo de benzodiazepínicos subiu 12,7% no ano de 2020 e houve um crescimento de quase 14% na comercialização de antidepressivos e estabilizadores de humor (Gallini, Freitas, Gonzaga, 2021).

Os benzodiazepínicos são utilizados em ampla escala para tratar ansiedade e insônia (Nielsen S., 2017). As ações deles acontecem devido à potencialização da

inibição neural que é mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). A maioria dos efeitos desses medicamentos são resultados de suas ações nos receptores ionotrópicos GABA (A) do sistema nervoso central (Olkkola, Ahonen, 2008). Segundo Golan et al, (2009, p. 151):

Os benzodiazepínicos são fármacos de alta afinidade e altamente seletivos, que se ligam a um único sítio dos receptores GABA A contendo as subunidades alfa 1, 2, 3 ou 5 e uma subunidade gama. Os benzodiazepínicos atuam como moduladores alostéricos positivos, potencializando a regulação dos canais na presença de GABA. Os benzodiazepínicos não ativam diretamente os receptores GABA A nativos na ausência de GABA, porém ativam efetivamente certos receptores mutantes, indicando que atuam como agonistas alostéricos fracos. Esse mecanismo é compatível com a localização conhecida do sítio de ligação dos benzodiazepínicos na interface entre os domínios externos das subunidades alfa e gama. Esse sítio é um homólogo estrutural dos dois sítios agonistas do GABA nas interfaces entre as subunidades alfa e gama. Os benzodiazepínicos aumentam a frequência de abertura dos canais na presença de baixas concentrações de GABA. Em concentrações de GABA semelhantes àquelas observadas nas sinapses, a desativação do receptor é prolongada, indicando aumento da ligação do GABA e/ou probabilidade aumentada de abertura do canal. O consequente influxo aumentado de Cl^- provoca hiperpolarização da membrana e diminui a excitabilidade neuronal.

Os benzodiazepínicos exercem um efeito ansiolítico através da inibição das sinapses no sistema mesolímbico, uma região do sistema nervoso central (SNC) que controla o comportamento emocional, a fissura e a memória, e se caracteriza por uma elevada densidade de receptores GABA A (Golan, 2009). Além disso, também atuam no sistema mesocortical, que é responsável pela compulsão e perda de controle no consumo. Seus principais efeitos são sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, amnésia anterógrada, relaxamento muscular mediado centralmente e atividade anticonvulsivante (Olkkola, Ahonen, 2008). De acordo com Golan et al (2009, p. 153):

O uso crônico de benzodiazepínicos induz o desenvolvimento de tolerância, que se manifesta na forma de uma redução na eficácia dos benzodiazepínicos e também dos barbitúricos. Modelos de animais sugerem que a tolerância aos benzodiazepínicos resulta da expressão diminuída dos receptores de benzodiazepínicos (GABA A) nas sinapses. Outro mecanismo proposto para a tolerância observada envolve o

desacoplamento do sítio de ligação dos benzodiazepínicos do sítio do GABA. A súbita interrupção dos benzodiazepínicos após a sua administração crônica pode resultar em uma síndrome de abstinência, caracterizada por confusão, ansiedade, agitação e insônia.

Além disso, os benzodiazepínicos podem causar falta de coordenação psicomotora (Costa, 2002) e os efeitos na cognição e equilíbrio são preocupantes, tornando-os cada vez mais tratamentos de segunda linha para a maior parte das suas indicações (Nielsen, 2017).

Nas últimas décadas, novas alternativas para tratamento da ansiedade se tornaram conhecidas e muitos desses tratamentos estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2021).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), foi publicada em 2006 e instituiu no SUS abordagens de cuidado integral à população por meio de práticas que envolvem recursos terapêuticos diversos. A Portaria nº 702 de 2018, incluiu mais nove práticas no SUS e a aromaterapia foi uma delas. Inicialmente, estavam inclusas apenas cinco Práticas Integrativas e Complementares (PICs) e hoje o SUS disponibiliza 29 PICs à população, as quais estão presentes em 54% dos municípios brasileiros. Alguns exemplos de outras práticas integrativas e complementares são: Yoga, Meditação, Reiki, Reflexologia, entre outras (Brasil, 2021).

A PNPIC traz diretrizes gerais para a incorporação das práticas nos serviços e cabe ao gestor municipal elaborar normas para inserir a política na rede municipal de saúde. De 2017 para 2018, o número de participantes nessas atividades cresceu 36%, de 4,9 milhões de participantes para 6,67 milhões neste período (Brasil, 2021).

A indicação de tratamentos complementares, no SUS, ocorre no âmbito da Atenção Básica, nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) e também no atendimento especializado, nas unidades hospitalares e centros especializados (Brasil, 2021).

1.2 Aromaterapia

Os medicamentos convencionais nem sempre são eficazes no tratamento das doenças e, em muitos casos, podem levar à tolerância e à dependência. Por conta disso, os tratamentos integrativos têm sido cada vez mais procurados, o que é

evidenciado no crescimento do número de consumidores e fornecedores das práticas alternativas e complementares, juntamente com o aumento de pacientes e profissionais de saúde que desejam tratamentos que apresentem redução dos efeitos adversos (Otani, Barros, 2011). Neste contexto, a aromaterapia tem sido usada para tratar a ansiedade como alternativa ao tratamento convencional com benzodiazepínicos, evitando o surgimento dos eventos adversos comuns a esses medicamentos (Agatonovic-Kustrin et al., 2020). Além disso, outros objetivos de utilizar a aromaterapia é cuidar do indivíduo e diminuir a porcentagem de pacientes diagnosticados com ansiedade (Costa, 2002).

A aromaterapia é uma terapia integrativa e complementar que busca promover saúde física, mental e emocional. Ela é realizada por meio do uso de óleos essenciais que são extraídos de plantas aromáticas e são usados no tratamento de estresse, depressão, ansiedade e com o intuito de trazer bem-estar e qualidade de vida aos pacientes (Lyra et al., 2010). Tais óleos essenciais são misturas complexas compostas por diversos componentes que podem variar em sua composição, a depender do processo de extração realizada pelo produtor ou da origem da planta (Ramsey et al., 2020). Eles agem de várias formas no organismo, assim suas moléculas podem ser absorvidas por meio da inalação, por uso tópico e pela ingestão. Quando são usados a partir da inalação, uma porcentagem ativa o sistema olfativo pelos nervos olfativos e pelo bulbo, o que gera uma ligação direta com o SNC, levando estímulo ao sistema mesolímbico. Outra porcentagem chega à corrente sanguínea através do sistema respiratório. Quando eles são utilizados de forma tópica, ou seja, por via cutânea, são absorvidos e transportados pela circulação sanguínea, sendo levados até os órgãos e tecidos corporais. Já quando são usados por ingestão, as moléculas dos óleos essenciais são absorvidas pelo intestino e levadas aos tecidos do corpo (Gnatta, Dornellas, Silva, 2011).

Um dos óleos essenciais usados para tratar o estresse e ansiedade é o óleo essencial extraído da camomila romana (*Anthemis nobilis*), o qual é muito usado em todo o mundo como sedativo, ansiolítico e antiespasmódico (Gardiner, 1999). O óleo essencial de camomila romana também é muito utilizado em cosméticos e pomadas para tratamento da irritação e inflamação leve da pele, suavizando-a e acalmando-a (Nardoni et al., 2016). Os componentes químicos encontrados no óleo é que são os responsáveis por seus efeitos terapêuticos. Os componentes majoritários

encontrados na no óleo essencial de camomila romana são: isobutilangelato (36,3–38,5%) e 2-metilbutil angelato (18,2–20,3%); outros componentes são o 2-butenil angelato, angelil angelato e 2-hidroxi-2-metilbutenil angelato (Omidbaigi et al., 2004).

Um estudo recente demonstrou o mecanismo de ação e o alvo do óleo essencial de camomila romana, mostrando que se caracteriza por apresentar múltiplos alvos e múltiplas vias para o tratamento do transtorno de ansiedade (Jia et al., 2021). Dentre os mecanismos envolvidos, foi identificado uma possível intervenção no processo de desenvolvimento da doença por meio da via de sinalização de Adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC), a interação ligante-receptor neuroativa e a sinapse de serotonina (Jia et al., 2021).

Os óleos essenciais extraídos de espécies cítricas também são úteis na redução dos sintomas de ansiedade (Song et al., 2021). O óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) demonstrou atividade ansiolítica e sedativa (Song et al., 2021). Sua composição química tem 90% do monoterperno limoneno e outros componentes minoritários como β -pineno 0.35%, γ -terpineno 4% e linalol 1% (Gargano, Almeida, 2008). O limoneno que é o componente majoritário do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*), age no receptor de adenosina A2A regulando a atividade neuronal DAérgica e GABAérgica e assim, inibe o comportamento que está relacionado à ansiedade (Song et al., 2021).

1.3 Zebrafish

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um modelo animal muito usado para estudo de distúrbios neurocomportamentais (Levin, 2011) e tem sido cada vez mais utilizado em pesquisas neurocientíficas e na descoberta de drogas para o sistema nervoso central (Kysil, 2017). Atualmente, é considerado um dos modelos ideais para estudos neurocomportamentais com relevância para os seres humanos, em virtude do custo-benefício, da simplicidade e por possuir estrutura genética 84% semelhante à humana. Além disso, tem vantagens sobre modelos de roedores devido ao seu tamanho ser menor, por ter maior facilidade de manutenção, um custo de experimentação menor, maior poder de reprodução e a transparência dos embriões (Saluja et al., 2021).

Testes comportamentais de resposta ao estresse feitos no modelo *zebrafish* podem ser utilizados para identificar as bases neurais da ansiedade e possíveis

novos tratamentos ansiolíticos. Assim, diversos métodos foram desenvolvidos para estudar a resposta à ansiedade e ao estresse no *zebrafish*, como por exemplo resposta de cardume, esquiva de predador e escolha de ambiente claro-escuro (Levin, 2011).

