

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Perfil químico dos óleos essenciais de *Citrus aurantium* Lineu e *Citrus sinensis*
(L.) Osbeck e avaliação psicofarmacológica da ação ansiolítica

ADRIANA NUNES WOLFFENBÜTTEL

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Perfil químico dos óleos essenciais de *Citrus aurantium* Lineu e *Citrus sinensis*
(L.) Osbeck e avaliação psicofarmacológica da ação ansiolítica

Tese apresentada por **Adriana Nunes
Wolffenbüttel** para a obtenção do
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Mirna Bainy Leal

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Cassel

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Profa. Dr. Luciana Grazziotin Rossato

Universidade de Passo Fundo (UPF), Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Wolffenbüttel, Adriana Nunes

Perfil químico dos óleos essenciais de Citrus aurantium Lineu e Citrus sinensis (L.) Osbeck e avaliação psicofarmacológica da ação ansiolítica / Adriana Nunes Wolffenbüttel. -- 2014.

223 f.

Orientadora: Renata Pereira Limberger.

Coorientadora: Mirna Bainy Leal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Óleo essencial. 2. Citrus aurantium. 3. Citrus sinensis. 4. ansiolítico. 5. melatonina e corticosterona. I. Limberger, Renata Pereira, orient. II. Leal, Mirna Bainy, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger e co-orientação da Prof^a. Dr. Mirna Bainy Leal, nos laboratórios de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Parte dele também foi executado no Laboratório do Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, da Facultad de Medicina, da Universidad Complutense de Madrid, sob coordenação e orientação da Catedrática Prof^a Dr. Ana Isabel Esquifino e da Prof^a Dr. Maria Pilar Cano.

Que este trabalho seja para o bem.

AGRADECIMENTOS

A todos os que estiveram comigo, atuando de forma interrelacionada como minhas Mestras e meus Mestres.

Pela acolhida calorosa, pela extrema disponibilidade, pela ajuda incomparável, pelo desprendimento, pela capacidade de ensinar e pelo bom humor, agradeço:

à minha orientadora Prof^a. Dr. Renata Pereira Limberger, co-orientadora Prof^a. Dr. Mirna Bainy Leal e à Prof^a. Dr. Ana Isabel Esquifino da Universidad Complutense de Madrid;

aos Profs. Drs. Elaine Elisabetsky, Eliane Dallegrave, Leandro Machado de Carvalho, Claudia Alcaraz Zini, Maria Pilar Cano, Miriam Anders Apel e Sandra Manoela Dias Macedo;

aos colegas de trabalho e de laboratório Amanda Zamboni, Ana Cláudia Fagundes, Ana Laura Bemvenuti Jacques, André Rech, Bruna Coppe, Bruna Tassi Borille, Caroline Gonçalves Vieira, Charline Fernanda Backes, Claudia Bacelar Rita, Eloisa Comiran, Erica Maciel, Fernanda Oliveira Lima, Gabriela Mezzomo Zemolin, Gabriel Moraes Reis, Gabriela Becker, Gabriela Schimith, Janaína Lucas de Oliveira Salomón, Leire Virto, Luana Pereira de Souza, Kristiane de Cássia Mariotti, Maíra Kerpel dos Santos, Mayara Closs, Otávio Américo Augustin, Rachel Bulcão, Rosana Fernanda Fogaça, Vanessa Rodrigues Coelho e Viviane Linck.

Às empresas Laszlo Aromaterapia Ltda e Ferquima Ltda pela doação de seus óleos essenciais; à Verbhena Ltda pela disponibilidade de uso de seus óleos essenciais neste estudo; à colega Ana Stela Goldbeck e amiga Adriane Biachi pela doação das espécies vegetais de *Citrus* para a extração dos óleos essenciais.

Ao PPGCF/UFRGS pela possibilidade deste estudo; ao PPGCF/UFSM, ICBS/UFRGS e UCM/Madrid pela parceria em uso de suas instalações e equipamentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Este estudo pesquisou a composição química dos óleos essenciais (OE) do pericarpo (casca dos frutos) e folhas de *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce) visando correlacionar seus constituintes com a avaliação psicofarmacológica da ação ansiolítica, através da inalação durante 30 minutos destes OE por camundongos. Os OE foram obtidos por destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio de cítricos coletados nas regiões sul e centro-sul do Brasil, tanto de extrações em laboratório como de marcas comerciais, onde constatamos a semelhança química entre seus constituintes, com importância comercial e farmacológica. Os OE provenientes do pericarpo possuem o limoneno como componente majoritário (67,7-82,5%) e os OE provenientes das folhas possuem o acetato de linalila (28,0-51,8%) e o linalol (14,2-24,8%) como componentes majoritários. O isômero (*R*)-(+)-limoneno é *ee* em todos os OE analisados. O isômero (*R*)-(-)-linalol é *ee* nos OE *C. aurantium*, e que o (*S*)-(+)-linalol é *ee* nos OE *C. sinensis*. Após a inalação, os camundongos foram submetidos a ensaios comportamentais. O OE de *C. sinensis* demonstrou provocar comportamento indicativo de redução da ansiedade através do teste claro-escuro e diminuição da sua atividade locomotora no teste de atividade locomotora, indicando um efeito depressor do SNC. Demonstramos que os OE inalados foram absorvidos pelo organismo dos camundongos através da detecção dos componentes dos OE, dentre eles o limoneno e o linalol no plasma dos camundongos. Quantificamos os hormônios relacionados com os estados emocionais de ansiedade e estresse, Melatonina (MEL) e Corticosterona (CORT), onde constatamos que os OE inalados não atuam no sistema que envolve a síntese da MEL, bem como no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal da CORT. Comprovamos que o protocolo aplicado aos camundongos e o ensaio de suspensão pela cauda não são eventos estressantes, pois o hormônio CORT manteve-se nos valores basais.

Palavras-chaves: acetato de linalila, ansiedade, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, corticosterona, estresse, limoneno, linalol, melatonina, óleo essencial.

ABSTRACT

This study investigated the chemical composition of essential oils (EO) of the pericarp of the fruit and leaves of *Citrus aurantium* Linne (bitter orange) and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet orange) in order to correlate their constituents with psychopharmacological evaluation the anxiolytic action through inhalation for 30 minutes these EO for mice. EO were obtained by steam distillation, hydrodistillation and cold pressing of *Citrus* collected in southern and south-central regions of Brazil, both in laboratory extractions as trademarks, which found the chemical similarity among their constituents, with important commercial and pharmacology. OE from pericarp have limonene as a major component (67.7 to 82.5%) and EO from the leaves have linalyl acetate (28.0 to 51.8%) and linalool (14.2 to 24.8%) as major components. The (*R*)-(+)-Limonene is ee in all OE analyzed. The (*R*)-(-)-linalool is ee in the OE *C. aurantium*, and (*S*)-(+)-linalool is ee in the OE *C. sinensis*. After inhalation, the mice were subjected to behavioral testing. The EO of *C. sinensis* showed cause behavior indicative of anxiety reduction through the light-dark test and decreased their locomotor activity in the locomotor activity test, indicating a CNS depressant effect. We have demonstrated that inhaled EO were absorbed by the body of the mice over the detections components of EO, including limonene and linalool, in the plasma of mice. We quantify the hormones related to emotional states of anxiety and stress, melatonin (MEL) and corticosterone (CORT), which found that inhaled OE do not work in the system involving the synthesis of MEL, as well as in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of CORT. We prove that the protocol applied to mice and the tail suspension test are not stressful events because the hormone CORT remained at basal values.

Keywords: anxiety, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, corticosterone, essential oil, limonene, linalool, linalyl acetate, melatonin, stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa mundial da origem e distribuição da cultura da laranja.	30
Figura 2 -	Produção mundial de laranja em 2011.	31
Figura 3 -	(a) Mapa da produção nacional de laranja; (b) Mapeamento de aptidão para a cultura de <i>Citrus</i> no Rio Grande do Sul.	32
Figura 4 -	Cadeia econômica parcial da produção de <i>Citrus</i> no Brasil em 2008/2009.	33
Figura 5 -	Aplicações dos OE na indústria e em produtos.	34
Figura 6 -	Funções desempenhadas pelos metabólitos secundários nas espécies vegetais: alcalóides, flavonóides, saponinas e OE.	35
Figura 7 -	Imagens das estruturas secretoras de OE nos <i>Citrus</i> : (a) desenho em corte longitudinal do fruto e glândulas de OE, "oil glands"; (b) cortes transversal e longitudinal do fruto de <i>Citrus</i> ; (c) fotografias microscópicas das cavidades glandulares de OE.	37
Figura 8 -	Organograma demonstrativo dos processos industriais de extração de produtos a partir de espécies vegetais, com destaque por sombreamento para os métodos aplicados aos <i>Citrus</i> para a obtenção de OE.	39
Figura 9 -	Esquema de extrator industrial de OE por arraste de vapor.	41
Figura 10 -	Vidraria para a extração de OE de espécies vegetais, pelo processo de destilação por arraste de vapor, vidraria de <i>cleverger</i> .	42
Figura 11 -	Adaptação da vidraria de <i>cleverger</i> ao vaso recipiente onde água e espécie vegetal são adicionados.	43
Figura 12 -	Esquema de equipamento industrial de obtenção de suco e OE pelo método de prensagem ou espessão.	44
Figura 13 -	Visualização da metodologia para a obtenção da nomenclatura dos enantiômeros pelo sistema " <i>Cahn-Ingold-Prelog</i> " ou sequência de prioridade.	47
Figura 14 -	(a) Estruturas espaciais do (S)-(-)-limoneno e do (R)-(+)-limoneno; (b) separação cromatográfica destes isômeros quirais.	48

Figura 15 -	(a) Estruturas espaciais do (<i>R</i>)-(-)-linalol e (<i>S</i>)-(+)-linalol; (b) separação cromatográfica destes isômeros quirais.	49
Figura 16 -	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, com ênfase na via mevalonato e terpenóides dos OE.	51
Figura 17 -	Esquema da formação estrutural dos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides, a partir do ácido mevalônico ($\underline{8}$ = C ₈) e pirofosfato de isoprenila ($\underline{9}$ = C ₉) em uma condensação denominada <i>cabeça-cauda</i> .	52
Figura 18 -	Estruturas químicas de alguns dos monoterpenos presentes nos OE de <i>Citrus</i> : alfa-pineno, beta-pineno, mirceno, terpineno, limoneno, (<i>E</i>)-citral, (<i>Z</i>)-citral, citronelal, alfa-terpineol, acetato de linalila, linalol, geraniol, citronelol, geraniol acetato.	53
Figura 19 -	Formação de alguns monoterpenos lineares a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e seus isômeros, LPP (pirofosfato de linalila) e NPP (pirofosfato de nerila) e a acetilação do linalol pela coenzima tio eter acetil-CoA (CH ₃ COSCoA) gerando o acetato de linalila.	54
Figura 20 -	Rotas biossintéticas para monoterpenos cíclicos.	55
Figura 21 -	Esquema da formação, a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e LPP (pirofosfato de linalila), das estruturas enantiômeras: (a) (+)-(<i>R</i>)-limoneno e (+)-(<i>R</i>)- <i>alfa</i> -pineno; (b) (-)-(<i>S</i>)-limoneno e (-)-(<i>S</i>)- <i>alfa</i> -pineno.	56
Figura 22 -	Formação dos enantiômeros (-)- <i>trans</i> -carveol a partir do (<i>S</i>)-(-)-limoneno, e do (+)- <i>cis</i> -carveol a partir do (<i>R</i>)-(+)-limoneno.	57
Figura 23 -	Detecção dos componentes do OE em plasma por CG: (a) CG-FID, OE de lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>), após seção de massagem em voluntários; (b) SPE-CG/EM, OE de eucalipto (<i>Meulaleuca leucadendron</i> Linn), após inalação por camundongos.	69
Figura 24 -	Modelo de caixa do ensaio comportamental claro-escuro. Inicialmente o animal é colocado na área clara de costas para a abertura que dá acesso à área escura.	71
Figura 25 -	Caixa de atividade exploratória e locomotora, com as fotocélulas de luz infravermelha.	71

Figura 26 -	Modelo de caixa para o teste suspensão pela cauda.	72
Figura 27 -	Gráfico da estatística mundial de registros de estudos em saúde referente o 2012, com destaque para o dado de 16,8% da área da saúde mental.	73
Figura 28 -	Representação esquemática dos vários estímulos sofridos pela glândula pineal, com destaque à via do estímulo luminoso através da retina (a). Localização cerebral da glândula pineal e sua estimulação via luz-retina produzindo e liberando a MEL no sangue (b).	77
Figura 29 -	(a) Rota de biotransformação do triptofano, via serotonina, à MEL contendo as enzimas envolvidas; (b) rota simplificada.	78
Figura 30 -	Variação da concentração plasmática de MEL (pg/mL) em camundongos ao longo de 24 hs.	79
Figura 31 -	Ilustração dos órgãos envolvidos e o mecanismo simplificado da produção do hormônio COR e CORT.	81
Figura 32 -	Rota de síntese dos hormônios esteróides COR e CORT produzidos pelas glândulas adrenais em humanos e em roedores, respectivamente.	81
Figura 33 -	Variação da concentração plasmática de CORT (ng/mL) em camundongos ao longo de 24 hs.	82
Figura 34 -	Sistema de imunoensaio Luminex [®] .	87
Figura 35 -	Processo analítico de detecção e de quantificação no Luminex [®] .	88
Figura 36 -	Fluxograma desta tese.	89
Figura 37 -	Fotografias do pericarpo e das folhas utilizados para a extração dos OE nesta tese.	92
Figura 38 -	Mapa do Brasil com a localização dos municípios Dois Córregos, São Paulo, Montenegro, Porto Alegre e Cristal, onde as espécies <i>C. aurantium</i> e <i>C. sinensis</i> foram cultivadas.	92
Figura 39 -	Vidraria de <i>clevenger</i> : (a) modificada por suporte para destilação por arraste de vapor; (b) tradicional por balão para hidrodestilação. As setas mostram a localização da espécie vegetal.	93
Figura 40 -	Fotografias da câmara de inalação (a) e (b); Desenho da câmara de inalação (c).	100

Figura 41 - Sequência do ensaio comportamental da avaliação da atividade ansiolítica (teste claro-escuro) e da atividade locomotora.	102
Figura 42 - Sequência do ensaio comportamental da avaliação da atividade antidepressiva (teste de suspensão pela cauda).	103
Figura 43 - Imagens do sistema de imunoensaio Luminex [®] .	106
Figura 44 - Diagrama das diluições da solução padrão no sistema Luminex [®] .	108
Figura 45 - Fluxograma do procedimento de preparo das amostras, padrões e controles para a leitura no sistema Luminex [®] .	112
Figura 46 - Percentual médio dos componentes mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila dos OE provenientes do pericarpo e das folhas de <i>C. aurantium</i> e de <i>C. sinensis</i> de acordo com os resultados da Tabela 8.	118
Figura 47 - Parte do cromatograma gasoso do OE <i>C. sinensis</i> que evidencia o enantiômero (S)-(-)-limoneno e o enantiômero (R)-(+)-limoneno.	119
Figura 48 - Parte do cromatograma gasoso do OE <i>C. aurantium</i> , que evidencia o enantiômero (R)-(-)-linalol e o enantiômero (S)-(+)-linalol.	119
Figura 49 - Efeito da inalação de OE <i>C. aurantium</i> (10%, durante 30 min) e de <i>C. sinensis</i> (10%, durante 30 min) no teste claro-escuro (5 min).	121
Figura 50 - Efeito da inalação do OE <i>C. aurantium</i> (10%, durante 30 min) e de <i>C. sinensis</i> (10%, durante 30 min) no teste da atividade locomotora (10 min).	122
Figura 51 - Efeito da inalação dos OE <i>C. aurantium</i> (10%, durante 30 min) e de OE <i>C. sinensis</i> (10%, durante 30 min) no teste de suspensão pela cauda (6 minutos).	123
Figura 52 - Cromatogramas: (a) OE de <i>C. sinensis</i> analisado por CG/EM; (b) OE de <i>C. aurantium</i> analisado por CG/EM; (c) plasma de camundongo analisado por HS-CG/EM após a inalação do OE de <i>C. sinensis</i> (10%, durante 30 min); (d) plasma de camundongo analisado por HS-CG/EM após a inalação do OE de <i>C. aurantium</i> (10% OE, durante 30 min).	125
Figura 53 - Espectros de massa de identificação e principais fragmentos <i>m/z</i> (abundância %) do beta-mirceno,	127

limoneno, linalol e acetato de linalila.

Figura 54 -	Curva de calibração da MEL obtida no equipamento Luminex [®] .	129
Figura 55 -	Curva de calibração da CORT no equipamento Luminex [®] .	130
Figura 56 -	Concentrações plasmáticas da MEL obtidas por imunoensaio no equipamento Luminex [®] no plasma dos camundongos após a inalação durante 30 min do OE de <i>C. aurantium</i> (10%) e de <i>C. sinensis</i> (10%).	131
Figura 57 -	Concentrações plasmáticas da CORT obtidas por imunoensaio no equipamento Luminex [®] no plasma dos camundongos após a inalação durante 30 min dos OE de <i>C. aurantium</i> (10%) e de <i>C. sinensis</i> (10%).	131
Figure 58 -	Biotransformação de linalol à acetato de linalila através da acetilação pela co-enzima acetil-CoA-tioéter (CH ₃ COSCoA).	135
Figure 59 -	Metabolização do linalol à acetato de linalila através de hidrólise no organismo do camundongo.	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituição dos OE de <i>C. aurantium</i> reportados na revisão da literatura.	58
Tabela 2 -	Constituição dos OE de <i>C. sinensis</i> reportados na revisão da literatura.	59
Tabela 3 -	Revisão bibliográfica das ações psicofarmacológicas atribuídas aos OE <i>Citrus</i> , <i>Lavandula officinalis</i> rica em linalol e componentes linalol e limoneno em humanos.	66
Tabela 4 -	Revisão bibliográfica das ações psicofarmacológicas atribuídas aos OE de <i>Citrus</i> , <i>Lavandula officinalis</i> rica em linalol e componentes linalol e limoneno em animais roedores.	67
Tabela 5 -	Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de MEL em diversas matrizes de humanos e de animais roedores.	83
Tabela 6 -	Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de COR e CORT em diversas matrizes de humanos e de animais roedores.	84
Tabela 7 -	Concentrações de MEL e CORT em fluidos biológicos de roedores de acordo com o horário de 24 hs do ciclo claro-escuro segundo dados bibliográficos.	85
Tabela 8 -	Resultados das quantidades relativas dos componentes dos OE analisados por CG/EM.	116
Tabela 9 -	Resultados das quantidades relativas dos componentes limoneno e linalol, percentuais dos isômeros ópticos (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol, excesso enantiomérico (ee) e rotação óptica dos OE analisados por CG/EM e polarímetro.	117
Tabela 10 -	Resultados das quantidades relativas dos componentes dos OE de <i>C. sinensis</i> e <i>C. aurantium</i> no plasma dos camundongos analisados por HS-CG/EM, e nos respectivos OE analisados por CG/EM.	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação botânica do gênero <i>Citrus</i> e algumas de suas espécies cultiváveis.	29
Quadro 2 - Número de metabólitos secundário.	35
Quadro 3 - Código identificador dos OE analisados.	93
Quadro 4 – Dados dos OE de <i>Citrus aurantium</i> Lineu analisados.	94
Quadro 5 – Dados dos OE de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck analisados.	94
Quadro 6 - Dados das microesferas do kit comercial Rat Stress Hormone (#RSHMAG-69K).	105
Quadro 7 - Dados dos reagentes do kit comercial Rat Stress Hormone (#RSHMAG-69K).	105
Quadro 8 - Soluções padrão de trabalho.	107
Quadro 9 - Concentrações das soluções padrão de CORT e de MEL.	108
Quadro 10 - Ajuste do <i>software</i> .	109
Quadro 11 - Dados de validação do método no sistema Luminex®.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE: acetato de etila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BZP: benzodiazepínico

C.: *Citrus*

CG/EM: Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massa

CG/DIC: Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COR: Cortisol

CORT: Corticosterona

d: destilação

DZP: Diazepam

ee: excesso enantiomérico

EIA: enzimaímunoensaio (do inglês *enzymaimmunoassay*)

EM: erro médio

EUA: Estados Unidos da América

h: hora

HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

HS: do inglês *headspace*

i.p.: intraperitoneal

IMI: imipramina

IR: índice de retenção relativo

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

min: minutos

m/z: massa/carga

MEL: Melatonina

n: número de animais

nd: não detectado

ng/mL: nanograma/mililitro

OE: óleo essencial

pg/mL: picograma/mililitro

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

rpm: rotações por minuto

RIA: radioimunoensaio (do inglês *radioimmunoassay*)

s: segundos

SAL: solução salina

SNC: sistema nervoso central

SPA: substâncias psicoativas

SPE: extração por fase sólida (do inglês: *solid phase extraction*)

tr: tempo de retenção

µg/dL: micrograma/decilitro

µm: micrômetro

vial: recipiente de coleta e reação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. REVISÃO DO TEMA	29
3.1. A origem dos <i>Citrus</i>	29
3.2. A produção de espécies <i>Citrus</i> , de laranja e seus produtos: suco e óleo essencial	31
3.3. O óleo essencial nos <i>Citrus</i> e na laranja	34
3.4. Métodos de extração do OE	38
3.4.1. Extração por arraste de vapor	40
3.4.2. Extração por hidrodestilação	42
3.4.3. Extração por prensagem ou expressão	43
3.5. Métodos de análises do OE	44
3.5.1. Determinação dos constituintes dos OE por cromatografia em fase gasosa	45
3.5.2. Determinação dos constituintes dos OE com isomeria enantiomérica	45
3.5.2.1. Isomeria enantiomérica	45
3.5.2.2. Enantiômeros dos OE dos <i>Citrus</i>	48
3.5.2.3. CG/EM com coluna quiral	49
3.5.2.4. Determinação da Rotação Óptica ou Poder Rotatório	50
3.6. Principais constituintes do OE de <i>C. sinensis</i> e <i>C. aurantium</i> , suas estruturas químicas e rotas de formação metabólicas	51
3.7. Atuação terapêutica do OE no SNC	60
3.8. Detecção do OE nos fluídos biológicos	68
3.9. Ensaios Comportamentais com animais	69

3.9.1. Modelos experimentais de ansiedade	69
3.9.1.1. Caixa claro-escuro	70
3.9.1.2. Atividade exploratória e locomotora	71
3.9.2. Modelos experimentais de atividade tipo antidepressiva	72
3.9.2.1. Teste de suspensão pela cauda	72
3.10. Doenças da área da saúde mental	73
3.10.1. O estado emocional de ansiedade e o hormônio metalonina (MEL)	74
3.10.2. O estado emocional de estresse e o hormônio corticosterona (CORT)	80
3.11. Métodos de análise da MEL e da CORT	82
3.11.1. Método de análise da MEL e da CORT por imunoensaio com microesferas magnetizadas da tecnologia Luminex®	86
4. MATERIAIS E MÉTODOS	91
4.1. Extração e análise dos componente dos OE	91
4.1.1. Método de extração dos OE e cálculo do rendimento	95
4.1.2. Método de identificação dos componentes químicos dos OE através de CG/EM	95
4.1.3. Método de determinação do percentual dos enantioméricos quirais do limoneno e do linalol	97
4.1.4. Método de determinação da rotação óptica dos OE	97
4.2. Ensaio comportamentais em camundongos e análise em material biológico	98
4.2.1. Animais	98
4.2.2. Critérios de escolha dos óleos essenciais	98
4.2.3. Câmara de inalação	99
4.2.4. Materiais e equipamentos utilizados	100
4.2.5. Avaliação da atividade ansiolítica	101
4.2.6. Avaliação da atividade locomotora	101

4.2.7. Avaliação da atividade antidepressiva	102
4.2.8. Coleta do plasma	103
4.3. Pesquisa dos componentes dos OE inalados no plasma	104
4.4. Análise simultânea de MEL e CORT no plasma por imunoensaio sistema Luminex®	104
4.4.1. Materiais e reativos	105
4.4.2. Preparação dos reativos	106
4.4.3. Ajuste do <i>software</i>	108
4.4.4. Procedimento de preparo	110
4.4.5. Dados de validação da metodologia	113
5. RESULTADOS	115
5.1. Extração e análise dos componentes dos OE de <i>C. aurantium</i> e <i>C. sinensis</i> por CG/EM.	115
5.2. Ensaio comportamentais em camundongos após a inalação dos OE de <i>C. sinensis</i> (código identificador DCspp) e de OE de <i>C. aurantium</i> (código identificador CCafv).	120
5.2.1. Avaliação da atividade ansiolítica no teste claro-escuro	120
5.2.2. Avaliação da atividade locomotora	122
5.2.3. Avaliação da atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda	123
5.3. Análise do plasma dos camundongos	124
5.3.1. Análise por HS-CG/EM	124
5.3.2. Medição de MEL e CORT no plasma dos camundongos por imunoensaio Luminex®	129
6. DISCUSSÃO GERAL	133
7. CONCLUSÕES	151
8. REFERÊNCIAS	153
9. ANEXOS	187
ANEXO I - Carta de Aprovação na CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do projeto n.º 18717 e adendo.	187

ANEXO II - Autorizações para utilização dos OE e divulgação das marcas das empresas Laszlo Aromaterapia Ltda, Ferquima Ind. e Com. Ltda, Verbhena Ltda	189
ANEXO III - Intercâmbio com a Universidad Complutense de Madrid - Facultad de Medicina	192
ANEXO IV - Manuscrito do artigo " <i>Chemical Components of Citrus Essential Oils from Brazil</i> "	193



1.INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário internacional pela extraordinária diversidade de sua flora. Especialistas em economia relatam que a citricultura é considerada um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio. Em relação à produção mundial de laranja, o Brasil produziu 19.811.064.000 toneladas desta fruta em 2011 (FAO, 2014), detendo 30% do mercado mundial. Quanto à produção de suco de laranja, o Brasil chegou a aproximadamente 60% deste mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2012b). Além do suco, esta produção gera outros produtos, sendo especialmente importantes os óleos essenciais (OE). O OE de laranja-doce já foi responsável por 86% das exportações dos cítricos, o de limão 8%, o de lima 3%, outros cítricos 2% (como toranja, tangerina, entre outros) e os de bergamota e *petitgrain* por aproximadamente 1%, no período de janeiro de 2005 a outubro de 2008 (BIZZO *et al.*, 2009).

