



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DE  
*Melissa officinalis*, EM RATOS**

**Adefunmilayo Ebot Taiwo**

**BRASÍLIA-DF  
2007**

Adefunmilayo Ebot Taiwo

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DE  
*Melissa officinalis*, EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira.**

**BRASÍLIA-DF  
2007**

## **ORIENTADORA**

Prof. Dra. VÂNIA MARIA MORAES FERREIRA

Os resultados apresentados nesta Dissertação de Mestrado foram obtidos no Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a Deus por ter me ajudado a ter força de começar e terminar essa etapa de minha formação, apesar de todas as dificuldades.
- ✓ Ao Prof. Dr. João Batista de Souza, pela oportunidade nos dada em realizar nossas pesquisas no Laboratório de Cirurgia Experimental.
- ✓ Aos meus pais e família, principalmente à família Wright, que cuidou de mim, como se fosse a sua filha.
- ✓ A minha orientadora, Profa Vania Maria Moraes Ferreira. pela ajuda, atenção e à Profa. Marília Barros que me forçaram a atingir e ultrapassar todos os desafios do Mestrado.
- ✓ Aos colegas Robson, Halian, João, Flávia, Cris, Greice e Pollyana que muito contribuíram, auxiliando com os meus experimentos.
- ✓ Ao Centroflora (Botucatu) por terem providenciado a *Melissa officinalis*; e à Profa. Dâmaris pelo preparo e fornecimento do extrato usado nesta pesquisa.

*Everything that has a beginning surely has an end, no matter how tough things may appear or how rough the road may be, never give up. Just look up to God and believe in yourself that you can make it. All thanks to Almighty God who saw me through all odds in this foreign land of Brazil.*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1. Plantas medicinais.....	01
1.2. Melissa officinalis.....	04
1.3. Ansiedade e Depressão.....	07
1.4 Modelos experimentais.....	13
1.4.1. Labirinto em cruz elevado.....	14
1.4.2. Nado forçado.....	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
3.1. Animais.....	18
3.2. Preparação dos extratos de Melissa.....	18
3.3. Diluição dos extratos.....	19
3.4. Análises comportamentais.....	20
3.4.1. Atividade locomotora.....	24
3.4.2. Labirinto em cruz elevado.....	25
3.4.3. Nado forçado.....	27
3.5. Análise estatística.....	28
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
4.1. Tratamento agudo.....	29
4.1.1. Atividade locomotora .....	29
4.1.2. Labirinto em cruz elevado .....	30
4.1.3. Nado forçado.....	31

4.2. Tratamento subcrônico.....	32
4.2.1. Atividade locomotora .....	32
4.2.2. Labirinto em cruz elevado .....	33
4.2.3. Nado forçado.....	35
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>57</b>

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Eu, **Adefunmilayo Ebot Taiwo**, RG V401328-I, CIC 739.413.441-53, declaro, para os devidos fins e sob penas da lei, que esta Dissertação de Mestrado intitulada ***Alterações comportamentais decorrentes da administração de Melissa officinalis, em ratos***, é de minha única e exclusiva autoria, estando a Universidade de Brasília autorizada a divulgá-la, mantendo cópia em biblioteca, sem ressarcimento dos direitos autorais, por se tratar de exigência para certificação em Ciências da Saúde.

*TAIWO, Adefunmilayo Ebot.*

*Alterações comportamentais decorrentes da administração de Melissa officinalis, em ratos. Brasília-DF, 2007. 70 f. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.*

Orientadora: Profa. Dra.Vania Maria Moraes Ferreira

Defesa: 16.03.2007

[Ansiedade] [Depressão] [Locomoção] [*Melissa officinalis*] [Ratos]

## LISTA DAS FIGURAS E GRÁFICOS

<b>Figura 1</b> – <i>Melissa officinalis</i> .....	04
<b>Figura 2</b> – Tratamento agudo da melissa.....	21
<b>Figura 3</b> – Tratamento subcrônico da melissa.....	23
<b>Figura 4</b> – Arena de atividade locomotora.....	24
<b>Figura 5</b> – Labirinto em cruz elevado.....	26
<b>Figura 6</b> – Nado forçado.....	28
<b>Gráfico 1</b> – Tratamento agudo – locomoção.....	29
<b>Gráfico 2</b> – Tratamento agudo - ansiedade.....	30
<b>Gráfico 3</b> – Tratamento agudo – depressão.....	31
<b>Gráfico 4</b> – Tratamento subcrônico – locomoção.....	32
<b>Gráfico 5</b> – Tratamento subcrônico - ansiedade.....	34
<b>Gráfico 6</b> – Tratamento subcrônico - depressão.....	35

## RESUMO

A *Melissa officinalis* tem despertado interesse de alguns pesquisadores nos últimos anos devido a algumas particularidades terapêuticas, em especial às relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes doses do extrato dessa planta no comportamento de ratos adultos, machos e fêmeas. Os efeitos da administração oral, por gavagem, do extrato alcoólico de *Melissa officinalis* sobre o comportamento de ratos, após o tratamento agudo ou subcrônico (10 dias), foram avaliados no teste da atividade locomotora (ambulação), teste do Labirinto em cruz elevado (ansiedade) e teste do nado forçado (depressão). Para o tratamento agudo foram usados 50 ratos machos e 50 ratos fêmeas, que foram subdivididos em 5 subgrupos de 10 animais, para receberem: 1) o diluente do extrato (animais controles), 2) diferentes doses do extrato (30, 100 ou 300 mg/kg) por via oral, 3) controle positivo (1 mg/kg de diazepam ou 10 mg/kg de fluoxetina, conforme o teste). Para o tratamento subcrônico (10 dias de tratamento), foram utilizados 50 ratos machos, que foram administrados, diariamente, as mesmas doses mencionadas anteriormente. As fêmeas, por sua vez, foram administradas as doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg. Os testes foram realizados uma hora após o último dia de administração. Para a avaliação experimental, os animais foram levados cobertos do Biotério Setorial da Faculdade de Ciências da Saúde/Faculdade de Medicina para o Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina, e foram mantidos na sala por um período de 1 hora para habituação ao ambiente do teste, onde esses foram realizados 1 hora após a administração dos extratos. Os resultados obtidos não mostraram nenhuma alteração comportamental quando o

extrato de *Melissa officinalis* foi administrado agudamente. No entanto, quando administrado subcronicamente por 10 dias, o extrato modificou o comportamento dos animais, que demonstraram uma resposta sugestiva de atividade ansiolítica, tendo em vista que os animais avaliados no teste do LCE aumentaram a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, sem que fosse alterada a frequência de entradas dos animais nos braços fechados daquele Labirinto. Além disso, o extrato também favoreceu a redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sem que fossem observadas quaisquer alterações no número de ambulações avaliado nesses mesmos animais. Diante dos resultados mencionados, esse estudo reforça outros dados experimentais, mostrando que o extrato de *Melissa officinalis* pode se constituir em uma boa alternativa terapêutica medicinal para o tratamento de algumas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão.

## ABSTRACT

In recent past, the plant *Melissa officinalis* has received much attention from researchers due to its peculiar therapeutic benefits particularly in relation to the Central Nervous System (CNS). The aim of this work was thus to evaluate the effect of different doses of an alcoholic extract of *Melissa officinalis* on the behavior of adult male and female Wistar rats. The effects of oral administrations, by gavage, of the alcoholic extract of *Melissa officinalis* on the rats' behavior after an acute and subchronic (ten days) treatment were evaluated using the Open field (locomotion), Elevated plus-maze (anxiety) and Forced swimming (depression) tests. For acute treatment, one hundred rats were used (50 male and 50 females); divided into subgroups of 10 animals per treatment (control solution, 30, 100, 300 mg/kg of extract and 1 mg/kg of diazepam or 10 mg/kg of fluoxetine as positive controls, by oral route. During the subchronic treatment, 50 male rats were used; different doses of the extract or control solution or the positive controls were administered daily for ten days, and on the tenth day animals were tested. On the other hand, female rats received doses of 10, 30, 100 or 300 mg/kg of extract or controls. The tests were carried out one hour after administration of the various treatments on the tenth day. For the experimental procedures, animal were covered and carried from the Animal Facility of Healthy Sciences Faculty/Faculty of Medicine to the Experimental Surgery Laboratory of the Faculty of Medicine. Animals were left in their cages and maintained in the experimental room for at least one hour before beginning the administration of the various treatments, in order to be habituated to the experimental environment. Results obtained after acute administration of the extract indicated that the rats' behavior was not altered.

However, subchronic administration of the extract for 10 days modified the animals' behavior, suggestive of an anxiolytic effect. This was indicated by an increase in the frequency of entries and the time spent in the open arms without a corresponding change in the frequency of enclosed arm entries in the Elevated plus maze. In addition, the extract also reduced immobility time in the forced swimming test, without changing locomotion in the Open field test. Despite the results mentioned above, this study requires further experimental data demonstrating that extracts of *Melissa officinalis* can be a good therapeutic or medicinal alternative for the treatment of certain behavioral conditions related to anxiety and depression.

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais, segundo relata os testemunhos históricos pertencentes a diferentes civilizações e culturas, é quase tão antiga quanto a própria humanidade (Corrêa Júnior et al., 1991). Até cerca de 2.000 anos a.C., as plantas desempenhavam dois papéis fundamentais nas comunidades primitivas: o de complementos alimentares essenciais; e o místico/religioso/curativo, que ainda pode ser visto preservado em algumas comunidades indígenas (Di Stasi, 1996).

Um conhecimento acumulado empiricamente através de várias gerações e entre diversas etnias, hoje, é trazido para laboratórios que buscam evidências de sua aplicabilidade em terapêuticas (Di Stasi, 1996). Torna-se claro este interesse ao observarmos que grande parte dos recursos medicamentosos, utilizados em toda a história, provém do reino vegetal (Graça, 1990).

Até o aperfeiçoamento da síntese química, as plantas eram o principal recurso no tratamento das doenças das mais diversas origens. Os conhecimentos acumulados pela medicina popular, por exemplo, permitiram o desenvolvimento de medicamentos utilizados na clínica médica, como os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, entre outros. Com o avanço e a eficácia das novas drogas sintéticas, principalmente a partir da Segunda Grande Guerra, quando a indústria química descobriu e aperfeiçoou processos de produção sintética dos diversos

princípios ativos, anteriormente obtidos somente nas plantas, o consumo dos produtos naturais começou a ser mais reduzido (Berg, 1993; Ming, 1994).

Com passar dos anos, e o aparecimento de sérias reações adversas a produtos sintéticos, a população começou a redescobrir as plantas medicinais e procurar nelas a solução para esses problemas. Por serem produtos que se encontram disponíveis em qualquer centro comercial popular e em algumas farmácias, ou seja, de fácil acesso e custo acessível, intensificou-se o consumo (Berg, 1993).

Segundo uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial recorre à medicina tradicional para satisfazer suas necessidades de cuidados primários de saúde. Os fitoterápicos de utilização popular, mais freqüentemente utilizados, são derivados de 25.000 espécies de plantas, sendo que foram catalogadas mais de 365.000 delas. Desse total, somente cerca de 1.100 espécies já foram estudadas como fonte de compostos biologicamente ativos, e em sua grande maioria, espécies européias (Albagli, 2001). Muito há, ainda, para se conhecer da flora mundial. E esse conhecimento precisa ser coordenado e assentado sobre bases científicas seguras.

No que se refere ao Brasil, este é um país rico em uma diversidade de biomas, os quais incluem a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e a Caatinga. Na época da descoberta de nosso país, pouco se sabia sobre esses biomas. Nossos primeiros cientistas, os Jesuítas, foram quem escreveram os primeiros registros etnobotânicos das plantas medicinais brasileiras e seus usos pelas diferentes populações (Giorgetti et al., 2007)

Nosso país, atualmente, é possuidor de uma flora rica, composta de uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas e constitui-se o mais rico do mundo em espécies vegetais, e que muito pode contribuir para o avanço da medicina mundial. De toda a cobertura vegetal existente no planeta, cerca de 2/3 das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais, de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul. Somente o Brasil detém aproximadamente 60.000 espécies representando um total de 20% de todas as espécies da flora mundial, e supõe-se que existam mais de 10.000 espécies ainda não catalogadas na Floresta Amazônica (Albagli, 2001).

No Brasil, a inexistência de literatura tradicional alicerçou a medicina popular em informações verbais transmitidas pelos índios, europeus e negros, principais formadores da etnia brasileira, e na influência de outras populações imigrantes (Borrás, 2003). Entre as muitas plantas utilizadas popularmente, que tiveram suas origens junto aos povos indígenas, habitantes de nosso país, e que delas faziam uso, destacam-se a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha*), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e o guaraná (*Paullinia cupana*).

A utilização de outras plantas nativas das Américas difundiu-se devido à grande importância terapêutica a elas atribuída pela população, como é o caso do boldo (*Peumus boldus* Mol.), a macela (*Acchyroclines satureioides* D.C.), o quebra-pedra (*Phyllanthus nirurii* L. e *Phyllanthus urinaria* L.) (Borrás, 2003; Revilla, 2001). As plantas de origem européia, trazidas pelos colonizadores, também tiveram rápida difusão entre o povo brasileiro, como foi o caso da camomila (*Matricaria chamomilla* L.), da malva (*Malva sylvestris* L.) e da melissa (*Melissa officinalis* L.) (Borrás, 2003; Revilla, 2001).