O teste claro-escuro é baseado na aversão de roedores a ambiente com luminosidade. Dessa forma, pela similaridade e usando o *zebrafish* adulto como modelo de estudo, os peixes são colocados nas soluções que se pretende avaliar, por tempo determinado. Após esse tempo, é colocado na parte clara de um aquário e após tempo determinado a barreira é aberta e são feitos registros por 300 segundos. Esse registro permite avaliar: 1) A latência para a primeira entrada no lado escuro; 2) O número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro; e 3) O tempo total que o peixe ficou no lado claro (Gebauer, 2011).

O *zebrafish* tem preferência por zonas escuras (Gebauer, 2011). Sendo assim, ao ficar mais tempo na parte clara, é possível inferir que as substâncias - as quais os animais foram expostos - exercem o efeito ansiolítico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a ação ansiolítica dos óleos essenciais de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) no Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

2.2 Específicos

- Avaliar a ação ansiolítica dos óleos essenciais no zebrafish adulto por meio do ensaio de preferência claro/escuro;
- Avaliar a relação entre a composição química dos óleos essenciais e a ação ansiolítica.

3 METODOLOGIA

3.1 Óleos essenciais

Foram avaliados os óleos essenciais de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e tangerina (*Citrus reticulata*) da marca dōTERRA®. A escolha foi feita baseada no conhecimento popular da ação ansiolítica do óleo essencial de camomila romana e também de alguns estudos em que outras plantas do gênero *Citrus* exercem essa mesma atividade. Além disso, a escolha também se baseou na utilização de óleos essenciais extraídos de partes diferentes de plantas, uma vez que o o.e. de camomila romana é extraído das pétalas da flor e o.e. de tangerina é extraído da casca da fruta. Outro fator utilizado na escolha, foi a diferença de preço dos dois óleos essenciais, pois o o.e. de camomila romana dōTERRA® de 5mL custa R\$371,00, enquanto que o o.e. de tangerina dōTERRA® de 5mL custa R\$52,00, pensando na acessibilidade a esse tipo de tratamento.

3.2 Ética em Experimentação Animal

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o número de protocolo 2700091221, seguindo os cuidados para utilização de animais para fins experimentais.

3.3 Manutenção e Cultivo dos Animais

Foram adquiridos 96 peixes adultos *Zebrafish* (*Danio rerio*), igualmente distribuídos em machos e fêmeas. Os animais foram mantidos em aquário de vidro contendo 25L de água desclorada durante 15 dias antes do início do experimento. A aeração foi constante e realizada com o auxílio de bomba mecânica. A temperatura foi mantida a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com o auxílio de um termostato. A iluminação da sala foi ajustada artificialmente de forma a fornecer os ciclos de claro:escuro 14h:10h e os animais foram alimentados diariamente com ração floculada.

3.4 Exposição dos peixes

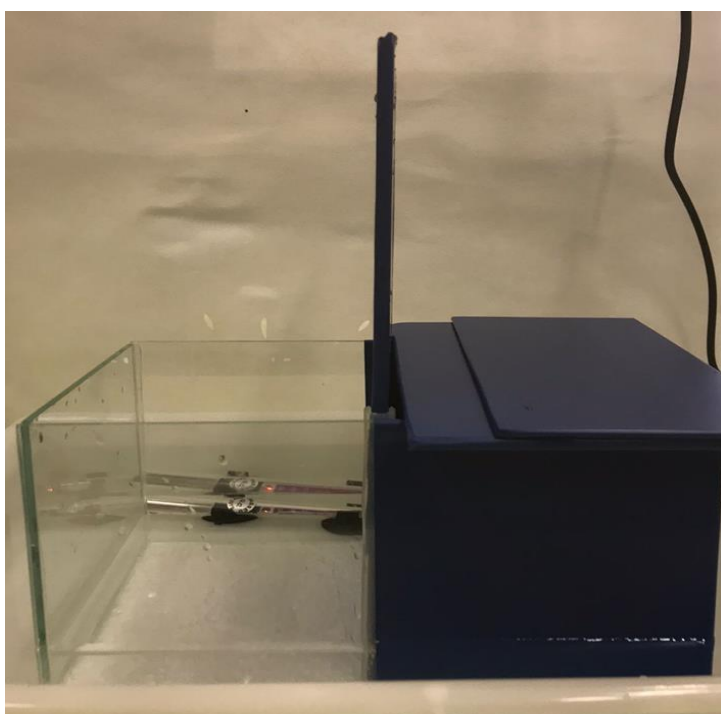
Os peixes foram expostos às concentrações escolhidas com base em estudos pilotos anteriores, que não produziram efeito letal e que conseguiram estabelecer ação ansiolítica efetiva (Hacke, 2020). Assim, os peixes foram expostos ao óleo

essencial de camomila romana (*Anthemis nobilis*) e ao óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*), nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/L. Os peixes do grupo controle positivo foram expostos ao clonazepam (Rivotril®) na concentração de 0,75 mg/L, enquanto os peixes do grupo controle negativo foram expostos ao meio aquoso. Foram utilizados 12 peixes por grupo, totalizando 96 animais. Inicialmente, todos os peixes estavam em um aquário de 50 litros, contendo água desclorada. Durante a exposição, os peixes foram expostos por 20 minutos em béqueres de 250mL contendo a respectiva solução. Foram utilizados 4 béqueres, sendo que cada animal era exposto em um, e posteriormente submetido ao teste claro/escuro. Após o teste, os animais foram colocados em um béquer de 1L até que todos os animais fossem testados.

3.5 Avaliação da ação ansiolítica: ensaio claro/escuro

O ensaio de preferência claro/escuro foi realizado de acordo com o protocolo elaborado por Gebauer et al. (2011). Sendo assim, foi utilizado um aquário dividido em duas partes: uma com o vidro incolor e outra com o vidro recoberto para evitar entrada de luz.

Figura 1 - Aquário claro/escuro frontal.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Figura 2 - Aquário claro/escuro lateral



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Após o período de exposição (20 min), os animais foram individualmente colocados no aquário dividido em claro e escuro e ficaram 300s na parte clara, para se habituarem ao ambiente. Decorridos os 300s, o compartimento foi aberto para que os peixes pudessem deslocar para ambos os lados (claro e escuro).

A avaliação da ação ansiolítica foi feita por meio das seguintes medições: a) o tempo que o animal ficou na parte clara do aquário, uma vez que o *zebrafish* tem preferência pelo escuro; b) o tempo que o animal levou para ir para a parte escura após a abertura do compartimento, avaliando se as soluções sedaram o animal; e c) o número de vezes que os peixes cruzaram entre os lados claro e escuro do aquário, avaliando se as soluções afetaram o sistema locomotor do animal. Espera-se que os óleos essenciais exerçam sua atividade ansiolítica, sem sedar o animal e sem comprometer seu sistema locomotor, não trazendo prejuízos na sua capacidade de exploração de novos ambientes.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* 5.0 por meio da análise paramétrica por teste-T. Os resultados foram expressos em *p-value*, o qual deve ser < 0.05 para ser considerado estatisticamente significativo.

3.7 Preparo das amostras de óleos essenciais

Os óleos essenciais foram diluídos em diclorometano na concentração de 0,5% v/v, previamente à análise por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (item 3.8).

3.8 Análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Após a diluição dos óleos essenciais em diclorometano (item 3.7), as amostras foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) a fim de identificar e avaliar a porcentagem relativa dos compostos voláteis. O espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (Q) com fonte de ionização por elétron (EI) foi operado no modo *full scan* na faixa de massa de 50 – 400 m/z , e os parâmetros utilizados foram: temperatura da fonte de ionização de 250 °C, corrente de emissão de 60 μ e energia de ionização de 70 eV. As amostras foram injetadas no modo *splitless*, utilizando uma coluna capilar do tipo DB-5MS e hélio como gás de arraste com o fluxo de 1.35 mL/min. A temperatura inicial do forno do GC foi de 60 °C com aumento linear de 5 °C/min até atingir a temperatura de 330 °C durante 57 min.

Os dados cromatográficos obtidos foram analisados pelo *software* GC-MS Solution (Shimadzu) e as substâncias voláteis foram identificadas por meio de comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST e WILEY.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade ansiolítica por meio do teste claro/escuro

O *zebrafish*, modelo usado no estudo, apresenta uma preferência por áreas escuras, baseado na similar aversão de roedores por áreas claras. Dessa forma, o teste claro-escuro é usado para avaliar os efeitos de ansiolíticos nesses roedores (Gebauer et al., 2011). Da mesma forma, esse parâmetro também é útil para avaliar os efeitos de ansiolíticos em *zebrafish* (Serra et al., 1999). O teste de preferência claro/escuro é simples, não causa dor e não é necessário condicionamento do animal, pois avalia as tendências naturais do peixe-zebra (Ali et al., 2011). Neste estudo, foi avaliado o tempo total que o animal ficou na parte clara do aquário. Como o *zebrafish* tem preferência pelo escuro, o tempo na parte clara, mostra que as amostras exerceram efeito ansiolítico nos animais (Gebauer et al., 2011). Essa preferência pela parte escura é uma estratégia de defesa dos animais, assim eles preferem ficar em ambientes em que se sentem mais seguros (Magno et al., 2015). Também foi avaliado o tempo de latência para ir do lado claro para o lado escuro, o que mostra se as amostras estão exercendo efeito sedativo nos animais (Hacke et al., 2020). Foi analisado também o número de cruzamentos do lado claro para o lado escuro, para avaliar se as soluções afetaram o sistema locomotor dos peixes (Gebauer et al., 2011). Essas são informações importantes para identificar se a droga está tendo o efeito esperado e se não está causando efeitos indesejáveis, que atrapalhem o animal em outras atividades (Hacke et al., 2020).

O controle positivo usado no estudo foi o clonazepam (Rivotril®) na concentração 0,75 mg/L, que é um fármaco usado para tratar os transtornos de ansiedade (Hacke et al., 2020). Quando o grupo tratado com o clonazepam foi comparado com o grupo controle negativo, notou-se que o tempo que o peixe ficou na parte clara do aquário foi maior. Já em relação ao tempo de latência para ir para o lado escuro e ao número de cruzamentos de um lado para o outro do aquário, os valores foram semelhantes ao do grupo controle negativo, sendo possível inferir que o fármaco não sedou os animais e nem afetou sua atividade locomotora, o que evidencia que o *zebrafish* é um ótimo modelo para avaliação de atividade ansiolítica (Hacke et al., 2020).