O uso dos OE fundamenta-se nas suas propriedades físico-químicas, organolépticas (sabor e gosto) e aromáticas (nota perfumística ou olfativa) (FROCHOSO, 2004; BORRULL, 2012). Eles fornecem matéria-prima para uma grande variedade de indústrias: resinas para papéis e têxteis, desengraxantes, aglutinantes usados no preparo de inseticidas, antissépticos, produtos farmacêuticos, perfumaria, alimentos, condimentos e como coadjuvantes em medicamentos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006). Na última década, a indústria farmacêutica tem investido em pesquisas de avaliação de odores naturais que atuem no estado emocional humano (HOWARD *et al.*, 2008; CASES *et al.*, 2011; ROLLS, 2014).

Em se tratando de saúde mental, muitas são as publicações da Organização Mundial da Saúde (OMS) contendo recomendações e diretrizes sobre a problemática de dois estados mentais patológicos que atingem a humanidade como um todo: a ansiedade e o estresse (WHO, 2000; OMS, 2001; WHO, 2013); sendo que estudos indicam a possibilidade de avaliação

dos níveis destas duas patologias, através da quantificação de alguns parâmetros biológicos, dentre eles os hormônios melatonina (MEL) e cortisol (COR) ou corticosterona (CORT) (SPENCE *et al.*, 2004; KELLER, 2006; REITER *et al.*, 2009; BERGAMINI *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2014).

Em 2010, um laboratório da Alemanha registrou e lançou no mercado o medicamento Silexan[®], cuja composição de cada cápsula é 160 mg de OE de lavanda *Lavandula officinalis*, contendo como principais constituintes o linalol e o acetato de linalila (Silexan[®], register 2009). Os resultados das investigações evidenciaram a ação ansiolítica deste medicamento ao ser ingerida 01 (uma) cápsula diariamente por um período de 14 dias consecutivos (KASPER, 2013), demonstrando que Silexan[®] é tão eficaz quanto o benzodiazepínico (BDZ) lorazepam em adultos com desordem de ansiedade generalizada (WOELK e SCHLÄFKE, 2010; KASPER, 2013). A ação ansiolítica do Silexan[®] não se caracteriza como a ação de um BDZ, o que pode explicar a ausência de tolerância, dependência e síndrome de abstinência pelo OE de lavanda (SILENIEKS *et al.*, 2013). UEHLEKE e colaboradores (2012) em seus resultados, constataram a ação do Silexan[®] também em situações de estresse pós-traumático, vindo ao encontro da investigação de TODA e MORIMOTO (2008), relativo à redução do estresse em voluntários humanos quando submetidos à inalação do óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*).

Os OE de espécies de *Citrus* e os isolados de seus extratos, como o mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila possuem resultados indicativos de seu potencial terapêutico na saúde mental, devido a suas propriedades ansiolíticas (CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; PULTRINI *et al.*, 2006; FATURI *et al.*, 2010; LINCK *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; JAFARZADEH *et al.*, 2013) e sedativas (SANTOS *et al.*, 1988; SANGUINETTI, 1989; VASQUEZ *et al.*, 1997; LEHRNER *et al.*, 2000; CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; LINCK *et al.*, 2009; BUCHBAUER e ILIC, 2013).

Esta tese estudou a ação psicofarmacológica da inalação dos OE de *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga) e de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce), os quais possuem entre seus componentes o mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila. Estes OE são obtidos como produtos da

indústria de sucos cítricos, a qual possui uma importância econômica regional, no Estado do Rio Grande do Sul, nacional e internacional (WREGE *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2010; CITRUSBR, 2012; JOUE, 2013). A aplicação destes produtos e seus constituintes no auxílio terapêutico das patologias da área da saúde mental é promissor, tanto pelo seu baixo custo frente a outros investimentos, como pela redução dos efeitos colaterais em relação aos medicamentos tradicionais (AUCHEWSKI *et al.*, 2004; MUGUNTHAN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013). Optou-se por ensaios comportamentais com camundongos para a avaliação da ansiedade e da atividade tipo antidepressiva, bem como foi escolhida a matriz biológica plasma para a detecção dos componentes do OE inalado e a quantificação dos hormônios MEL e CORT.



2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Obter o perfil químico dos óleos essenciais de *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce) e avaliar a ação psicofarmacológica da inalação destes OE em camundongos.

2.2. Objetivos específicos, incluem:

- Analisar quimicamente os OE de *C. aurantium* e *C. sinensis* comercializados no Brasil para conhecer a sua constituição química, levando em consideração também os isômeros ópticos dos componentes limoneno e linalol.
- Extrair o OE de plantas das espécies de *C. aurantium* e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, do pericarpo e das folhas, por extração por arraste de vapor e hidrodestilação. Verificar o rendimento das extrações, a constituição química e os isômeros ópticos dos componentes limoneno e linalol dos OE obtidos.
- Realizar o estudo comparativo entre os OE extraídos em laboratório e os provenientes de marcas comerciais.
- Avaliar a ação da inalação do OE de *C. aurantium* e *C. sinensis* no comportamento de camundongos.
- Desenvolver metodologia analítica CG/EM com amostragem por headspace e detectar em plasma de camundongos os componentes dos OE inalados.
- Quantificar os hormônios MEL e CORT, simultaneamente, por metodologia de imunensaio Luminex® no plasma dos camundongos após a inalação dos OE.
- Avaliar se o protocolo aplicado aos camundongos é estressante.

- Avaliar se o ensaio comportamental de suspensão pela cauda é estressante.



3. REVISÃO DO TEMA

3.1. A origem dos *Citrus*

Os *Citrus* pertencem à família *Rutaceae*, composta de 155 gêneros e 1.600 espécies aproximadamente, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. Estima-se que este gênero tenha surgido há entre 20 a 30 milhões de anos. No Brasil, a família *Rutaceae* está representada por cerca de 29 gêneros e 182 espécies (CORAZZA-NUNES *et al.*, 2005).

No Quadro 1 está apresentada a classificação botânica do gênero *Citrus* e algumas das espécies cultiváveis, demonstrando a importância econômica de seus frutos.

Quadro 1 - Classificação botânica do gênero *Citrus* e algumas de suas espécies cultiváveis*.

Família: <i>Rutaceae</i>
Sub-família: <i>Aurantioideae</i>
Tribo: <i>Citreae</i>
Sub-tribo: <i>Citrinae</i>
Genero: <i>Citrus</i>
Espécies (algumas delas):
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle (lima ácida galego)
<i>Citrus aurantium</i> L. (laranja azeda)
<i>Citrus deliciosa</i> Tenore (mexirica do Rio)
<i>Citrus fortunella</i> (tangerina murcot)
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck (toranja)
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka (lima ácida Tahiti)
<i>Citrus limettioides</i> Tanaka (lima da Pérsia)
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. (limão siciliano)
<i>Citrus limonia</i> Osbek (limão cravo)
<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr. (pomelo)
<i>Citrus medica</i> L. (cidra, citron)
<i>Citrus paradisi</i> Macfad. (pomelo)
<i>Citrus paradisi</i> X <i>Poncirus trifoliata</i> (citromelo swingle)
<i>Citrus reshini</i> (Hayata) hort. ex. Tanaka (tangerina sunki)

<i>Citrus reshni</i> Nortex-tan, <i>Citrus reshini</i> hort. ex Tanaka (tangerina Cleopatra)
<i>Citrus reticulada</i> sinensis (tangerina murcot)
<i>Citrus reticulata</i> Blanco (mandarina, cravo, tangerina comum)
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck (laranja doce)
<i>Citrus sunki</i> Nortex Jan (tangerina sunki)

*(ARAÚJO *et al.*, 2003; MABBERLEY, 2004; CORAZZA-NUNES *et al.*, 2005; KOLLER *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2012b; GARCIA-LOR *et al.*, 2013)

A laranja foi trazida originalmente do sul da Ásia, provavelmente da região acerca da Índia, China e Golfo de Bengala, por volta de 4.000 anos atrás (GMITTER Jr. *et al.*, 1990). O comércio entre as nações e as guerras propiciaram a expansão do cultivo dos *Citrus*, assim na Idade Média, a laranja foi levada pelos árabes para a Europa. Nos anos de 1.500, nas grandes expedições navais, mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano. Introduzida no Brasil logo no início da colonização, a laranja encontrou em nosso país melhores condições para desenvolver-se do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo o território nacional (LASZLO, 2008; NEVES *et al.*, 2010), Figura 1.

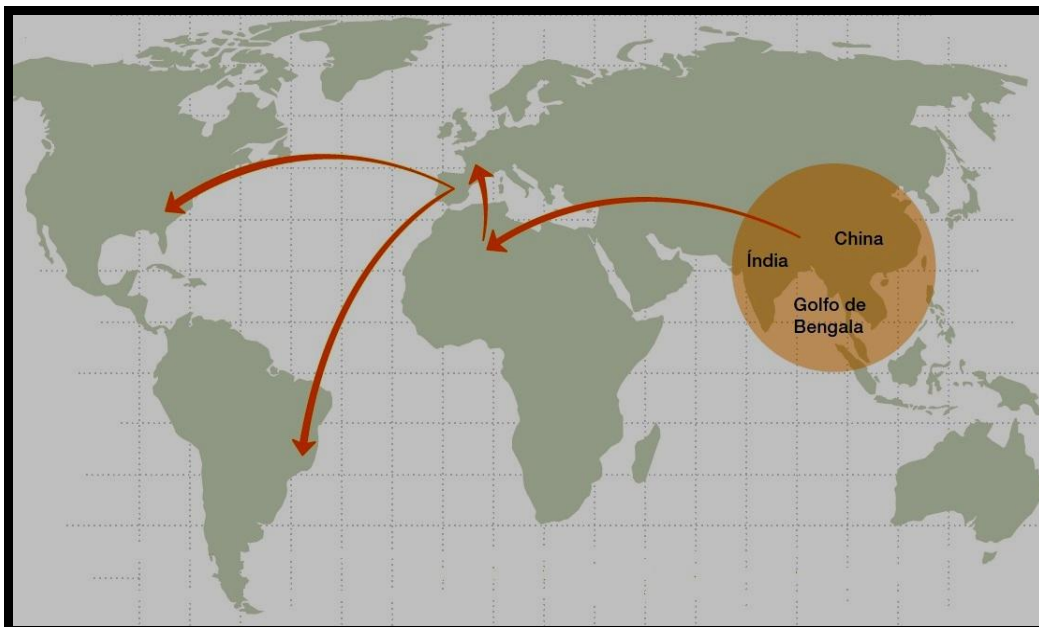


Figura 1 - Mapa mundial da origem e distribuição da cultura da laranja (Adaptação de NEVES *et al.*, 2010).

3.2. A produção de espécies *Citrus*, de laranja e seus produtos: suco e óleo essencial

O Brasil destaca-se no cenário internacional pela extraordinária diversidade de sua flora. Especialistas em economia relatam que a citricultura é considerada um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio. Em relação à produção mundial de laranja, o Brasil produziu 19.811.064 toneladas desta fruta em 2011 (FAO, 2014), detendo 30% do mercado mundial, sendo que quanto à produção de suco de laranja, chegou-se a aproximadamente 60% deste mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2012b). Na Figura 2, apresentamos a representação gráfica da hegemonia do Brasil na produção mundial de laranja.

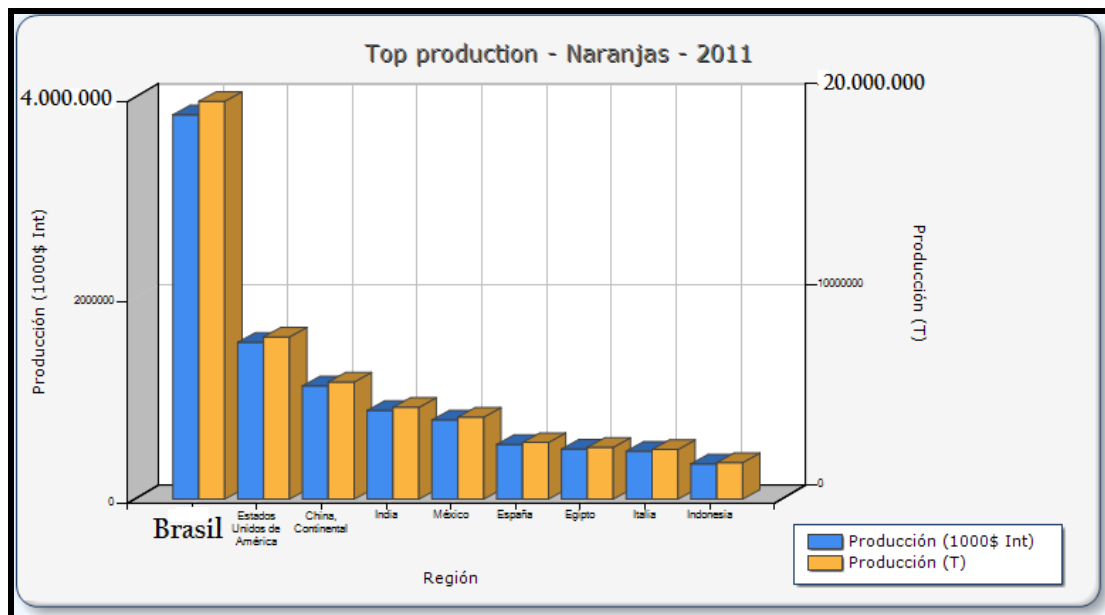
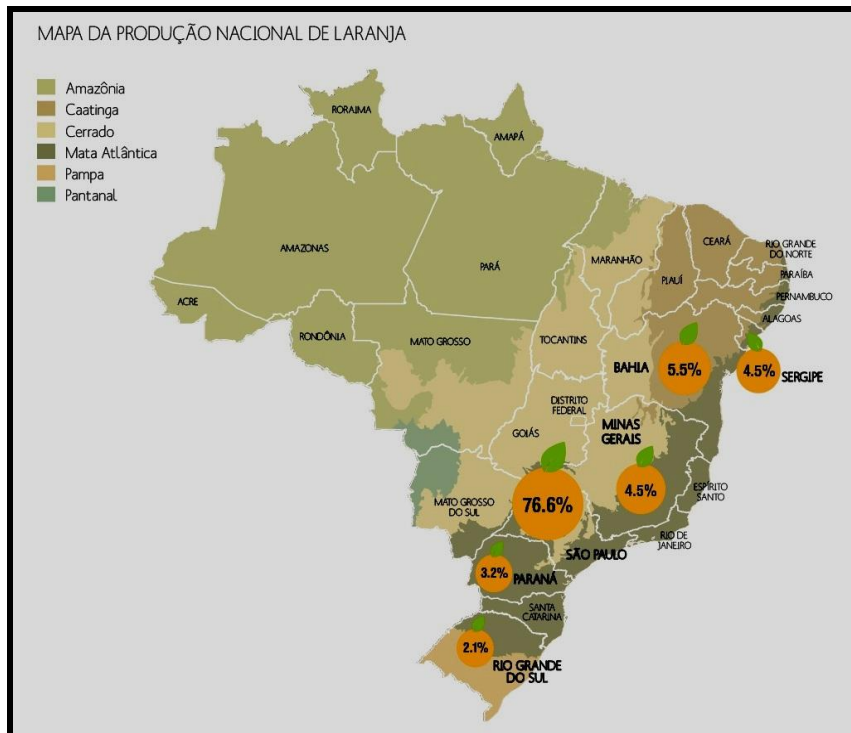
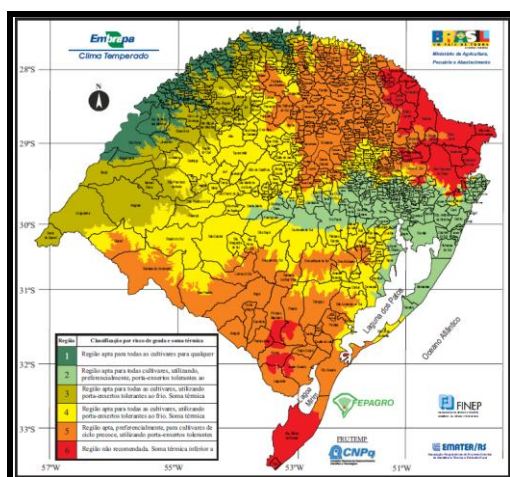


Figura 2 - Produção mundial de laranja em 2011 (Fonte: FAO, 2014).

A citricultura destacou-se em vários estados do Brasil como São Paulo (76,6% da produção nacional), Rio de Janeiro, Bahia, Sergipe, Paraná e nos últimos tempos o Rio Grande do Sul (2,1% da produção nacional) vem despontando como um estado promissor (WREGGE *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2010; IBGE, 2012) (Figura 3a). O mapeamento analítico das zonas adequadas no estado do Rio Grande do Sul para o plantio de *Citrus* é mostrado na Figura 3b.



(a)



(b)

Região	Classificação por risco de geada e soma térmica
1	Região apta para todas as cultivares para qualquer
2	Região apta para todas cultivares, utilizando, preferencialmente, porta-enxertos tolerantes ao
3	Região apta para todas as cultivares, utilizando porta-enxertos tolerantes ao frio. Soma térmica
4	Região apta para todas as cultivares, utilizando porta-enxertos tolerantes ao frio. Soma térmica
5	Região apta, preferencialmente, para cultivares de ciclo precoce, utilizando porta-enxertos tolerantes
6	Região não recomendada. Soma térmica inferior a

Figura 3 - (a) Mapa da produção nacional de laranja (Fonte: CITRUSBR, 2012); (b) Mapeamento de aptidão para a cultura de *Citrus* no Rio Grande do Sul (Fonte: WREGGE *et al.*, 2004).

A produção dos *Citrus* gera fruta *in natura*, suco (concentrado e não concentrado), OE, terpenos, D-limoneno e outros, fornecendo suporte para as indústrias de alimentos, cosméticos, produtos de limpeza e ração animal. Interessante constatar que mesmo os terpenos e o D-limoneno sendo constituintes integrantes dos OE, possuem um valor de mercado em separado,

devido a suas propriedades para as indústrias de cosméticos, químicos e desengraxantes (BERGAMASCHI, 2011). Na Figura 4 apresentamos esta cadeia econômica parcial da produção de *Citrus* no Brasil em 2008/2009 e na Figura 5 um detalhamento de diversos mercados de aplicações deste OE.

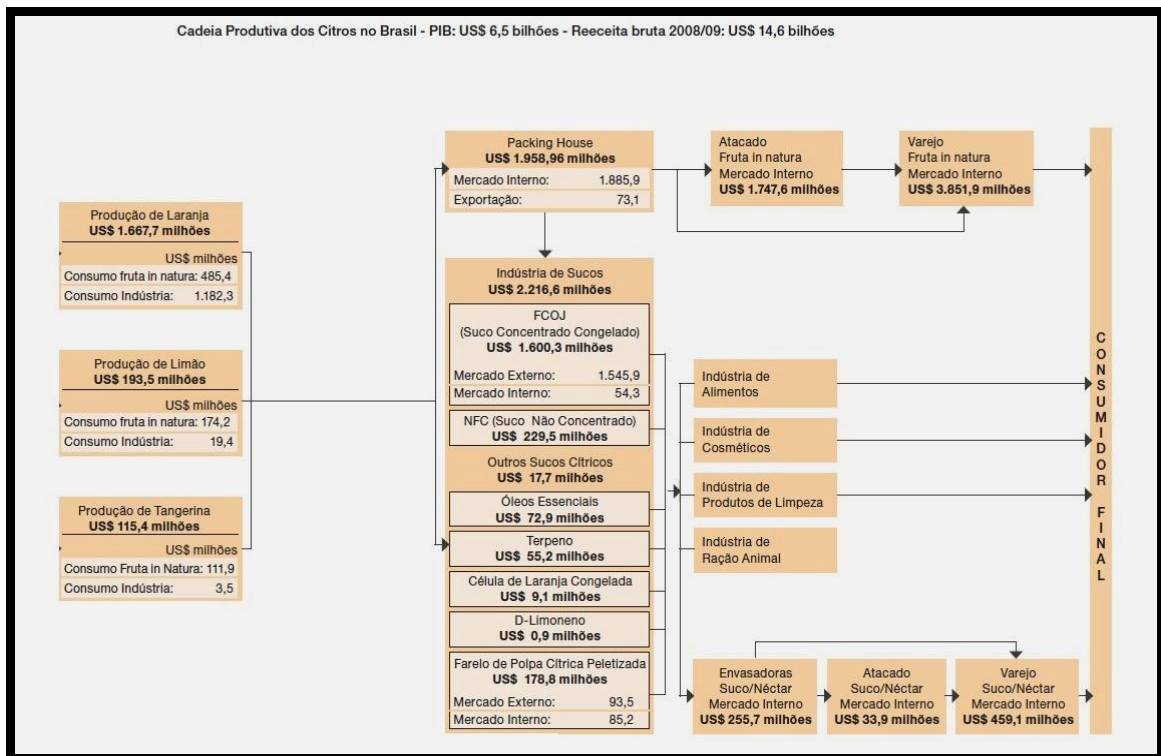


Figura 4 - Cadeia econômica parcial da produção de *Citrus* no Brasil em 2008/2009 (Adaptado de NEVES, 2010).