## 1.2. *Melissa officinalis*

A *Melissa officinalis*, mais popularmente conhecida como erva-cidreira devido ao seu aroma de limão, tem existido por muitos anos (mais de 2000 anos) como uma planta medicina de grande importância (Koch-Heitzmann, 1988). Esta erva da família Labiatae é cultivada em inúmeros países, inclusive no Brasil, sendo comercializada principalmente na forma de um chá, preparada sozinha ou em combinação com outras espécies de ervas da mesma família, como por exemplo a *Valeriana officinalis* (Kennedy et al., 2006).

As folhas da espécie em questão são ricas em tanino, flavonóides e óleos essenciais e têm sido usadas na medicina popular na forma de infusão (Teske e Trentini, 1994) por suas propriedades antimicrobianas e anti-oxidantes (Mimica-Dukic et al., 2004).



**Figura 1** - *Melissa officinalis* (fontes:

[www.botany.wisc.edu](http://www.botany.wisc.edu) e [bellquel.bo.cnr.it](http://bellquel.bo.cnr.it))

Estudos têm mostrado que chá de *Melissa officinalis* acalma os nervos, alivia as cólicas menstruais, cólicas em bebês, além de ter propriedades antibacterianas, antivirais e acarminativas, uma diminuição de níveis elevados de ansiedade, estresse e distúrbios do sono, não acarretando efeitos colaterais significativos ou sintomas de toxicidade através de um largo espectro de doses (Coleta et al., 2001; Kennedy et al., 2004). Apesar de muitas pesquisas estarem sendo realizadas diretamente em humanos, muitas lacunas ainda encontram-se em aberto para o entendimento dos mecanismos de ação que justificam as respostas comportamentais decorrentes do uso da *Melissa officinalis*.

Em termos dos seus efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), descobertas recentes têm mostrado as propriedades da *Melissa officinalis* na modulação dos processos cognitivos e do humor (Akhondzadeh et al., 2003; Kennedy et al., 2002), por suas propriedades sedativas e calmantes, incluindo-se entre eles alterações dos movimentos espontâneos (Cerny e Schmid, 1999; Dressing et al., 1992; Soulimani et al., 1991; Wagner e Sprinkmeyer, 1973), além dos efeitos positivos sobre os déficits cognitivos observados na doença de Alzheimer (Perry et al., 1999). Outros estudos mostraram que os óleos voláteis de *Melissa officinalis* e os seus terpenóides isolados reduziram os movimentos espontâneos em camundongos (Wagner e Sprinkmeyer, 1973) e uma redução em outros parâmetros comportamentais após a administração de seu extrato hidroalcoólico (Soulimani et al., 1991).

O real mecanismo de ação envolvido com os efeitos acima citados, ainda tem muito a ser descoberto. No entanto, estas respostas terapêuticas geraram muitas pesquisas que demonstram que a *Melissa officinalis* exibe alguns efeitos

no SNC, mais propriamente no sistema colinérgico com ação nos receptores nicotínicos e muscarínicos (Wake et al., 2000). No caso dos receptores muscarínicos, o estudo demonstrou que seis partes diferentes da folha da planta promoveram ligações em proporções diferentes nos dois subtipos dos receptores colinérgicos, sendo que esta proporção de ligação foi maior no subtipo nicotínico, pelo fato de que nos tecidos do córtex occipital humano a concentração deste receptor é mais expressiva (Perry et al., 1996; Wake, 2000).

A despeito do progresso feito pela química orgânica sintética e a biotecnologia, as plantas são ainda uma fonte de obtenção indispensável de conhecimento de drogas e de material fresco para muitas preparações (Corrêa Júnior et al., 1991). Apesar de muitas pesquisas estarem sendo realizadas diretamente em humanos, muitas lacunas ainda encontram-se em aberto para o entendimento dos mecanismos de ação que justificam as respostas comportamentais decorrentes do uso da *Melissa officinalis*.

A nossa responsabilidade, como potenciais fornecedores de matéria-prima para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos, é enorme e passa, necessariamente, por várias mudanças. Nos estudos científicos das espécies com potenciais terapêuticos para a utilização clínica, em especial sobre as interferências do SNC, muito ainda tem-se a descobrir devido a diversidade de problemas comportamentais que merecem maior atenção quanto às suas terapias.

### **1.3. Ansiedade e Depressão**

A base biológica das desordens da ansiedade não é completamente conhecida. Todavia, há boa razão para considerar que os mesmos sistemas neuronais estejam envolvidos na geração dos fenômenos dos estados de medo fisiológico agudo e do estado de ansiedade patológica, ainda que as situações e condições que levam à ansiedade fisiológica e patológica sejam diferentes (Haefely, 1990).

A ansiedade, portanto, é um termo usado para descrever um estado emocional normal, associado aos eventos estressantes, ou então dificuldades psicológicas em condições patológicas. Quando a ansiedade é crônica, e não está claramente ligada a eventos bem-definidos, é geralmente considerada anormal e apropriada para intervenção psicológica ou psiquiátrica. Como uma condição clínica, a ansiedade é passível de análise biológica de bases psicológicas e bioquímicas (Sanger, 1991).

Sheehan (1982) propôs uma classificação da síndrome de ansiedade sugerindo que em sujeitos com ataques de pânico ou ataques com sintomas autonômicos similares, provavelmente haveria um erro de metabolismo inato, denominado de ansiedade endógena. Outras desordens de ansiedade, que são mais diretamente relacionadas a situações fóbicas, ou originadas de estímulos fóbicos, são classificadas como ansiedade exógena. Por outro lado, a existência de múltiplos tipos de desordens de ansiedade, cada qual com um padrão característico de resposta às drogas tem sido reconhecida (Fyer, 1987) e maiores avanços têm sido dados, recentemente, ao entendimento da neurobiologia das respostas ao medo (Fanselow, 1991; LeDoux, 1993).

O conhecimento atual das estruturas envolvidas na regulação da ansiedade baseia-se tanto em evidências clínicas quanto experimentais, obtidas em seres humanos e animais de laboratório. No que diz respeito ao medo e à ansiedade, a perspectiva evolutiva leva a pensar que tais emoções estão associadas a diferentes estratégias de defesa, que ocorrem em resposta a perigos que determinada espécie animal encontra, invariavelmente, em seu nicho ecológico (Graeff, 1999).

Com o tempo, novas estruturas foram incorporadas ao sistema límbico, que passaram a serem consideradas como parte do SNC que coordena o funcionamento das vísceras e as emoções. Foi dada uma conotação neuroquímica ao conceito de sistema límbico, ao destacar que o conjunto de estruturas nucleares que o constituem são ricas em neuropeptídeos, enquanto que estruturas adjacentes contêm monoaminas, como noradrenalina, dopamina e serotonina. Os neurônios monoaminérgicos projetam-se difusamente para quase todas as estruturas límbicas, o que sugere um papel regulador amplo dessas aminas sobre as funções do sistema límbico (Graeff, 1999).

Com o objetivo de tratar a ansiedade patológica, através do uso de diferentes alternativas farmacológicas que vão agir nas diversas estruturas do sistema límbico e neurotransmissores, os benzodiazepínicos destacam-se pela sua ampla margem de segurança, ainda que não sejam destituídos de efeitos colaterais ou de potencial de abuso. Sua atividade ansiolítica é alcançada com doses que não induzem depressão respiratória clinicamente significativa. O diazepam é o principal representante dessa classe (Stewart e Westra, 2002; Wecker e Catalano, 2006). Esse benzodiazepínico pelo fato de ser boa alternativa

terapêutica para o tratamento da ansiedade se constitui um excelente controle positivo na pesquisa básica para avaliar substâncias com prováveis propriedades ansiolíticas.

Os benzodiazepínicos exercem seus efeitos através de interações alostéricas com os receptores do ácido gama-amino-butírico do tipo A (GABA<sub>A</sub>), que são canais iônicos pentaméricos operados por ligante. A estimulação desses receptores pelo GABA leva ao influxo de cloreto, resultando em hiperpolarização das células pós-sinápticas. Esta hiperpolarização diminui a probabilidade de disparo da célula em resposta a um estímulo excitatório aferente, mediando, assim, os efeitos inibitórios do GABA em todo o SNC (Wecker e Catalano, 2006).

A depressão, por sua vez, é uma doença que se caracteriza por afetar o estado de humor de uma pessoa, deixando-a com um predomínio anormal de tristeza. Em seres humanos, a depressão pode ser normal ou patológica, dependente do grau ou nível de acontecimento. Na vida normal têm situações ou experiências que trazem flutuações em nosso afeto, mas em algumas pessoas, estas flutuações se tornam excessivas em termos de intensidade e/ou duração, que passam interferindo de forma significativa em seu cotidiano. Sintomas depressivos podem estar presentes em 13 a 20% da população em um dado momento, com pelo menos 2 a 3% desta podem ser seriamente prejudicada por um distúrbio afetivo (Guimarães, 2000).

Os distúrbios depressivos podem incluir a depressão maior, a distímia e tipos não especificados de depressão. A depressão maior caracteriza-se por um ou mais episódios depressivos, com pelo menos duas semanas de humor

deprimido ou perda de interesse na maior parte das atividades, acompanhados de ao menos quatro sintomas adicionais de depressão como sentimentos de desesperança, culpa, desvalia, desamparo, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio, e pensamentos recorrentes sobre a morte, com ou sem tentativas de suicídio (Guimarães, 2000).

Todas as pessoas, homens e mulheres, de qualquer faixa etária, podem ser atingidas por esse distúrbio, sendo as mulheres duas vezes mais afetadas que os homens, interferindo também cerca de 3 a 5% das crianças e dos adolescentes. A depressão também interfere negativamente no crescimento e desenvolvimento, afeta o desempenho escolar e na reação familiar, podendo levar o paciente inclusive ao suicídio. O critério para o diagnóstico da depressão em crianças e adolescentes são essencialmente os mesmos daqueles para adultos, entretanto a expressão de sintomas pode variar com o estágio de desenvolvimento. Se a terapia cognitiva não é disponível, os antidepressivos podem ser considerados (Bhatia e Bhatia, 2007).

Uma série de evidências experimentais sugere uma hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em pacientes com depressão. Essa característica, um dos achados mais consistentes da psiquiatria biológica segundo alguns, parece estar relacionada com a intensidade dos sintomas. Pacientes mais severos apresentam maior hiperatividade daquele eixo, enquanto a remissão dos sintomas depressivos, espontânea ou decorrente do uso de drogas antidepressivas ou eletrochoque, é geralmente acompanhada de normalização desse eixo (Guimarães, 2000).

Vários investigadores têm procurado localizar o componente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que estaria desregulado, Até o momento as evidências apontam para o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Neurônios produtores de CRH localizam-se em diversas regiões do SNC, entre as quais o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O CRH liberado por esses neurônios estimula a liberação do corticotrofina (ACTH) pela hipófise, a qual, por sua vez, estimula a secreção de glicocorticóides pela adrenal (Guimarães, 2000).

Pacientes deprimidos apresentam aumentos de volume tanto da hipófise quanto das adrenais, o que tem sido atribuído à uma hipersecreção de CRH. Além de estimular a secreção de ACTH, o CRH também atua como neurotransmissor em outros sistemas. Sua injeção intracerebroventricular produz alterações comportamentais como diminuição de apetite e libido, alterações psicomotoras e de sono e ansiedade, que lembram os sintomas observados em pacientes com depressão. Nesse aspecto, sugere-se que o CRH pode coordenar não apenas as respostas endócrinas, mas também as alterações comportamentais, autonômicas e comportamentais ao estresse (Guimarães, 2000).

Há várias alternativas terapêuticas para tratar a depressão. O lítio ainda é usado no tratamento de longa duração dos transtornos afetivos unipolares e também por sua eficácia no tratamento do transtorno afetivo bipolar e depressão resistente (Cipriani et al., 2006). Entretanto, vêm aumentando o consumo de inibidores de recaptção de serotonina, como a fluoxetina devido ao fato de também tratar a ansiedade de adultos e crianças (Nash e Hack, 2002)

A fluoxetina faz parte de um tratamento seguro para crianças e adolescentes com epilepsia e depressão, além de melhorar a memória e promover a neurogênese no hipocampo (Mowla et al., 2007; Quintana et al., 2007; Thome-Souza et al., 2007). Pelo fato de constituir uma boa alternativa terapêutica para o tratamento da depressão, acaba sendo bastante usado como controle positivo na pesquisa básica para avaliar substâncias com prováveis propriedades antidepressivas.

O limite de segurança mínimo que se deve ter para investigar os mecanismos de ação *in vivo* de compostos novos ou pouco conhecidos em humanos, restringe o número e tipos de estudos que podem ser realizados. Neste contexto, o uso de modelos animais torna-se fundamental, particularmente quando se demonstra uma analogia relevante entre o modelo e o homem. Através deles é possível realizar pesquisas celulares e moleculares, envolvendo neurotransmissores e receptores, que se constituem em ferramentas fundamentais para um melhor esclarecimento de mecanismos fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos, comportamentais e neurobiológicos envolvidos em várias patologias (Delgado et al., 2006; McBride e Li, 1998).