Nesse estudo, os óleos essenciais de camomila romana e tangerina foram avaliados nas concentrações de 1mg/L, 5mg/L e 10mg/L, com o intuito de observar os efeitos ansiolíticos nas diferentes concentrações. O óleo essencial de camomila romana aumentou o tempo que os peixes permaneceram na parte clara do aquário quando comparado ao tempo do grupo controle negativo na parte clara (Figura 3). Além disso, é possível observar que o tempo de permanência na parte clara aumentou de forma proporcional com o aumento da concentração do óleo essencial de camomila romana, ou seja, o grupo exposto à solução de 10 mg/L foi o que permaneceu mais tempo na parte clara, seguido do grupo exposto à solução de 5 mg/L e depois o grupo exposto à solução de 1mg/L (Figura 3). Assim, é possível observar que a atividade ansiolítica, proporcionada pelo óleo essencial de camomila romana, aumentou de forma proporcional ao aumento da concentração do óleo. Também, é importante considerar que a atividade ansiolítica proporcionada pelo óleo essencial de camomila romana foi significativa nas concentrações de 10mg/L ($p = 0,002$) e de 5mg/L ($p = 0,0029$).

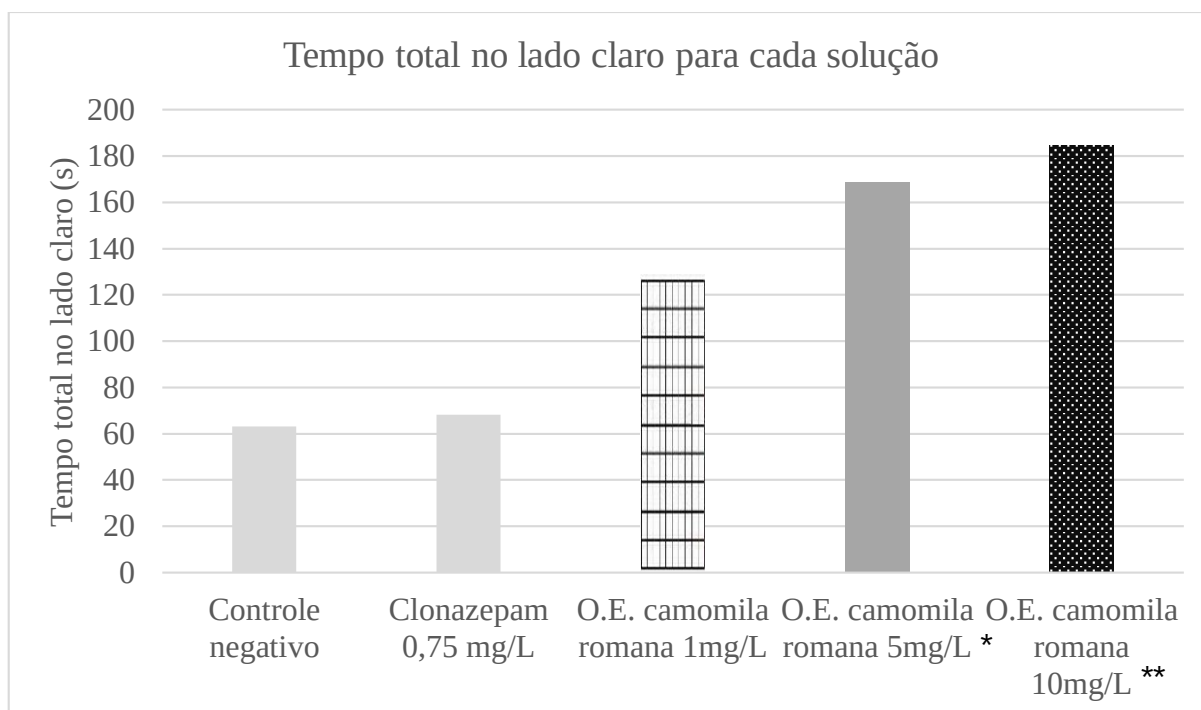


Figura 3 - Tempo total em segundos que o peixe ficou na parte clara do aquário nas soluções do óleo essencial de camomila romana, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo exerceram atividade ansiolítica. * p (5mg/L) = 0,0029 e ** p (10mg/L) = 0,0002.

Além disso, o número de cruzamentos entre o lado escuro e o lado claro não foi inferior ao número de cruzamentos observado no grupo controle negativo para nenhum dos grupos expostos às soluções de óleo essencial de camomila romana (Figura 4), demonstrando que o óleo essencial de camomila romana não afetou a capacidade de locomoção do peixe. Outro ponto importante, é que a diferença entre o tempo de latência observado nos grupos expostos ao óleo essencial de camomila romana e o observado no grupo controle negativo não foi estatisticamente significativa, demonstrando que o óleo essencial de camomila romana não afetou a capacidade do animal de explorar novos ambientes (Figura 5).

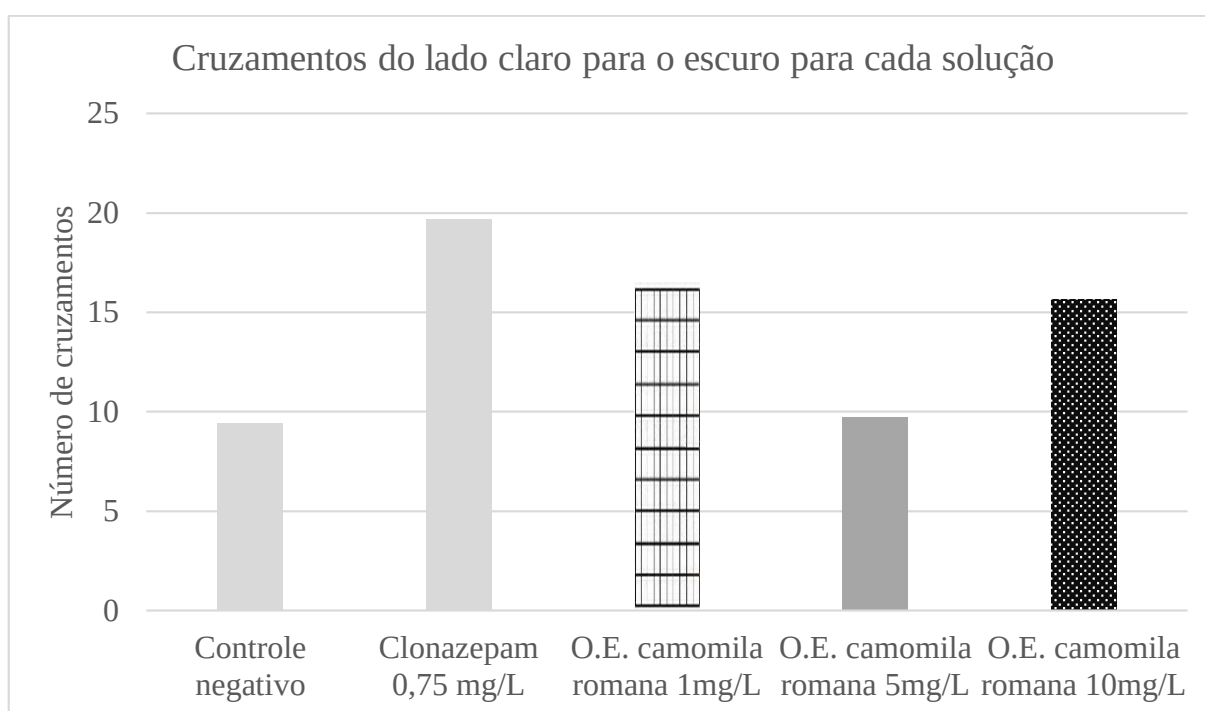


Figura 4 - Número de cruzamentos do peixe de um lado para outro do aquário nas soluções do óleo essencial de camomila romana, controle negativo e clonazepam. Esse número avalia se as soluções em estudo afetaram o sistema locomotor dos animais, prejudicando sua exploração por novos ambientes.

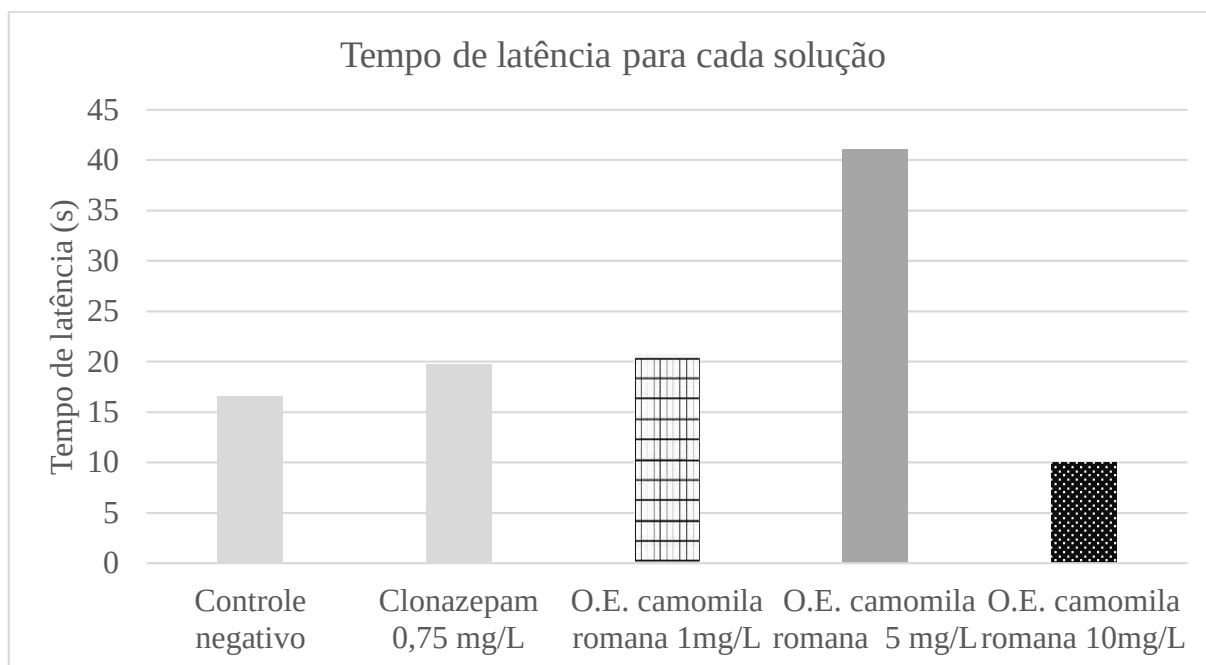


Figura 5 - Tempo de latência em segundos para o peixe ir do lado claro para o lado escuro do aquário, nas soluções do óleo essencial de camomila romana, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo causaram sedação nos animais.