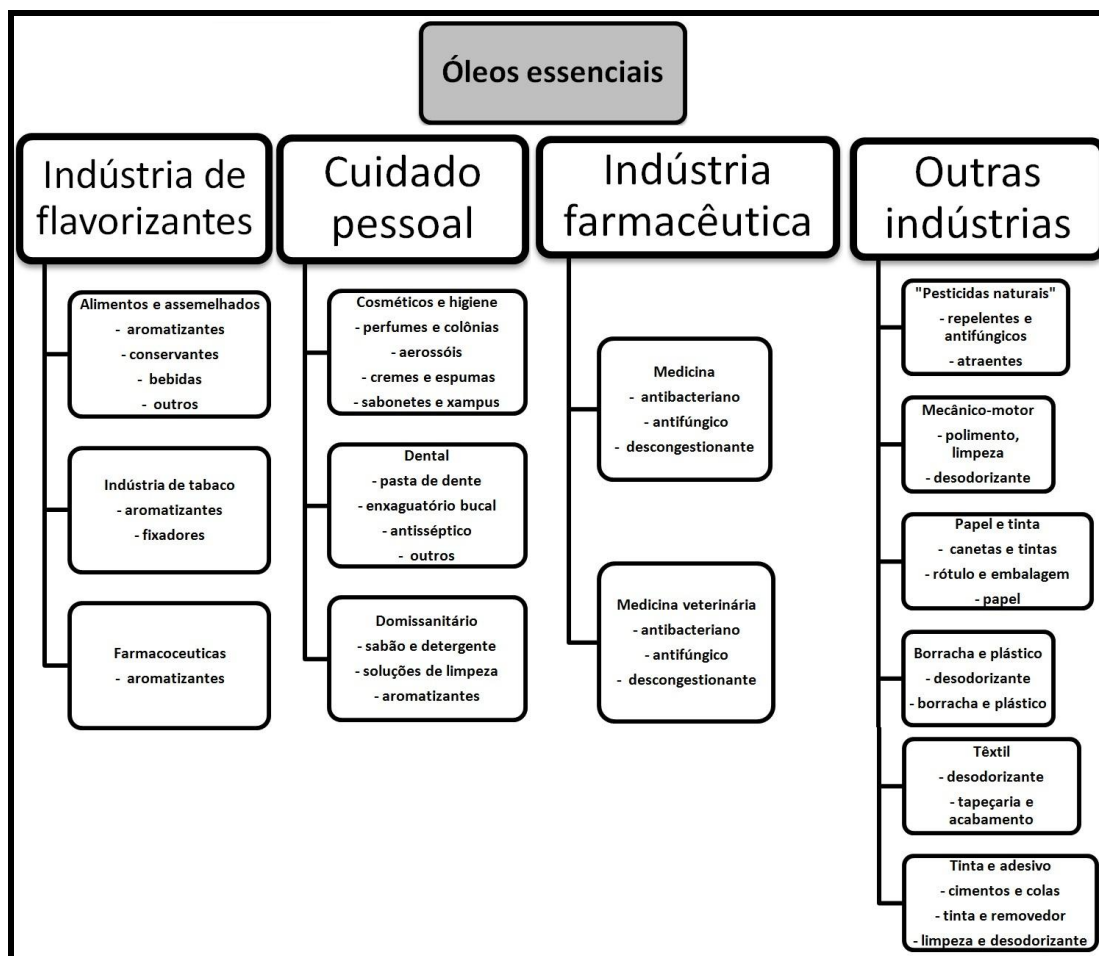


Figura 5 - Aplicações dos OE na indústria e em produtos (Adaptado de UNIDO/FAO, 2005).

3.3. O óleo essencial nos *Citrus* e na laranja

As espécies vegetais produzem metabólitos primários, tais como açúcares e nitrogenados, e metabólitos secundários, aqueles que não são utilizados diretamente para sua alimentação e nutrição (DUDAREVA *et al.*, 2013). Na Figura 6 apresentamos as funções desempenhadas pelos metabólitos secundários, e entre eles os alcalóides, os flavonóides, as saponinas e os OE. O número de metabólitos secundários conhecidos de acordo com sua classificação, encontram-se no Quadro 2, onde destacamos os monoterpenos e sesquiterpenos por serem a composição majoritária dos OE dos *Citrus*, em especial da laranja *C. sinensis* e da *C. aurantium* (ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2010; WINK, 2010, 2011).

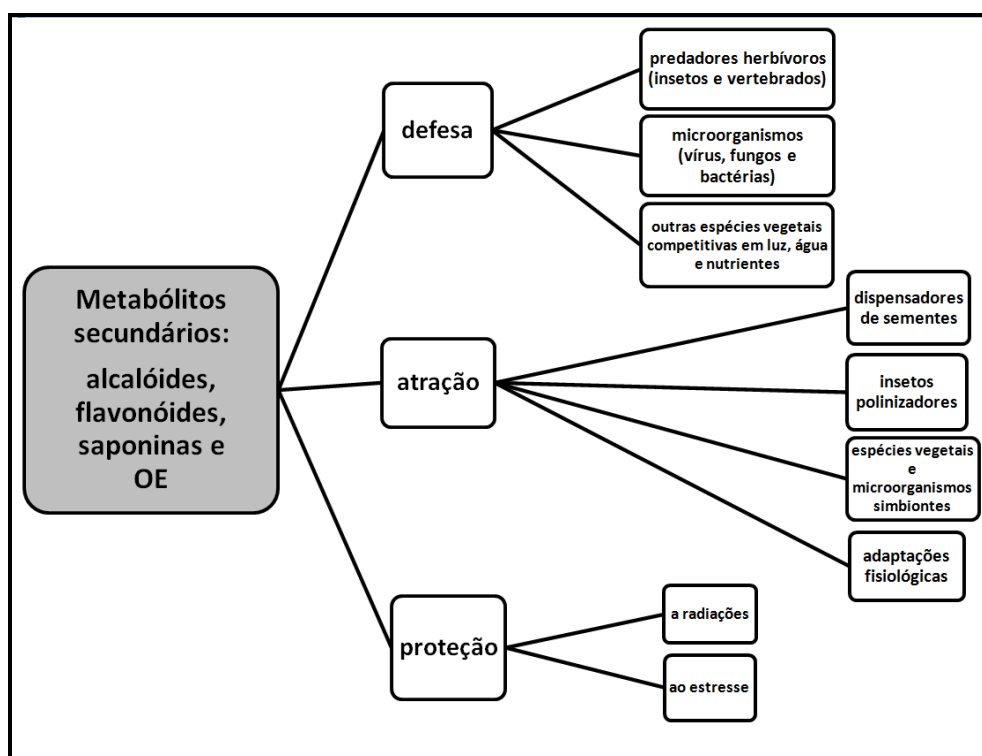


Figura 6 - Funções desempenhadas pelos metabólitos secundários nas espécies vegetais: alcalóides, flavonóides, saponinas e OE (Adaptado de WINK, 2010 e 2011).

Quadro 2 - Número de metabólitos secundário*.

Metabólitos secundários	Número aproximado
Nitrogenados	
alcalóides	21000
aminoácidos não proteicos	700
aminas	100
glicosídeos cianogênicos	60
glucosinolatos	100
alcamides	150
lecitinas, peptídeos, polipeptídeos	2000
Não-nitrogenados	
monoterpenos (C ₁₀)	2500
sesquiterpenos (C ₁₅)	5000
diterpenos (C ₂₀)	2500
triterpenos, esteroides, saponinas (C ₃₀ , C ₂₇)	5000
tetraterpenos (C ₄₀)	500

total de terpenóides	acima de 22000
flavonóides, taninos	5000
fenilpropanoides, ligninas, cumarínicos	2000
poliacetilenos, ácidos graxos, graxas	1500
policetides	750
carboidratos, ácidos orgânicos	200

*WINK, 2010

Os OE podem ser encontrados em todo tecido vivo da planta, geralmente concentrados nas cascas, folhas, caules, raízes, flores, rizomas e nas sementes (GOMES *et al.*, 2010). BENNICI e TANI (2004) estudaram a formação das cavidades secretoras de OE nas espécies de *Citrus sinensis* e *Citrus limon*. No gênero *Citrus*, o desenvolvimento do fruto consiste na formação de três estruturas: o exocarpo (flavedo), o mesocarpo (albedo) e o endocarpo. Nas camadas mais externas do exocarpo, grupos de células começam a formar as cavidades secretoras repletas de OE rico em monoterpenos. Nos *Citrus*, estas cavidades secretoras de OE são formadas a partir do processo denominado esquizolisigenia, onde ocorre morte celular seguida de rearranjo espacial das células epiteliais (BENNICI e TANI, 2004; CHEN e WU, 2010). Devido a análises biomorfológicas, fisiológicas e de desenvolvimento, considera-se o pericarpo, também denominado "casca do fruto", a junção do exocarpo com o mesocarpo (SALUNKHE e KADAM, 1995; LASKOWSKI *et al.* 2006; SINHA *et al.* 2012). A Figura 7 mostra estas estruturas secretoras de OE.

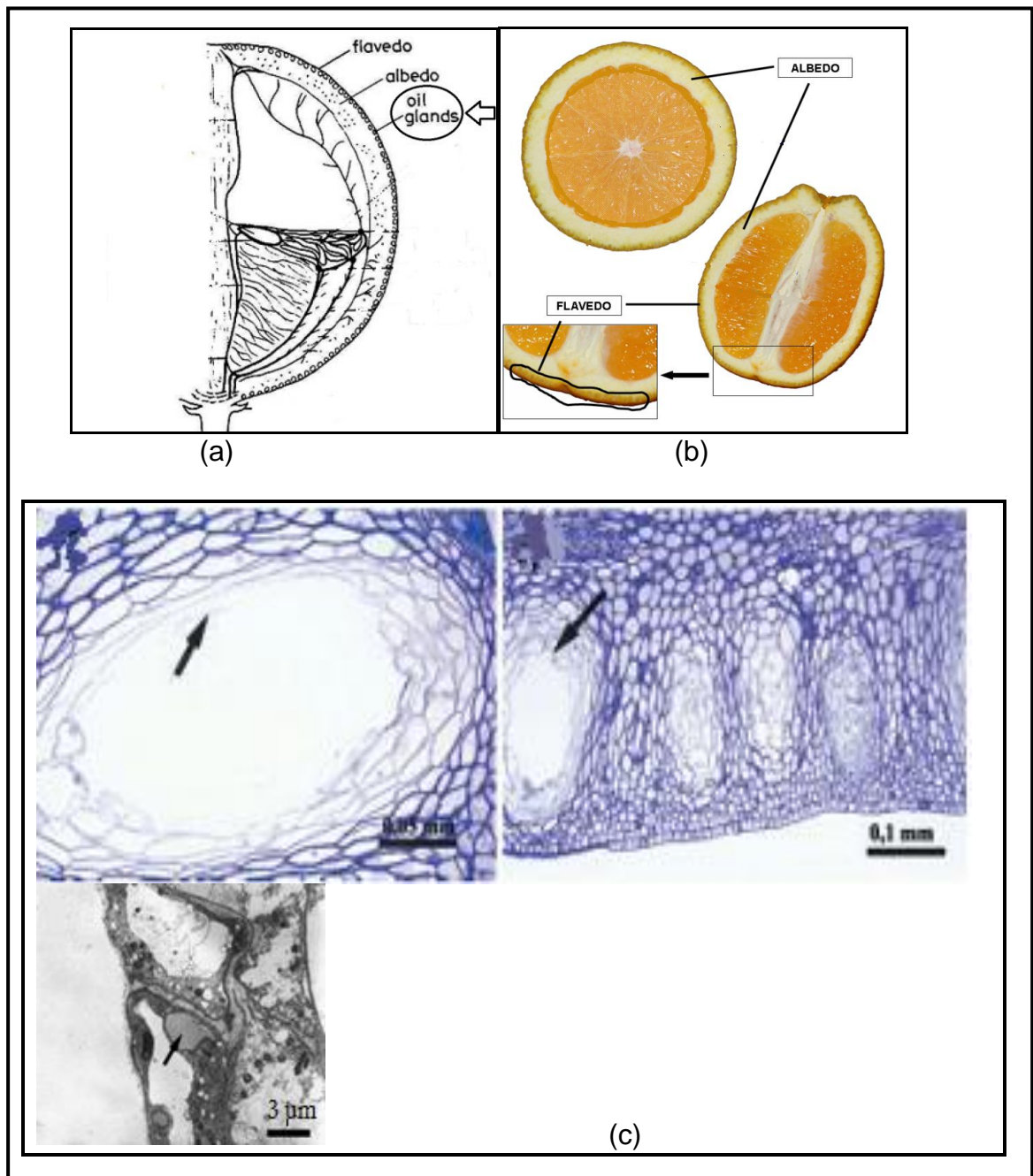


Figura 7 - Imagens das estruturas secretoras de OE nos *Citrus*: (a) desenho em corte longitudinal do fruto, com destaque para as camadas flavedo e albedo, que formam o pericarpo ("casca do fruto"), e glândulas de OE "oil glands" (Adaptado de SPIEGEL-ROY e GOLDSCHMIDT, 1996); (b) cortes transversal e longitudinal do fruto de *Citrus* com destaque para as camadas flavedo e albedo (Fonte: *Orange cross section picture with legend*, CC-BY-SA-2.5; Released under the GNU Free Documentation License; CC-BY-SA-3.0-MIGRATED); (c) Fotografias microscópicas das cavidades glandulares de OE, indicadas com setas (Adaptado de BENNICI e TANI, 2004).

3.4. Métodos de extração do OE

Os OE são definidos como o "*produto obtido a partir da matéria-prima vegetal, quer por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de Citrus por um processo mecânico (de prensagem ou expressão), ou por meio de destilação. O OE pode sofrer tratamentos físicos (por exemplo, redestilação, aeração), que não envolvam mudanças significativas na composição. Após a destilação, o óleo essencial é fisicamente separado da fase de água*" (ISO/DIS 9235.2, 1997).

A ANVISA (ANVISA, RDC n.º2 de 15/01/2007) define OE como: "*produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos.*"

Dentre os métodos mais utilizados para a obtenção dos OE de *Citrus* estão a prensagem a frio, a hidrodestilação e destilação por arraste de vapor (NJOROGE *et al.*, 2005; BAGETTA *et al.*, 2010; TRANCHIDA, *et al.*, 2011). A partir das definições apresentadas, constata-se que a forma ou o método de extração dos OE são de extrema importância. A Figura 8 apresenta alguns métodos industriais de extração de produtos a partir de espécies vegetais, com destaque por sombreado para aqueles de onde se obtém os OE de *Citrus*.

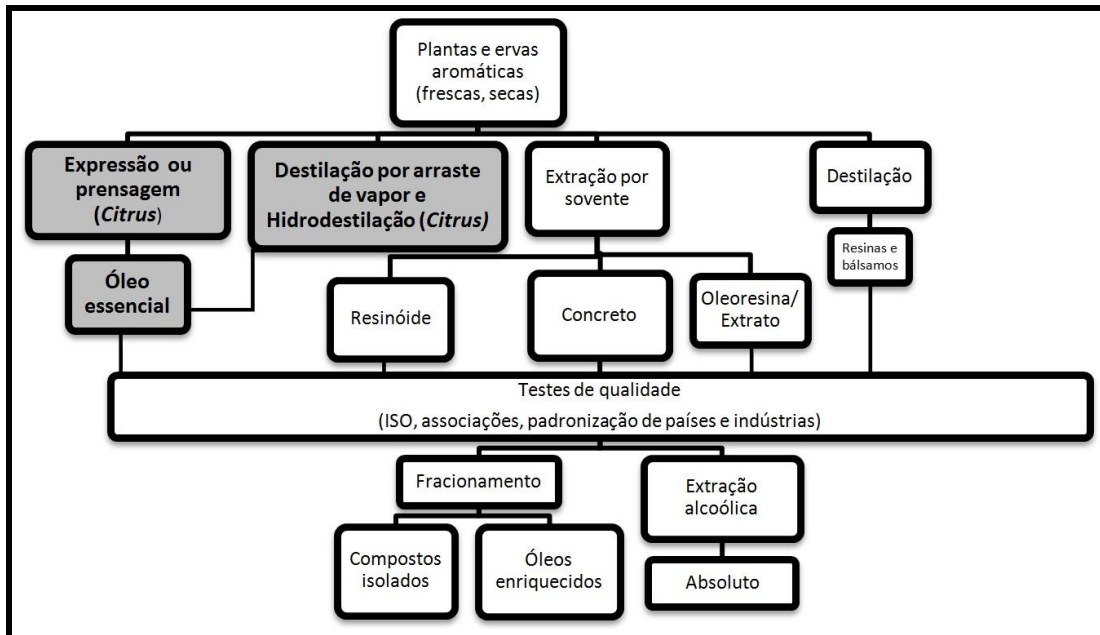


Figura 8 - Organograma demonstrativo dos processos industriais de extração de produtos a partir de espécies vegetais, com destaque por sombreamento para os métodos aplicados aos *Citrus* para a obtenção de OE, "Essential oil" (Adaptado de UNIDO/FAO, 2005).

Os OE de *C. sinensis* e *C. aurantium* que possuem produção industrial são:

1. flores de *C. aurantium* por arraste de vapor: obtem-se o OE néroli (PEYRON, 2004; CHEN *et al.*, 2008; AMMAR *et al.*, 2012);
2. folhas e pequenos frutos imaturos de *C. aurantium* por arraste de vapor: obtem-se OE *petitgrain* (PEYRON, 2004);
3. pericarpo de *C. sinensis* e *C. aurantium* por prensagem: obtem-se o OE laranja-doce (TIRADO, 1995; BANDONI, 2003, CHOI, 2003; TRANCHIDA, *et al.*, 2011);

Para fins de investigações em laboratório, os métodos mais utilizados são de arraste por vapor e de hidrodestilação:

1. folhas e pequenos frutos não maduros de *C. aurantium* por hidrodestilação (ELLOUZE *et al.*, 2012);
2. pericarpo de *C. aurantium* por arraste de vapor (CACCIONI *et al.*, 1998; CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002);
3. pericarpo de *C. aurantium* por hidrodestilação (PULTRINI *et al.*, 2006);
4. pericarpo de *C. sinensis* por hidrodestilação (SINGH *et al.*, 2010);
5. pericarpo de *C. sinensis* por arraste de vapor (CACCIONI *et al.*, 1998; EZEJIOFOR *et al.*, 2011; VELAZQUES-NUNES *et al.*, 2013);
6. folhas e pequenos frutos não maduros de *C. sinensis* por arraste de vapor (TIRADO, 1995; BANDONI, 2003);

Existem outros métodos de extração de OE, como a extração subcrítica e a supercrítica, os quais utilizam outros solventes ou co-solventes como fluido extrator, por exemplo o CO₂ (BANDONI, 2003; SANTOS *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2010; VARGAS *et al.*, 2013).

A seguir, abordagem dos métodos amplamente utilizados na produção dos OE de *C. sinensis* e *C. aurantium*, tanto na indústria como em investigações em laboratório.

3.4.1. Extração por arraste de vapor

A extração por arraste de vapor é uma das técnicas mais utilizadas para a extração de OE, por ser um método simples e com reduzido custo em relação a outros métodos. Baseia-se em extrair o OE a partir da ruptura da parede celular das estruturas secretoras com a passagem do vapor d'água. O sistema integra um gerador de vapor d'água, uma caldeira na indústria e um vaso recipiente com água em laboratório. Este vapor d'água percola o vaso de extração onde está o leito com a espécie vegetal. A dinâmica do processo

ocorre com o duto do vapor entrando na parte inferior deste leito, com a sua saída na parte superior. Em seguida, a mistura vapor d'água e OE em fase vapor deixa o leito da espécie vegetal, o vaso de extração e atinge um condensador. No condensador ocorre a liquefação. A diferença de densidade e solubilidade entre a água e o OE permitem a separação destes em duas fases líquidas (CASSEL e VARGAS, 2006). O processo de extração por arraste de vapor apresenta o inconveniente dos constituintes dos OE poderem sofrer degradação térmica ou hidrólise (BANDONI, 2003). Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (SIMÕES *et al.*, 2010). Na Figura 9 está representado o esquema de um extrator industrial de OE por arraste de vapor e na Figura 10, o aparato de laboratório denominado vidraria de *clevenger* utilizado para a extração de OE por arraste de vapor e por hidrodestilação.

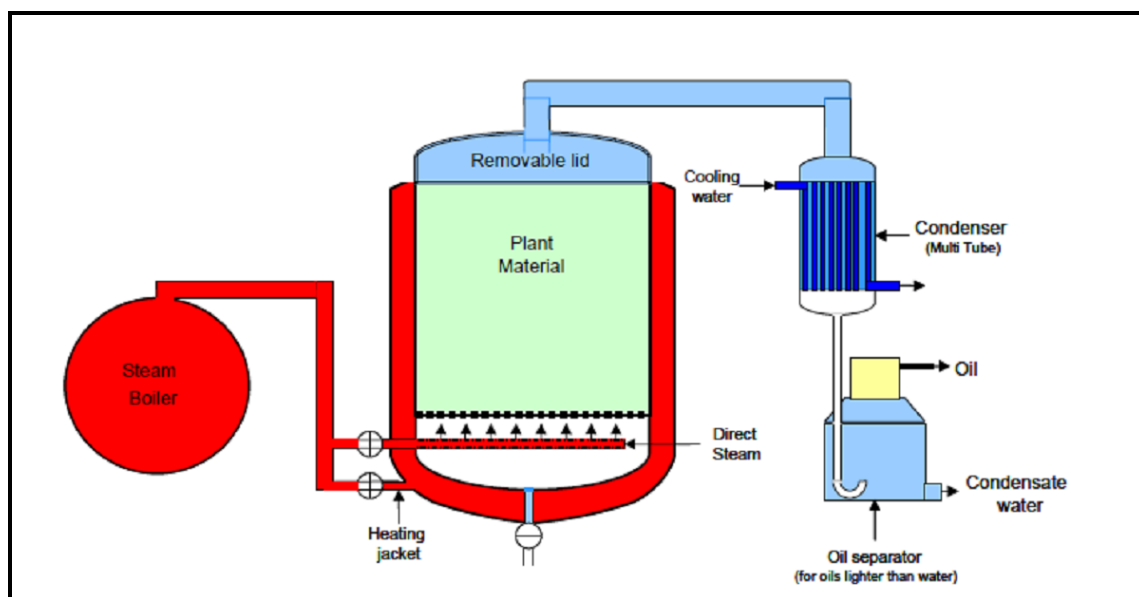


Figura 9 - Esquema de extrator industrial de OE por arraste de vapor (Adaptado de UNIDO/FAO, 2005).

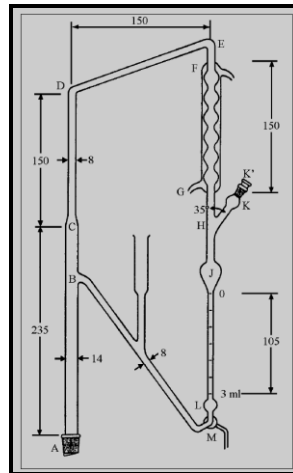


Figura 10 – Vidraria para a extração de OE de espécies vegetais, vidraria de *cleveenger* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.4.2. Extração por hidrodestilação

A extração por hidrodestilação é uma técnica muito utilizada em investigações laboratoriais (HOSNI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012a). Apesar de semelhante à técnica anterior, apresenta a diferença da água estar no mesmo recipiente ou vaso da espécie vegetal, assim ambos são aquecidos simultaneamente, deste modo o contato do OE com a água ocorre quando esta ainda está no estado líquido. A partir daí o processo segue o mesmo princípio da descrição anterior.

Na Figura 11 apresentamos a vidraria de *cleveenger* acoplada ao vaso recipiente, onde é colocada a água juntamente com a espécie vegetal.

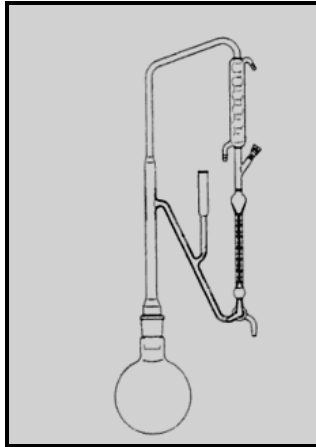


Figura 11 - Adaptação da vidraria de *clevenger* ao vaso recipiente onde água e espécie vegetal são adicionados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

3.4.3. Extração por prensagem ou expressão

A extração por prensagem ou expressão é conhecida desde o ano de 1776, geralmente aplicada a frutos de *Citrus*. Em plantas industriais de produção de suco, o fruto é espremido com a casca, gerando ambos os produtos líquidos, suco e OE, primeiramente misturados em uma emulsão. A emulsão pode ser desfeita por métodos de centrifugação e de resfriamento. O processo baseia-se na desagregação das estruturas secretoras do OE e recolhimento imediato deste, para evitar que seja absorvido pelo farelo esponjoso que resulta após este tipo de processo (BANDONI, 2003).