Sabendo-se que os mecanismos neurais das respostas às circunstâncias que induzem medo, provavelmente são similares em humanos e animais, modelos experimentais animais podem ter um bom valor preditivo das respostas nas desordens de ansiedade e depressão (Delgado et al., 2006; Handley, 1994).

#### **1.4. Modelos experimentais para avaliação comportamental**

Tem sido proposto por vários pesquisadores (Montgomery, 1955) que roedores são motivados a investigar objetos e lugares novos, mas que a novidade também induz medo, o que pode tender a suprimir a exploração ou produzir fuga ativa da situação nova. Drogas (ou outras manipulações) que reduzem o presumível mecanismo inibitório podem aumentar, claramente, os níveis de exploração, sem afetar as respostas à novidade (Gray, 1977). Além disso, em vista das grandes evidências de diferenças sexuais na ansiedade basal e na resposta a certas drogas anti-ansiedade (Blanchard et al., 1992), é importante que as manipulações experimentais sejam efetuadas com animais de ambos os sexos.

Em uma literatura recente “*What’s wrong with my mouse?*”, Crawley (2000) avaliou de forma minuciosa os modelos animais de ansiedade e depressão, o que tem sido discutido em detalhes em várias revisões recentes (Cryan e Holmes, 2005; Kalueff et al., 2007; Nestler et al., 2002;). Apesar das diversidades de opiniões sobre os modelos experimentais animais, eles são indispensáveis para as pesquisas envolvendo drogas psicotrópicas (Prut e Belzung, 2003; Wong e Licinio, 2004) e para testar as hipóteses neurobiológicas e encontrar os prováveis genes candidatos para os distúrbios humanos (Clement et al., 2002; Geyer e Markou, 2002).

Modelos tradicionais de ansiedade incluem paradigmas baseados em explorações, como campo aberto, labirinto em Y, teste de interação social, caixa claro-escuro e labirinto em cruz elevado (Crawley e Goodwin, 1980; Kalueff et al., 2007; Mallo et al., 2007; Marriott e Spencer, 1965; Nolan e Parkes, 1973), e entre

os modelos experimentais de depressão, destacam-se o teste da suspensão da cauda e o teste do nado forçado (Kalueff et al., 2007; Mallo et al., 2007). Todos os exemplos citados são usados com frequência, pela rapidez do uso e não requererem equipamentos complexos e caros.

#### 1.4.1. **Labirinto em cruz elevado**

Sua validação comportamental para ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos (Lister, 1987), foi feita a partir dos trabalhos pioneiros de Montgomery (1955) e de Handley e Mithani (1984). Este modelo experimental é muito utilizado, não somente para o estudo de drogas ansiolíticas e/ou ansiogênicas, mas também para o estudo dos mecanismos neurobiológicos da ansiedade (Lopes-da-Silva et al., 1996; Pellow e File, 1986).

O LCE é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Montgomery, 1955), pois quando ratos são forçados a permanecerem nos braços abertos do labirinto, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow et al., 1985) e como uma consequência, permanecem um tempo maior nos braços fechados. A proporção da exploração total nos braços abertos determina uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas percentagens de tempo e de entradas nos braços abertos é considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

Em uma série de estudos, Treit et al. (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” é a falta das paredes altas dos ramos

abertos, que impediria a tigmotaxia. Morrison e Stephenson (1970) relataram que drogas que diminuem o medo ou a ansiedade, como, por exemplo, clordiazepóxido, diazepam e pentobarbital, podem aumentar a frequência e a duração de entradas nos braços abertos de um labirinto em Y, ao contrário de outras drogas como anfetamina, nicotina, imipramina, atropina e clorpromazina.

A avaliação do comportamento de animais no LCE está sujeita a variações decorrentes do próprio organismo em estudo, ou do procedimento empregado (Rodgers e Cole, 1993). Assim, manipulações das condições de criação dos animais, ou fatores sexuais e ontogenéticos, podem interferir com as respostas comportamentais em relação às drogas sob investigação. Foi observado que ratos mantidos em isolamento social pós-desmame por 30 dias, apresentaram diferenças comportamentais quando submetidos ao LCE aos 2 meses de idade, em comparação com ratos criados em grupo (Lopes-da-Silva et al., 1996).

#### **1.4.2. Teste do nado forçado**

Esse teste é usado para reproduzir aspectos relevantes da depressão humana nas espécies de roedores. Animais que mostram níveis elevados de imobilidade nesse teste assumem um estado patológico de sujeitos deprimidos, o que pode ser explorado pela pesquisa pré-clínica da depressão, além de ser usado como um modelo muito utilizado para as avaliações dos antidepressivos (Alcaro et al., 2002; Petit-Demouliere et al., 2005).

O limite de segurança mínimo que se deve ter se investiga os mecanismos de ação *in vivo* de compostos novos ou pouco conhecidos em humanos, restringem o número e tipos de estudos que podem ser realizados. Neste

contexto, o uso de modelos animais torna-se fundamental, particularmente quando se demonstra uma analogia relevante entre o modelo e o homem. Através deles é possível realizar pesquisas celulares e moleculares, envolvendo neurotransmissores e receptores, que se constituem em ferramentas fundamentais para um melhor esclarecimento de mecanismos fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos, comportamentais e neurobiológicos envolvidos em várias patologias (McBride e Li, 1998).

Embora alguns distúrbios sejam exclusivos de humanos, muitos modelos animais têm sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar os substratos neurais que subsidiam diferentes respostas comportamentais, incluindo as de natureza emotiva (Deutsch e Eisner, 1977; McBride e Li, 1998; Samson, 1986). Vários deles podem mimetizar diversas psicopatologias e estão disponíveis para estudar as funções normais e patológicas do SNC.

O presente plano de trabalho teve como foco central a investigação das possíveis alterações comportamentais de locomoção, ansiedade e depressão produzidas após administração de extratos de *Melissa officinalis*, fazendo uso de modelos experimentais clássicos em roedores, visto que, estudos prévios mostram a interferência do extrato em alguns desses comportamentos em humanos, tanto agudamente quanto diante do tratamento acima de quatro meses, sem que os efeitos tivessem sido avaliados, previamente, na pesquisa básica.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Fazer uma análise de diversas respostas comportamentais decorrentes da administração aguda e crônica de extratos de *Melissa officinalis* em roedores.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar o impacto do consumo de *Melissa officinalis* sobre as respostas comportamentais de locomoção, ansiedade, depressão.
- Verificar se o fator sexo pode interferir nas avaliações comportamentais, mencionadas anteriormente, decorrentes da administração de *Melissa officinalis*.
- Estabelecer o efeito de uma administração aguda e subcrônica de extratos de *Melissa officinalis* sobre os parâmetros comportamentais acima avaliados.
- Observar se algumas reações observadas em humanos, diante do uso crônico dos extratos, também estavam evidentes nos animais aqui avaliados.

### 3. METODOLOGIA

---

#### 3.1. Animais experimentais

Ratos Wistar (n=210), machos (n=100) e fêmeas (n=110) adultos, pesando entre 250-300 g, provenientes do Biotério Setorial da Faculdade de Ciências da Saúde / Faculdade de Medicina foram empregados como sujeitos experimentais. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. As normas estabelecidas pelo Alojamento de Animais Experimentais da FM/FS-UnB, seguiam as normas dos Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais da UnB e do Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Biologia, da UnB, cujo comprovante encontra-se no anexo dessa dissertação (página 57).

#### 3.2. Preparação dos extratos de *Melissa officinalis*

Folhas secas de *Melissa officinalis* foram obtidas pela Centroflora (Botucatu, Brasil), que foram separadas de seus caules e secas sob a luz solar. Após toda a água ter sido evaporada, elas foram moídas. Cerca de 300 mg de folhas secas moídas foram colocadas em um frasco com quantidade de etiletanol a 95%, em quantidade suficiente para cobri-las e mantidas nesse procedimento durante sete dias. O frasco com o material foi vedado para evitar a evaporação do álcool. Após uma semana, o material foi filtrado e transferido para um rota-vapor, sendo, em seguida, colocado para evaporar. Após todo o solvente ter sido evaporado, as soluções estoques foram armazenadas em um refrigerador (4°C).

### 3.3. Diluição do extrato

As concentrações de 10, 30, 100 ou 300 mg/mL dos extratos alcoólicos de *Melissa officinalis* foram preparadas com o auxílio das seguintes misturas de solventes: 150 µL de tween 80, 150 µL de álcool e 150 µL de DMSO, totalizando 450 µL de solução. O extrato foi misturado com a solução de solventes na proporção de 1:1. A seguir, foi adicionada salina (0,9% NaCl) lentamente até completar o volume de 4 mL, sendo que a mistura era realizada de forma vigorosa para conseguir a maior homogeneização possível da preparação e evitar os precipitados.

A solução foi administrada nas doses de 10, 30, 100 ou 300 mg/kg, conforme o sexo ou tipo de administração (aguda ou subcrônica). Esta correlação de preparação do extrato foi baseada no princípio de que 1 mL do extrato foi dado para cada 1 kg do animal. Todos os tratamentos foram feitos por via oral, através do procedimento de gavagem, para garantir que o animal receberia a dose total administrada em que houvesse perda e reproduzir, ao máximo, a forma de administração oral usada em humanos para avaliar esse tipo de extrato nas pesquisas clínicas.

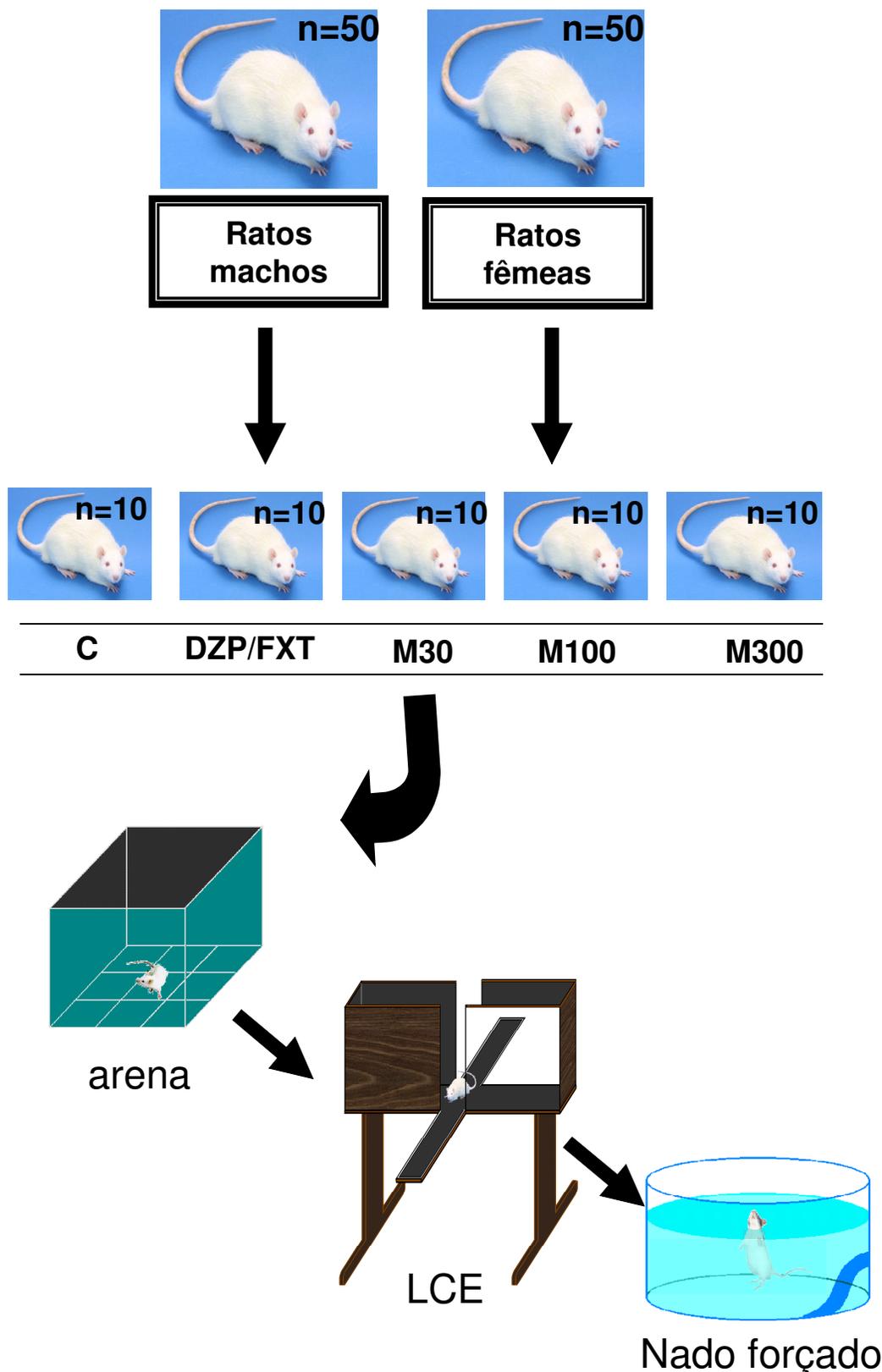
A maior dose usada (300 mg/Kg) foi baseada em estudos prévios realizados por Kennedy et al. (2002, 2004), enquanto as demais foram baseadas em estudos pilotos realizados no CIEX.