O óleo essencial de tangerina exerceu efeito ansiolítico significativo ($p < 0,05$), uma vez que proporcionou aumento do tempo que os peixes ficaram na parte clara do aquário quando comparado ao tempo do grupo controle negativo na parte clara (Figura 6). É importante considerar que a atividade ansiolítica – avaliada pelo tempo que os peixes ficaram na parte clara do aquário - proporcionada pelo óleo essencial de tangerina foi significativa em todas as concentrações usadas: 1mg/L ($p = 0,001$), 5mg/L ($p = 0,0048$) e 10mg/L ($p = 0,0008$).

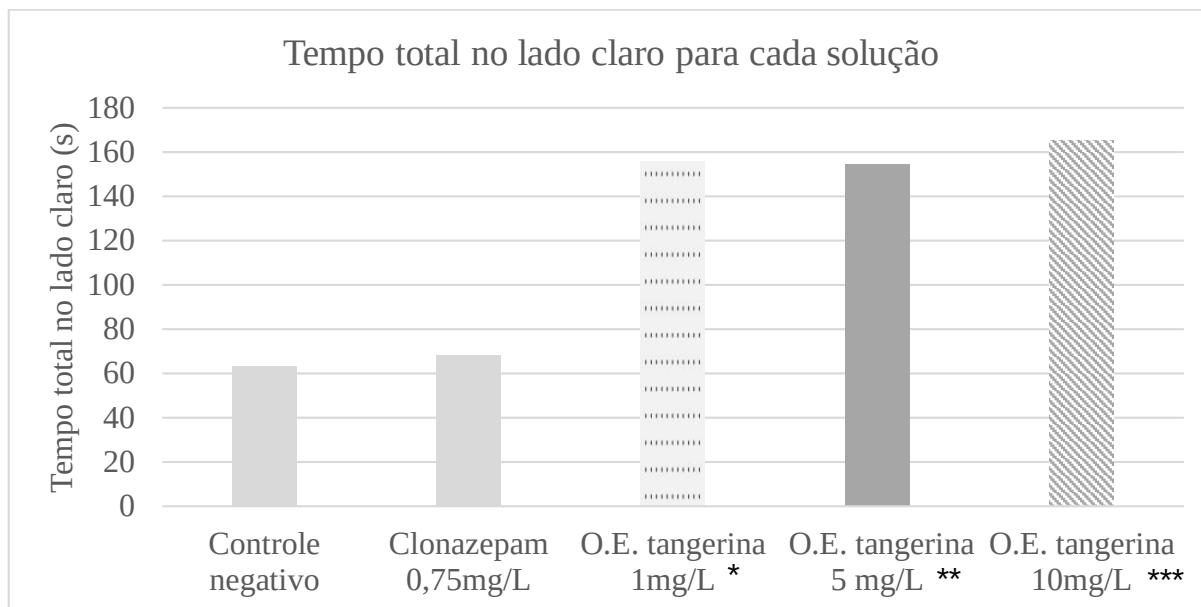


Figura 6 - Tempo total em segundos que o peixe ficou na parte clara do aquário nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo exerceram atividade ansiolítica. * p (1mg/L) = 0,001; **p (5mg/L) = 0,0048; ***p (10mg/L) = 0,0008.

Além disso, o número de cruzamentos entre o lado escuro e o lado claro não foi inferior ao número de cruzamentos observado no grupo controle negativo para nenhum dos grupos expostos às soluções de óleo essencial de tangerina (Figura 7), demonstrando que a capacidade de locomoção do peixe não foi afetada. Outro ponto importante, é que a diferença entre o tempo de latência observado nos grupos expostos ao óleo essencial de tangerina e o observado no grupo controle negativo não foi estatisticamente significativa, demonstrando que o óleo essencial de tangerina não afetou a capacidade do animal de explorar novos ambientes (Figura 8).

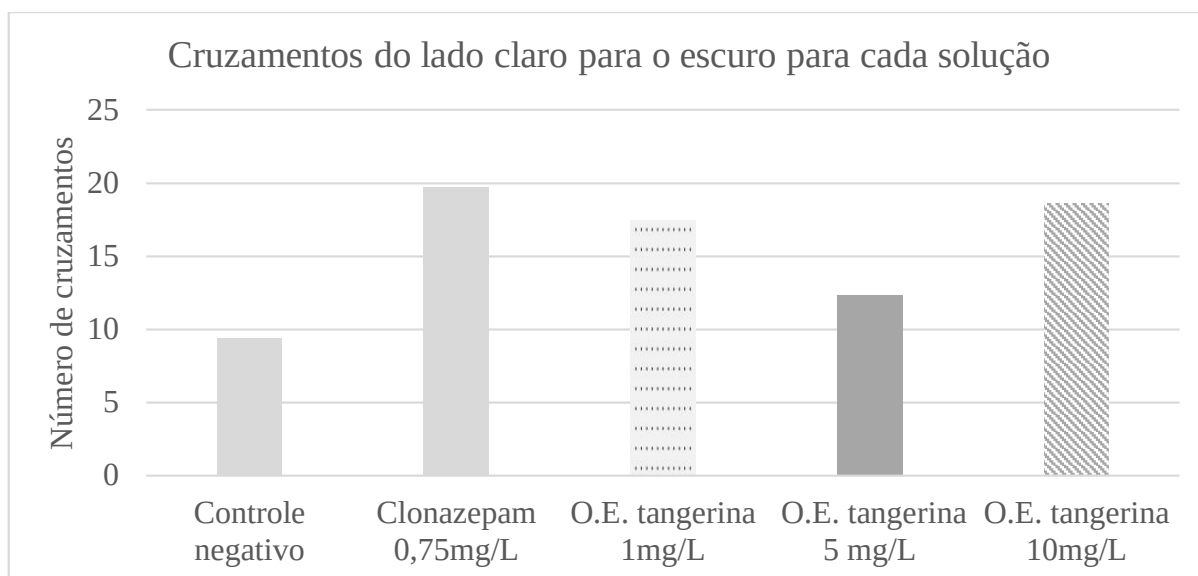


Figura 7 - Número de cruzamentos do peixe de um lado para outro do aquário nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse número avalia se as soluções em estudo afetaram o sistema locomotor dos animais, prejudicando sua exploração por novos ambientes.

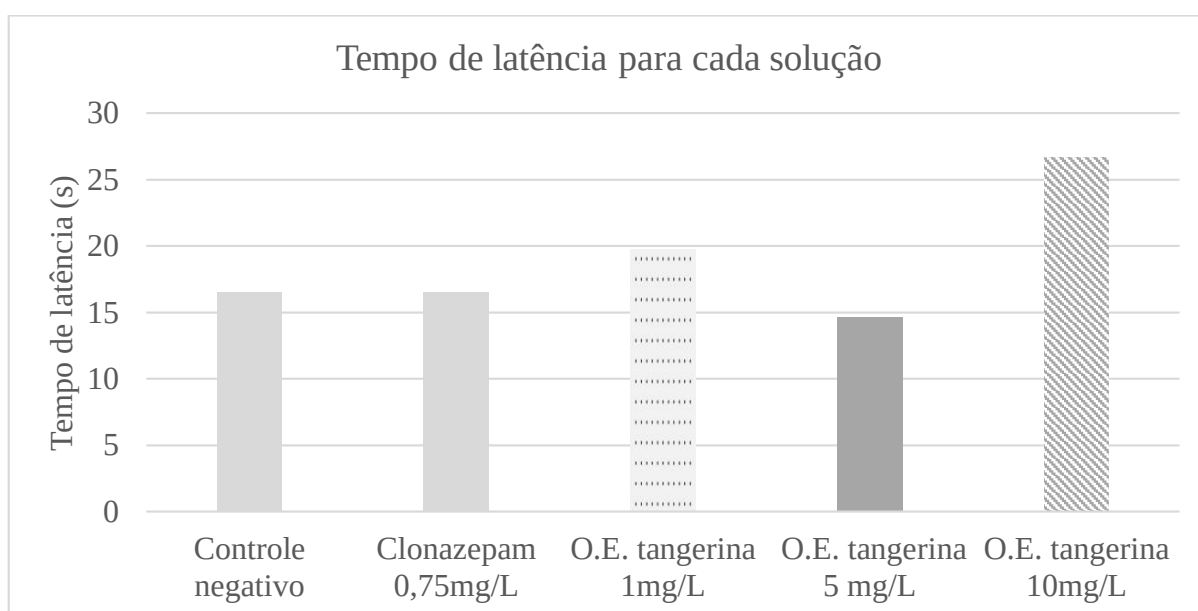


Figura 8 - Tempo de latência em segundos para o peixe ir do lado claro para o lado escuro do aquário, nas soluções do óleo essencial de tangerina, no controle negativo e no clonazepam. Esse tempo avalia se as soluções em estudo causaram sedação nos animais.