Os estágios e fenômenos que ocorrem durante a extração dos OE são:

- a) dilaceração das camadas do exocarpo (flavedo), do mesocarpo (albedo), do endocarpo, juntamente com as estruturas secretoras que contêm o OE;
- b) aumento da pressão junto às estruturas secretoras de OE, gerando uma força propulsora a partir da qual o OE flui para fora destas estruturas;
- c) abrasão do pericarpo (mesocarpo e exocarpo) formando partículas menores de OE.

A Figura 12 apresenta um esquema de equipamento industrial de prensagem e obtenção de suco e OE.

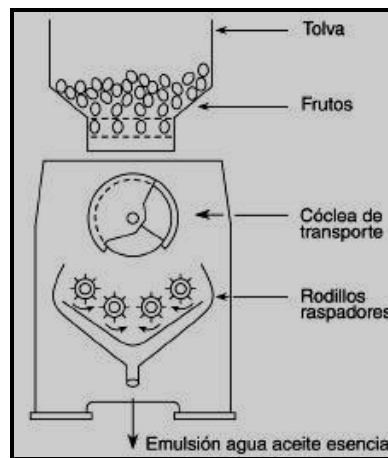


Figura 12 - Esquema de equipamento industrial de obtenção de suco e OE pelo método de prensagem ou espessão (Adaptado de BANDONI, 2003).

3.5. Métodos de análises do OE

Após a obtenção do OE, este pode ser submetido a muitos ensaios visando à obtenção de suas características físico-químicas, tais como densidade, índice de refração, acidez, miscibilidade em etanol, resíduo de evaporação, rotação óptica, ponto de solidificação, ponto de ebulição e também a análises que forneçam informações sobre a constituição química do OE (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; EZEJIOFOR *et al.*, 2011; AZIMOVA, 2012; TUREK, 2013).

As características dos OE foram compiladas em normas internacionais, como a *International Organization for Standardization* (ISO, Technical Committee ISO/TC 54 "Essential oils"), a *Association Française de Normalisation* (AFNOR) e as monografias das Farmacopéias, com o objetivo de estabelecer parâmetros e padrões aos produtos que são comercializados internacionalmente (UNIDO/FAO, 2005; MARTINS *et al.*, 2011; WOLFFENBÜTTEL, 2011).

3.5.1. Determinação dos constituintes dos OE por cromatografia em fase gasosa

A análise por cromatografia à gás é muito empregada com o objetivo de conhecer os constituintes químicos dos OE, devido às suas características de elevado número de constituintes com baixo peso molecular, elevada volatilidade, solubilidade em solventes orgânicos, entre outras (TIRADO, 1995; TRANCHIDA *et al.*, 2012; SMELCEROVIC *et al.*, 2013; TUREK, 2013; KUPSKA *et al.*, 2014).

A cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG/DIC) e a cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massa (CG/EM) são técnicas monodimensionais, ou seja, cromatografia em fase gasosa de uma dimensão (1D-CG), amplamente utilizadas (TRANCHIDA *et al.*, 2012; SMELCEROVIC *et al.*, 2013). Agregou-se a estas técnicas, a cromatografia bidimensional, a qual utiliza dois cromatógrafos à gás em sequência, acoplada ao detector de espectrometria de massa por tempo de voo (CGxCG/TOFEM, onde TOF significa *time-of-flight*, do inglês). A vantagem da cromatografia CGxCG/TOFEM é a possibilidade de identificar um maior número de componentes, que podem ter sido co-eluídos na 1D-GC, bem como melhorar a sensibilidade, seletividade e resolução. Por outro lado, esta técnica apresenta um custo e um tempo de análise dos dados mais elevados (BICCHI *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2007; CHEONG *et al.*, 2011; WELKE e ZINI, 2011; QIN *et al.*, 2013; SMELCEROVIC *et al.*, 2013; KUPSKA *et al.*, 2014; WELKE *et al.*, 2014).

3.5.2. Determinação dos constituintes dos OE com isomeria enantiomérica

3.5.2.1. Isomeria enantiomérica

Isômeros são compostos que possuem a mesma fórmula molecular, porém com fórmula estrutural distinta. Pode-se classificar os tipos de isomeria em planar e espacial. A isomeria planar estuda os isômeros de cadeia, posição,

função química, compensação e tautomeria. A isomeria espacial classifica-se em geométrica (ou *cis-trans*) e óptica (ou enantiomérica).

A isomeria espacial enantiomérica de alguns dos constituintes dos OE de *Citrus*, possui importância farmacológica, biológica e aromática (PADRAYUTTAWAT *et al.*, 1997; HEUBERGER *et al.*, 2001; HÖFERL *et al.*, 2006; SMITH, 2009; ÖZEK *et al.*, 2010; NÖLDNER *et al.*, 2011; WARD e WARD, 2012; LIMA *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2013).

Os enantioméricos, ou estereoisômeros, possuem atividade óptica porque apresentam centros assimétricos, denominados centros quirais (do grego, "*cheiral*"), em analogia à mão humana, a qual não pode ser sobreposta por estarem os dedos diametralmente em oposição espacial. Eles são compostos não sobreponíveis, mas simétricos em relação a um plano espacial, com a capacidade de desviar a luz polarizada opostamente. Uma mistura em partes iguais dos dois componentes enantioméricos denomina-se mistura racêmica, que é opticamente inativa (ELIEL e WILEN, 2008; SOLOMONS, 2012; GOLDBERG e WEISSMAN, 2014).

Existem vários sistemas de nomenclatura quiral. Discorreremos brevemente acerca dos mais importantes.

Louis Pasteur's, em 1848, descobriu esta quiralidade e criou uma das mais antigas nomenclaturas das estruturas quirais, baseada no desvio da luz polarizada. Quando a luz polarizada atravessa de forma linear, interagindo com a amostra enantiomérica e esta luz sofre uma rotação óptica para a direita, este composto é denominado dextro-rotatório: "*d*" (dextro) ou "+". Da mesma forma, quando a luz sofre uma rotação óptica para a esquerda, o composto é denominado levo-rotatório: "*l*" (levo) ou "-" (FLACK, 2009).

Em 1891, surge uma nova nomenclatura com FISCHER, que desenvolveu o sistema "*D*" e "*L*", ao considerar a estrutura do gliceraldeído, onde o carbono 2 é o centro assimétrico desta molécula. Assim, as hidroxidrilas posicionadas à direita receberam a denominação de D-gliceraldeído e as posicionadas à esquerda, L-gliceraldeído. Este sistema inicialmente

direcionado para carboidratos estereoisômeros foi também estendido para os aminoácidos (SMITH, 2009; SOLOMONS, 2012).

Em 1966, CAHN e colaboradores desenvolveram uma outra nomenclatura, que é hoje adotada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), com o objetivo de configurar o centro quiral da molécula. Primeiramente ordena-se por número atômico os substituintes ligados ao carbono assimétrico ou quiral, de acordo com o sistema "*Cahn-Ingold-Prelog*". A isto denomina-se "sequência de prioridade", após coloca-se o átomo ou o substituinte de última prioridade, de forma a ficar espacialmente mais afastado do observador, e os demais à frente do observador, como se fosse um volante à frente do motorista. Quando a sequência de prioridade, do número 1 ao 3, é observada para o lado direito, este enantiômero recebe o prefixo "*R*" (do latim, "*rectus*", direita) e quando esta sequência ocorre para o lado esquerdo, o enantiômero recebe o prefixo "*S*" (do latim, "*sinister*", esquerda) (ALLINGER *et al.*, 1976; LIM, 2011). A Figura 13 apresenta a visualização do método para a obtenção do enantiômero "*R*" ou "*S*".

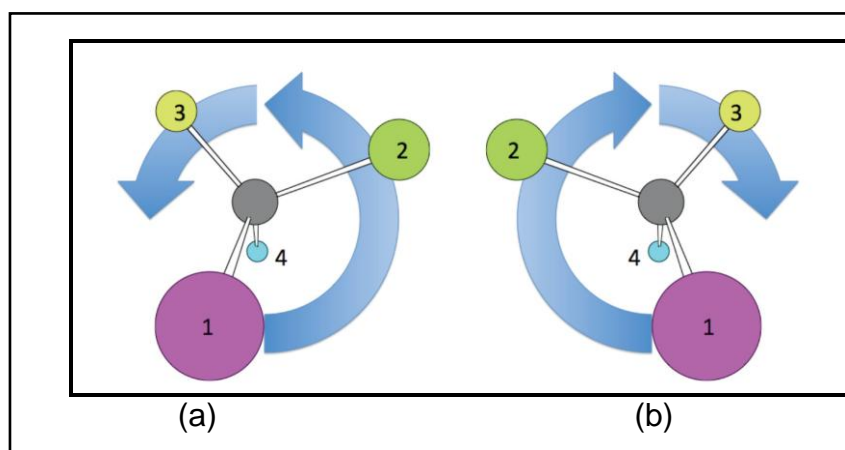


Figura 13 - Visualização da metodologia para a obtenção da nomenclatura dos enantiômeros, quando a sequência de prioridade, do 1 ao 3: (a) "*S*" (do latim, "*sinister*", esquerda) é observada para o lado esquerdo, no sentido anti-horário do relógio; e (b) "*R*" (do latim, "*rectus*", direita) é observada para o lado direito, no sentido horário do relógio. (Adaptado de LIN, 2011).

3.5.2.2. Enantiômeros dos OE dos *Citrus*

Os OE de *Citrus* apresentam muitos estereoisômeros (PADRAYUTTAWAT *et al.*, 1997; HEUBERGER *et al.*, 2001; HÖFERL *et al.*, 2006; SMITH, 2009; ÖZEK *et al.*, 2010; NÖLDNER *et al.*, 2011; WARD e WARD, 2012; LIMA *et al.*, 2013). Visando a obter o máximo de informações sobre a característica e estrutura espacial destes componentes quirais, o sistema *R/S* pode ser empregado em conjunto com o sistema *d(+)/l(-)*, por exemplo: (*S*)-(-)-limoneno e (*R*)-(+)-limoneno, (*R*)-(-)-linalol e (*S*)-(+)-linalol (JUCHELKA *et al.*, 1996; BLANCH E NICHOLSON, 1998; BICCHI *et al.*, 1999; LÜCKER *et al.*, 2002; TKACHEV, 2007; DEWICK, 2009; SCIARRONE *et al.*, 2010; BONACCORSI *et al.*, 2011; PRAGADHEESH *et al.*, 2013). Nas Figuras 14 e 15 apresentamos as estruturas destes enantiômeros e sua separação através da cromatografia em fase gasosa.

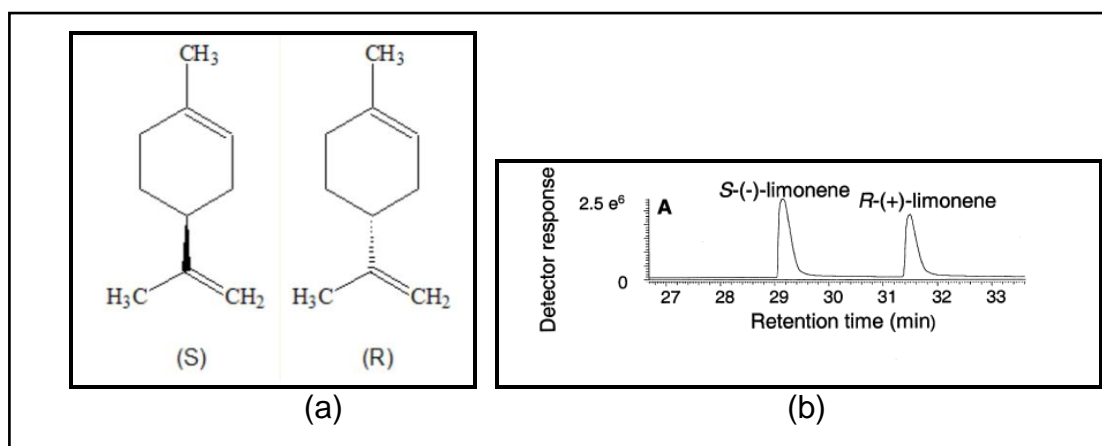


Figura 14 - (a) Estruturas espaciais do (*S*)-(-)-limoneno e do (*R*)-(+)-limoneno (Adaptado de: BLANCH e NICHOLSON, 1998); (b) separação cromatográfica destes isômeros quirais (Adaptado de: LÜCKER *et al.*, 2002).

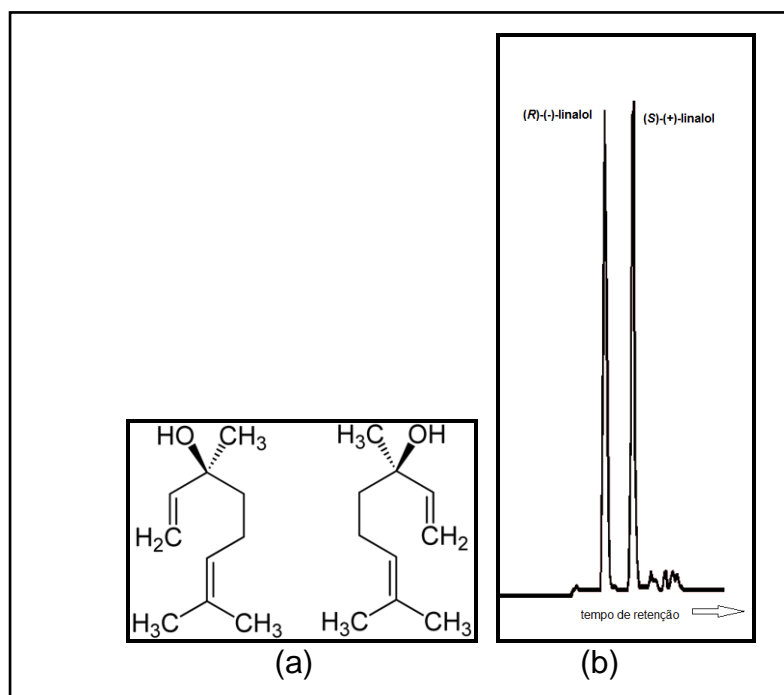


Figura 15 - (a) Estruturas espaciais do (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol; (b) separação cromatográfica destes isômeros quirais (Adaptado de TABACCHI *et al.*, 1997).

3.5.2.3. CG/EM com coluna quiral

A identificação dos enantiômeros mediante separação dos compostos quirais continua a ser um grande desafio, devido às suas propriedades físico-químicas idênticas. As técnicas de separações quirais estão consolidadas, robustas e são amplamente utilizadas, embora a investigação de novas e especializadas técnicas de separação continue em desenvolvimento para resolver casos de enantiômeros ainda não individualizados. As publicações nessa área citam as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, *High Performance Liquid Chromatography*, em inglês), Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*, em inglês), Eletrocromatografia Capilar (*Capillary Electrochromatography*, em inglês), Cromatografia em Fluido Supercrítico (*Supercritical Fluid Chromatography*, em inglês), Cromatografia em Leito Móvel Simulado (*Simulated Moving Bed Chromatography*, em inglês), Cromatografia em Contra-Corrente à Alta Velocidade (*High-Speed Counter-Current Chromatography*, em inglês), Cromatografia em Camada Delgada (*Thin*

Layer Chromatography, em inglês) e Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*, em inglês) (STEPHANY *et al.*, 2012; WARD e WARD, 2012; SMELCEROVIC *et al.*, 2013).

Nesta tese optamos pela utilização da técnica da cromatografia em fase gasosa por ser amplamente utilizada, com reconhecida eficiência, custo moderado e por estar à disposição deste trabalho. O essencial desta técnica está na composição da fase estacionária da coluna cromatográfica, onde os derivados de ciclodextrina têm dominado o campo da separação quiral, como, por exemplo, a fase contendo *permethylated beta-cyclodextrin* (TABACCHI *et al.*, 1997; BICCHI *et al.*, 1999; BISHT *et al.*, 2009; PRAGADHEESH *et al.*, 2013).

3.5.2.4. Determinação da Rotação Óptica ou Poder Rotatório

A determinação da rotação óptica ou do poder rotatório é uma técnica utilizada para realizar a medição do desvio da luz polarizada de uma substância farmacêutica ópticamente ativa, e o equipamento utilizado é o Polarímetro. Esta técnica apresenta melhor eficiência para substâncias puras, ou para misturas contendo um número reduzido de substâncias opticamente ativas. É uma técnica empregada na indústria farmacêutica para controle de qualidade, visando distinguir enantiômeros e determinar a pureza enantiomérica dos fármacos. O poder rotatório apresenta variação com a temperatura, comprimento de onda da luz incidente, solvente utilizado, natureza e concentração da substância em teste. Quando a solução teste apresenta mais de uma substância opticamente ativa não reativas entre si, o resultado da medição será o ângulo de desvio da soma algébrica dos ângulos de desvios das substâncias presentes na solução teste (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; WHO, 2011, ANVISA, 2013).

Os OE são misturas complexas de vários componentes que apresentam isomeria quiral, mesmo assim este ensaio é um dos testes indicados para

controle de pureza, adulteração, estabilidade ou degradação dos OE (ANVISA, 2013; TUREK e STINTZING, 2013; GOLDBERG e WEISSMAN, 2014).

3.6. Principais constituintes do OE de *C. sinensis* e *C. aurantium*, suas estruturas químicas e rotas de formação metabólicas

A rota metabólica de formação dos principais constituintes químicos dos OE de *C. sinensis* e *C. aurantium* é apresentada na Figura 16, onde a partir da molécula de glicose e através da Via mevalonato é gerado o grupo dos terpenóides. Os terpenóides são substâncias cuja biossíntese deriva de unidades de isopreno, composto com cinco átomos de carbono (SARKER *et al.*, 2006; DEWICK, 2009; GOUNARIS, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; WINK, 2010, 2011; TIWARI *et al.*, 2013). Apesar destas rotas serem conhecidas, nas últimas décadas, foi descoberta e elucidada a estrutura de centenas de componentes dos OE. Deste modo, está sendo possível entender a complexidade e a diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010; WINK, 2010; TRANCHIDA *et al.*, 2011; TIWARI *et al.*, 2013).

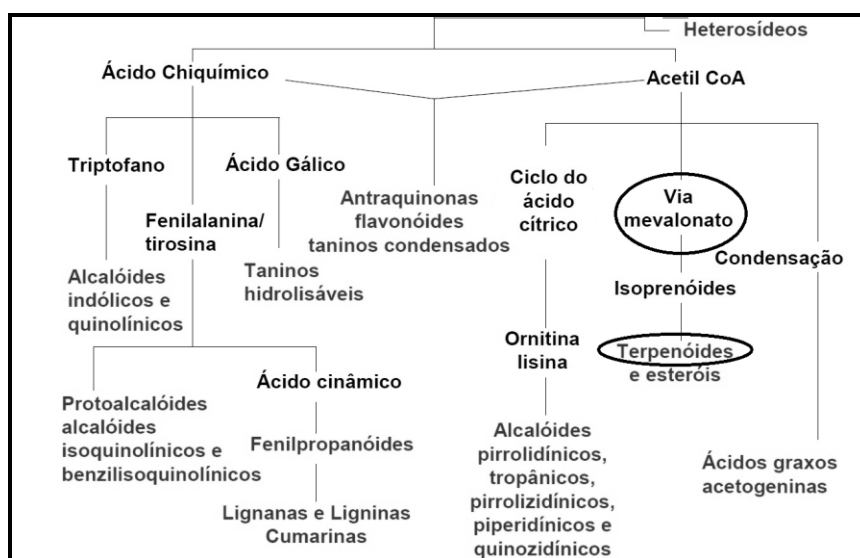


Figura 16 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, com ênfase na *Via mevalonato* e terpenóides dos OE (Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2010).

A Figura 17 apresenta de forma esquemática a formação estrutural dos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides (ou esteróis), a partir do ácido mevalônico (C₈) e pirofosfato de isoprenila (C₉) em uma condensação denominada *cabeça-cauda*.

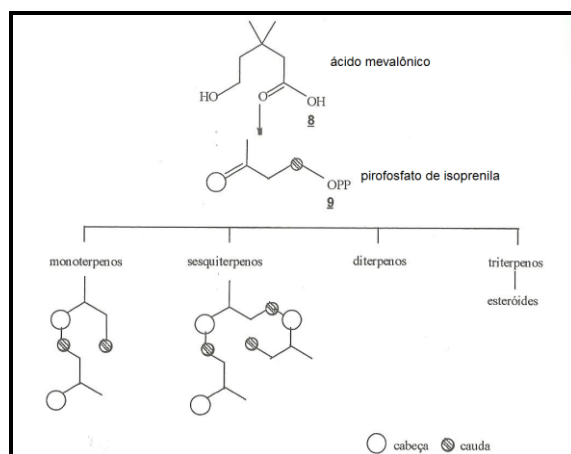


Figura 17 - Esquema da formação estrutural dos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides, a partir do ácido mevalônico ($\underline{8}$ = C₈) e pirofosfato de isoprenila ($\underline{9}$ = C₉) em uma condensação denominada *cabeça-cauda* (Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2010).

A partir deste mecanismo *cabeça-cauda* e uma série de reações de reduções, oxidações e rearranjos, formam-se os monoterpenos, geralmente hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres e acetatos (DEWICK, 2009). Na Figura 18, apresentamos a estrutura química de alguns monoterpenos presentes nos OE de *Citrus*.

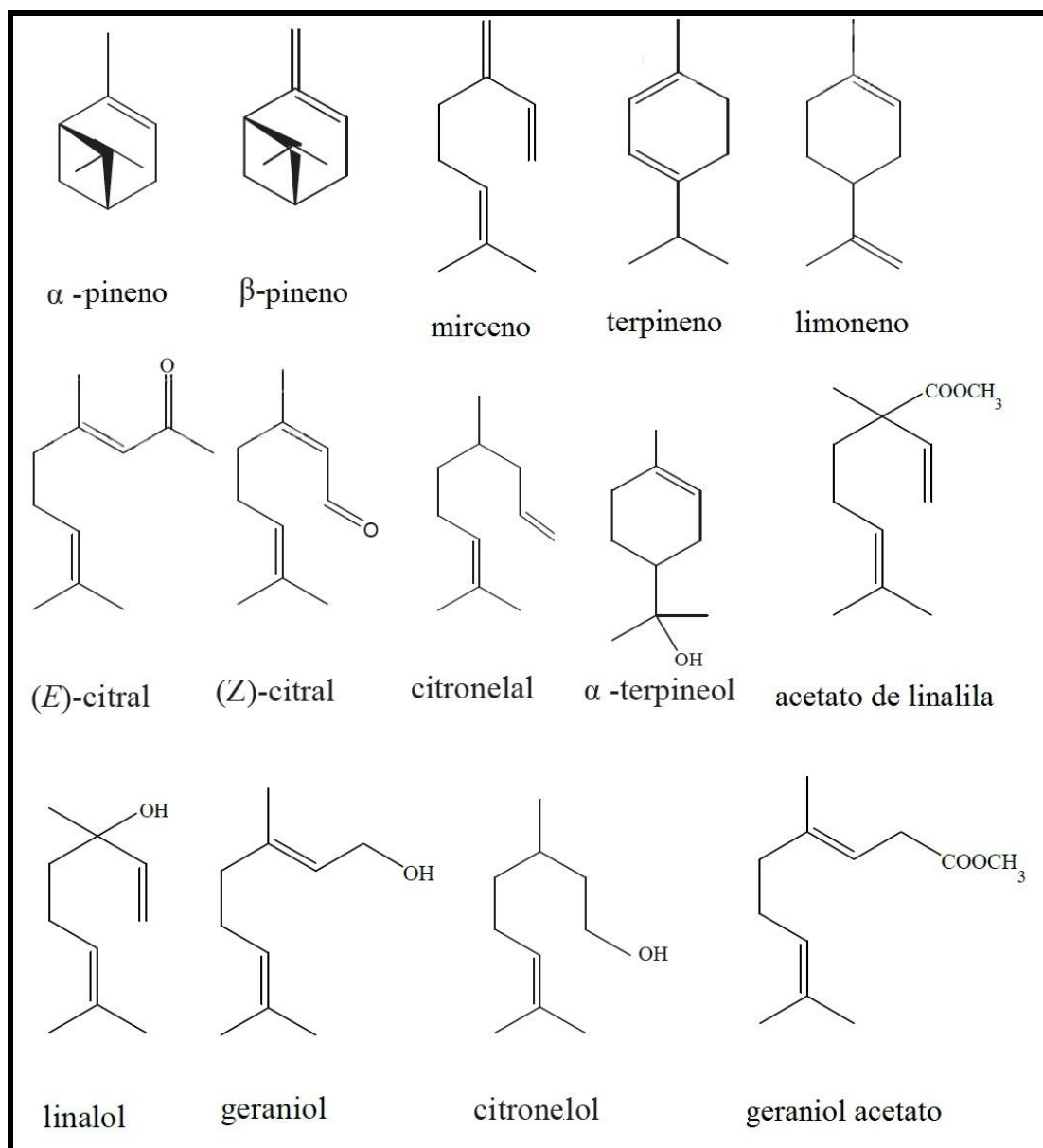


Figura 18 - Estruturas químicas de alguns dos monoterpenos presentes nos OE de *Citrus*: α -pineno, β -pineno, mirreno, terpineno, limoneno, (*E*)-citral, (*Z*)-citral, citronelal, α -terpineol, acetato de linalila, linalol, geraniol, citronelol, geraniol acetato.