### 3.4. Análises Comportamentais

O procedimento experimental foi dividido em duas fases. A primeira (Fase 1) consistiu em testar um grupo de animais após um tratamento agudo com extrato de *Melissa officinalis*. A Fase 2, por sua vez, consistiu em testar um outro grupo de animais, após 10 dias (tratamento subcrônico) de uma administração diária do mesmo composto.

Na primeira fase, os animais (n=50 machos e 50 fêmeas) foram agrupados, randomicamente, por sexo, em cinco grupos experimentais (n=10/tratamento), a saber: 1) controle – onde foi administrado o diluente do extrato; 2) controle positivo (1 mg/kg de diazepam ou 10 mg/kg de fluoxetina, conforme o teste) 3) M30 – foi administrada a dose de 30 mg/kg de *Melissa officinalis*; 4) M100 – dose de 100 mg/kg do mesmo composto; 5) M300 – dose de 300 mg/kg do mesmo composto.

## TRATAMENTO AGUDO

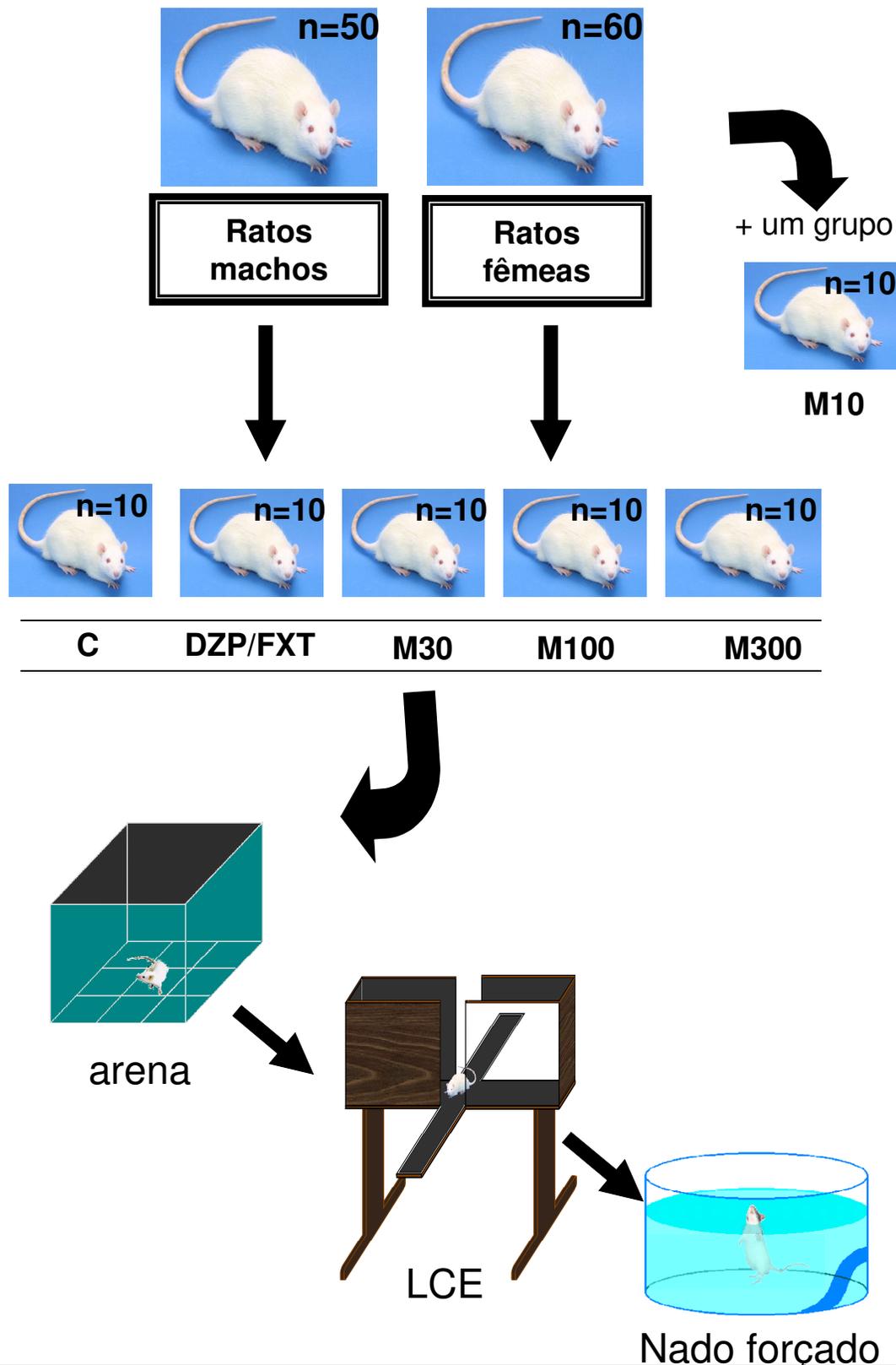


**Figura 2** – Esquema da seqüência do **tratamento agudo** de *Melissa officinalis*. Cada animal foi testado 5 min em cada teste C=controle, DZP/FXT= 1 mg/kg de diazepam ou 10 mg/kg de fluoxetina, M30= Melissa 30 mg/kg, M100= Melissa 100 mg/kg, M300= Melissa 300 mg/kg.

Na segunda fase foi testado um segundo grupo de animais (n=50 machos e 60 fêmeas) agrupados, randomicamente, por sexo, nos seguintes grupos experimentais (n=10/tratamento): 1) controle – onde foi administrado o diluente do extrato; 2) controle positivo (1 mg/kg de diazepam ou 10 mg/kg de fluoxetina, conforme o teste); 3) M30 – foi administrada a dose de 30 mg/kg de *Melissa officinalis*; 4) M100 – foi administrada a dose de 100 mg/kg do mesmo composto; 5) M300 – foi administrada a dose de 300 mg/kg do mesmo composto. Para os ratos fêmeas, foi realizado mais o grupo M10, no qual foi administrado a dose de 10 mg/kg do extrato em questão.

Nesta fase os animais foram administrados diariamente um dos tratamentos durante um período de 10 dias. Todas as administrações foram feitas por via oral através do procedimento de gavagem. Os comportamentos foram avaliados 1h após a administração dos extratos ou diluente dos extratos, de acordo com a seguinte seqüência de testes:

## TRATAMENTO SUBCRÔNICO

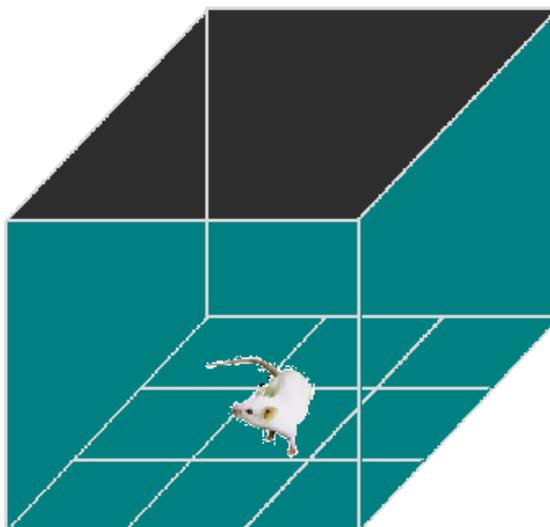


**Figura 3** – Esquema da seqüência do **tratamento subcrônico** de *Melissa officinalis*. Cada animal foi testado 5 min em cada teste C=controle, DZP/FXT= 1 mg/kg de diazepam ou 10 mg/kg de fluoxetina, M10= Melissa 10 mg/kg, M30= Melissa 30 mg/kg, M100= Melissa 100 mg/kg, M300= Melissa 300 mg/kg.

### 3.4.1. Atividade locomotora espontânea

**Fundamento:** A avaliação de roedores em uma arena ou campo aberto é um procedimento muito utilizado por vários pesquisadores com a finalidade de se observar a atividade locomotora desses animais. Em uma primeira instância, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, poderão reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês “freezing”), que é um comportamento bem típico, que muitas vezes os animais usam como uma forma de diminuir as detecções visuais e auditivas por parte dos predadores. No entanto, em uma segunda instância, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra.

**Aparato:** Para este teste, será utilizada uma arena em madeira (60x60x35 cm), onde o chão será dividido em 9 quadrantes iguais de 20x20 cm.



**Figura 4 - Teste da atividade locomotora** – O interior da arena, demarcada com 9 divisões de igual dimensão para favorecer a contagem da atividade locomotora.

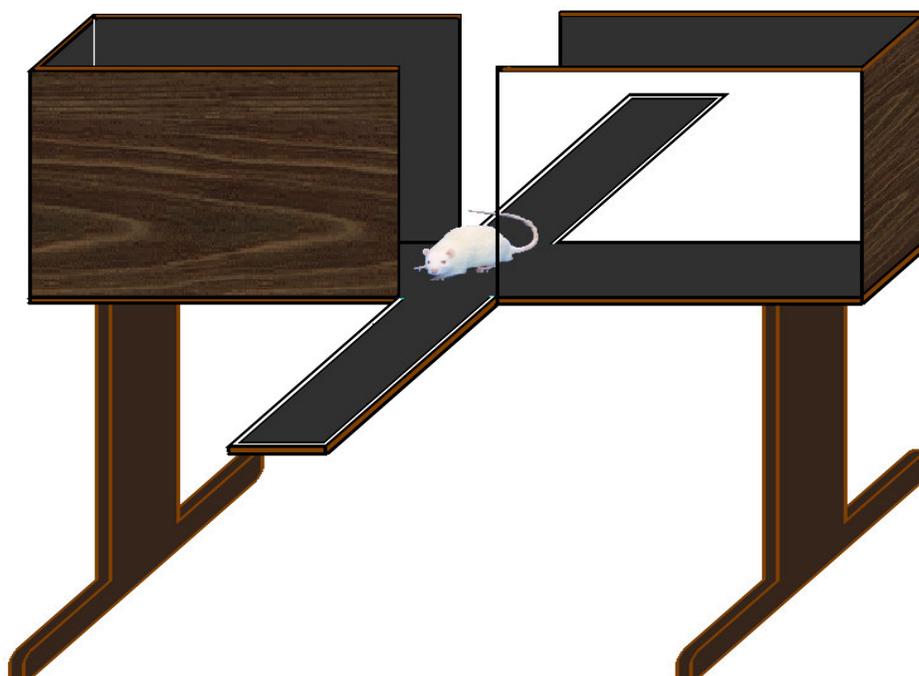
**Procedimentos experimentais:** Antes de começar os experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora para aclimatação e habituação ao ambiente do teste. Foi considerado como parâmetro de locomoção toda vez que o animal se deslocava de um quadrante para outro. Por outro lado, o referido comportamento não era considerado quando o animal colocava uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original. Cada animal foi testado individualmente por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais. Em seguida, os animais foram transferidos para o centro do LCE.

#### **3.4.2. Labirinto em cruz elevado (LCE).**

**Fundamento:** O LCE é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Montgomery, 1955), pois, quando ratos são forçados a permanecerem nos braços abertos do labirinto, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow et al., 1985) e como uma consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados. Como colocado, anteriormente, em uma série de estudos, Treit et al. (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” é a falta das paredes altas dos ramos abertos, que impede a tigmotaxia. A proporção da exploração total nos braços abertos determina uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas percentagens de tempo e

de entradas nos braços abertos é considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

**Aparato:** É um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (Handley e Mithani, 1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura, circundou os braços abertos, objetivando com isso impedir a queda dos animais do LCE.



**Figura 5 - Teste do labirinto em cruz elevado** – Dois braços abertos, opostos aos dois braços fechados, facilitam a avaliação comportamental de ansiedade.

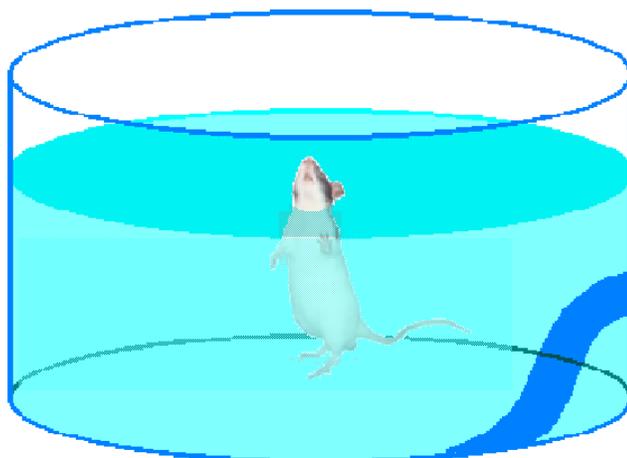
**Procedimentos experimentais:** Cada rato foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. Um observador fez as anotações do número de entradas

e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos/fechados. Após observar cada animal, o LCE foi limpo com álcool 10% (v/v). As percentagens de entradas nos braços abertos foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e ao tempo de exploração nesses braços, em relação ao tempo total do experimento. O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição (respectivamente) na proporção das entradas nos braços abertos, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental (Pellow et al., 1985).