O teste claro-escuro é muito usado na neurociência comportamental em estudos de ansiedade e medo. Ele recebeu legitimidade comportamental para algumas espécies de peixes como *Astyanax altiparanaei*; *Oreochromis niloticus*;

Poecilia reticulata; *Paracheirodon axelrodi*; *Gymnotus carapo* e também o *Danio rerio* (*zebrafish*) (Mansur et al., 2015). É importante observar que o *zebrafish* é um animal social e tem a tendência de nadar em grupo. Essa sociabilidade é mostrada a partir de interações sociais, cardume, agressões e viagem eficiente em busca de alimento (Mansur et al., 2015). Dessa forma, quando eles são retirados do seu ambiente e isolados em recipientes contendo as soluções que serão usadas como testes, o que se espera é que eles apresentem um certo nível de ansiedade, pois esse isolamento é estressante para o animal (Hacke et al., 2020).

O *zebrafish* tem semelhanças neurocomportamentais com os humanos devido ao sistema de neurotransmissores (dopaminérgico, noradrenérgico, colinérgico e 5-hidroxitriptaminérgico) e pela alta semelhança fisiológica, uma vez que possuem um sistema nervoso que conta com telencéfalo, diencéfalo e cerebelo e também um sistema nervoso periférico com componentes sensoriais e motores, além de sistema nervoso autônomo e entérico (Barros et al., 2008). Possuem também uma barreira hematoencefálica permeável, ou seja, que tem alta sensibilidade aos fármacos e o mecanismo de ação deles acontece em locais-alvo no cérebro (Hacke et al, 2020). Seu genoma também já foi sequenciado e em grande parte é homólogo geneticamente ao de humanos (Barbazuk et al., 2000). Por isso, tem sido muito usado como modelo para o estudo da depressão, ansiedade, doenças neurodegenerativas e distúrbios do sono (Hacke et al, 2020).

O uso do *zebrafish* para esse tipo de estudo apresenta vantagens em relação ao uso de roedores, uma vez que a resposta ao estresse dos mesmos é parecida com a de humanos, pois o principal hormônio do estresse é o cortisol, já nos roedores é a corticosterona (Hacke et al, 2020). Por serem animais menores, o custo e a dificuldade de manuseio são reduzidos (Gebauer et al., 2011); a via de administração por meio de absorção direta a partir da água do aquário reduz o estresse do peixe e possibilita a obtenção de resultados num menor espaço de tempo (Hacke et al., 2020).

No estudo realizado, a análise estatística dos valores encontrados a partir do teste claro/escuro validam a atividade ansiolítica do óleo essencial de camomila romana nas concentrações de 5mg/L e 10mg/L e do óleo essencial de tangerina nas concentrações de 1mg/L, 5mg/L e 10mg/L, uma vez que os animais permaneceram mais tempo na parte clara do aquário, sem que houvesse sedação e prejuízo na exploração por novos ambientes.

4.2 Composição química dos óleos essenciais de camomila romana e tangerina

A partir da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi possível identificar e avaliar a porcentagem dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais de camomila romana e tangerina da marca dōTERRA®.

O cromatograma do óleo essencial de camomila romana apresentou os compostos majoritários: Éster pentadecílico (21,66%), Éster hexadecílico (19,94%), Éster dodecílico (19,87%), Ciclopentano (17,07%).

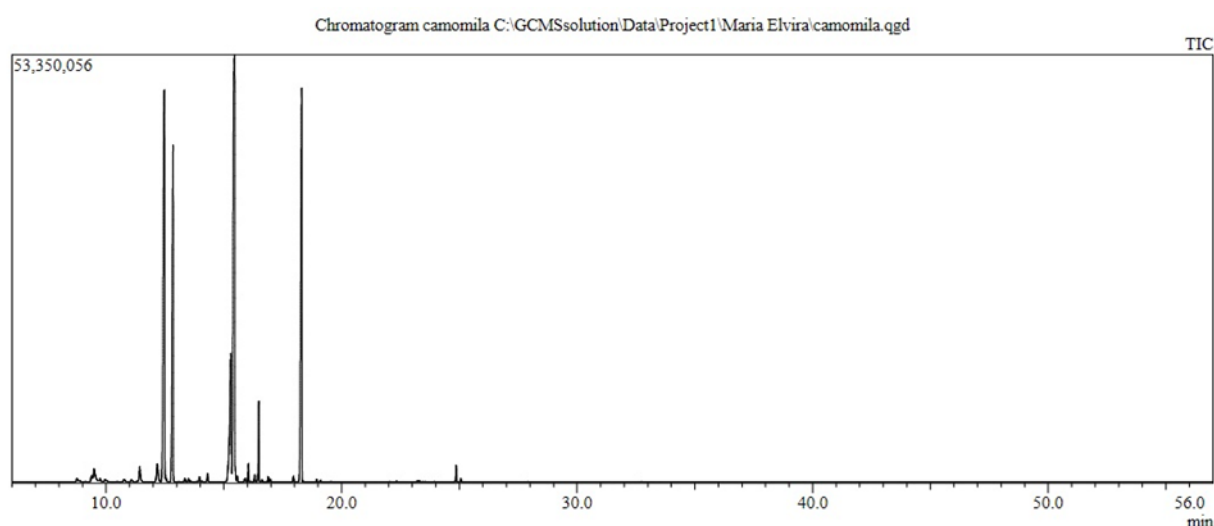
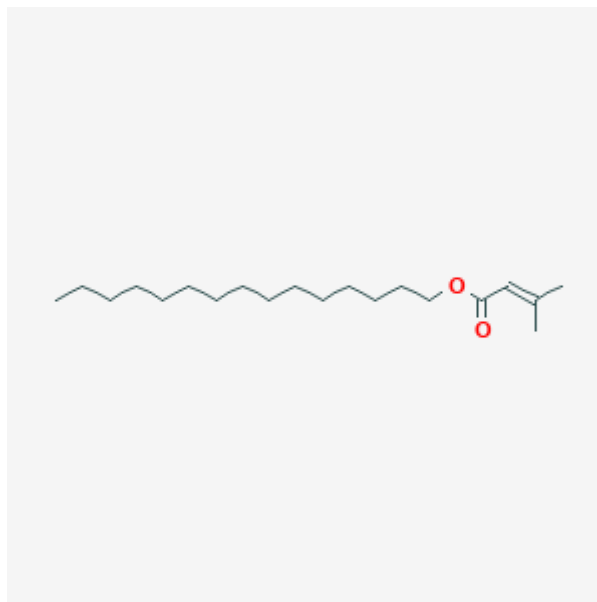


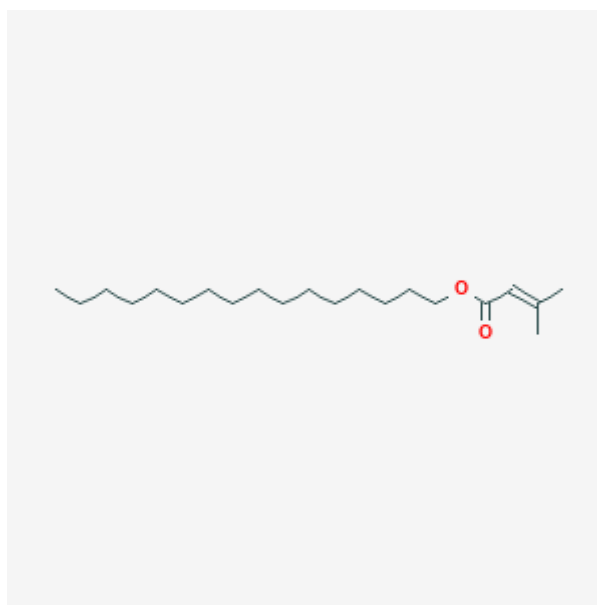
Figura 9 - Cromatograma do óleo essencial de camomila romana

Figura 10 – Estrutura química do éster pentadecílico ($C_{20}H_{38}O_2$)



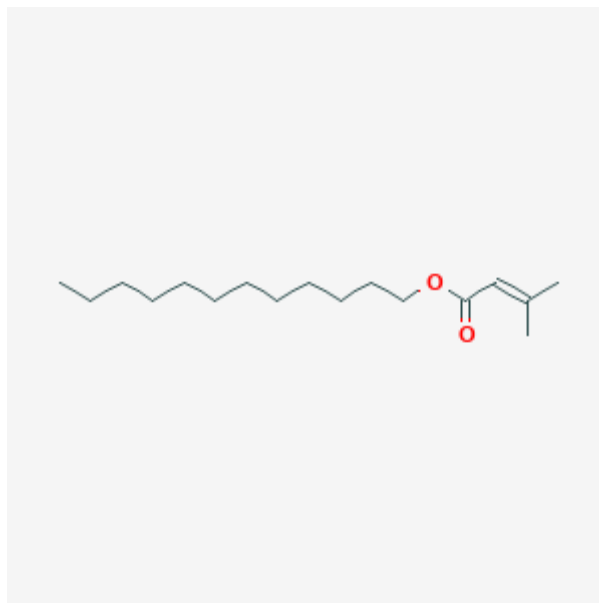
Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/567822>)

Figura 11 - Estrutura química do éster hexadecílico ($C_{21}H_{40}O_2$)



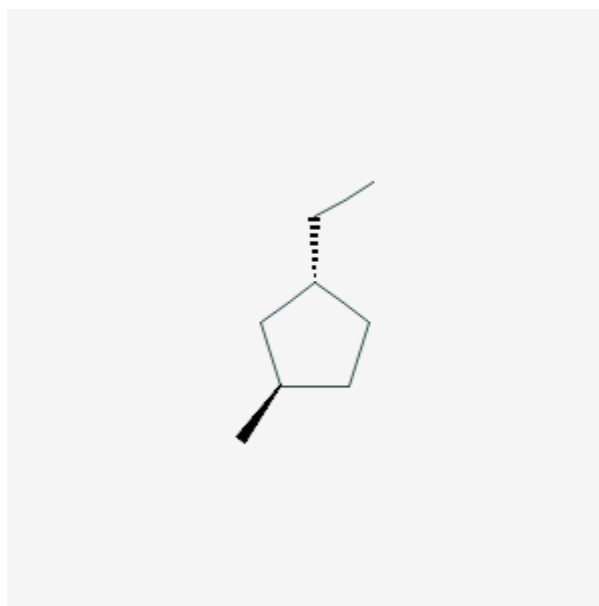
Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/538716>)

Figura 12 - Estrutura química do éster dodecílico ($C_{17}H_{32}O_2$)



Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/558157>)

Figura 13 - Estrutura química do Ciclopentano, 1-etil-3-metil,-trans (C_8H_{16})



Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6432281>)

Tabela 1 - Componentes químicos encontrados no óleo essencial de camomila romana doTerra® por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Componente químico	% da área da substância	% de similaridade de acordo com a biblioteca NIST
Éster pentadecílico	21,66	87
Éster hexadecílico	19,94	87
3-Metil-2-ácido butenóico, Éster dodecílico	19,87	89
Ciclopentano, 1-etil-3-metil-, trans-	17,07	85
Etil 1-metilciclopropanocarboxilato	6,52	88
Ácido ciclobutanocarboxílico, 3-metilbut-2-eni	4,08	87
Biciclo[2.2.1]heptan-3-ona, 6,6-dimetil-2-m	0,94	85
Ácido ciclopropanocarboxílico, 3-metilbutil est	0,93	94
1,6-Ciclodecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-m	0,84	85
Ácido propanóico, 2-metil-, 3-metilbutil éster	0,78	96
1S-alfa-Pineno	0,69	91
Ácido propanóico, 2-metil-, hexil éster	0,43	85
Isoborneol	0,39	87
Ácido 2-propenóico, 2-metil-, 2-metilpropil éster	0,31	95
1S-alfa-Pineno	0,29	91
Hexano, 3-etil-2-metil-	0,29	85
Ciclopentano, nitro-	0,21	87
Ácido propanóico, 2-metil-, 2-metilpropil-este	0,19	94

Ciclopentano, nitro-	0,19	90
Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol, 2,3,3-trimetil-	0,19	87
1,5-Heptadieno, 3,4-dimethyl-	0,18	88
Alfa-Farneseno	0,18	89
Ácido 2-pentenóico	0,17	90
Biciclo[3.1.1]hept-2-eno-2-metanol, 6,6-dimet	0,16	89
Éter vinilciclohexil	0,15	91
Ácido 2-butenóico, 2-methyl-, (E)-	0,14	87
Santolina trieno	0,12	91
Ácido butanóico, 2-metil-, 2-metilpropil éster	0,11	91
Ácido ciclobutanocarboxílico, 2-pentil éster	0,11	88
2-hidroxi-2-metil-but-3-enil 2-metil-2 (Z) -bu	0,3	91
Ciclohexano, nitro-	0,3	90
Ácido 2-metilciclopropanocarboxílico	0,1	83
Triciclo[6.3.3.0]tetradec-4-eno,10,13-dioxo-	0,07	86
Aromadendreno	0,06	85
Ácido ciclobutanocarboxílico, éster ciclobutílico	0,05	87
Ácido propanóico, 2-metil-, 3-metilbutil éster	0,05	93
2-Penten-1-ol, acetato, (Z)-	0,05	82
Ciclohexano, 1-etenil-1-metil-2,4-bis (1-metilo	0,05	86
Ácido butírico, 2,2-dimetil-, vinil éster	0,05	91
Isobutil 3-hidroxi-2-metilenobutanoato	0,04	78
Ciclohexano, nitro-	0,04	91

Ciclobutanocarboxílico, hexil éster	0,04	86
Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(	0,03	82
N-(Trifluoroacetil)-N,O,O',O''-tetraquis(trimetil	0,03	82
Copaena	0,03	84
Ácido propanóico, 2-metil-, 2-metilpropil éster	0,03	95
2-Dodecanona	0,03	87
2,5-Ciclooctadien-1-ol	0,03	81
2-Propenamida	0,03	93
1-Hepteno, 2,6,6-trimetil-	0,03	80
Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletenol)-, (S	0,03	88
Ácido propanóico, hexil éster	0,03	89
Ácido butanóico, éster 2-metil-, 3-metilbutílico	0,03	93
Ácido butanóico, éster 2-metil-, 3-metilbutílico	0,03	91
3-Butoxi-1,1,1,7,7,7-hexametil-3,5,5-tris(trim	0,03	81
Oxirano, 2-etil-2-metil-	0,02	78
3-Hexen-1-ol	0,02	89
Benzeno, 1-metill-2-(1-metiletil)-	0,02	87
1-Propen-1-tiol	0,02	84
2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptametiltetrasiloxan-2'-iloxi	0,02	81
N-(Trifluoroacetil)-N,O,O',O''-tetraquis(trimetil	0,02	77
3-Etóxi-1,1,1,7,7,7-hexametil-3,5,5-tris(tri	0,02	76
Ciclopentano, 1-etil-3-metil-	0,02	85
Ciclopropano, 1-(2-metileno-3-butenil)-1-(1-m	0,02	80

Biciclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-metil-1-(1-metil	0,02	79
2,4,6-Trimetil-1-noneno	0,01	82
2,3,3-Trimetil-1-hexeno	0,01	77
Cis-3-Hexenil-.alfa.-metilbutirato	0,01	83
1,6-Heptadieno, 3,5-dimetil-	0,01	82
1-Pentanol, 3-metil-	0,01	87
Ácido butanóico, 2-metil-, etil ester	0,01	83
1-Butino, 3-metil-	0,01	77
Ácido 2-butenóico, 2-metil-, (E) -	0,01	86
1-Hexeno, 3,5-dimetil-	0,01	85
8-Nonan-2-ona	0,01	76
Nonano, 3,7-dimetil-	0,01	92
Nonano, 4-etil-5-metil-	0,01	84
1,5-Hexadieno, 2-metil-	0,01	86
1,3,6-Heptatrieno, 2,5,5-trimetil-	0,01	83
1-Hexanol, 2-etil-	0,01	79
Fluoroformato de sec-butil	0,01	80
Ciclopentano, nitro-	0,01	85
Dodecano, 1-cloro-	0,01	74
Ácido fenilacético, éster 3-metilbut-2-enílico	0,01	84
1,9-Decadiino	0,01	82
1,3,7-Octatrieno, 3,7-dimetil-	0,01	88
1,3,6,10-Dodecatetraeno, 3,7,11-trimetil-, (Z,E	0,01	80

Ciclohexano, (1-metiletil)-	0,01	83
Ciclohexanol, 2-metil-5-(1-methylethenil)-, acet	0,01	82
1,9-Decadiino	0,01	79
1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-metileno-8-(1-m	0,01	75
Ácido butanóico, 3-metil-, 1-etenil-1,5-dimetil-4-he	0,01	80
Hexano, 1-cloro-5-metil-	0,01	78
1,9-Decadiino	0,01	71
1,6-Heptadieno, 3-metil-	0,01	77
Propan-1-ona, 3-nitro-1-fenil-	0,01	68
Metil 4-metil-4-nitroso-2-trimetilsiloxi-pent	0,01	81
2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptametiltetrasiloxano-2'-y	0,01	78
Metil 4-metil-4-nitroso-2-trimetilsiloxi-pentanoato	0,01	78
1,4-Hexadieno, 3,3,5-trimetil-	0,01	78
1-Propenilaziridina	0,01	89
1-Trifluoroacetoxi-2-metilpentano	0,01	86
Ciclopenteno, 3-etilideno-1-metil-	0,01	83
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (2-metilpro	0,01	86
2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptametiltetrasiloxano-2'-	0,01	76
1,1,1,3,5,7,7,7-Octametil-3,5-bis(trimetilsilo	0,01	76
1,1,1,3,5,7,9,11,11,11-Decametil-5-(trimetil	0,01	75
1,1,1,3,5,7,7,7-Octametil-3,5-bis(trimetilsiloxi)t	0,01	76

O cromatograma do óleo essencial de tangerina apresentou os compostos majoritários: Limoneno (64,21%) e Gama-terpineno (33,2%).

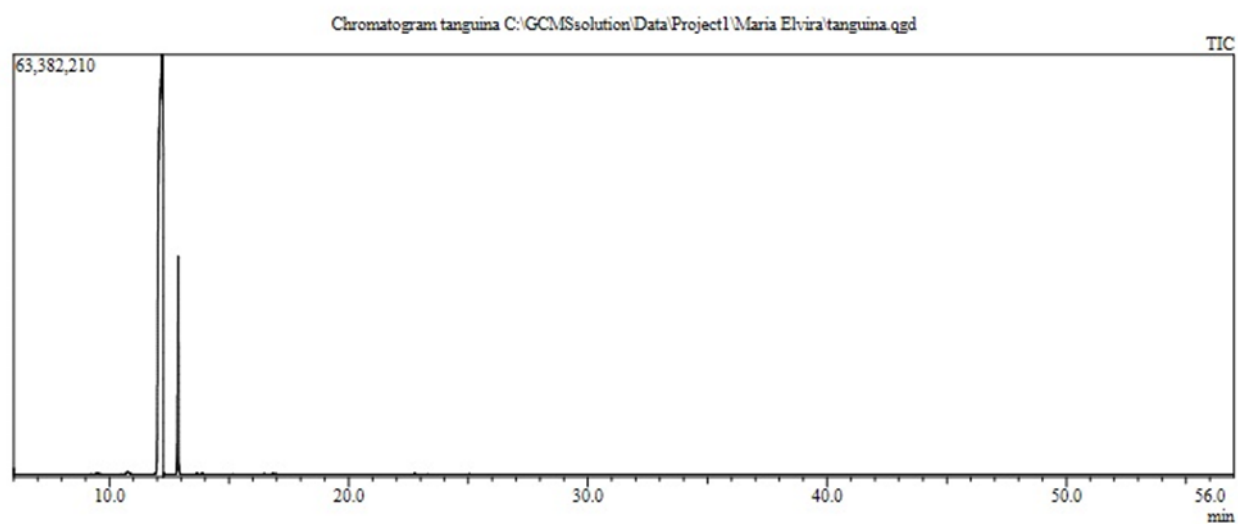
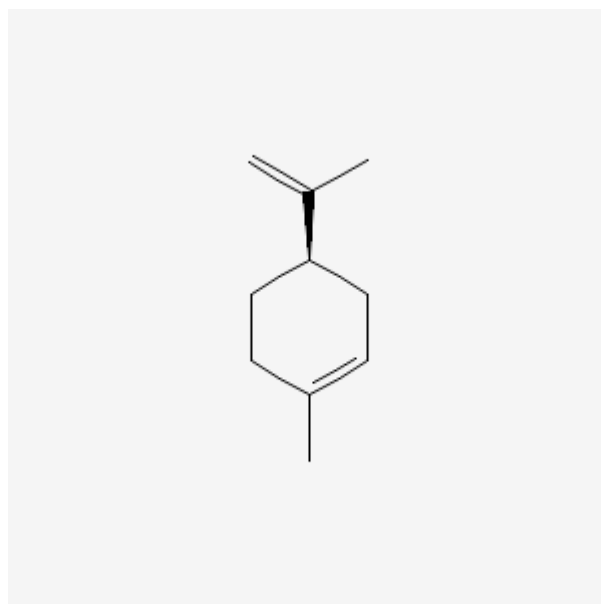