As rotas biossintéticas para a formação de alguns monoterpenos lineares estão representadas na Figura 19.

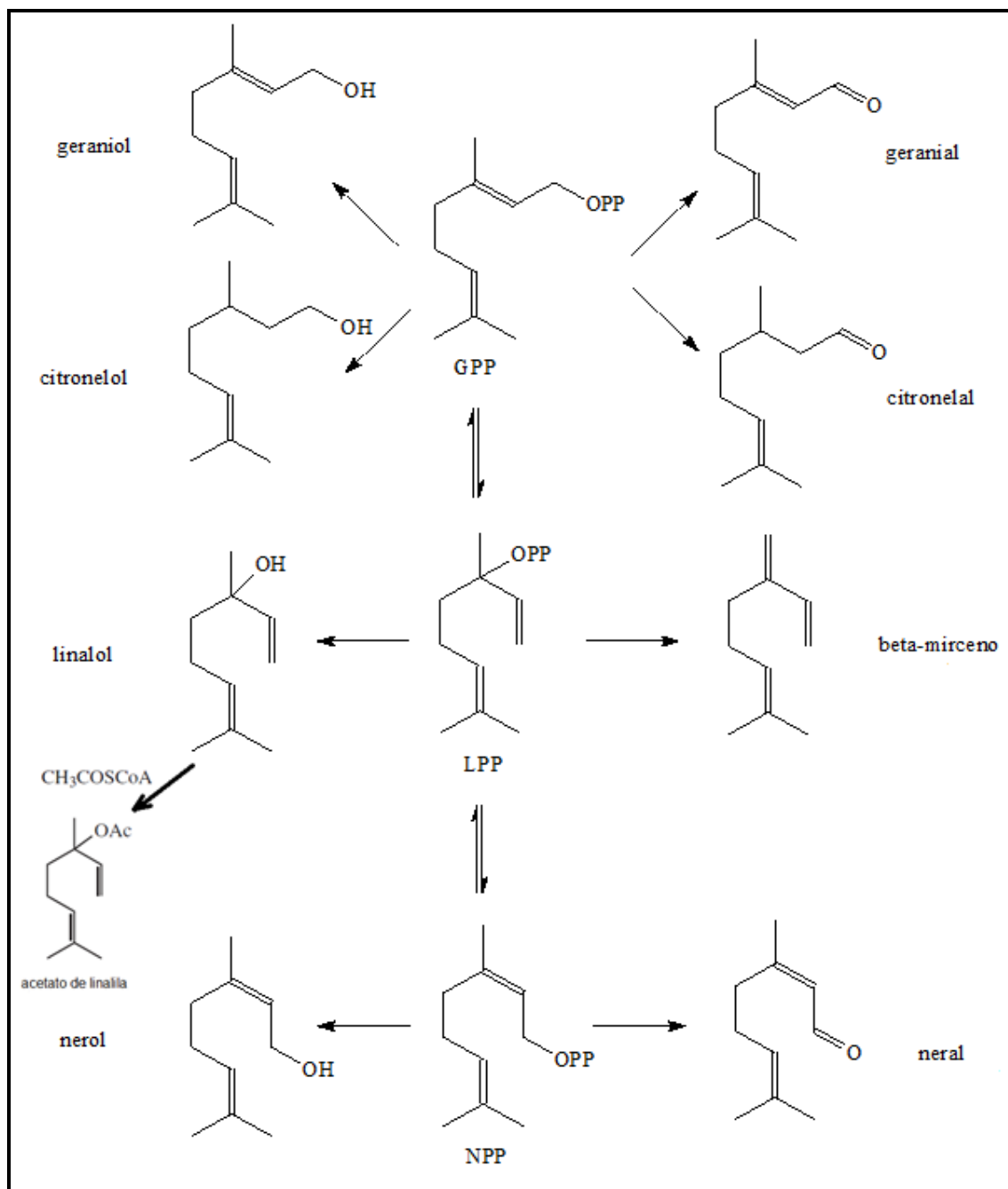


Figura 19 - Formação de alguns monoterpenos lineares a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e seus isômeros, LPP (pirofosfato de linalila) e NPP (pirofosfato de nerila) e a acetilação do linalol pela co-enzima tio eter acetil-CoA (CH₃COSCoA) gerando o acetato de linalila (Adaptado de DEWICK, 2009; WINK, 2010).

Os monoterpenos cíclicos possuem suas rotas biossintéticas de acordo com a Figura 20.

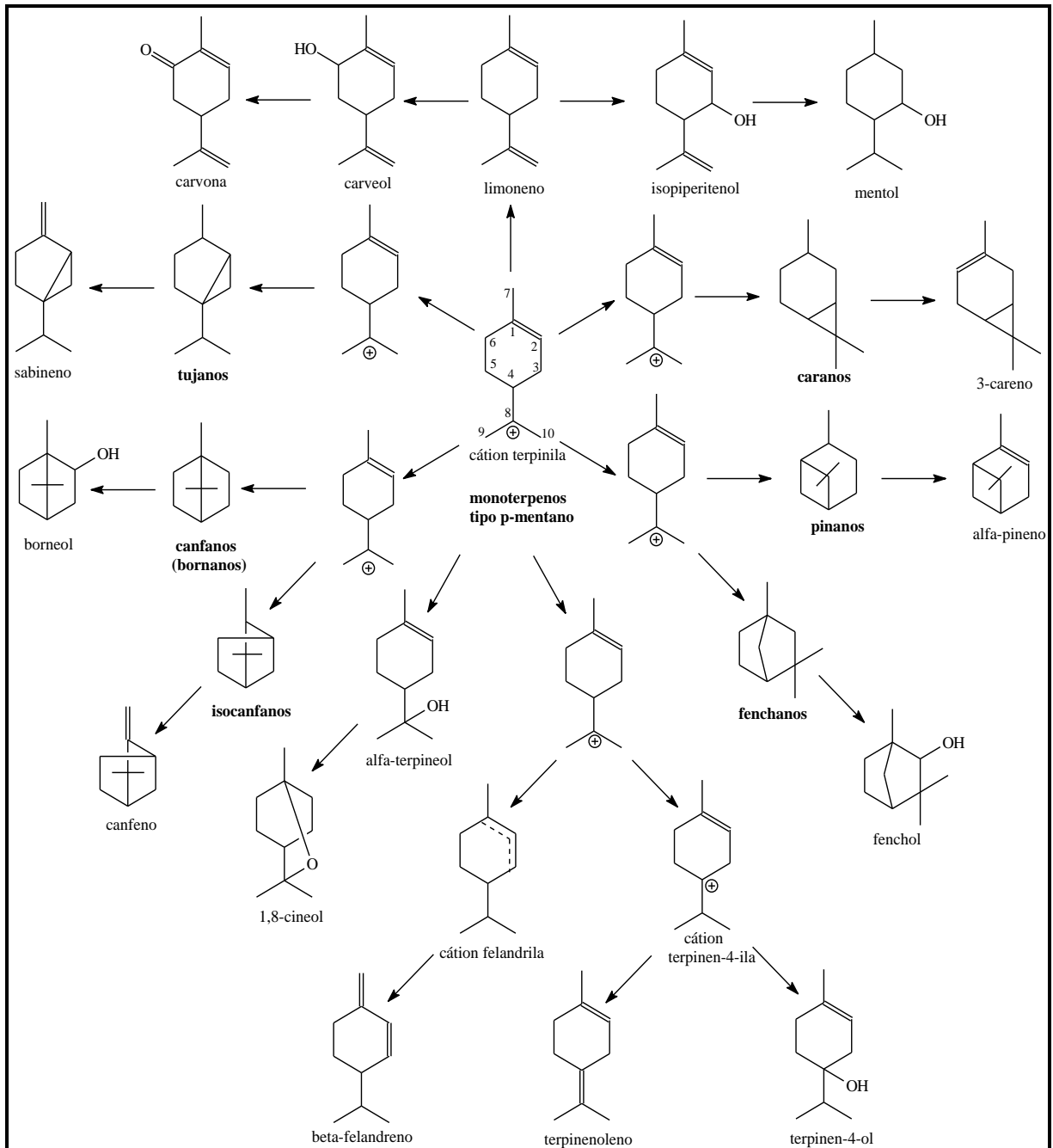


Figura 20 - Rotas biossintéticas para monoterpenos cíclicos (Adaptado de CROTEAU, 1987; DEWICK, 2009; WINK, 2010; BELL e CHARLWOOD, 2011).

A formação das estruturas enantiômeras do limoneno e do pineno são mostradas no esquema da Figura 21, a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e LPP (pirofosfato de linalila).

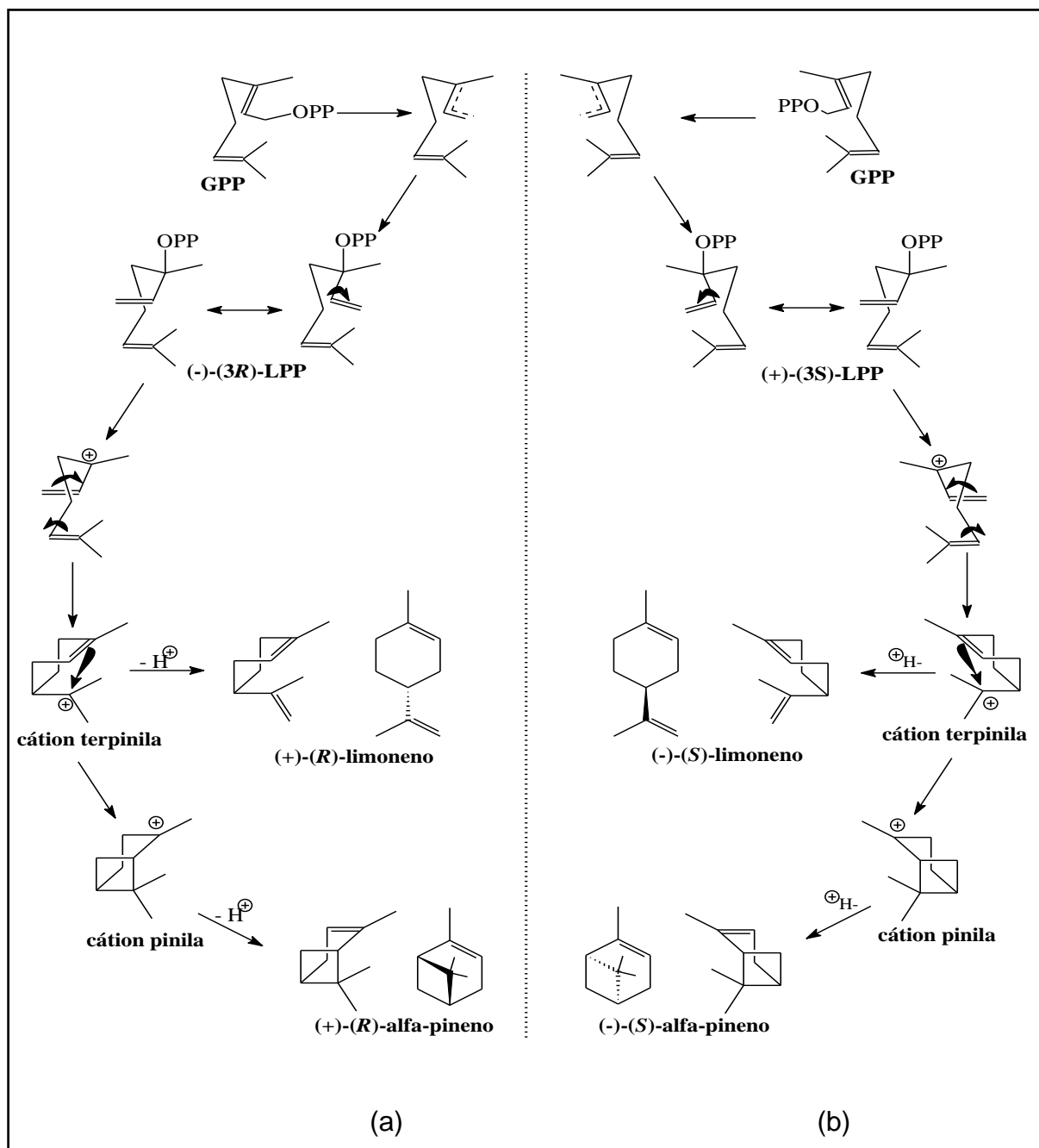


Figura 21 - Esquema da formação, a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e LPP (pirofosfato de linalila), das estruturas enantiômeras: (a) *R*-(+)-limoneno e *R*-(+)-alfa-pineno; (b) *S*-(-)-limoneno e *S*-(-)-alfa-pineno (Fonte: CROTEAU, 1987; DEWICK, 2009).

Após a sua formação, os enantiômeros do limoneno podem seguir a biotransformação, gerando os isômeros quirais do carveol, conforme estudaram WÜST e CROTEAU (2002), de acordo com a Figura 22.

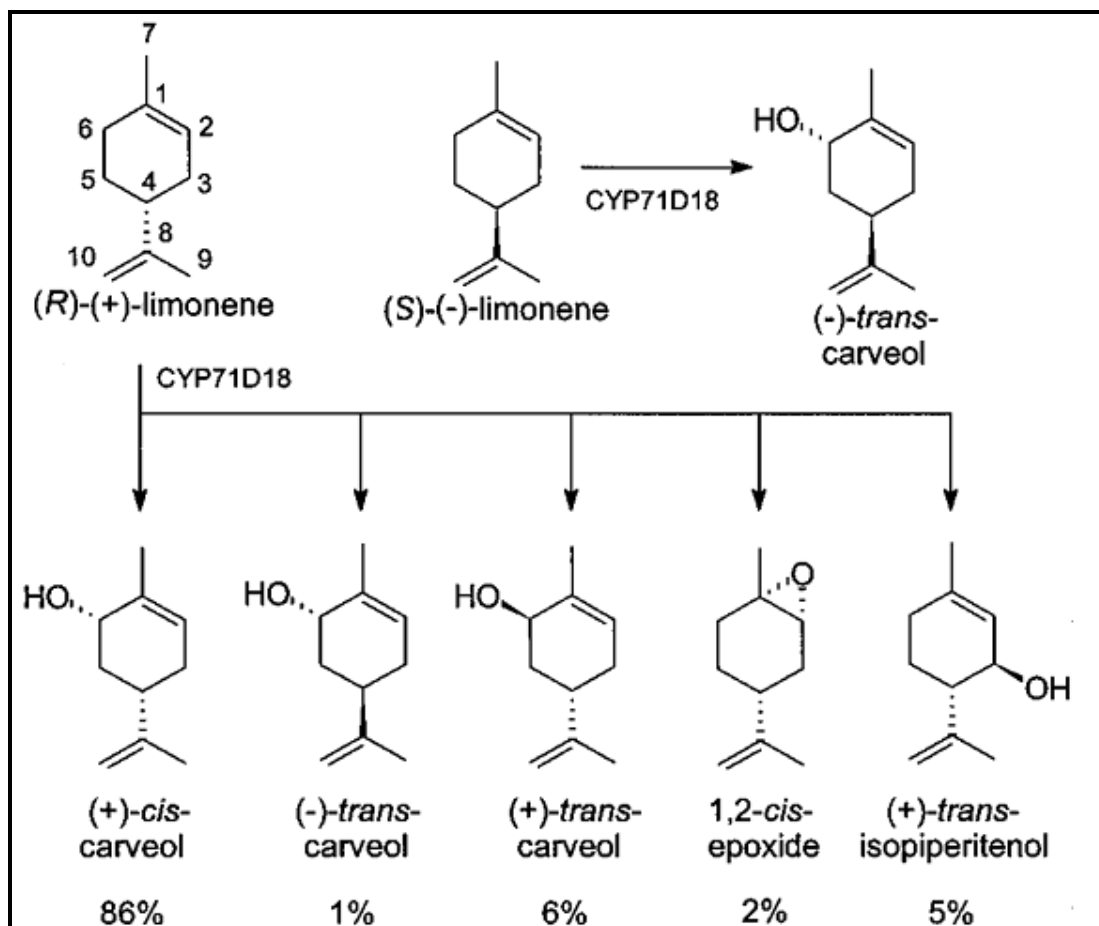


Figura 22 - Formação dos enantiômeros (-)-*trans*-carveol a partir do (S)-(-)-limoneno, e do (+)-*cis*-carveol a partir do (R)-(+)-limoneno. (Adaptado de WÜST e CROTEAU, 2002).

Nas Tabelas 1 e 2 apresentamos uma revisão da literatura dos constituintes químicos dos OE de *C. aurantium* e *C. sinensis*, respectivamente, obtidos das folhas e do pericarpo, através dos métodos de destilação por arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio. Podemos constatar a diferença entre os dados dos diversos estudos, pois utilizam diferentes métodos de extração e diferentes partes das espécies vegetais.

Tabela 1 - Constituição dos OE de *C. aurantium* reportados na revisão da literatura*.

referência bibliográfica	JUCHELKA <i>et al.</i> , 1996	CACCIONI <i>et al.</i> , 1998	CARVALHO-FREITAS e COSTA 2002	PULTRINI <i>et al.</i> , 2006	GARGANO 2007	LEITE <i>et al.</i> , 2008	HOSNI <i>et al.</i> , 2010	ELLOUZE <i>et al.</i> , 2012	NAJAFIAN <i>et al.</i> , 2012	COSTA <i>et al.</i> , 2013	SARROU <i>et al.</i> , 2013			
espécie vegetal	<i>C. aurantium</i>													
parte da planta	pericarpo	folhas	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	folhas	folhas	pericarpo	pericarpo	folhas novas	folhas antigas
método de obtenção do OE	prensagem a frio	d.arraste de vapor	clevenger hidrodestilação	d.arraste de vapor	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	hidrodest	hidrodest	hidrodest
% rendimento da extração							1,24			0,5		1,67	0,27	0,45
% componente														
alfa-tujeno			tr			nd								
alfa-pineno			0,4		0,57	0,53	0,3	0,16-0,44			0,53	0,19	nd	
sabineno			0,08		nd	0,27	0,3	nd-3,62			0,18	0,37	0,22	
beta-pineno	0,9-5,5		0,33		1,16		1,4			0,41	0,62	3,58	1,9	
beta-mirceno			1,88		1,43	1,09	2,24	nd	nd-1,99	0,53	2	1,63	2,74	
octanal + alfa-felandreno	1,4-2,2		0,1		0,45						0,24	nd	nd	
delta-3-carene			0,01					nd			nd	nd	nd	
limoneno	74-86		94,27	90,4	97,83	87,01	96,24	96,9	nd-1,70	98,66	94,67	0,53	0,77	
(Z)-beta-ocimeno			tr					nd	0,05-2,19	tr	0,3	0,71	1,22	
(E)-beta-ocimeno			0,23					tr			nd	4,08	3,11	
gamma-terpineno			0,02		nd			nd	0,20-1,46		nd	nd	nd	
n-octanol			0,33											
cis-linalol oxido			tr						nd-0,99	tr	nd	nd	nd	
terpinoleno			0,02		nd			nd			nd	0,4	0,7	
trans-linalol oxido			0,05						0,57-1,64	tr				
linalol	0,5-1,0		0,78		2,76	0,44	0,2	43,2-65,97	48,7		0,76	58,21	36,03	
isopulegol	0,3-0,4		nd											
citronelal			nd											
terpineol-4	0,3-0,4		0,06		nd			nd	nd-0,31	0,2	nd	0,17	0,13	
alfa-terpineol	0,2-0,3		0,26		1,26			9,29-12,12	21,6		0,13	7,11	12,89	
n-decanal			0,11			0,25					0,16	nd	nd	
octanol acetato			0,05											
nerol			0,06						nd-1,19	3,4	nd	1,45	2,89	
neral (E-citral)			0,03		nd					0,2				
geraniol acetato de linalila	0,3-1,0							nd	0,77-24,77	18,8	0,18	12,42	23	
geraniol (Z-citral)			0,11		nd			nd		0,3				
perila aldeído			nd							0,2				
timol			nd							1,7	0,1	2,18	4,46	
nerol acetato			nd		nd			nd						
geraniol acetato			nd					nd	0,53-3,44	3,5	nd	4,49	8,7	
beta-elemene			0,01					tr						
(E)-cariofileno			0,07							0,2	nd	1,09	0,22	
alfa-trans-bergamoteno			nd					nd						
germacreno D								tr	nd-0,21		nd	nd	nd	
valenceno			nd											
alfa-(E,E)-farneseno			nd						nd-tr		nd	0,13	nd	
beta-bisaboleno			nd											
(E)-nerolidol cariofileno oxido											nd	nd	0,1	
alfa-bisabolol						nd								
nootkatone	0,01		nd											
(S)-(-)-limoneno		29,2-35,1												
(R)-(+)-limoneno		64,9-70,8												
ee limoneno		29,8-41,6												
(R)-(-)-linalol		66,4-90,2												
(S)-(+)-linalol		9,8-33,6												
ee linalol		32,8-80,4												

* Os espaços não preenchidos são referentes aos dados não fornecidos na publicação.

nd: não detectado
tr: traços (<0,01%)

Tabela 2 - Constituição dos OE de *C. sinensis* reportados na revisão da literatura *.