### **3.4.3. Teste do nado forçado**

**Fundamento:** Um perfeito modelo experimental para uso com animais deve ser isomórfico às condições humanas e torna-se útil quando pode ser mostrado que tem uma analogia relevante, ou seja, quando ele revela alguns aspectos de um processo complexo através de hipóteses testadas em humanos (McBride e Li, 1998). Existem duas teorias que envolvem o uso desse teste: uma voltada para avaliação de estresse e outra envolvendo o estado de imobilidade dos animais, que poderia representar apatia, caracterizando o estado de depressão. As duas podem ser avaliadas através desse modelo, tendo em vista que as reações de fuga e luta são bem caracterizadas (Redrobe e Bourin, 1998; Martin et al., 2000)

**Aparato:** Os animais avaliados no teste do nado forçado (Porsolt et al., 1978) foram colocados em um cilindro Plexiglass, de 50 cm de diâmetro x 50 cm de altura, com 35 cm de água a uma temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 6 - Teste do nado forçado** – O nível de água no tanque deve estar em uma quantidade suficiente para não permitir que o animal encoste a cauda no fundo, não interferindo, portanto, na avaliação do comportamento depressivo.

**Procedimentos experimentais:** Os ratos exibiram dois tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que será observada nos primeiros dois minutos; e *imobilidade contínua* (permanecerá flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água), nos três últimos minutos. Os dois minutos iniciais (*fuga*) foram considerados para habituação ao teste.

### 3.5. Análises estatísticas

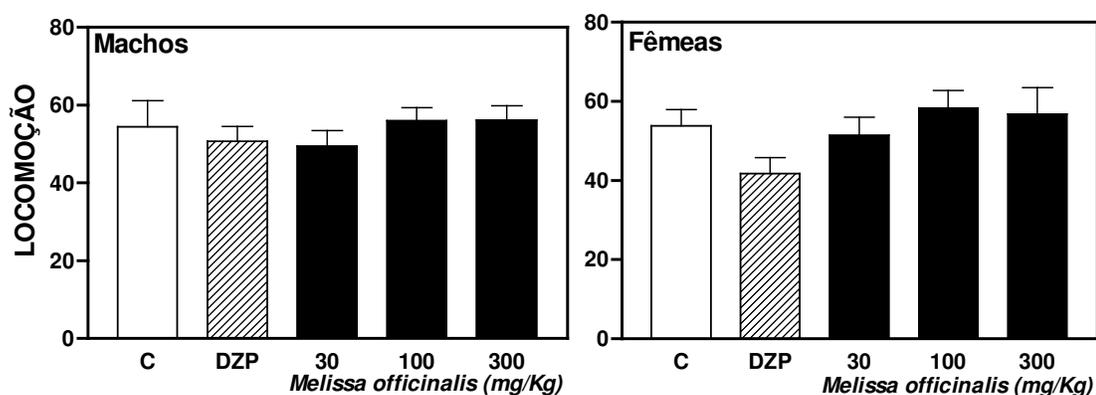
As comparações estatísticas foram realizadas através da Análise de Variância (ANOVA). Para as avaliações *post hoc* o teste utilizado foi o Newman Keuls. Os dados foram representados como a média  $\pm$  epm de 10 animais por tratamento. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TRATAMENTO AGUDO

#### 4.1.1. Atividade locomotora espontânea

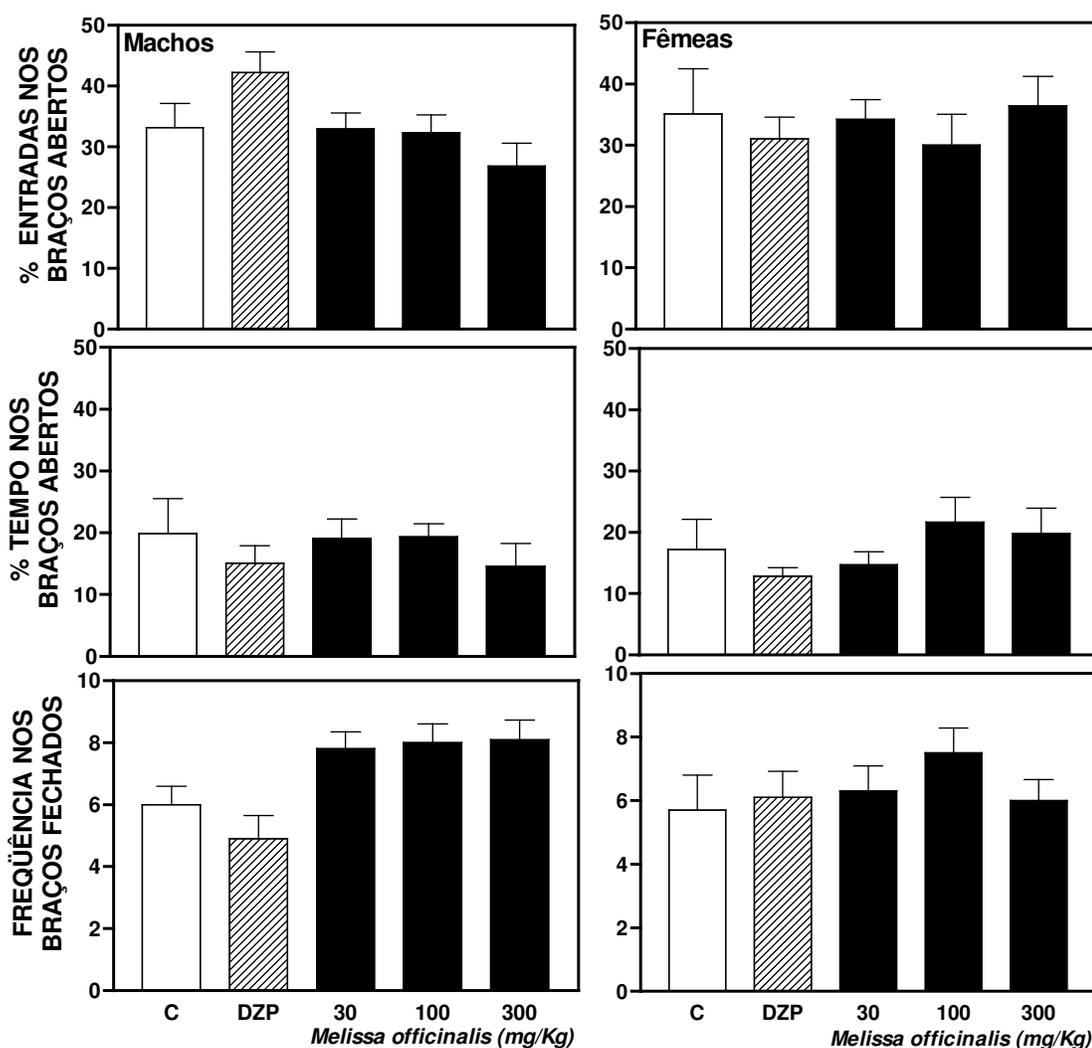
O tratamento agudo com o extrato de *Melissa officinalis*, não modificou o comportamento natural do animal. Quando avaliado o primeiro parâmetro, a atividade locomotora, a ANOVA não demonstrou nenhuma diferença estatística entre os grupos. Os animais tratados com diferentes doses do extrato (30, 100 e 300 mg/kg) não apresentaram nenhuma modificação em termos de ambulação, quando comparados aos animais controles. O controle positivo diazepam, na dose de 1 mg/kg, também não alterou as respostas comportamentais quando comparado aos controles tratados com os diluentes (gráfico 1).



**Gráfico 1** – Avaliação do número de ambulações de ratos adultos, machos (à esquerda) e fêmeas (à direita) no teste da atividade locomotora, cujos animais foram administrados **agudamente** por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e testados, após uma hora, no LCE. O diazepam foi administrado também por via oral, na dose de 1 mg/kg, em ambos os sexos, e os animais foram testados após uma hora. Cada barra representa a média ± e.p.m. de 10 animais. C=controle, DZP= diazepam.

#### 4.1.2. LCE

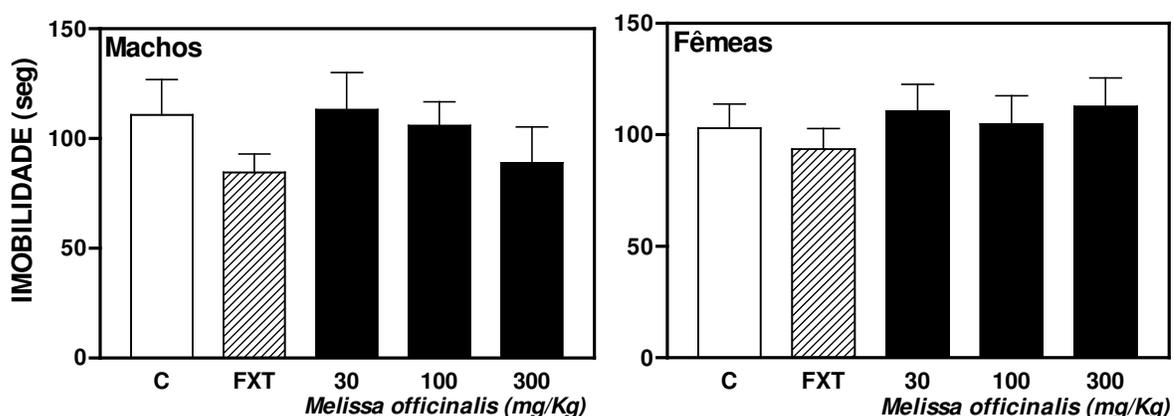
No teste de avaliação de ansiedade, a única diferença detectada através da ANOVA foi para os ratos machos, na porcentagem das entradas nos braços abertos, quando a dose de 300 mg/kg foi comparada ao controle positivo diazepam e na frequência de entradas nos braços fechados, quando todas as doses foram comparadas ao diazepam (gráfico 2).



**Gráfico 2** – Avaliação do **comportamento relacionado à ansiedade** de ratos adultos, machos (painel à esquerda) e fêmeas (painel à direita), administrados **agudamente** por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg para os machos e fêmeas e testados, após uma hora, no **LCE**. O diazepam foi administrado também por via oral, na dose de 1 mg/kg, em ambos os sexos, e os animais foram testados após uma hora. Cada barra representa a média  $\pm$  e.p.m. de 10 animais. C=controle, DZP= diazepam.

#### 4.1.3. Teste do nado forçado

Na avaliação do tempo de imobilidade, a exemplo das outras avaliações realizadas para locomoção e nível de ansiedade, a ANOVA também não detectou diferença entre os grupos, tanto para os machos quanto para as fêmeas. A fluoxetina, usada como controle positivo nas avaliações não apresentou diferença quando comparado ao controle (gráfico 3).

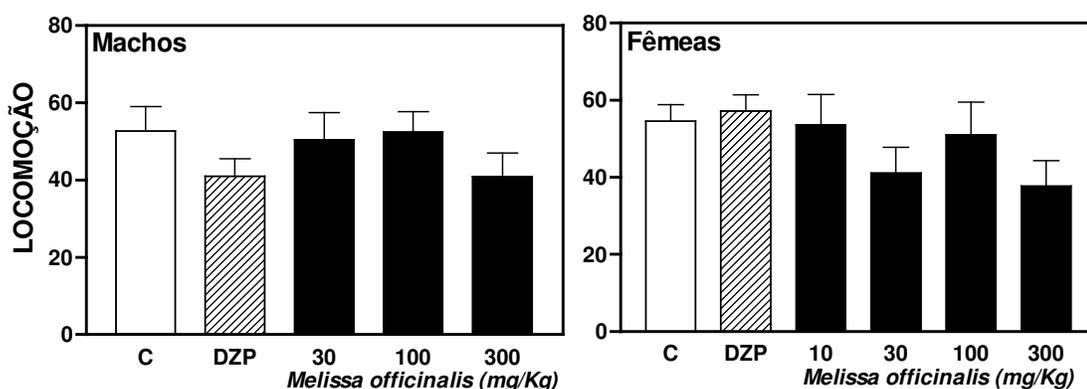


**Gráfico 3** – Avaliação do **tempo de imobilidade** de ratos adultos, machos (à esquerda) e fêmeas (à direita) no **teste do nado forçado**, que foram administrados **agudamente** por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e testados, após uma hora, no LCE. A fluoxetina foi administrada também por via oral, na dose de 10 mg/kg, em ambos os sexos, e os animais foram testados após uma hora. Cada barra representa a média±e.p.m. de 10 animais. C=controle, FXT= fluoxetina.