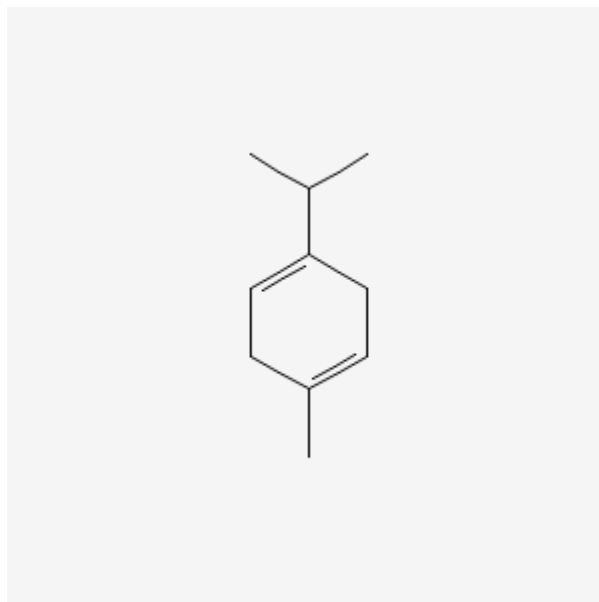
Figura 14 – Cromatograma do óleo essencial de tangerina

Figura 15 - Estrutura química do limoneno ($C_{10}H_{16}$)



Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440917>)

Figura 16 - Estrutura química do gamma-terpineno ($C_{10}H_{16}$)



Fonte: Recuperada do **PubChem** (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7461>)

Tabela 2 - Componentes químicos encontrados do óleo essencial de tangerina doTerra® por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Componente químico	% da área da substância	% de similaridade de acordo com a biblioteca NIST
Limoneno	64,21	90
Gamma-terpineno	33,2	95
Beta-mirceno	0,39	88
Biciclo[3.1.0]hexano, 4-metileno-1-(1-metila	0,37	88
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil-	0,24	90
P-menth-1-en-8-ol	0,23	91
Ácido benzóico, 2-(metilamino)-, metil éster	0,19	90
1,3,6-Heptatrieno, 2,5,5-trimetil-	0,17	90
1S-alfa-Pineno	0,16	93

3-Ciclohexen-1-ol, 4-metil-1-(1-metiletil)	0,1	88
Alfa-Farneseno	0,08	86
Decanal	0,07	92
1,9-Decadiino	0,03	80
Etil 6-metilpiridino-2-carboxilato	0,03	75
1,4-Metano-1H-Ciclopropa[d]piridazino, 4,4	0,03	82
1S-alfa-Pineno	0,03	93
Óxido de limoneno, trans-	0,03	83
3,4-Octadieno, 7-metil-	0,02	80
1,6-Octadieno, 3,7-dimetil-, (S)-	0,02	80
3-Ácido nitropropanóico	0,02	86
1,3,6-Heptatrieno, 5-metil-, (E)-	0,01	86
1-Metileno-2-vinilciclopentano	0,01	81
3-Penten-1-ol, (E)-	0,01	81
Ácido acético, mercapto-	0,01	92
3,5-Nonadien-7-in-2-ol, (E,E)-	0,01	80
1-Butanol, 2-metil-	0,01	88
Ciclopenteno, 3-etenil-	0,01	77
2,5-Furandiona, 3,4-dimetil-	0,01	77
2-Penteno, 4-metil-	0,01	88
1-Butanol, 2-metil-, (S)-	0,01	87
7-Oxabiciclo[2.2.1]hept-2-eno, 5-metileno-	0,01	77
4-Hidróxi-3-metilacetofenona	0,01	82

Metil 4-metil-4-nitroso-2-trimetilsiloxi-pen	0,01	82
2,7-Octadieno-1,6-diol, 2,6-dimetil-, (E)-	0,01	77
Aziridina, 1-vinil-	0,01	94
Etóxi(metóxi)metilsilano	0,01	87
2,5-Octadieno	0,01	72
2-Butino-1,4-diol	0,01	86
Etanona, 1-ciclopropil-2-(4-piridinil)-	0,01	76
Ciclopropano, 1-(2-metileno-3-butenil)-1-(1-metil	0,01	78
1,3,6-Heptatrieno, 2,5,5-trimetil-	0,01	75
3-Ciclopentil-1-propino	0,01	78
N-(3-Benzamidofenil)-3-(m-toluamido)benzam	0,01	71
3-Ácido nitropropanóico	0,01	81
Ácido acrílico, (5-ciclopropilidenepentil) éster	0,01	78
(SS)- or (RR)-4-metil-2,3-pentanodiol	0,01	91
Etanamina, N-etil-	0,01	91
(SS)- or (RR)-4-metil-2,3-pentanodiol	0,01	91
(SS)- or (RR)-4-metil-2,3-pentanodiol	0,01	89
DL-4,5-Octanodiol	0,01	88
N-(Trifluoroacetil)-N,O,O',O''-tetraquis(trimetil	0,01	78
Hidrato de amileno	0,01	92
3-Etóxi-1,1,1,7,7,7-hexametil-3,5,5-tris(trim	0,01	78
(SS)- or (RR)-2,3-hexanodiol	0,01	78
RS-2,3-hexanodiol	0,01	78

4.3 Avaliação da relação entre atividade ansiolítica dos óleos essenciais e a composição química

A atividade ansiolítica pode ser atribuída aos compostos majoritários presentes em cada óleo essencial. Dessa forma, a partir das análises das amostras dos óleos essenciais de camomila romana e de tangerina (item 2.5) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (item 2.6) foi possível identificar a composição química de cada um dos óleos, principalmente os compostos majoritários (item 4.2).

Os óleos essenciais e seus constituintes possuem diferentes atividades farmacológicas, tais como: ansiolíticas, antinociceptivas e efeitos anticonvulsivantes (Wang e Heinbockel, 2018). Óleos essenciais populares com propriedades ansiolíticas incluem a camomila romana (*Anthemis nobilis*), sálvia (*Salvia sclarea*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) e rosa (*Rosa damascena*) (Wang e Heinbockel, 2018). Estes, interagem com o sistema gabaérgico para exercerem sua atividade farmacológica (Wang e Heinbockel, 2018).

Os óleos essenciais com ação ansiolítica geralmente são ricos em álcoois terpenoides, como linalol, geraniol e citrionelol, e o monoterpeno limoneno (ou citral). (Agatonovic-Kustrin et al., 2020). O limoneno é um constituinte químico de vários óleos essenciais bioativos (Wang e Heinbockel, 2018). Um estudo usando um modelo de labirinto elevado para avaliação da ansiedade em camundongos relatou que o limoneno possui efeitos semelhantes aos fármacos ansiolíticos, como por exemplo o diazepam (Lima et al., 2018).

As propriedades ansiolíticas dos óleos essenciais das espécies do gênero *Citrus*, como a *Citrus auranticum* L. também foram demonstradas em camundongos (Lima et al., 2018). Outro estudo, pré-clínico e feito em ratos, avaliou o efeito ansiolítico do óleo essencial de bergamota (*Citrus bergamia*) utilizando os testes tarefa em campo aberto, tarefa de labirinto em cruz elevada, tarefa de natação forçada e também comparou com o diazepam. Os resultados mostraram que os efeitos são semelhantes, mas não maiores que do diazepam (Rombola et al., 2017).

Em relação ao constituinte gama-terpineno, também presente no óleo essencial de tangerina, é importante observar que tal composto também é um dos majoritários

no óleo essencial da espécie *Achillea umbellata*, a qual possui atividade ansiolítica, uma vez que, no teste claro-escuro feito com ratos, houve um aumento do tempo que o animal ficou na parte clara e o tempo no lado escuro diminuiu, de forma dose-dependente (Wojtunik-Kulesza et al., 2021).

A camomila romana é uma droga vegetal tradicional que tem efeitos leves e comprovada ação ansiolítica (Jia et al., 2021). Um estudo foi realizado em pacientes com intervenção coronária percutânea (ICP), para avaliar os efeitos na ansiedade, no sono e na pressão arterial. Foram usados os óleos essenciais de camomila romana, lavanda e néroli, inalados antes e após a ICP e os resultados mostraram que o grupo que foi tratado com a aromaterapia reduziu significativamente a ansiedade e melhorou a qualidade do sono (Cho, 2013).

O uso de práticas integrativas como a massagem e a massagem com aromaterapia foram avaliadas em um estudo com pacientes com câncer recebendo cuidados paliativos. Um grupo recebeu apenas massagem com óleo veicular e outro recebeu massagem com óleo veicular e óleo essencial de camomila romana. A segunda pareceu reduzir os níveis de ansiedade, mostrando que a adição do óleo essencial potencializou a massagem, o que melhorou os sintomas psicológicos e físicos (Wilkinson, 1999).

Um estudo feito em humanos, examinou se a terapia feita a longo prazo com a camomila romana prorrogou o tempo de recaída dos sintomas de ansiedade depois da recuperação de transtornos de ansiedade ao comparar com o placebo. Os resultados mostraram uma melhora significativa dos sintomas da ansiedade e melhor bem-estar psicológico (Mao et al., 2016).