referência bibliográfica	TIRADO et al., 1995	TIRADO et al., 1995	TIRADO et al., 1995	CACCIONI et al., 1998	CHOI et al., 2003	LEHRNER et al., 2005	NJOROGE et al., 2005	FERHAT et al., 2006	FATURI et al., 2010	HOSNI et al., 2010	SINGH et al., 2010	BONACCORSI et al., 2011	JAFARZADEH et al., 2013	VELÁZQUEZ-NÚÑEZ et al., 2013
espécie vegetal	<i>C. sinensis</i>													
parte da planta	pericarpo	pericarpo	pericarpo	folhas	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo	pericarpo
método de obtenção do OE	prensagem a frio	d. por arraste de vapor	prensagem a frio	d. por arraste de vapor	clevenger hidrodestilação	prensagem a frio	prensagem a frio	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	clevenger hidrodestilação	prensagem a frio	clevenger d. por arraste de vapor	clevenger d. por arraste de vapor
% rendimento da extração		0,17	0,79	0,34		1,02		0,1	0,39	1,49-2,31				
% componente														
alfa-tujeno		nd	nd	0,3	tr-0,01									
alfa-pineno	0,1-0,6	0,28-0,32	0,29-0,53	0,55	0,40-0,50	0,53		0,3	1,6		0,2	0,36		0,47
sabineno	0,1-0,6	0,02	0,02-0,03	47,68	0,13-0,83	2,15		0,2	1,2	0,11	0,2	0,37		
beta-pineno		0,63-1,05	0,63-0,76	2,00	tr-0,06	0,1		nd	2,7		1,6	0,03	detectado	0,53
beta-mirceno	0,9-2,1	nd-0,01	nd	3,73	1,74-1,98	1,86	1,88	nd	5,3	1,11	0,2	1,71	3	1,72
octanal + alfa-felandreno		1,52-1,68	1,59-1,94	0,73	0,12-0,59			nd		0,16		0,47		
delta-3-carene		0,04-0,08	0,05-0,07	7,38	nd-0,22				0,1		tr			
limoneno	83-97	91,63-92,57	93,77-94,55	5,95	91,14-94,95	90,68	95,3	92,5	78,5	97,66	96,5	90,66		92 96,62
(Z)-beta-ocimeno		nd	nd	8,31	tr	0,16		nd			nd			detectado
(E)-beta-ocimeno		0,02-0,03	0,02		0,01-0,05						tr	0,21		
gama-terpineno	0,1	0,41-1,09	0,02-0,04	0,65	0,04-0,18	0,88		nd	0,2		tr			
n-octanol		0,02-0,03	0,02-0,04	0,27	0,03-0,24	tr		0,2	0,5	0,02				
cis-linalol oxido					nd	0,81		tr						
terpinoleno		1,83-2,61	0,58-0,78	1,57	0,01-0,07	0,11		tr			tr	0,18		
trans-linalol oxido					nd			tr						
linalol	0,3-5,3	nd	nd	4,38	0,61-2,56	0,47		0,2	2	0,28	0,13			detectado
nonanal		nd	nd	nd	tr-0,03			tr	0,1	0,02				
cis-limoneno oxido					nd	tr		0,3		0,04				
trans-limoneno oxido					nd	tr		tr	0,1	0,03				
isopulegol		0,03-0,05	nd	0,13	nd							0,26		
citronelal		nd	nd	2,83	0,02-0,04	0,19		tr	0,3					
terpineol-4		0,11-0,13	0,06-0,23		0,06-0,31	tr		tr	0,5		tr			
alfa-terpineol		nd	nd	0,1	0,12-0,25			0,1	0,4					
n-decanal		0,11-0,35	0,26-0,39	0,15	0,11-0,26	tr		tr	1,7			0,02		
octanol acetato					nd				0,1					
trans-carveol					nd				0,3					
nerol		0,07-0,13	nd		0,01-0,09				0,3					
citronelol		nd	nd	0,53								0,17		
neral (E-citral)		0,12-0,15	0,08	1,87	0,04-0,18	tr		tr	0,3					0,34
carvona								0,1				0,05		
geraniol		0,14-0,17	0,10-0,11	0,21	0,01-0,09	tr			0,1					detectado
acetato de linalila				0,03		tr		0,1			tr	2,8		
geraniol (Z-citral)		0,15-0,23	0,02	2,61		tr		tr	0,5	0,01	tr	0,09		0,31
perila aldeído		0,01-0,03	nd			tr		tr				0,03		
timol				0,03	nd									
alcool perfílico								tr	0,1	nd				
alfa-terpineol acetato					nd	tr								
citronelol acetato		nd	nd	0,06	nd	tr								
nerol acetato				0,17	nd			0,1			ts			
geraniol acetato				0,16	nd	tr		tr			nd			
beta-elemene		0,07-0,09	0,03-0,08	0,63	nd	tr			0,1		tr			
(E)-cariofileno		0,02-0,15	nd	0,21	tr-0,04									
alfa-trans-bergamoteno		nd	nd	nd	nd								tr	
germacreno D		0,02-0,15	0,02	nd				tr		0,1		tr		
valenceno					tr-0,03					0,4				
alfa-(E,E)-farneseno					nd	tr			0,1					
beta-bisaboleno		nd	nd	0,03	nd									
alfa-cadineno					nd									
(E)-nerolidol					nd			tr						
alfa-bisabolol				nd										
nootkatone	0,1				nd			0,1						
(S)-(-)-limoneno													0,5	
(R)-(+)-limoneno													99,5	
ee limoneno													99	
(R)-(-)-linalol													7,8-17,9	
(S)-(+)-linalol													82,1-92,2	
ee linalol													64,2-84,4	

* Os espaços não preenchidos são referentes aos dados não fornecidos na publicação; nd: não detectado; tr: traços (<0,01%)

3.7. Atuação terapêutica do OE no SNC

O uso dos OE fundamenta-se nas suas propriedades físico-químicas, organolépticas (sabor e gosto) e aromáticas (nota perfumística ou olfativa) (FROCHOSO, 2004; BORRULL, 2012). São empregados como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol, safrol, linalol (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006). Na última década, a indústria farmacêutica tem investido na avaliação da utilização de odores naturais, como os OE, no estado emocional, tais como calma, alerta e humor (WARRENBURG, 2005; MARTIN, 2006; PERRY e PERRY, 2006; EDRIS, 2007; HOWARD *et al.*, 2008; WEBER e HEUBERGER, 2008; HERZ, 2009; IBARRA *et al.*, 2010; CASES *et al.*, 2011; KASPER, 2013; SAYEED *et al.*, 2014). Muitas das bases neurais para as propriedades psicofarmacológicas desses OE são conhecidas, visto que os receptores do olfato estão diretamente ligados ao sistema límbico do SNC, o que justifica a associação de odores com a emoção (BAGETTA *et al.*, 2010; HEUBERGER *et al.*, 2010; UMEZU, 2006, 2012; HORII *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2013).

Vários resultados de investigações indicam o potencial terapêutico de OE ou isolados dos extratos destes. O OE obtido das cascas das frutas de *C. aurantium* teve suas propriedades ansiolíticas demonstradas (CARVALHO-FREITAS e COSTA, 2002; PULTRINI *et al.*, 2006). Este OE é popularmente empregado para curar ou aliviar insônia, tratar nervosismo, ansiedade e histeria, e as flores são utilizadas com fins sedativos (SANTOS *et al.*, 1988, SANGUINETTI, 1989, VASQUEZ *et al.*, 1997; LEHRNER *et al.*, 2000, AKHLAGHI *et al.*, 2011). Em camundongos, a inalação de OE de limão, *Citrus limon* (KOMIYA *et al.*, 2006), a administração do OE de *Rosa centifolia* (UMEZU, 1999; UMEZU *et al.*, 2002) e a administração de OE de *Passiflora incarnata* (DHAWAN *et al.*, 2001; MIRODDI *et al.*, 2013) também demonstraram efeito ansiolítico. GARGANO (2007) estudou os efeitos ansiolítico e sedativo dos OE das cascas dos frutos de *Citrus latifolia* Tanaka (limão Tahiti), *Citrus reticulata* Blanco (tangerina) e *C. aurantium* em

camundongos. Alguns detalhes dos experimentos e os resultados destes estudos encontram-se nas Tabelas 3 e 4.

O OE de néroli, obtido por arraste de vapor das flores de *C. aurantium*, cujos componentes majoritários eram o limoneno (97,83%) e o mirceno (1,43%), demonstrou ter efeito ansiolítico em animais *gerbils* (*Meriones unguiculatus*, também chamados de “*ratos do deserto*”), quando estes foram submetidos à sua inalação, sendo que este efeito ansiolítico do OE néroli foi superior ao do medicamento Xanax[®], cujo princípio ativo é o BZP alprazolam (CHEN *et al.*, 2008). Relevantes também, foram os resultados obtidos por LEITE *et al.* (2008), relativos à diminuição da ansiedade em ratos submetidos à inalação do OE de *C. aurantium* rico em limoneno e mirceno.

A ação ansiolítica do OE de *C. sinensis* foi estudada mediante ensaios com pacientes, que inalaram este aroma na ante-sala de consultório dentário (LEHRNER *et al.*, 2000; LEHRNER *et al.*, 2005; KRITSIDIMA *et al.*, 2010). LEHRNER e colaboradores (2005) demonstraram que a inalação deste OE, com composição química de 95,3% de limoneno e 1,88% de mirceno, provocou a redução da ansiedade, o aumento do estado de alerta, o aumento do estado de calma e a melhoria do humor dos pacientes. Tal constatação foi feita através dos testes psicológicos de avaliação da ansiedade ("*State-Trait Anxiety Inventory*", inventário do estado de ansiedade) e do humor ("*Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen*", questionário multidimensional de humor). GOES e colaboradores (2012) em experimentos com voluntários humanos que inalaram OE *C. sinensis*, com composição química contendo 54,48% de limoneno, constataram a diminuição do estado de ansiedade através de testes fisiológicos e psicológicos. FATURI e colaboradores (2010) em seus estudos com ratos, obtiveram resultados de ação ansiolítica após a inalação do OE de *C. sinensis*, contendo limoneno (97,66%), mirceno (1,11%) e linalol (0,28%), dentre os seus componentes. LIMA e colaboradores (2013) direcionaram seus estudos para a inalação do isômero óptico (*R*)-(+)-limoneno por camundongos, obtendo resultados da ação ansiolítica deste componente químico presente no OE de *C. sinensis*.

A ação ansiolítica do OE de *C. sinensis*, constatada através da redução do nível de COR no fluido oral de crianças em idades de 6 a 9 anos, foi estudada por JAFARZADEH e colaboradores (2013), mediante a inalação deste OE. A composição química do OE estudado incluía 3% de mirceno, 92% de limoneno, além de linalol, *alfa*-pineno, *beta*-pineno, ocimeno, geraniol e outros em menor percentagem.

O linalol encontra-se na composição de muitos OE e tem sido amplamente estudado. Ele pode estar presente em óleos cítricos, sendo que é um dos majoritários do óleo de lavanda. Vários estudos têm demonstrado em seus resultados os efeitos do OE de lavanda (SHAW *et al.*, 2007) e do linalol no SNC. Quando inalado, o linalol apresenta ação ansiolítica, de alívio da tensão emocional (YAMADA *et al.*, 2005), efeito sedativo e anticonvulsivante (LINCK *et al.*, 2009). A ação ansiolítica do linalol também foi demonstrada pela administração tanto por via oral como por via intraperitoneal em camundongos (ELISABETSKY *et al.*, 1995; BARROS e ELISABETSKY, 1996; ELISABETSKY *et al.*, 1999; LINCK *et al.*, 2010).

Em 2010, um laboratório da Alemanha registrou e lançou no mercado o medicamento Silexan[®], cuja composição de cada cápsula varia de 80 mg ou 160 mg de OE de lavanda *Lavandula officinalis*, contendo como principais constituintes o linalol e o acetato de linalila (Silexan[®], register 2009). Os resultados das investigações evidenciaram a ação ansiolítica deste medicamento, ao ser ingerida 01 (uma) cápsula diariamente por período de 14 dias consecutivos (KASPER, 2013), demonstrando que Silexan[®] é tão eficaz quanto o benzodiazepínico (BDZ) Lorazepam, em adultos com desordem de ansiedade generalizada (WOELK e SCHLÄFKE, 2010; KASPER, 2013). No estudo de SCHUWALD *et al.* (2013) foi demonstrado que o Silexan[®], atua de forma semelhante ao medicamento pregabalina, inibindo o influxo de cálcio nos neurônios pré-sinápticos do hipocampo. Deste modo eles indicam seu uso clínico por via oral para tratar ansiedade. A ação ansiolítica do Silexan[®] não se caracteriza como a ação de um BDZ, o que pode explicar a ausência de tolerância, dependência e síndrome de abstinência pelo OE de lavanda (SILENIEKS *et al.*, 2013). UEHLEKE *et al.* (2012), em seus resultados, constataram a ação do Silexan[®] também em situações de estresse pós-

traumático, vindo ao encontro da investigação de TODA e MORIMOTO (2008), relativa à redução do estresse em voluntários humanos quando submetidos à inalação do óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*). Uma das hipóteses do mecanismo da ação ansiolítica do OE de *Lavandula officinalis* sustentam que este OE, através de seus componentes, é uma potente droga ansiolítica, semelhante ao fármaco pregabalina, que reduz o influxo de cálcio nos terminais pré-sinápticos em neurônios hiperexcitados, reduzindo desta forma a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (SIMONNET, 2008; CARRASCO *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2013).

TODA e MORIMOTO (2008) constataram a redução do estresse em voluntários humanos, através da medição do hormônio COR no fluído oral, quando estes voluntários foram submetidos à inalação do OE de lavanda (*Lavandula officinalis*). O estudo experimental submetia os voluntários a uma situação de estresse e imediatamente após, à inalação de um papel embebido com o OE durante 10 min. Mesmo sugerindo a necessidade de aprofundamento nas investigações, os autores concluíram que o OE de lavanda apresenta um efeito de alívio do estresse.

Os resultados de investigações mostram que alguns constituintes químicos dos OE possuem ação diferenciada de acordo com a sua quiralidade, ou seja, além da sensibilidade olfativa de fragrância diferenciada, os isômeros ópticos atuam distintamente em relação à ansiedade (PADRAYUTTAWAT *et al.*, 1997; SMITH, 2009). NÖLDNER e colaboradores (2011) atribuem a ação terapêutica do medicamento ansiolítico Silexan[®], aos componentes quirais (*R*)-(-)-linalol e (*R*)-(-)-acetato de linalila, presentes majoritariamente no OE de lavanda (*Lavandula angustifolia*, sinônimo de *Lavandula officinalis*).

Os efeitos fisiológicos da inalação dos isômeros quirais (*R*)-(-)-linalol e (*S*)-(+)-linalol, separadamente, foram estudados por HÖFERL e colaboradores (2006) através dos parâmetros de avaliação do estresse. O estudo submeteu voluntários humanos a estes componentes em concentração inferior ao limite de detecção olfativa no ar inspirado, assim eles não percebiam o que estavam inalando. Durante a sessão de teste, os voluntários não foram informados sobre qual dos componentes e em que momento estavam sendo expostos a

eles, evitando assim influências subjetivas de suas expectativas. Os resultados indicaram claramente que ambos os isômeros exercem efeitos no sistema endócrino, com a redução do nível do COR no fluido oral, demonstrando um relaxamento. Neste estudo o isômero (S)-(+)-linalol demonstrou ser um agente ativador, quando avaliado frente à atividade eletrodérmica, aumentando o estado de alerta; e o isômero (R)-(-)-linalol demonstrou ser um agente de relaxamento, quando avaliado frente à frequência cardíaca, provocando o alívio do estresse. Em outros estudos CHIOCA e colaboradores (2013a, 2013b) observaram o efeito ansiolítico do OE de *Lavandula angustifolia*, rico em linalol e acetato de linalila, mesmo em camundongos com anosmia, ou seja, sem a percepção olfativa, levando à conclusão de que sua ação dá-se sem levar em conta a sensação aromática.

NAKAMURA e colaboradores (2009) em relação ao (R)-(-)-linalol, e YAMAMOTO e colaboradores (2013) em relação ao (S)-linalol, avaliaram o efeito da sua inalação em ratos submetidos ao estresse por isolamento durante 2 hs (detalhes na Tabela 4). Constataram alterações de parâmetros hormonais (corticosterona e adrenocorticotrófico), sanguíneos (glóbulos brancos, neutrófilos, linfócitos) e de genes ligados ao estresse, indicando sua diminuição, entretanto em ambos os estudos não foi detectado a redução do nível da CORT plasmática.

LIMA e colaboradores (2013) sugerem que o isômero quiral (R)-(+)-limoneno pode ser utilizado, através da inalação, como agente ansiolítico em camundongos. HEUBERGER e colaboradores (2001) demonstraram, através dos resultados dos testes em humanos, que tanto a inalação do (R)-(+)-limoneno como do (S)-(-)-limoneno provocam um leve aumento da pressão arterial sistólica, contudo somente o (R)-(+)-limoneno alterou o estado de alerta e de humor, o que foi atribuído também ao seu aroma agradável, segundo o critério de avaliação dos voluntários submetidos ao estudo.

A busca do mecanismo neurológico desta ação está em investigação, sendo que os efeitos ansiolíticos poderiam ser devido a uma interação dos componentes do OE atuando em diferentes sistemas de neurotransmissores (BRADLEY *et al.*, 2007). BAGETTA e colaboradores (2010) estudaram

neurofarmacologicamente a ação do OE de bergamota (*Citrus bergamia* Risso) nos sintomas de ansiedade induzida por estresse, transtornos leves de humor e dor do câncer. Eles constataram que este OE é capaz de interferir no hipocampo dos mamíferos, na plasticidade sináptica normal e patológica. A neuroproteção foi observada no decurso de uma isquemia cerebral e dor. Estes autores associam estes efeitos aos componentes do OE, entre eles o linalol e o acetato de linalila. BASTARD e TIRAN (2009) relatam que a ansiedade pré-natal tem sido associada a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal materno, podendo afetar o desenvolvimento fetal e psicológico da criança. Os tratamentos convencionais são baseados em técnicas de psicoterapia e medicamentos psicoativos, sendo que os medicamentos ansiolíticos BZP foram encontrados no leite materno, e foram associados à sedação e à hipotermia de bebês. Os autores sugerem a utilização dos OE, através da inalação e massagem, os quais demonstraram resultados de melhora significativa na redução da ansiedade. Outra vantagem é que as parturientes não veem na utilização dos OE, o estigma negativo associado às drogas psicoativas.

Vários ensaios experimentais em voluntários humanos e em animais geraram resultados significativos em relação a diminuir os sintomas de ansiedade, estresse e em gerar sensação de bem-estar. Nas Tabelas 3 e 4 apresentamos uma breve revisão destas publicações, as quais utilizaram OE de *Citrus*, seus componentes linalol e limoneno, *Lavandula officinalis* rica em linalol, em voluntários humanos e em animais, respectivamente.

Tabela 3 - Revisão bibliográfica das ações psicofarmacológicas atribuídas aos OE *Citrus*, *Lavandula officinalis* rica em linalol e componentes linalol e limoneno em humanos.

OE ou componente	RESULTADO (avaliação do ensaio)	aplicação (detalhes)	tempo de exposição ao OE	controle	voluntários humanos (incluindo grupo teste e grupo controle)	instrumentos de avaliação (testes)	referência bibliográfica
<i>Citrus limonum</i> , <i>Citrus reticulata</i> , <i>Lavandula officinalis</i> e outros	POSITIVO (bem estar)	inalação, massagem corporal, solução quente para imersão dos pés	variado	não especificado	8058 voluntárias mulheres em idade e condições de parturientes (duração do estudo: 8 anos)	questionário	BURNS <i>et al.</i> , 2000
bergamota, outros	NEGATIVO, sem significância (ansiedade)	inalação (mistura dos OE em óleo vegetal de soja)	não especificado	não especificado	66 mulheres esperando por aborto cirúrgico	escala verbal de ansiedade 0-10	WIEBE, 2000
(R)-(+)-limoneno e (S)-(-)-limoneno (separadamente)	POSITIVO (ação no SNC: bem estar emocional e mental)	inalação (vaporização de 500 mg de limoneno/voluntário)	3 seções de 30 min	isômeros da carvona	10 mulheres e 10 homens	questionário; pressão sanguínea, temperatura da pele; oxigênio sanguíneo, atividade eletrodérmica; taxa de pulso, taxa de respiração	HEUBERGER <i>et al.</i> , 2001
<i>Lavanda e Bergamota</i>	NEGATIVO, sem significância (ansiedade)	inalação (3 gotas da mistura de OE em máscara sobre o nariz e boca, durante as seções de radioterapia)	15 a 20 min	não especificado	313 pacientes (33 a 90 anos)	questionários: SPHERE (Somatic and Psychological Health Report); GHQ (General Health Questionnaire); SOFA (Symptoms of Fatigue and Anergia)	GRAHAM <i>et al.</i> , 2003
<i>Lavandula officinalis</i> e outro	POSITIVO (ansiedade)	inalação (aromatização)	10 min	aroma agradável de perfume sintético	73 voluntários (18 a 31 anos)	Profile of Mood States; parâmetros fisiológicos	BURNETT <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus limon</i> , <i>Citrus bergamia</i> , <i>Lavandula officinalis</i> e outros	POSITIVO (ansiedade e depressão)	massagem (4 gotas do OE diluído em 15mL de óleo vegetal)	40 min/15 dias/12 semanas	não especificado	32 pacientes	Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS); Tyrer Brief Anxiety Scale (TBAS); questionário Hospital Depression Anxiety Scale (HADS)	LEMON, 2004
<i>Lavandula officinalis</i>	Parcialmente POSITIVO (ansiedade, depressão, qualidade do sono, qualidade de vida)	massagem (solução do OE a 1% com óleo vegetal de amendoa, 4 semanas consecutivas)	30 min/1x semana	não especificado	42 pacientes com diagnóstico de câncer	VAS e Modified Tursky Pain Descriptors; Verran and Snyder-Halpern (VSH); Hospital Anxiety and Depression (HAD); Rotterdam Symptom Checklist (RSCL).	SODEN <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus sinensis</i> e <i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (ansiedade e humor)	inalação (vaporização através de difusor elétrico, em sala de 16m ² , cada OE separadamente)	11 horas (7h30min-18h30min)	não especificado	200 pacientes (18-77 anos); duração do estudo: 15 meses	ansiedade (State-Trait Anxiety Inventory, STAI); humor, calma, alerta (Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen, MDBF)	LEHRNER <i>et al.</i> , 2005
(R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol (separadamente)	POSITIVO (estresse)	inalação em concentração 100 menor que o limite da sensibilidade olfativa para cada um dos isômeros (vaporização)	90 min	ar atmosférico	4 homens e 4 mulheres por grupo (total de 24 voluntários)	cortisol salivar, pressão sanguínea, batimentos cardíacos, atividade eletrodérmica	HÖFERL <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrus aurantium</i> (neroli) e <i>Lavandula officinalis</i> (lavanda)	POSITIVO (ansiedade)	massagem (solução com óleo vegetal contendo 0,5% de mistura dos OE de neroli e lavanda)	30 min	não especificado	36 mulheres	Maternity Blues Scale; State-Trait Anxiety Inventory; Profile of Mood States (POMS); Feeling toward Baby Scale	IMURA <i>et al.</i> , 2006
<i>Lavandula officinalis</i>	NEGATIVO, sem significância (ansiedade)	inalação (vaporização através de difusor elétrico, em sala de 16m ² , cada OE separadamente)	não especificado	não especificado	118 pacientes a espera dos exames de colonoscopia e esofagogastroduodenoscopia	State Trait Anxiety Inventory (STAI)	MUZZARELLI <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrus limon</i> , <i>Lavandula officinalis</i> e outros	POSITIVO (ansiedade e bem estar)	massagem (mistura dos OE diluídos em óleo vegetal de jojoba a 3% v/v, por 2 períodos de 3 semanas consecutivas com massagem+1 semana sem massagem)	20min/3x semana	não especificado	36 voluntárias mulheres idosas (65-85 anos)	medição da pressão sanguínea; Spielberg's State-Trait Anxiety Inventory (STAI)-X1; Rosenberg Self-Esteem Scale (RSE)	RHO <i>et al.</i> , 2006
incenso de lavanda	POSITIVO (ansiedade)	Inalação (10 incensos, sala com área de 165.93 m3)	60 min	não especificado	95 estudantes	questionário e STAI (State Trait Anxiety Inventory)	KUTLU <i>et al.</i> , 2008
<i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (estresse)	Inalação (papel umedecido com 150µL de OE)	10 min	não especificado	30 voluntários (21 a 26 anos)	cortisol e chromogranin A (CgA) salivar; visual analog scale; Uchida-Kraepelin test	TODA e MORIMOTO, 2008
<i>Citrus sinensis</i> , <i>Lavandula officinalis</i> e outros	Parcialmente POSITIVO (ansiedade)	massagem (mistura dos 3 OE na proporção 2:1:1 em solução 1% com óleo vegetal Macadamia integrifolia)	45 min	não especificado	13 voluntários	State Anxiety Inventory (SAI); Visual Analog Scale; Face Scale (humor); cortisol salivar; imunoglobulina A salivar;	TAKEDA <i>et al.</i> , 2008
<i>Lavandula officinalis</i> , bergamota, outros	Parcialmente POSITIVO (ansiedade e estresse)	inalação (três difusores elétricos, em sala de 193 cm ³ , contendo 1 gota de cada OE diluído em 100ml de água destilada)	60 min	não especificado	46 voluntários estudantes de enfermagem	STAI (State Trait Anxiety Inventory); parâmetros fisiológicos; VAS (<i>visual analogue scale</i>) = resposta a questionário com escala	KIM <i>et al.</i> , 2010
<i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (ansiedade)	ingestão oral (cápsula de Silexan [®] , contendo 80 mg de OE)	1x dia/6 semanas	Lorazepan (i.p.)	78 pacientes (18 a 65 anos)	Hamilton Anxiety Rating Scale (HAM-A-totalscore); SAS (Self-rating Anxiety Scale), PSWQ-PW (Penn State Worry Questionnaire), SF 36 Health survey Questionnaire and Clinical Global Impressions of severity of disorder (CGI)	WOELK e SCHLÄPFKE, 2010
<i>Citrus sinensis</i>	POSITIVO (ansiedade)	inalação (vaporização através de difusor elétrico, 2 mL de OE em sala 10m2)	1 h	não especificado	30 crianças (6-9 anos) em tratamento dentário	cortisol salivar e pressão sanguínea	JAFARZADEH <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus bergamia</i> (bergamota)	POSITIVO (ansiedade)	inalação (sala aromatizada)	30 min	não especificado	109 pacientes	State Trait Anxiety Inventory (STAI)	NI <i>et al.</i> , 2013

Tabela 4 - Revisão bibliográfica das ações psicofarmacológicas atribuídas aos OE de *Citrus*, *Lavandula officinalis* rica em linalol e componentes linalol e limoneno em animais roedores.