## 4.2. TRATAMENTO SUBCRÔNICO

### 4.2.1. Atividade locomotora

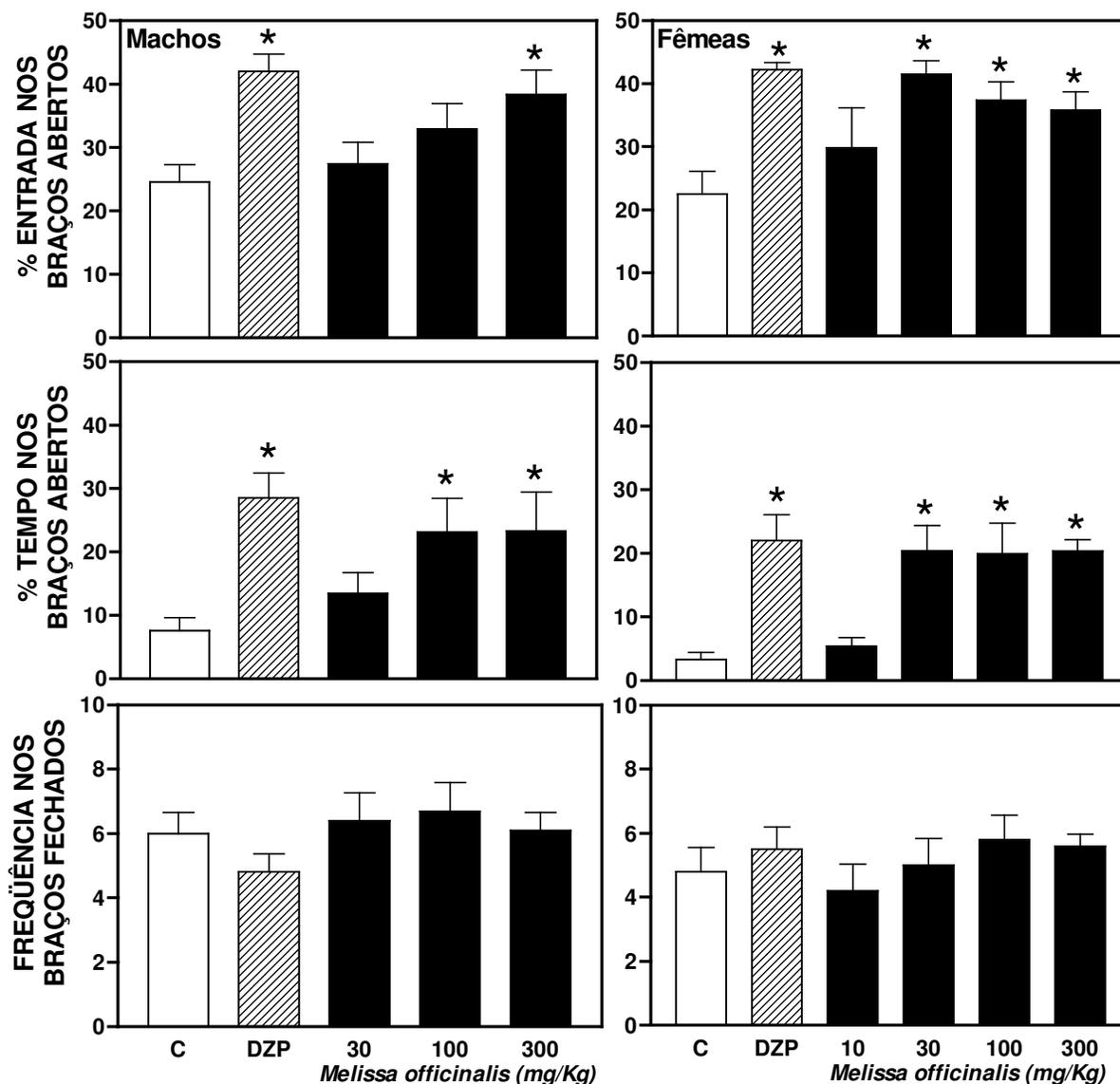
O tratamento subcrônico por um período de 10 dias com o extrato de *Melissa officinalis* não demonstrou nenhuma alteração na locomoção dos ratos machos e fêmeas, quando a comparação foi feita com os animais controles, administrados com o diluente do extrato ou com o diazepam (gráfico 4).



**Gráfico 4** – Avaliação do **número de ambulações** de ratos adultos, machos (à esquerda) e fêmeas (à direita), administrados durante 10 dias por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg para os machos e 10, 30, 100 e 300 mg/kg para as fêmeas e testados, após uma hora da última administração, no LCE. O diazepam foi administrado também por via oral, na dose de 1 mg/kg, em ambos os sexos e os animais foram testados após uma hora do último dia de tratamento. Cada barra representa a média ± e.p.m. de 10 animais (ANOVA, Teste de Newman Keuls). C=controle, DZP= diazepam.

#### 4.2.2. LCE

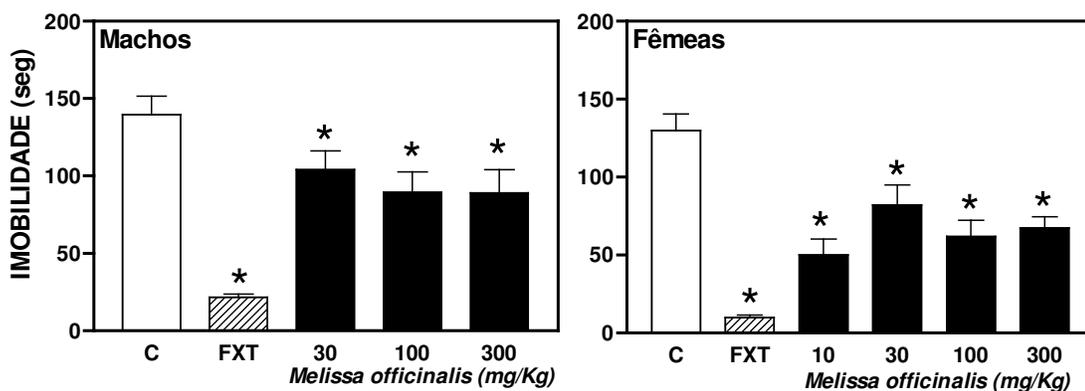
O extrato de *Melissa officinalis*, dado subcronicamente aos animais, induziu um efeito ansiolítico, que foi dependente da dose. Para os ratos machos, a dose de 300 mg/kg, dado por via oral, aumentou a porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos do LCE [F(4,49)= 4,081; p<0,05]. Para os ratos fêmeas, que foram mais sensíveis ao uso do extrato, observou-se um aumento na porcentagem das entradas nos braços abertos do LCE, o que foi demonstrado com as doses de 30 [F(5,59)= 5,322; p<0,01], 100 [F(5,59)= 4,160; p<0,05] e 300 mg/kg [F(5,59)= 3,713; p<0,05]. Para esses mesmos animais, também observou-se um aumento na porcentagem do tempo de permanência naqueles mesmos braços, com o uso das mesmas doses, ou seja, 30 [F(5,59)= 5,324; p<0,01], 100 [F(5,59)= 5,177; p<0,01] e 300 mg/kg [F(5,59)= 5,316; p<0,01]. O diazepam, controle positivo usado para as comparações da resposta ansiolítica decorrente do uso dos extratos de *Melissa officinalis*, quando dado subcronicamente no animais, induziu um claro efeito ansiolítico, demonstrado pelo aumento na porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos do LCE - machos [F(4,49)= 5,156; p<0,01]; fêmeas [F(5,59)= 5,522; p<0,01] e aumento na porcentagem do tempo de permanência dos animais naqueles mesmos braços – machos [F(4,49)= 4,774; p<0,05]; fêmeas [F(5,59)= 5,834; p<0,01]. A frequência de entradas nos braços fechados, parâmetro principal usado como indicativo para avaliar se as respostas produzidas pelos animais, diante do consumo dos extratos ou do diazepam, eram ou não sugestivas de efeito ansiolítico, não foi afetada por quaisquer dos tratamentos.



**Gráfico 5** – Avaliação do comportamento de ratos adultos, machos (painel à esquerda) e fêmeas (painel à direita), administrados durante 10 dias por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg para os machos e 10, 30, 100 e 300 mg/kg para as fêmeas e testados, após uma hora da última administração, no LCE. O diazepam foi administrado também por via oral, na dose de 1 mg/kg, em ambos os sexos e os animais foram testados após uma hora do último dia de tratamento. \* $p < 0,05$  representa diferença estatística em relação ao grupo controle administrado com os diluentes do extrato. Cada barra representa a média  $\pm$  e.p.m. de 10 animais (ANOVA, Teste de Newman Keuls). C=controle, DZP= diazepam.

### 4.2.3. Teste do nado forçado

Quando avaliado o tempo de imobilidade, o extrato de *Melissa officinalis* administrado durante 10 dias, foi eficaz em reduzir o tempo de imobilidade para os machos, nas doses de 30 [F(4,49)= 3,019;  $p < 0,05$ ], 100 [F(4,49)= 4,248;  $p < 0,05$ ] e 300 mg/kg [F(4,49)= 4,307;  $p < 0,05$ ] e também para as fêmeas nas doses de 10 [F(5,59)= 8,296;  $p < 0,001$ ], 30 [F(5,59)= 4,984;  $p < 0,001$ ], 100 [F(5,59)= 7,050;  $p < 0,001$ ] e 300 mg/kg [F(5,59)= 6,500;  $p < 0,001$ ]. A fluoxetina, usada como controle positivo nas avaliações, também demonstrou uma considerável redução no parâmetro avaliado tanto para os machos [F(4,49)= 10,01;  $p < 0,001$ ], quanto para as fêmeas [F(5,59)= 12,47;  $p < 0,001$ ].



**Gráfico 6** – Avaliação do **tempo de imobilidade** de ratos adultos, machos (à esquerda) e fêmeas (à direita) no **teste do nado forçado**, que foram administrados **subcronicamente** durante 10 dias por via oral, com extratos de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e testados, após uma hora da última administração, no LCE. A fluoxetina foi administrada também por via oral, na dose de 10 mg/kg, em ambos os sexos e os animais foram testados após uma hora do último dia de tratamento. Cada barra representa a média ± e.p.m. de 10 animais. C=controle, FXT= fluoxetina.

## 5. DISCUSSÃO

---

Os resultados do presente estudo mostram que o extrato de *Melissa officinalis* apresentou uma alteração de comportamento sugestivo de resposta ansiolítica e atividade antidepressiva, o que foi dependente do tempo de tratamento, visto que os efeitos terapêuticos dos extratos só foram observados após 10 dias de tratamento. Essas observações contribuem para reforçar os dados encontrados na literatura, quando fizeram os estudos com humanos, sem que uma pesquisa anterior, com animais de pequenos portes, tivesse sido previamente investigada.

O tratamento agudo com o extrato de *Melissa officinalis*, nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg não produziu nenhuma alteração comportamental nos animais de ambos os sexos, quando comparados ao controles. Estes resultados não estão em concordância com aqueles encontrados por Kennedy et al. (2004), quando mostraram as propriedades anti-estresse daquela planta em humanos, diante de uma única exposição ao extrato de melissa, na dose de 600 mg/kg.

Essa divergência de resultados, anteriormente mostrada, pode ser atribuída às diferenças de sujeitos experimentais (visto que Kennedy e colaboradores fizeram suas pesquisas em humanos), bem como à dose utilizada, uma vez que eles usaram uma dose superior a que foi usada em nossas pesquisas. A dose usada por aqueles pesquisadores, no entanto, não foi possível ser investigada devido à formação de muitos grumos, o que dificultava a diluição dos extratos.

Nos estudos realizados por Kennedy et al. (2004), com humanos, observou-se que a melissa melhorou o humor e reduziu o estresse quando o extrato foi dado por via oral na dose de 600 mg. No entanto, nenhuma alteração desses comportamentos foi observada na dose of 300 mg/kg. Esta última observação está em conformidade com os nossos resultados em ratos, visto que a mesma dose, dada agudamente, não alterou os parâmetros estudados, quando os animais foram avaliados quanto à ansiedade, depressão e locomoção.

Em relação ao tratamento subcrônico de 10 dias, o extrato de melissa favoreceu uma atividade ansiolítica, uma vez que aumentou a frequência de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do LCE, observação detectada em ambos os sexos. Nos ratos machos, o efeito significativo foi observado com as doses de 100 e 300 mg/kg. Nas fêmeas, os efeitos também foram observados com a dose de 30 mg/kg. Essa diferença de resultados pode ser considerada devido à farmacocinética apresentada pelas fêmeas diante da maior sensibilidade ao extrato, o que, normalmente, favorece a resposta em doses menores do que aquelas usadas em machos.

Soulimani et al. (1991) sugeriram que existe um efeito U-invertido na dose resposta com maior efeito de 25 mg/kg do extrato de melissa, que aumentou os parâmetros do sono induzido pelo pentobarbital. *Melissa officinalis* combinada com algumas ervas, principalmente *Valeriana officinalis* tem demonstrado uma melhora na qualidade de sono em sujeitos normais e naqueles que apresentavam distúrbios de sono, *Melissa officinalis* tem efeitos semelhantes à dose de 0,125 mg de triazolam (Dressing et al., 1992).