A atividade biológica da camomila romana se dá devido aos seus flavonoides presentes, como por exemplo a apigenina. Esta, em estudos com camundongos, mostrou possuir afinidade com os receptores de benzodiazepínicos, mostrando assim sua atividade ansiolítica, sem produzir efeito sedativo e sem afetar o sistema locomotor dos animais (Al-Snafi, 2016)

Até o presente momento, não há estudos que correlacionam a ação ansiolítica com os compostos majoritários do óleo essencial de camomila romana: Éster pentadecílico, Éster hexadecílico, Éster dodecílico, Ciclopentano. No entanto, é importante observar que o sinergismo dos compostos – majoritários e minoritários -

presentes no óleo essencial pode ser responsável pela atividade ansiolítica observada no presente trabalho. Nossos resultados estão em consonância com os resultados apresentados por Hacke et al. (2020), que observaram que a ação sinérgica dos diferentes compostos presentes nos extratos e óleo essencial foi responsável pela atividade ansiolítica no *zebrafish*.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o óleo essencial de tangerina nas concentrações de 1mg/L, 5mg/L e 10mg/L e o óleo essencial de camomila romana nas concentrações de 5mg/L e 10mg/L podem ser alternativas promissoras no manejo da ansiedade e, possivelmente, a ação ansiolítica de ambos está associada à sinergia dos compostos químicos presentes, principalmente os compostos majoritários. Além disso, os óleos essenciais não causaram sedação nos peixes e não afetaram seu sistema locomotor, demonstrando a possível aplicabilidade no tratamento da ansiedade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agatonovic-Kustrin S, Kustrin E, Gegechkori V, Morton DW. **Anxiolytic Terpenoids and Aromatherapy for Anxiety and Depression**. Adv Exp Med Biol. 2020;(1260): 283-296.

Ali Esmail Al-Snafi. **Medical importance of anthemis nobilis (Chamaemelum Nobile) – A review**. Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology. Vol 6|Issue 2| 2016 |89-95.

Bandelow B, Michaelis S. **Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century**. Dialogues Clin Neurosci. 2015; (3):327-335.

Barbazuk W.B, Korf I., Kadavi C., Heyen J., Tate S., Wun E., Bedell J.A., McPherson J.D., Johnson S.L., 2000. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes**. Genome Res;10:1351–8.

Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., 2008. **Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery**. Bri. J. Pharmacol. 154, 1400-1413.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Cresce 46% procura por Práticas Integrativas Complementares no SUS**. Brasília, 2019. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45294-cresce-46-procura-por-praticas-integrativas-no-sus-2>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem**. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>>

Craske MG, Stein MB. **Anxiety**. Dez. 2016, 17;(10063):3048-3059.

Cho MY, Min ES, Hur MH, Lee MS. **Effects of aromatherapy on the anxiety, vital signs, and sleep quality of percutaneous coronary intervention patients in intensive care units**. Evid Based Complement Alternat Med. 2013:381381.

Costa, A. F. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gullbenkair. v. 3, 2002.

Gabinete do Ministro. **Portaria nº 702**, de 21 de março de 2018. Brasília, 1999. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt0702_22_03_2018.html

Galloni, L., de Freitas, L. R., & Vieira Gonzaga, R. . (2021). **Consumo de psicoativos ilícitos durante a pandemia de Covid-19**. *Revista Brasileira De Ciências Biomédicas*, 2(1), e0442021 – 1/8. <https://doi.org/10.46675/rbcbm.v2i1.44>

Gardiner, P. **Chamomile (Matricaria recutita, Anthemis nobilis)**. Page 1

Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>.

Gargano, A.C., Almeida Costa, C.A.R. **Essential oils from Citrus latifolia and Citrus reticulata reduce anxiety and prolong ether sleeping time in mice**. Tree and Forestry Science and Biotechnology. Global Science Books, 2008.

Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, Â.L., Schaefer, I.C., Bonan, C.D., Lara, D.R., 2011. **Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol**. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 480-486.

Gnatta, J. R.; Dornellas, E. V.; Silva, M. J. P. S. **O uso da aromaterapia no alívio da ansiedade**. In: *Acta Paul Enferm. São Paulo*, 24(2):257-63, 2011.

Golan, D.E., Tashjian, A.H., Armstrong, E.J., Armstrong, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

Goularte, J.F, Serafim, S.D., Colombo, R., Hogg, B., Caldieraro, M.A., Rosa, A. R.. **COVID-19 and mental health in Brazil: Psychiatric symptoms in the general population**, *Journal of Psychiatric Research*, 2021; (132): 32-37.

Jia Y, Zou J, Wang Y, Zhang X, Shi Y, Liang Y, Guo D, Yang M. **Action mechanism of Roman chamomile in the treatment of anxiety disorder based on network pharmacology**. *J Food Biochem*. 2021; (1):13547.

Kysil EV, Meshalkina DA, Frick EE, Echevarria DJ, Rosemberg DB, Maximino C, Lima MG, Abreu MS, Giacomini AC, Barcellos LJG, Song C, Kalueff AV. **Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests**. *Zebrafish*. 2017;(3):197-208.

Lenhardtk, G.; Calvetti, P. U. **Quando a ansiedade vira doença?: Como tratar transtornos ansiosos sob a perspectiva cognitivo-comportamental.** *Aletheia*, Canoas, v. 50, n. 1-2, p. 111-122, dez. 2017.

Levin ED. **Avaliação do peixe-zebra da melhora cognitiva e ansiólise: preenchendo a lacuna entre os modelos in vitro e de roedores para o desenvolvimento de drogas.** *Rev Neurosci* . 2011; 22 (1): 75-84.

Lima, N.G.P.B., Sousa, D.P., Pimenta, F.C.F., Alves, M.F., Souza, F.S., Macedo, R.O., Cardoso, R.B., Moraes, L.C.S.L., Diniz, M.F.F.N., Almeida, R.N. (2018). **Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103 (2013) 450-454.

Lyra, C. S. de; Nakai, L. S.; Marques, A. P. **Eficácia da aromaterapia na redução de níveis de estresse e ansiedade em alunos de graduação da área da saúde: estudo preliminar.** 2010. 5 p. São Paulo, 2010.

Magno, L.D.P., Fontes, A., Gonçalves, B.M.N., & Gouveia, A. (2015). **Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (Danio rerio): Waterborne administration.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 135, 169–176.

Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5 (2014). (5ª ed.) Porto Alegre: Artmed.

Mansur, B.M., Santos, B.R., Dias, C.A.G.M., Pinheiro, M.S., Gouveia, A. (2015). **Effects of the number of subjects on the dark /light preference of zebrafish (Danio rerio).** *Zebrafish* V 00, N 00.

Mao, J. J., Xie, S. X., Keefe, J. R., Soeller, I., Li, Q. S., & Amsterdam, J. D. (2016). **Long-term chamomile (Matricaria chamomilla L.) treatment for generalized anxiety disorder: A randomized clinical trial.** *Phytomedicine*, 23(14), 1735–1742.

Mendes Hacke, A. C., Miyoshi, E., Marques, J. A., & Pereira, R. P. (2020). **Anxiolytic properties of Cymbopogon citratus (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (Danio rerio).** *Journal of Ethnopharmacology*.

Nardoni S, Pistelli L, Baronti I, Najjar B, Pisseri F, Bandeira Reidel RV, Papini R, Perrucci S, Mancianti F. **Traditional Mediterranean plants: characterization and**

use of an essential oils mixture to treat Malassezia otitis externa in atopic dogs. Nat Prod Res. 2017;(16):1891-1894.

Nielsen S. **Benzodiazepines.** Curr Top Behav Neurosci. 2017; (34): 141-159.

Olkkola KT, Ahonen J. **Midazolam and other benzodiazepines.** Handb Exp Pharmacol. 2008;(182):335-60.

Omidbaigi, R., Se fi dkon, F. e Kazemi, F. (2004), **Influência dos métodos de secagem sobre o teor de óleo essencial e composição da camomila romana.** Flavor Fragr. J., 19: 196-198.

Organização Mundial de Saúde-OMS. **Depression and other common mental disorders: global health estimates.** Geneva: WHO; 2017.

Otani, M. A. P., & Barros, N. F. de. (2011). **A Medicina Integrativa e a construção de um novo modelo na saúde.** Ciência & Saúde Coletiva, 16(3), 1801–1811.

Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. **Essential Oils and Health.** Yale J Biol Med. 2020; (2):291-305.

Rombola, L., Tridico, L., Scuteri, D., Sakurada, T., Sakurada, S., Mizoguchi, H., Avato, P., Corasaniti, M.T., Begetta, G., Morrone, L.A. (2017). **Bergamot essential oil attenuates anxiety-like behaviour in rats.** Molecules, 22, 614.

Saluja D, Jhanji R, Kaushal S, Verma B, Sharma N, Singh R, Agrawal S, Yadav M, Kumar A, Singh C, Singh A. **Importance of Zebrafish as an Efficient Research Model for the Screening of Novel Therapeutics in Neurological Disorders.** CNS Neurol Disord Drug Targets. 2021;(2):145-157.

Serra, E.L., Medalha, C.C., Mattioli, R., 1999. **Natural preference of zebrafish (Danio rerio) for a dark environment.** Braz. J. Med. Biol. Res. 32, 1551-1553.

Song Y, Seo S, Lamichhane S, Seo J, Hong JT, Cha HJ, Yun J. **Limonene has anti-anxiety activity via adenosine A2A receptor-mediated regulation of dopaminergic and GABAergic neuronal function in the striatum.** Phytomedicine. 2021.

Wang ZJ, Heinbockel T. **Essential Oils and Their Constituents Targeting the GABAergic System and Sodium Channels as Treatment of Neurological Diseases.** Molecules. 2018 May 2;23(5):1061.

Wilkinson S, Aldridge J, Salmon I, Cain E, Wilson B. **An evaluation of aromatherapy massage in palliative care.** Palliat Med. 1999; (5):409-417.

Wojtunik-Kulesza, K., Rudkowska, M., Kasprzak-Drozd, K., Oniszcuk, A., Borowicz-Reutt, K. (2021). **Activity of selected group of monoterpenes in Alzheimer's disease symptoms in experimental model studies – A non-systematic review.** Int. J. Mole. Sci., 22, 7366.