OE ou componente	RESULTADO (avaliação do ensaio)	aplicação (detalhes)	tempo de exposição ao OE	controle positivo (administração)	animais (n=número por ensaio)	instrumentos de avaliação (testes)	referência bibliográfica
<i>Citrus aurantium</i> L.	POSITIVO (ansiedade, sedativo)	ingestão oral (por gavagem) OE solubilizados em Tween 80 (doses de 0,5 a 1,0 g/Kg)	1 dose	Clordiazepóxido (i.p.); Ácido valproico (i.p.); Diazepam (i.p.)	camundongos (n=6-14/grupo)	labirinto em cruz elevado campo aberto rotor rotativo sono induzido por pentobarbital	CARVALHO- FREITAS e COSTA, 2002
<i>Lavandula officinalis</i> , <i>Citrus limon</i>	POSITIVO (estresse)	inalação (algodão embebido com 2mL da solução OE 50% v/v em etanol, em caixa de 30 cmx23 cmx15 cm)	90 min	Diazepam (i.p.); Flumazenil (i.p.); Buspirona (i.p.); WAY100635 (i.p.)	camundongos (n=5-10/grupo)	labirinto em cruz elevado, nado forçado, campo aberto, quantificação de monoaminas e seus metabólitos por CLAE	KOMIYA <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrus aurantium</i>	POSITIVO (ansiedade)	ingestão oral (OE diluído em Tween 80, e administrado por gavagem em 0,5 or 1,0 g/kg)	1x dia/ 2 semanas	Diazepam (i.p.)	camundongos (n=5-14/grupo)	<i>Marble-burying test</i> , caixa claro-escuro, rotor rotativo	PULTRINI <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka, <i>Citrus reticulata</i> Blanco e <i>Citrus aurantium</i> L.	POSITIVO (ansiedade e sedativo)	ingestão oral (por meio de uma cânula gástrica) OE solubilizados em Tween 80 (doses de 0,25 a 2,0 g/Kg)	1 dose	Diazepam (i.p.); Imipramina (i.p.)	camundongos (n=7-15/grupo)	Teste de Esconder Esferas (" <i>Marble Burying Test</i> ") Caixa Claro/Escuro (" <i>Light/Dark Box</i> ") Sono Induzido por Éter Etilíco Teste da Barra Giratória	GARGANO, 2007
<i>Lavandula angustifolia</i> (<i>Lavandula officinalis</i>)	POSITIVO (ansiedade)	inalação (vaporização do OE através de difusor elétrico, 4gotas/4x ao dia, em caixa de 38 cmx25 cmx20 cm)	24 hs/14 dias	Diazepam (i.p.)	gerbils (n=12-14/grupo)	labirinto em cruz elevado	BRADLEY <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrus aurantium</i> (neroli)	POSITIVO (ansiedade)	inalação (100uL de OE vaporizado através de nebulizador elétrico, gotas de OE na água da cuba de nado forçado)	30-120 min	Xanax (i.p.)	gerbils (n=8-12/grupo)	atividade locomotora, distinção olfativa; <i>Marble-burying test</i>	CHEN <i>et al.</i> , 2008
<i>Citrus aurantium</i>	POSITIVO (ansiedade, sedativo, relaxante)	inalação (OE diluído em 1,0%; 2,5% e 5,0% p/v)	7 min	Diazepam (i.p.)	ratos (n=12/grupo)	labirinto em cruz elevado, campo aberto, social interação	LEITE <i>et al.</i> , 2008
(R)-(-)-linalol	POSITIVO (estresse)	inalação (20 µL de linalol em caixa de 40 L)	2 horas	ar atmosférico	ratos (n = 4/grupo)	nível plasmático dos hormônios corticosterona (CORT) e adrenocorticotrófico (ACTH); exame de sangue e de genes	NAKAMURA <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus sinensis</i>	POSITIVO (ansiedade)	inalação (algodão embebido com 100, 200 ou 400 µl de OE, câmara de inalação com 36x30x29 cm)	5 min	Diazepam (i.p.)	ratos (n=10-11/grupo)	labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro	FATURI <i>et al.</i> , 2010
Linalol	POSITIVO (ansiedade, interação social, comportamento agressivo)	inalação (vaporização de solução 3% v/v OE diluído em tween-80)	60 min	Diazepam (i.p.)	camundongos (n=14-25/grupo)	comportamento agressivo, interação social caixa claro-escuro, <i>Step down inhibitory avoidance</i>	LINCK <i>et al.</i> , 2010
<i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (ansiedade)	inalação (algodão embebido com 1ml da solução de OE diluído 0,5-5% v/v em prolipropilenoglicol, em caixa 32 x 24 x 32 cm)	15 min	Diazepam (i.p.)	camundongos com anosmia (n=10/grupo)	atividade locomotora; nado forçado	CHIOCA <i>et al.</i> , 2013a
<i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (ansiedade)	inalação (algodão embebido com 1ml da solução de OE diluído 1,0%, 2,5% e 5,0% (v/v) em prolipropilenoglicol, em caixa de 32 x 24 x 32 cm)	15 min	Diazepam (i.p.); 8-OH-DPAT (i.p.); WAY100635 (i.p.); Fluoxetina (i.p.); 5-Hidroxitriptofano (i.p.)	camundongos (n=8-12/grupo)	<i>Marble-burying test</i> ; labirinto em cruz elevado, atividade locomotora, análises bioquímicas	CHIOCA <i>et al.</i> , 2013b
<i>Citrus aurantium</i> L. e (R)-(+)-limoneno	POSITIVO (ansiedade, depressão)	ingestão oral (solução 0,01% v/v em tween-80; doses 1, 5, 10 e 50 mL/Kg)	1x dia/14 dias	Diazepam (i.p.); Flumazenil (i.p.); Buspirona (i.p.); WAY100635 (i.p.)	camundongos	rotor rotativo, caixa claro-escuro, nado forçado, avaliação neuroquímica e análises toxicológica e bioquímica	COSTA <i>et al.</i> , 2013
(R)-(+)-limoneno	POSITIVO (ansiedade)	inalação (algodão embebido com 0,5%, 1,0% e 2,5% em solução tween- 80 (0,2% v/v em água destilada); em caixa de 36x30x29 cm)	7 min	Diazepam (i.p.); Flumazenil (i.p.)	camundongos (n = 8/grupo)	labirinto em cruz elevado	LIMA <i>et al.</i> , 2013
<i>Lavandula officinalis</i>	POSITIVO (ansiedade)	ingestão oral (1 and 30 mg/kg/dia Silexan®)	1x dia/3 dias	Diazepam (i.p.), Pregabalin (i.p.); Pentobarbital (i.p.)	camundongos (n=8/grupo)	labirinto em cruz elevado, tempo de sono; análises bioquímicas	SCHUWALD <i>et al.</i> , 2013
(S)-(+)-linalol	POSITIVO (estresse)	inalação (20 µL de linalol em caixa de 40 L)	2 horas	ar atmosférico	ratos (n = 4/grupo)	nível plasmático de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); exame de sangue e de genes	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2013
(+)-Limoneno epóxido	POSITIVO (ansiedade)	ingestão oral (+)-limoneno epóxido emulsificado com 0,05% tween-80 e dissolvido em 0,9% solução salina. doses: 25, 50 and 75 mg/kg)	1x dia/14 dias	Diazepam (i.p.)	camundongos (n=6-8/grupo)	<i>Marble burying test</i> (MBT); análises bioquímicas	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014

A maioria das publicações referenciadas nas Tabelas 3 e 4 registram em seus resultados que os OE de *Citrus*, seus componentes e de *Lavandula officinalis* reduzem os estados de ansiedade e estresse. Estes dados, juntamente com outros estudos, endossam a recomendação da utilização destes OE, como um complemento ao tratamento para pessoas com estes sintomas (FISMER *et al.*, 2012).

Contudo alguns autores, consideram que não há evidências conclusivas quanto a eficácia, durabilidade e efetividade destes efeitos, entretanto aceitam a sua recomendação como alternativa de baixo custo frente aos tratamentos convencionais (BUTJE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011; PERRY *et al.*, 2012; TRELLAKIS *et al.*, 2012).

3.8. Detecção do OE nos fluídos biológicos

Como apresentado nas Tabelas 3 e 4, vários estudos foram realizados com OE, aplicados através de diversas técnicas - vaporização/inalação, massagem, via oral, via peridural - em voluntários humanos e em animais, com o objetivo de avaliar os estados emocionais de ansiedade e de estresse.

Estudos demonstram que ocorreu a absorção do OE pelo organismo, pois foram encontrados os componentes dos OE no plasma, após estas aplicações (BOWLES, 2003). Nos estudos de JÄGER e colaboradores (1992) e MUCHTARIDI e MUSFIROH (2012), os componentes dos OE foram detectados através da análise por CG, em plasma de voluntários humanos após massagem com OE de lavanda (*Lavandula officinalis*) e em plasma de camundongos após a inalação do OE de eucalipto (*Meulaleuca leucadendron* Linn), respectivamente. Na Figura 23, apresentamos os cromatogramas obtidos por cromatografia em fase gasosa a partir dos plasmas nestes estudos.

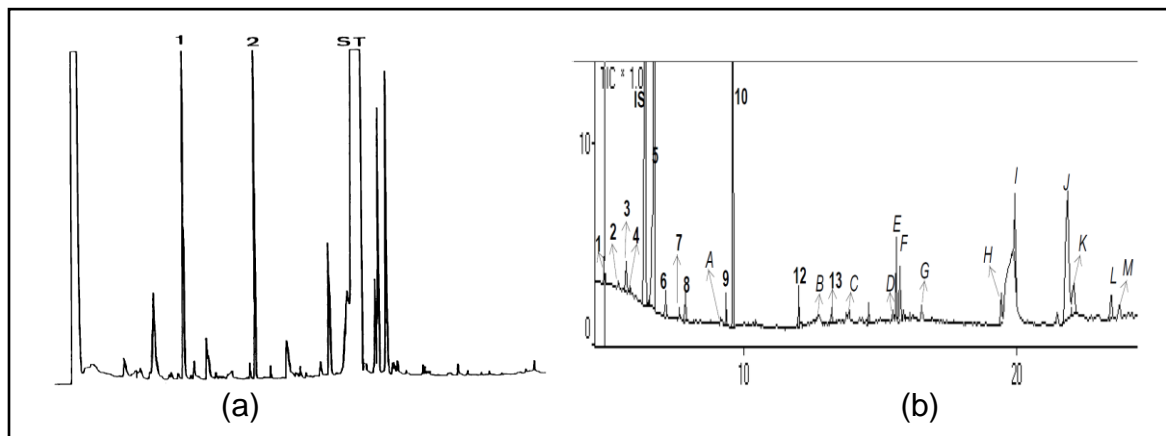


Figura 23 - Detecção dos componentes do OE em plasma por CG: (a) CG-FID, OE de lavanda (*Lavandula officinalis*), após seção de massagem em voluntários (pico 1: linalol; pico 2: acetato de linalila; pico ST: padrão interno) (Fonte: JÄGER *et al.*, 1992); (b) SPE-CG/EM, OE de eucalipto (*Meulaleuca leucadendron* Linn), após inalação por camundongos. (indicações: 1 - 13, componentes do OE; A - B, interferentes da análise) (Fonte: MUCHTARIDI e MUSFIROH, 2012).

3.9. Ensaio Comportamentais com animais

3.9.1. Modelos experimentais de ansiedade

Os modelos usualmente utilizados na avaliação de propriedades ansiolíticas de medicamentos sintéticos e compostos de origem natural incluem os testes que confrontam os roedores a novos ambientes, o que por sua vez provoca reação de medo e diminuição do comportamento exploratório, isto é, "emocionalidade". Em tais situações, os compostos ansiolíticos aumentam o comportamento exploratório (BELZUNG e LE PAPE, 1994). O termo emocionalidade foi utilizado por HALL (1934) para expressar o fato do animal ficar imóvel quando exposto a um ambiente novo.

Estes modelos animais de ansiedade evocam comportamentos análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade, o que pode ser relacionado à hipervigilância a riscos, apresentada por indivíduos

ansiosos. A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; entretanto, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos (BLANCHARD *et al.*, 2001 e 2011; RODRÍGUEZ e DUEÑAS, 2013).

3.9.1.1. Caixa claro-escuro

É um modelo baseado em comportamento não condicionado, ou seja, não necessita de aprendizagem (CHAOULOFF *et al.*, 1997). Este teste comportamental foi descrito inicialmente por CRAWLEY e GOODWIN (1980), sofrendo pequenas modificações posteriormente, por outros pesquisadores (SHIMADA *et al.*, 1995). Trata-se de um modelo de conflito, onde existe a tendência natural a explorar ambientes novos, frente à esquivas de executar tal exploração, devido à possibilidade potencial de estímulos aversivos neste novo ambiente. Baseia-se na aversividade natural dos roedores a ambientes excessivamente claros. Esta aversividade é medida a partir de comportamentos ansiogênicos expressados através de menor tempo de exposição ao compartimento claro da caixa e também do menor número de alternância entre os dois compartimentos claro-escuro (BOURIN e HASCOET, 2003). Os medicamentos BZP são utilizados como drogas controle (CHAOULOFF *et al.*, 1997). Basicamente, caracteriza-se por um compartimento claro, iluminado com uma intensidade relativamente elevada, apresentando paredes e piso brancos. Este compartimento claro está ligado através de uma abertura a outro compartimento, sem nenhuma luminosidade e com paredes e piso de coloração preta (LI e QUOCK, 2001; CARLILE *et al.*, 2012), Figura 24. Este teste tem a duração de 5 min.

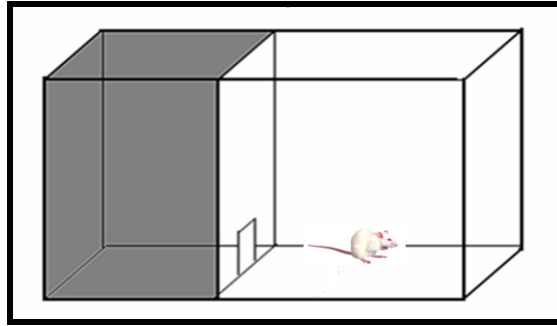


Figura 24 - Modelo de caixa do ensaio comportamental claro-escuro. Inicialmente o animal é colocado na área clara de costas para a abertura que dá acesso à área escura.

3.9.1.2. Atividade exploratória e locomotora

Este modelo foi adaptado por CREESE e colaboradores (1976), utilizando uma caixa de dimensão retangular, com fotocélulas de luz no infravermelho, que contam automaticamente cada vez que o animal cruza o seu feixe luminoso, interrompendo o circuito (Figura 25). A medida de atividade exploratória é obtida utilizando o número de cruzamentos ocorridos nos 5 minutos iniciais e a medida da atividade locomotora o número de cruzamentos nos 10 minutos finais. Este teste pode ser utilizado para avaliar drogas com atividade depressora ou estimulante do SNC, que podem diminuir ou aumentar a locomoção, respectivamente (GAWANDE *et al.*, 2011; THIRUPATHY *et al.*, 2011; ROUT *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013).



Figura 25 - Caixa de atividade exploratória e locomotora, com as fotocélulas de luz infravermelha.

3.9.2. Modelos experimentais de atividade tipo antidepressiva

CRYAN e HOLMES (2005) investigaram o desenvolvimento de modelos apropriados para avaliar os comportamentos associados à depressão e à ansiedade, objetivando a avaliação pré-clínica da eficiência de medicamentos antidepressivos e ansiolíticos. Um dos modelos estudados para avaliar o estado depressivo é o teste de suspensão pela cauda.

3.9.2.1. Teste de suspensão pela cauda

Este modelo foi descrito por STERU e colaboradores (1985), possibilitando determinar a característica de atividade individual do animal para reagir a uma situação desconfortável, estando relacionado diretamente à depressão e atividade do tipo antidepressiva. Este teste consiste em prender verticalmente o animal pelo terço final da cauda em uma estrutura, de modo que seu focinho fique a aproximadamente vinte centímetros do piso, o que pode ser visualizado na Figura 26. É cronometrado o tempo em que o animal permanece imóvel na posição cabeça-para-baixo, de modo a indicar sua não disposição para superar situações incômodas e desconfortáveis, realizando assim uma analogia ao comportamento depressivo, onde o indivíduo abandona a disposição de luta (CRYAN e HOLMES, 2005). Este teste tem a duração de 6 min.

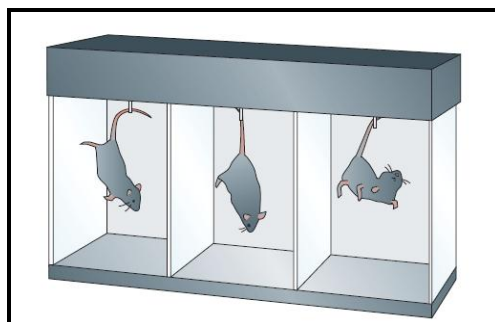


Figura 26 - Modelo de caixa para o teste suspensão pela cauda (Fonte: CRYAN e HOLMES, 2005).

3.10. Doenças da área da saúde mental

No ano de 2012, a área da desordem mental e comportamental apresentou o maior percentual, de 16,8%, na estatística mundial de pesquisas e registros da saúde, de acordo com o gráfico da Figura 27.

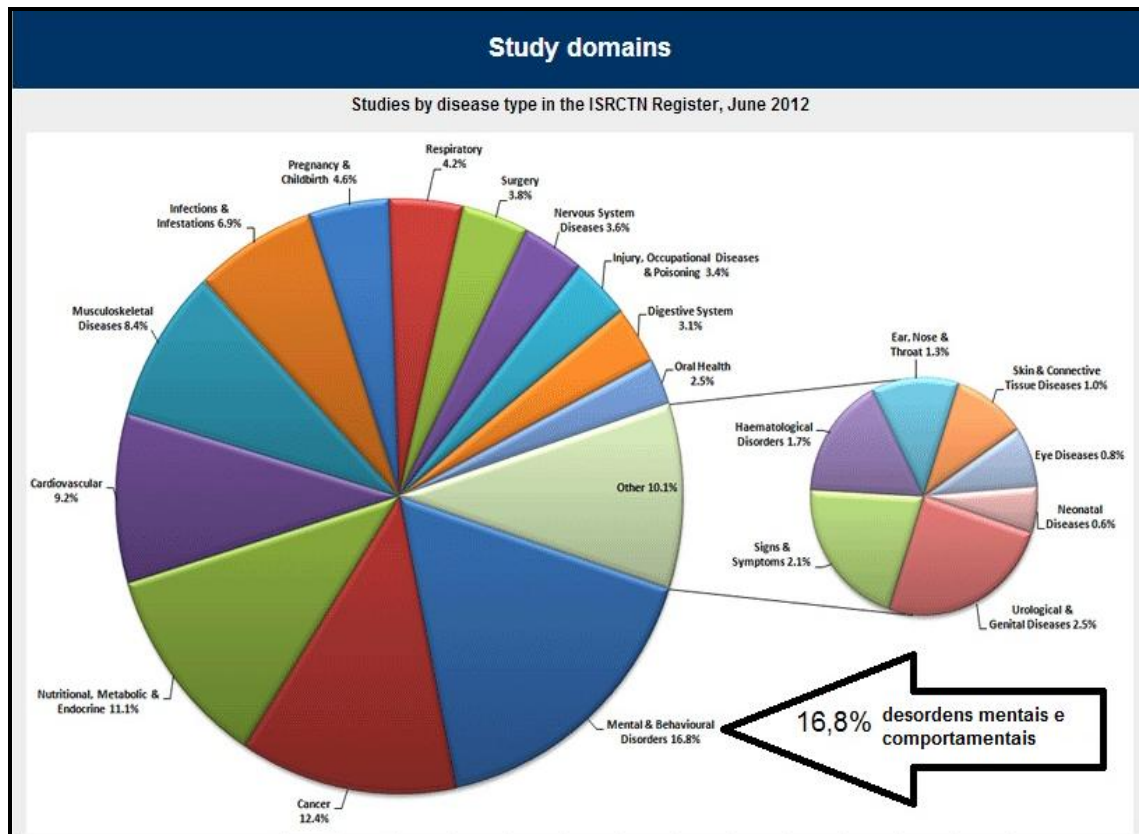


Figura 27 - Gráfico da estatística mundial de registros de estudos em saúde referente o 2012, com destaque para o dado de 16,8% da área da saúde mental (fonte: ISRCTN Register, <http://www.controlled-trials.com/news/statistics>. Acessado em 09/05/2013).

Em se tratando de saúde mental, a Organização Mundial da Saúde vem publicando recomendações e diretrizes sobre a problemática de dois estados mentais patológicos que atingem a humanidade como um todo: a ansiedade e o estresse (WHO, 2000; OMS, 2001; WHO, 2013; SHIRNESHAN *et al.*, 2013; TOWE-GOODMAN *et al.*, 2014). Embora estes estados emocionais sejam de

extrema complexidade, estudos indicam a possibilidade de avaliação dos níveis de ansiedade e de estresse, através da quantificação de alguns parâmetros biológicos, dentre eles os hormônios melatonina (MEL) e cortisol (COR) ou corticosterona (CORT) (SPENCE *et al.*, 2004; KELLER, 2006; REITER *et al.*, 2009; BERGAMINI *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2014).

3.10.1. O estado emocional de ansiedade e o hormônio melatonina (MEL)

A ansiedade pode ser definida como "*o estado de tensão, apreensão, vago ou difuso, na maioria das vezes acompanhado por sensações fisiológicas desconfortáveis, como aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, entre outros. É estimulada a partir de situações que sinalizem potencialmente um perigo, levando à inquietação*" (BRANDÃO, 2004).

A ansiedade é uma patologia de ordem da saúde mental que causa sofrimento e elevados custos para a sociedade (DUPONT *et al.*, 1996; BALLENGER, 2000; JAMES *et al.*, 2013). Quanto ao seu tratamento, durante muitos anos os BDZ foram os fármacos de escolha, pois são eficazes no controle de seus sintomas e apresentam a vantagem de oferecerem alívio num curto espaço de tempo. Entretanto, mesmo o uso em curto prazo tem sido associado a efeitos adversos importantes, tais como sedação, comprometimento psicomotor, amnésia anterógrada (incapacidade de formar lembranças de fatos recentes) e ainda dependência, caracterizada pela presença de síndrome de abstinência e tolerância (BUFFET-JERROT *et al.*, 1998; SCHMITT e KAPCZINSKI, 2004; SADOCK *et al.*, 2005). Atualmente, as ferramentas terapêuticas disponíveis para tratar ansiedade apresentam efeitos colaterais importantes ou não são eficazes para parte dos pacientes (BALLENGER, 2000; WOELK e SCHLÄFKE, 2010), portanto a avaliação de novos compostos com potencial atividade ansiolítica pode trazer novas alternativas de tratamento mais eficazes e seguras, uma vez que cerca de 43% dos pacientes que apresentam transtornos da ansiedade usam algum tipo de terapêutica complementar (ERNST, 2006).