As alterações observadas para o comportamento ligado à ansiedade, juntamente com a ausência de efeito na atividade locomotora e ausência de interferência na frequência de entradas nos braços fechados, sugeriram que o efeito ansiolítico observado tenha sido específico, e não dependente de um efeito sedativo, que poderia favorecer a permanência do animal muito mais tempo nos braços abertos do labirinto.

No que diz respeito a esses resultados, a literatura mostra que ratos têm maior preferência pelos braços fechados, devido a presença de paredes verticais altas. Uma esquia dos braços abertos do LCE é em decorrência da ausência dessas paredes, que impede o seu comportamento de tigmotaxia, o que acaba favorecendo um comportamento defensivo contra seus predadores (Treit et al., 1993). Geralmente, para avaliarmos os parâmetros acima, são usados padrões de drogas ansiolíticas, tais como o diazepam, que acaba por constituir controle positivo importante nessas avaliações.

Em nossos estudos, o diazepam, usado como controle positivo para a atividade ansiolítica, não mostrou qualquer diferença quando administrado agudamente, provavelmente pelo fato da resposta basal dos demais grupos já estarem em um teto máximo para o comportamento avaliado. Isso normalmente acontece em ratos na faixa etária de 2,5-3 meses, que foi a idade dos sujeitos experimentais usados nesta avaliação.

Estudo mostrou que ratos testados no LCE aos 2 meses de idade apresentaram baixos níveis de ansiedade, enquanto aqueles testados aos 4 meses de idade ou mais, apresentaram níveis de ansiedade significativamente mais elevados, independentemente do sexo. No entanto, aos 3 meses de idade,

ratos machos apresentaram níveis de ansiedade significativamente maiores do que fêmeas (Imhof et al., 1993). Foi também verificado que no LCE, a resposta a drogas ansiolíticas ou ansiogênicas variou de acordo com a idade dos animais. Assim, o diazepam, droga ansiolítica, foi efetivo somente em animais de 4 meses, enquanto que o pentilenotetrazol, droga ansiogênica, foi efetivo preferencialmente em animais testados aos 2 meses, mostrando a dependência da idade nessa resposta (Lopes-da-Silva et al., 1996).

Em roedores, diferenças sexuais observadas em comportamentos ligados à emocionalidade, têm sido descritas em diferentes condições experimentais (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers e Cole, 1993; Zimmerberg e Farley, 1993). Em alguns modelos, ratos fêmeas têm exibido menor comportamento associado ao medo do que machos (Imhof *et al.*, 1993; Johnston e File, 1991; Masur *et al.*, 1980; Steenbergen *et al.*, 1991). Em nossos estudos, não se observaram marcadas diferenças entre os dois sexos, visto que ratos machos e fêmeas responderam da mesma forma diante da administração do extrato de *Melissa officinalis*, exceto que as fêmeas apresentaram uma maior sensibilidade, uma vez que em dose mais reduzida (10 mg/kg) as fêmeas já apresentavam atividade ansiolítica e antidepressiva.

Examinando-se as diferenças sexuais em três modelos animais de ansiedade: interação social, LCE e teste de conflito de Vogel, observaram-se diferenças entre machos e fêmeas (Johnston e File, 1991). As fêmeas apareceram menos “ansiosas” no LCE e mais “ansiosas” no teste de Vogel, com resultados contraditórios no teste de interação social. Estas evidências indicam, claramente, que a validação de modelos animais, particularmente de ansiedade,

pode ser afetada pelo sexo dos animais considerados. Ratos fêmeas também mostraram-se menos ansiosas do que machos no LCE, quando eles foram testados aos 3 meses de idade, mas não em idades inferiores ou superiores, sugerindo que as diferenças sexuais são dependentes da idade (Imhof et al., 1993).

Além da atividade ansiolítica, o extrato também foi avaliado quanto a sua provável atividade antidepressiva. No teste do nado forçado, o tratamento agudo com o extrato de *Melissa officinalis* não alterou o tempo de imobilidade dos animais quando comparado aos animais controles. No entanto, a exemplo do que ocorreu para as avaliações de ansiedade, quando administrado subcronicamente com o extrato de melissa, os animais reduziram o tempo de imobilidade no tanque com água, efeito observado com as doses administradas em ambos os sexos.

Esses resultados, entretanto, não estão em concordância com a literatura, que mostra que a depressão é dependente do sexo, visto que o sexo feminino é duas vezes mais propício a apresentar esse comportamento do que masculino (Kennedy et al., 2006). Diante dessas informações haveria de se esperar que, talvez, os efeitos da melissa fossem mais pronunciados nos ratos fêmeas, pela maior sensibilidade. No entanto, ambos os sexos responderam da mesma forma, sendo que os efeitos não foram tão evidentes quanto à fluoxetina, que serviu de controle positivo nas avaliações.

A *Melissa officinalis*, até então, tem sido mostrada ser muito segura com nenhum efeito adverso associado ao seu uso (Wong et al., 1998), o que explica as razões do seu consumo direto em humanos. Como nenhum efeito tóxico foi observado durante 10 dias de tratamento com o extrato, em todas as doses

estudadas, pode-se sugerir que sua administração subcrônica pode ser considerada relativamente segura. Esses dados eram de se esperar visto que, em humanos, o consumo do extrato de melissa, durante 4 meses, também não apresentou quaisquer indícios de toxicidade (Akhondzadeh et al., 2003).

É bem sabido e descrito na literatura que os antidepressivos são geralmente prescritos para o tratamento da depressão e, mais recentemente, tem sido também recomendado para o tratamento de algumas desordens de ansiedade. Para avaliar as respostas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos machos Wistar foi usada uma administração aguda de fluoxetina, nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg por via intraperitoneal, 30 minutos antes do teste no LCE. O diazepam foi usado como controle positivo da atividade ansiolítica. Foi observada uma redução nas porcentagens de tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, quando da administração da fluoxetina, nas doses de 5 e 10 mg/kg (Drapier et al., 2007).

Em um estudo foram investigadas as contribuições das monoaminas (serotonina ou noradrenalina/dopamina) nos efeitos comportamentais agudos de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como, por exemplo, a fluoxetina, no teste da suspensão da cauda. Os resultados mostraram que a síntese de serotonina endógena mediava os efeitos comportamentais dos inibidores de recaptação de serotonina. Ao contrário, para o bloqueio dos efeitos comportamentais era necessário o bloqueio tanto da síntese das catecolaminas quanto dos mecanismos de suas estocagens e liberação (O'Leary et al., 2007). Em um outro estudo o efeito crônico da fluoxetina na neurotransmissão mediada pelos receptores 5HT<sub>1A</sub> da substância cinzenta periaqueductal dorsal estava

implicado com os efeitos dos inibidores de recaptção de serotonina nos transtornos do pânico (Zanoveli et al., 2007). Em nossos estudos, entretanto, nenhuma avaliação mais precisa em termo de mecanismo de ação foi investigada, para mapear os reais caminhos pelos quais o extrato de melissa poderia produzir seus efeitos antidepressivos.

A partir do ponto de vista fitoquímico, várias pesquisas têm mostrado que a maior parte dos constituintes químicos encontrados nessa espécie de planta, por nós investigada, foram os flavonóides, alcalóides, ácidos fenólicos, taninos e óleos essenciais, onde muito deles exercem atividade no SNC. Alguns flavonóides apresentam atividade anticonvulsivante e efeitos sedativos (Dos Santos et al., 2005, Fernandez et al., 2004), efeito de neuroproteção do SNC (Heitzman et al., 2005, Marder et al., 2003; Nagase et al., 2005) e atividade antidepressiva (Juergenliemk et al., 2003).

Muitos taninos mostraram efeito anticonvulsivo (Dos Santos et al., 2005). Os triterpenos pentacíclicos também apresentaram atividade sobre o SNC (Heitzman et al., 2005). Os alcalóides possuem atividade farmacológica e pode ser relevante no tratamento de desordens cognitivas, incluindo um aumento nas funções colinérgicas no SNC (Howes e Houghton, 2003).

Mesmo com uma gama de compostos isolados de plantas, que podem explicar a farmacodinâmica de muitos extratos de plantas, no caso da *Melissa officinalis* seus mecanismos de ação não são muito claros, mas se têm sugerido que os componentes ativos da planta inclui os monoterpenóides aldeídos (Carnat et al., 1998), flavonóides e compostos polifenólicos como ácido rosmarínico (Carnat

et al.,1998; Hohmann et al.,1999) e monoterpenos glicosídios (Mulken et al.,1985), aqueles componentes podem ser responsável pelas ações comportamentais (Kennedy et al., 2002) antioxidantes (Mantle et al., 2000; Hohmann et al.,1999) e afinidades pelos receptores colinérgicos (Wake et al., 2000). Os efeitos antioxidantes da *Melissa officinalis* poderia proteger o SNC contra os possíveis danos dos radicais livres na demência (Hohmann et al., 1999; Mantle et al., 2000).

Em nosso país, infelizmente, não é surpresa não haver registros de fitoterápicos derivados de fontes naturais brasileiras, com uma única exceção registrada pela Anvisa em 2004, o Acheflan<sup>®</sup>. Isto é devido a várias razões, que vai desde a falta de incentivos financeiros a partir do Governo para o estudo de produtos naturais, até recentes dificuldades nas legislações brasileiras relacionadas ao estudo de plantas medicinais (Giorgetti et al., 2007).

Alguns desses obstáculos acima têm sido revertidos ao longo dos últimos anos. Primeiro, através de incentivos providenciados pelas parcerias entre as companhias farmacêuticas e universidades, projetos de financiamento e treinamento de grupos de profissionais de grande importância para o Brasil (Rodrigues, 2005). Segundo, o registro de um fitoterápico particular leva anos para passar por todos os testes pré-clínicos e clínicos. Para isso, o fitoterápico tem que mostrar sua segurança farmacológica e efetividade, o que, geralmente, não é tão simples de ser mostrado, visto que em muitos estudos as espécies animais, que servem de sujeitos experimentais, não apresentam o efeito farmacológico desejado nos primeiros testes farmacológicos (Giorgetti et al., 2007)

Nossos achados não nos permitem chegar a uma conclusão sobre os prováveis mecanismos moleculares pelos quais o extrato de *Melissa officinalis* interfere com o comportamento de ansiedade e/ou depressão, no entanto eles abrem uma porta para pesquisas futuras que são necessárias para investigar novos fitoterápicos que auxiliem na farmacoterapia de muitas patologias relacionadas ao SNC e incentivar, quem sabe, as patentes desses compostos.

## 6. CONCLUSÕES

---

Baseando-se nos resultados, foi possível observar que o extrato alcoólico de *Melissa officinalis* apresentou ser eficaz e seguro nas atividades ansiolítica e antidepressiva, uma vez que:

- a) Nas doses de 100 e 300 mg/kg para machos e 30, 100 e 300 mg/kg para fêmeas, foi possível observar um aumento na porcentagem de entradas e no tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE.
- b) Os efeitos observados foram dependentes do tempo de tratamento, uma vez que quando administrado agudamente não observou-se alteração comportamental, enquanto que com 10 dias de tratamento, o extrato induziu um claro efeito ansiolítico, independente do sexo.
- c) O efeito ansiolítico observado pareceu ser específico, visto que a locomoção e a frequência de entradas nos braços fechados do LCE não sofreram quaisquer alterações.
- d) O efeito antidepressivo foi bem nítido, que foi caracterizado pela redução do tempo de imobilidade, comportamento este correspondente à apatia na depressão.

Em conjunto, os resultados mostram a importância de que futuras investigações dos mecanismos moleculares das atividades ansiolíticas e antidepressivas, apresentadas pelo extrato de *Melissa officinalis*, sejam levadas em consideração.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AKHONDZADEH S, NOROOZIAN M, MOHAMMADI M, OHADINIA S, JAMSHIDI AH, KHANI M. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 28: 53-59, 2003.
- ALBAGLI S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. *Parcerias Estratégicas*, 12: 5-19, 2001.
- ALCARO A, CABIB S, VENTURA R, PUGLISI-ALLEGRA S. Genotype- and experience-dependent susceptibility to depressive-like responses in the forced-swimming test. *Psychopharmacology*, 164: 138-143, 2002.
- BALLARD C, O'BRIEN J, REICHELT K, PERRY E. Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double blind, placebo controlled trial. *Clin Psychiatry*, 2007 (in press).
- BERG MEVD. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. rev. e. aum. Belém: MPEG, 207 p. II, 1993.
- BHATIA SK, BHATIA SC. Childhood and adolescent depression. *Am. Fam. Physician*, 75: 73-80, 2007.
- BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, CAROBREZ AP, VENIEGAS R, RODGERS RJ, SHEPHERD JK. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology*, 108: 352-362, 1992.
- BORRÁS MRL. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? *Ed. Valer*, 2003.
- CARNAT AP, CARNAT A, FRAISSE D, LAMAISON JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm. Acta Helv.*, 72:301-305, 1989.

- CERNY A, SCHMID K. Tolerability and efficacy of valerian/ lemon balm in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Fitotherapy*, 70:221-228, 1999.
- CIPRIANI A, SMITH K, BURGESS S, CARNEY S, GOODWIN G, GEDDES J. Lithium versus antidepressants in the long-term treatment of unipolar affective disorder. *Cochrane Database Syst Rev.*, Oct 18;(4):CD003492, 2006.
- CLEMENT Y, CALATAYUD F, BELZUNG C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Res. Bull.*, 57: 57-71, 2002.
- COLETA M, CAMPOS MG, COTRIM MD, PROENÇA DA CUNHA A. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry*, 34: S20-1, 2001.
- CORRÊA JÚNIOR C, LIN CM, SCHEFFER MC. Cultivo das plantas medicinais aromáticas e condimentares. 1<sup>a</sup>. Ed. Curitiba: EMATER, p. 166-167, 1991.
- CRAWLEY JN, GOODWIN FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13: 167-170, 1980.
- Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioural phenotyping of transgenic and knockout mice. NY: Wiley-Liss; 2000. p. 386.
- CRYAN JF, HOLMES A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 4: 775-790, 2005.
- DELGADO MR, OLSSON A, PHELPS EA. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biolog. Psychol.*, 73: 39-48, 2006.
- DEUTSCH JA, EISNER A. Ethanol self-administration in the rat induced by forced drinking of ethanol. *Behav. Biol.*, 20: 81-90, 1977.

- DI STASI LC. Arte, ciência e magia In: Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, p. 15-21, 1996.
- DOS SANTOS JG, BLANCO MM, DO MONTE FHM, RUSSI M, LANZIOTTI VMNB, LEAL LKAM, CUNHA GM. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia*, 76: 508-513, 2005.
- DRAPIER D, BENTUE-FERRER D, LAVIOLLE B, MILLET B, ALLAIN H, BOURIN M, REYMANN JM. Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 176: 202-209, 2007.
- DRESSING H, RIEMANN D, LÖW H, SCHEDRL M, REH C, LAUX P, MÜLLER W. Insomnia: are valerian/balm combinations of equal value of benzodiazepine? *Therapiewoche*, 42: 726-736, 1992.
- FANSELOW MS. The midbrain periaqueductal grey as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DePaulis, A.; Bander, R., editors. *The midbrain periaqueductal grey matter: functional, anatomical and neurochemical organisation*. New York: Plenum Press, 151-73, 1991.
- FERNANDEZ S, WASOWSKI C, PALADINI AC, MARDER M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 77: 399-404, 2004.
- FYER AJ, MANNUZZA S, ENDICOTT J. Differential diagnosis and assessment of anxiety: recent developments. In: Meltzer, H.Y., editor. *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press, 1177-1191, 1987.
- GEYER MA, MARKOU A. The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. NY: Lippincott Williams Wilkins, 445-455, 2002.

- GIORGETTI M, NEGRI G, RODRIGUES E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system – A study of historical sources from the 16th to 19th century. *J. Ethnopharmacol.*, 109: 338-347, 2007.
- GRAÇA C. Fitoterapia em atenção primária. Curitiba: Secretaria Municipal de saúde, p. 15 (apostila), 1990.
- GRAEFF FG. Medicamentos ansiolíticos. In: Fundamentos de Psicofarmacologia, Editores: Graeff FG, Guimarães FS. Ed. Atheneu, São Paulo, p 123-160, 1999.
- GRAY J. Drug effects on fear and frustration. Possible limbic site of action of minor tranquilizers, in Handbook of Psychopharmacology: *Drugs, Neurotransmitters and Behavior* (Iversen, L.L.; Iversen, S.D. and Snyder, S.H., eds), Plenum, New York, vol. 8, pp. 433-529, 1977.
- GUIMARÃES FS. Medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor. In: Fundamentos de Psicofarmacologia, Editores: Graeff FG, Guimarães FS. Ed. Atheneu, São Paulo, p 93-122, 2000.
- HAEFELY WE. The GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex and anxiety. In: *Anxiety. Psychobiological and Clinical Perspectives*. Sartorius, N.; Andreoli, V.; Cassano, G.; Eisenberg, L.; Kielholz, P.; Pancheri, P.; Racagni, G. (eds). Hemisphere Publishing Corporation, New York, 23-36, 1990.
- HANDLEY S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CNS Drugs*, 2: 397-414, 1994.
- HANDLEY SL, MITHANI S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.
- HEITZMAN ME, NETO CC, WINIARZ E, VAISBERG AJ, HAMMOND GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66: 5-29, 2005.

- HOHMAN J ZUPKO I, REDEI D, CSANYI M, FALKAY G, MATHE I, JANICSAK G. Protective effects of aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Med.*, 65: 576-578, 1999.
- HOWES MJR, HOUGHTON PJ. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75: 513-527, 2003.
- IMHOF JT, COELHO ZMI, SCHMITT ML, MORATO GS, CAROBREZ AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, 56: 177-180, 1993.
- JOHNSTON AL, FILE SE. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.*, 49: 245-250, 1991.
- JUERGENLIEMK G, BOJE K, HUEWEL S, LOHMANN C, GALLA HJ, NAHRSTEDT A. In vitro studies indicate that miquelianin (quercetin 3-O-beta-D-glucuronopyranoside) is able to reach the CNS from the small intestine. *Planta Medica*, 69: 1013-1017, 2003.
- KALUEFF AV, WHEATON M, MURPHY DL. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav. Brain Res.*, 2007, in press.
- KENNEDY DO, LITTLE W, HASKELL CF, SCHOLEY AB. Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytother. Res.*, 20: 96-102, 2006.
- KENNEDY DO, LITTLE W, SCHOLEY AB. Attenuation of laboratory-induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Psychosomatic Medicine*, 66: 607-613, 2004.

- KENNEDY DO, SCHOLEY AB, TILDESLEY NTJ, PERRY EK, WESNES KA. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharm. Biochem. Behav.*, 72: 953-964, 2002.
- KOCH-HEITZMANN I, SCHULTZE W. 2000 Jahre *Melissa officinalis*. *Z. Phytother.*, 9:77-85, 1988.
- LEDoux JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann NY Acad. Sci.*, 702: 149-57, 1993.
- LISTER RG. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185, 1987.
- LOPES-DA-SILVA N, FERREIRA VMM, CAROBREZ AP, MORATO GS. Social isolation modifies the performance of young rats in the elevated plus-maze apparatus. *Physiol. Behav.*, 1996.
- MALLO T, ALTHOA A, KOIV K, TONISSAAR M, ELLER M, HARRO J. Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behav. Brain Res.*, 177:269-281, 2007.
- MANTLE D, PICKERING AT, PERRY EK. Medicinal plant extracts for the treatment of dementia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *CNS Drugs*, 13:201–213, 2000.
- MARDER M, VIOLA H, WASOWSKI C, FERNANDEZ S, MEDINA JH, PALADINI AC. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 75: 537-545, 2003.
- MARRIOTT AS, SPENCER PS. Effects of centrally acting drugs on exploratory behaviour in rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 25: 432-441, 1965.

- MARTIN C, DUCLOS M, MORMEDE P, MANIER G, CHAOULOFF F. Hippocampal and striatal [(3)H]5-HT reuptake under acute stressors in two rat strains differing for their emotivity. *Neurosci Lett.*, 288: 246-248, 2000.
- MASUR J, SCHUTZ MT, BOERNGEN R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev. Psychobiol.*, 13: 107-110, 1980.
- MCBRIDE WJ; LI TK. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critic. Rev. Neurobiol.*, 12: 339-369, 1998.
- MIMICA-DUKIC N, BOZIN B, SOKOVIC M, SIMIN N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L (Lamiaceae) essential oil. *J. Agricult. Food Chem.*, 52: 2485-2489, 2004.
- MING LC. Introdução ao estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. Curitiba: SOB informa, 1994.
- MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.
- MORRISON CF, STEPHENSON JA. Drug effects on a measure of inconditioned avoidance in the rat. *Psychopharmacologia*, 18: 133-143, 1970.
- MOWLA A, MOSAVINASALO M, PANI A. Does fluoxetine have any effect on the cognition of patients with mild cognitive impairment? A double-blind placebo-controlled clinical trail. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 27: 67-70, 2007.
- MULKENS A, STEPHANOU E, KAPETENADIS I. Heterosides a genines volatiles dans les feuilles de *Melissa officinalis* L. (lamiaceae). *Pharm. Acta Helv.*, 60:276-278, 1985.
- NAGASE H, OMAE N, OMORI A, NAKAGAWASAI O, TADANO T, YOKOSUKA A, SASHIDA Y, MIMAKI Y, YAMAKUNI T, OHIZUMI Y. Nobiletin and its related flavonoids with CRE-

- dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 1330-1336, 2005.
- NASH LT, HACK S. The pharmacological treatment of anxiety disorders in children and adolescents. *Expert Opin. Pharmacother.*, 3: 555-571, 2002.
- NESTLER EJ, GOULD E, MANJI H, BUNCAN M, DUMAN RS, GRESHENFELD HK, HEN R, KOESTER S, LEDERHENDLER I, MEANEY M, ROBBINS T, WINSKY L, ZALCMAN S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol. Psychiatry*, 52: 503-528, 2002.
- NOLAN NA, PARKES MW. The effects of benzodiazepines on the behaviour of mice on a holeboard. *Psychopharmacologia*, 29: 277-288, 1973.
- O'LEARY OF, BECHTHOLT AJ, CROWLEY JJ, HILL TE, PAGE ME, LUCKI I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drug in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology*, 21: 2007 [Epub ahead of print].
- PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-167, 1985.
- PELLOW S, FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24: 525-529, 1986.
- PERRY EK, PICKERING AT, WANG WW, HOUGHTON PJ, PERRY NSL. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51: 527-534, 1999.
- PERRY N, COURT G, BIDET N, COURT J, PERRY E. European Herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int. Geriatr. Psychiatry*, 11: 1063-1069, 1996.

- PETIT-DEMOULIERE B, CHENU F, BOURIN M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*, 177: 245-255, 2005.
- PORSOLT RD, ANTON G, BLAVET N, JALFRE M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 47: 379-391, 1978.
- PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, 463: 3-33, 2003.
- QUINTANA H, BUTTERBAUGH GJ, PURNELL W, LAYMAN AK. Fluoxetine monotherapy in attention-deficit hyperactivity disorder and comorbid non-bipolar mood disorders in children and adolescents. *Child Psychiatry Hum. Dev.*, 37: 241-253, 2007.
- REDROBE JP, BOURIN M. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology*, 138: 198-206, 1998.
- REVILLA J. Plantas medicinais da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 2ª ed. *INPA e SEBRAE*, 2001.
- RODGERS RJ, COLE JC. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.*, 54: 729-736, 1993.
- RODRIGUES E. A parceria Universidade-empresa privada na produção de fitoterápicos no Brasil. *Revista Fármacos e Medicamentos*, 37: 30-39, 2005.
- SAMSON HH. Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and water-sated rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 10: 436-442, 1986.

- SANGER DJ. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: Boulton, A.; Baker, G. and Martin-Iverson, M. *Animal Models in Psychiatry, II*. The Humana Press Inc., vol. 19: 147-198, 1991.
- SHEEHAN DV. Current concepts in psychiatry, panic attacks and phobias. *N. Engl. J. Med.*, 307: 156-158, 1982.
- SOULIMANI R, FLEURENTIN J, MORTIER F, MISSLIN R, DERRIEU G, PELT JM. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Med.*, 57: 105-109, 1991.
- STEENBERGEN HL, FARABOLLINI F, HEINSBROEK RPW, VAN DE POOL NE. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.*, 43: 159-165, 1991.
- STEWART SH, WESTRA HA. Benzodiazepine side-effects: from the bench to the clinic. *Curr.Pharm. Des.*, 8:1-3, 2002.
- TESKE M, TRENTINI AMM. Herbarium, 2<sup>nd</sup>. Ed. Curitiba: Laboratório Botânico, p.410, 1994.
- THOME-SOUZA MS, KUCZNSKI E, VALENTE KD. Sertraline and fluoxetine: safe treatments for children and adolescents with epilepsy and depression. *Epilepsy Behav.*, 14: 2007 [Epub ahead of print].
- TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 463-9, 1993.
- WAGNER H, SPRINKMEYER L. über die pharmakologische Wirkung von Melissengeist, *Dtsch Apoth Ztg*, 113:1159-66, 1973.
- WAKE G, COURT J, PICKERING A, LEWIS R, WILKINS R, PERRY E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol.*, 69:105-114, 2000.

- WECKER L, CATALANO G. Tratamento da ansiedade e dos distúrbios do sono. In: Brody Farmacologia Humana. Ed: Minneman KP, Wecker L., Editora Mosby Elsevier, 4<sup>a</sup>. Edição, pág. 285-286, 2006.
- WONG AHC, SMITH M, BOON HS. Herbal remedies in psychiatric practice. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55:1033-1044, 1998.
- WONG ML, LICINIO J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3: 136-151, 2004.
- ZANOVELI JM, NOGUEIRA RL, ZANGROSSI H JR. Enhanced reactivity of 5-HT1A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology*, 14: 2007 [Epub ahead of print].
- ZIMMERBERG B, FARLEY MJ. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.*, 54: 1119-1124, 1993.

## 8. ANEXO

---



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA - IBD  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

05 de agosto de 2005.

*A QUEM POSSA INTERESSAR*