Vários mecanismos neurológicos e hormonais são associados à ansiedade, dentre eles a produção endógena de MEL que é uma substância secretada pela glândula pineal. Esta glândula localiza-se no cérebro, na área imediatamente rostral ao colículo superior, no teto do terceiro ventrículo e está envolvida na transdução, ou conversão, do sinal da informação ambiental para o sistema neuroendócrino (AFIFI e BERGMAN, 2008). A glândula pineal secreta as aminas biogênicas serotonina, noradrenalina e MEL. A MEL é sintetizada a partir da serotonina em um modo rítmico, que flutua com o ciclo diário de luz, sendo liberada na corrente sanguínea. Deste modo, sua produção sofre uma variação rítmica ao longo do dia, por isto é considerada um marcador do ciclo circadiano (LEWY *et al.*, 1999; ARENDT *et al.*, 2005; KLERMAN, 2005; PANDI-PERUMAL e CARDINALI, 2007; AFIFI e BERGMAN, 2008; SOUSA NETO e CASTRO, 2008; BEDROSIAN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013b). Ela age através da ativação de receptores específicos, sendo que inúmeros dados demonstram outras funções neuroendócrinas, além do ritmo noite-dia. Embora a MEL não possa ser denominada de *hormônio do bem-estar*, estudos demonstram que sua atividade está relacionada com inúmeras funções ligadas à sensação de bem-estar, humor e saúde neuropsíquica tais como suas atividades ansiolítica, antidepressiva, estabilizadora de humor e sedativa (KOOP *et al.*, 2000; FONSECA e PORTO, 2004; POYARES *et al.*, 2005; GUÉNOLÉ *et al.*, 2011; REITER *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2014), além da ação de controle neuroendócrino (ESQUIFINO *et al.*, 2007; LUGO *et al.*, 2010; ETAIN *et al.*, 2011; LUGO, 2011; KIM *et al.*, 2013b). Os estudos na área da saúde mental seguem investigando a MEL, pois verifica-se a alteração de sua secreção rítmica em quase todas as patologias psíquicas de transtorno afetivo sazonal, depressão unipolar, desordem bipolar, comportamento suicida, bulimia, anorexia, esquizofrenia, desordem do pânico e desordem obsessiva compulsiva (PACCHIEROTTI *et al.*, 2001; CUESTA *et al.*, 2013).

Estudos apontam também a atuação da MEL na melhora de estados de depressão leve induzidos por estresse crônico (DETANICO *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2013). Estes resultados indicam que a MEL: (a) *In vitro*, aumenta o número de novos neurônios derivados de células neuronais do hipocampo do adulto; (b) *In vitro*, aumenta a sobrevivência de células progenitoras neurais e

neurônios imaturos pós-mitóticas. Sugerem que a MEL administrada por meio do seu receptor, pode modular a sobrevivência dos neurônios recém-nascidos no hipocampo de adultos, tornando-se a primeira substância exógena com tal especificidade (MIRICK e DAVIS, 2008; KELLEHER *et al.*, 2014). Este efeito neuroprotetor está sendo estudado com resultados positivos em patologias de desordem neurodegenerativa, como a Doença de Alzheimer (HOPPE, 2009), Doença de Parkinson (BASSANI, 2013), cardioprotetor e hepatoprotetor (SANTOS, 2010). KONRATH e colaboradores (2005), demonstraram que a MEL pode atuar no pré-operatório e no pós-operatório devido às suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, e também no tratamento da insônia (ZHDANOVA *et al.*, 2001).

Em relação à toxicidade, a utilização de MEL exógena sugere efeitos antioxidante, aterogênico, atóxico, não-mutagênico (ANISIMOV, 2003). Outro estudo demonstra que o pré-tratamento com MEL impede a toxicidade induzida na espermatogênese, o que poderia ser usado conjuntamente como suplemento para proteger as pessoas submetidas à quimioterapia, protegendo-as dos efeitos colaterais de toxicidade reprodutiva (CHABRA *et al.*, 2014).

Na Figura 28 apresentamos a via neural, que transmite a informação da luz exterior para a glândula pineal (a) e também a visualização da anatomia cerebral com a localização da glândula pineal e a secreção da MEL no sangue (b).

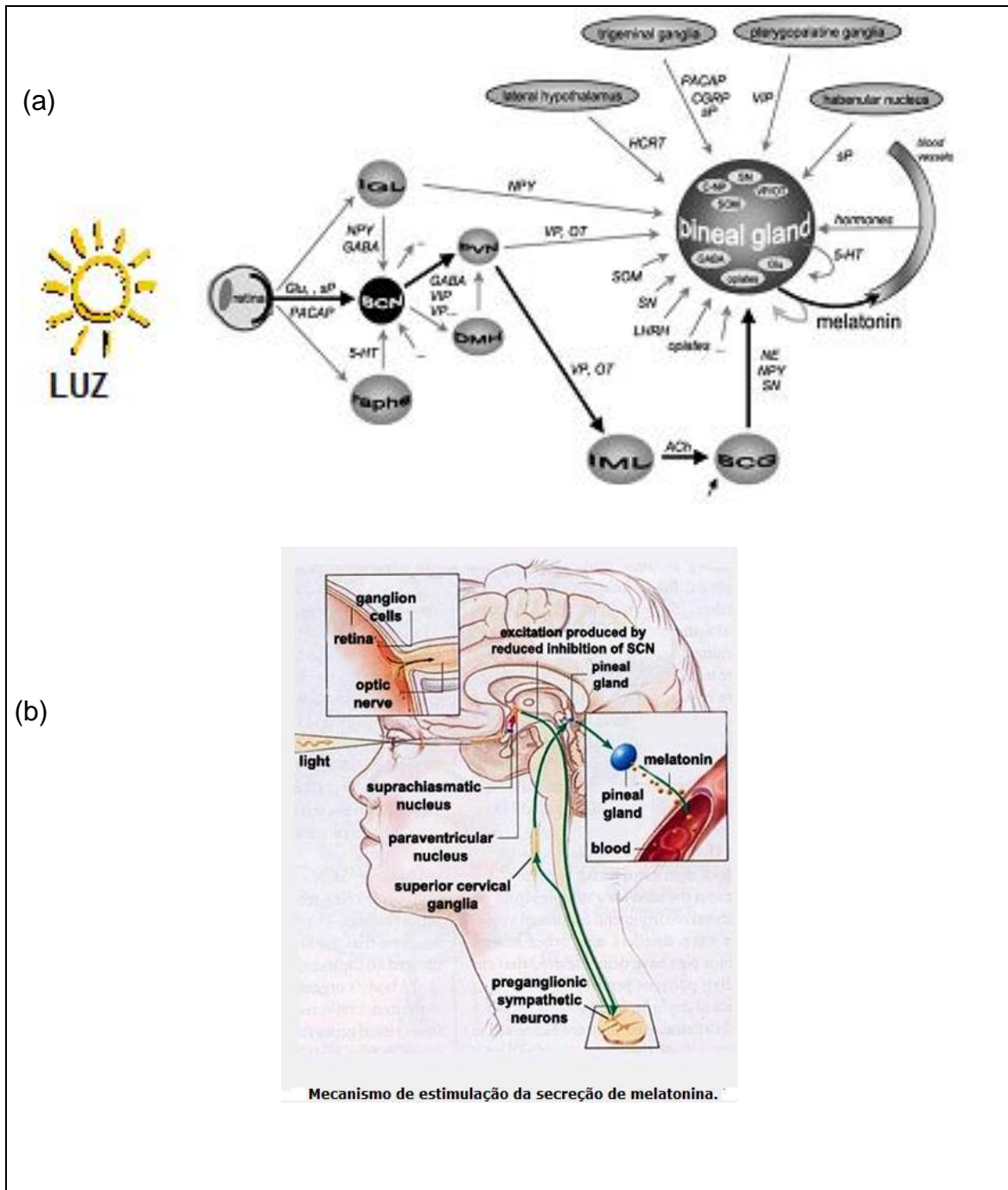


Figura 28 - (a) Representação esquemática dos vários estímulos sofridos pela glândula pineal, com destaque à via do estímulo luminoso através da retina (Adaptado de SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003); (b) Localização cerebral da glândula pineal e sua estimulação via luz-retina produzindo e liberando a MEL no sangue (Fonte: http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_11/a_11_cr/a_11_cr_hor/a_11_cr_hor.html Acessado em 20/02/2014).

Na Figura 29, apresentamos de forma esquemática a rota de biotransformação da MEL a partir do triptofano, chegando à serotonina e então à MEL, com as suas respectivas estruturas químicas.

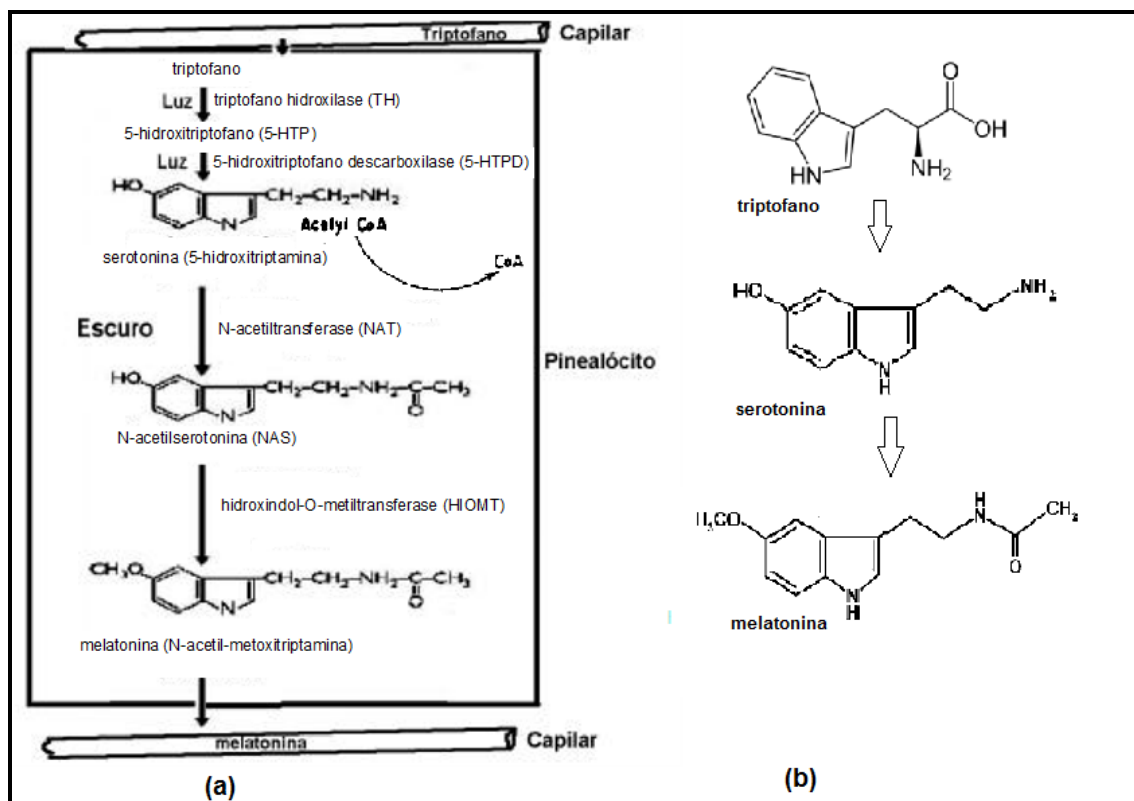


Figura 29 - (a) rota de biotransformação do triptofano, via serotonina, à MEL contendo as enzimas envolvidas; (b) rota simplificada (Adaptado de MAGANHIN *et al.*, 2008).

A MEL é sintetizada a partir do aminoácido triptofano. A enzima triptofano hidroxilase (TH) converte o triptofano, ativamente transportado através da membrana celular, em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Na pineal, esta etapa seria o fator limitante na biossíntese de serotonina. A 5-hidroxitriptofano decarboxilase (5-HTPD) remove o grupo *alfa*-carboxil terminal do 5-HTP e o transforma em serotonina (5-hidroxitriptamina). A N-acetiltransferase (NAT) catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). A enzima hidroxindol-O-

metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em MEL (N-acetil-metoxitriptamina). Esta enzima seria o fator limitante na produção da MEL. Nesta rota de biossíntese da melatonina, a síntese da serotonina a partir do triptofano é estimulada pela luz, no entanto a atividade da enzima N-acetiltransferase (NAT) é estimulada pela ausência de luz, o escuro (REITER, 1991; BOUTIN *et al.*, 2005; PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006; MAGANHIN *et al.*, 2008).

Tanto nos humanos como nos animais roedores, camundongos e ratos, a produção endógena de MEL atinge o seu valor plasmático máximo entre 02:00 h - 03:00 h (da madrugada), declinando ao longo do dia (MOCCHEGIANI *et al.*, 1998; SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003; CORBALAN-TUTAU *et al.*, 2014). A Figura 30 apresenta um gráfico da variação da concentração plasmática da MEL em camundongos ao longo do dia.

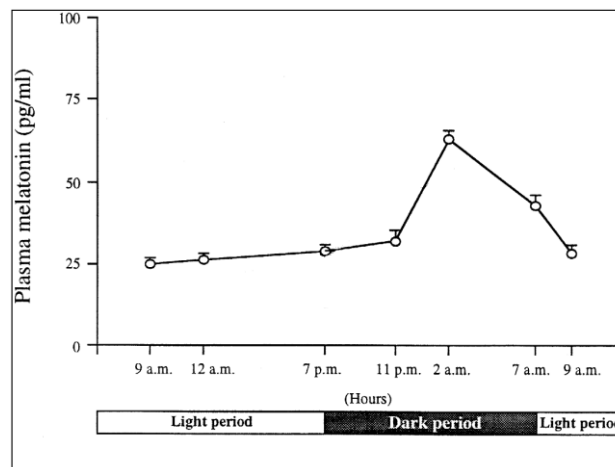


Figura 30 - Variação da concentração plasmática de MEL (pg/mL) em camundongos ao longo de 24 hs, mostrando o período com iluminação (*Light period*) e sem iluminação (*Dark period*) (Adaptado de MOCCHEGIANI *et al.*, 1998).

3.10.2. O estado emocional de estresse e o hormônio corticosterona (CORT)

O estresse é um estado emocional que pode ser definido por: "*situações onde as exigências excedem a capacidade adaptativa de um organismo, gerando mudanças psicológicas e biológicas, o que por sua vez, aumenta o risco do desenvolvimento de um estado de doença*" (COHEN *et al.*, 1997).

É considerado uma patologia da área da saúde mental com significativa importância (SOARES e ALVES, 2006). No estresse, neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotropina (CRH). A CRH estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na glândula hipófise (pituitária) anterior, além de outros neurohormônios e peptídeos cerebrais, como beta-endorfinas e prolactina. O ACTH age na glândula adrenal, localizada na parte superior dos rins, desencadeando a síntese e a secreção de glicocorticóides (principalmente o COR em humanos e a CORT em roedores) pelo córtex da supra-renal (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; ALGHASHAM e RASHEED, 2014). Na Figura 31 apresentamos uma ilustração dos órgãos envolvidos na produção do COR e CORT, onde o sistema HPA (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) regula a secreção de COR / CORT da glândula adrenal como uma resposta fisiológica ao estresse (NICOLAU, 2010). Desta forma o COR / CORT é considerado um hormônio marcador do estado de estresse, sendo avaliado no fluído oral, soro e plasma, em voluntários humanos, em investigações que o relacionam com a qualidade do sono e comportamentos em crianças (KIRSCHBAUM *et al.*, 1993; KELLER, 2006; HELLHAMMER *et al.*, 2009; SCHER *et al.*, 2010) e em animais após ensaios de estresse crônico ou agudo (SUTOH *et al.*, 2013; BERGAMINI *et al.*, 2014).

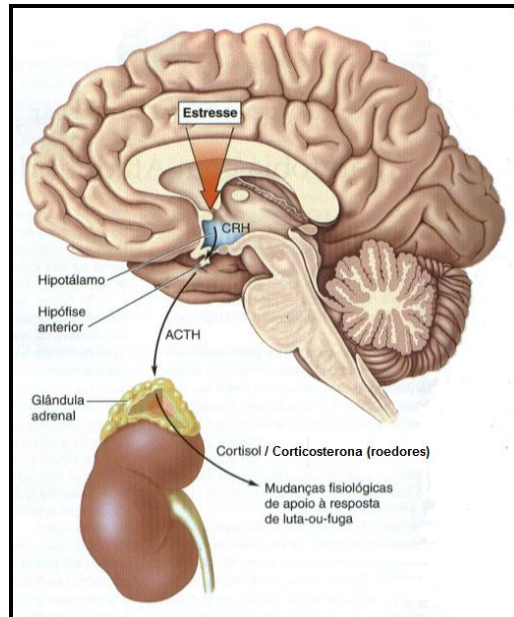


Figura 31 - Ilustração dos órgãos envolvidos e o mecanismo simplificado da produção do hormônio COR e CORT (Adaptado de NICOLAU, 2010).

Na Figura 32 apresentamos de forma esquemática a biotransformação do COR e CORT em humanos e em roedores, respectivamente, e suas estruturas químicas.

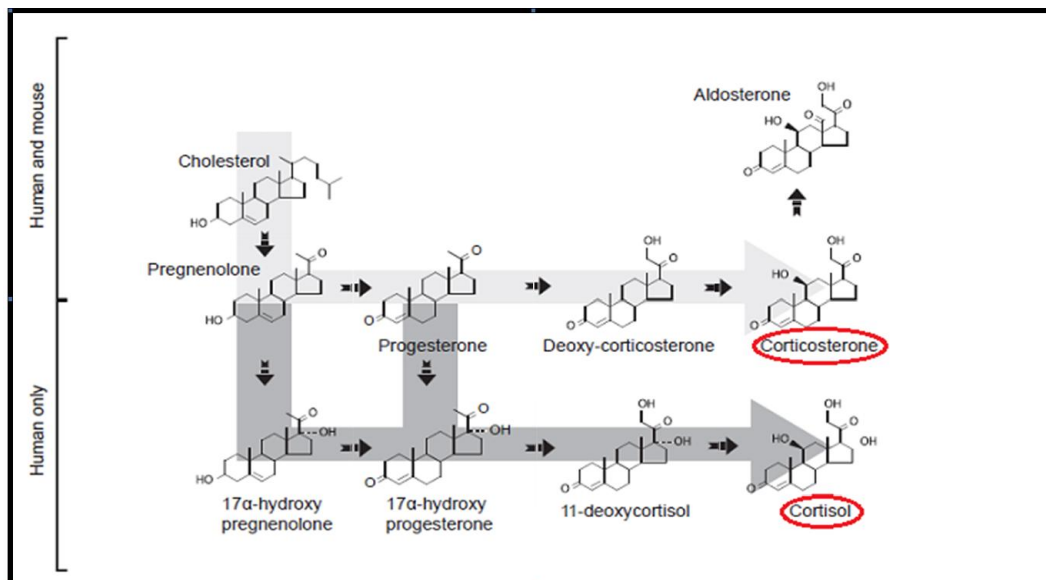


Figura 32 - Rota de síntese dos hormônios esteróides COR e CORT produzidos pelas glândulas adrenais em humanos e em roedores, respectivamente (Adaptado de KOSIR *et al.*, 2012).

A CORT também apresenta variação de concentração plasmática de acordo com a hora do dia, podendo ser usada como marcador do ciclo circadiano (KLERMAN, 2005; PEREIRA *et al.*, 2009; CORBALAN-TUTAU *et al.*, 2014), como pode ser visto na Figura 33.

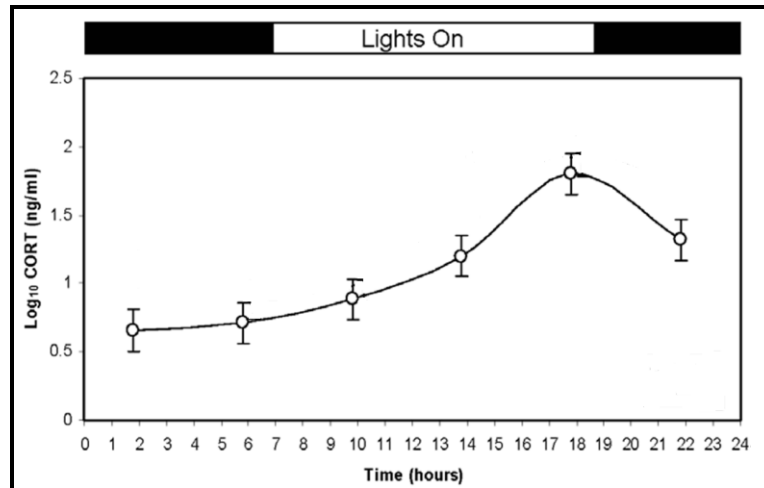


Figura 33 - Variação da concentração plasmática de CORT (ng/mL) em camundongos ao longo de 24 hs, mostrando o período com iluminação (*Lights On*) e sem iluminação (barra preta) (Adaptado de MALISCH *et al.*, 2008).

3.11. Métodos de análise da MEL e da CORT

Existem vários métodos analíticos para detectar e quantificar a MEL e a CORT em distintas matrizes biológicas. Nas Tabelas 5 e 6 apresentamos uma breve revisão bibliográfica destas metodologias para a MEL e a CORT, respectivamente.

Importante destacar os cuidados com os ensaios de MEL e de CORT, os quais sofrem degradação pela luz, exigindo que tanto os padrões, suas soluções e as amostras biológicas sejam protegidas da luz durante todo o processo analítico, podendo ser armazenadas sob refrigeração ou congeladas (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; TOLEDO-PINTO *et al.*, 2010). Tomados estes cuidados, tanto a MEL como a CORT demonstram apresentar estabilidade em matrizes diversas, por exemplo, plasma e fluido oral (SIMONIN *et al.*, 1999; MARWAH *et al.*, 2001; FUSTINONI *et al.*, 2013).

Tabela 5 - Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de MEL em diversas matrizes de humanos e de animais roedores.

Método analítico	unidade e dados de detecção	espécie	matriz (anticoagulante, quando houver)	referência bibliográfica
Enzimaimunoensaio (EIA, ELISA)	2,6 pg/mL (LD)	camundongos Balb (n = 10-50/grupo)	plasma (heparina)	MOCCHIGIANI <i>et al.</i> , 1998
CG/EM (derivatização com Pentafluorpropionico Anidro - PFP)	20 pg/mL (LD)	humanos (não especificado)	plasma (não especificado)	COVACI <i>et al.</i> , 1999
radioimunoensaio (RIA)	10 pg/mL (LD)	humanos (n = 14)	plasma (não especificado)	LEWY <i>et al.</i> , 1999
CL-RIA; CG-EM (extração por SPE, derivatização com Pentafluorpropionico Anidro - PFP)	15 pg/mL (LD); 1 pg/mL (LD)	humanos (não especificado)	plasma (não especificado); fluido oral	SIMONIN <i>et al.</i> , 1999
ELISA	3 pg/mL (LD, soro)	camundongos B6C3F1, hybrid between C57BL/6 e C3H (n = 2-3/grupo)	soro, pineal e outros tecidos	LAHIRI <i>et al.</i> , 2004
RIA; CL/EM/EM	pg/mg (unidade utilizada)	camundongos C57BL/6J (n = 14) humanos (n = 30-40)	foliculo capitar (pelo), pele	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2005
CL-EM/EM; GC/EM (derivatização com Pentafluorpropionico Anidro - PFP)	0,02 pmol - 0,25 pmol (LD, de acordo com o derivatizado)	camundongos WT129B6 (n = 3/grupo)	urina	MA <i>et al.</i> , 2006
RIA	40 pmol/L (ratos, LD em torno de); 2 pmol/L (humanos, LD em torno de)	ratos Wistar (n = 4-10/grupo); humanos (n = 5-6/grupo)	soro	PESCHKE <i>et al.</i> , 2006
RIA	6 pg/pineal (LD)	ratos Wistar (n = 8/grupo)	pineal	CANO <i>et al.</i> , 2008
UPLC-TOFMS*; CLAE-EM/EM	m/z	camundongos WT C57/BL6, CBA, e 129Sv (n = 4/grupo)	urina	MA <i>et al.</i> , 2008
CG/EM; CLAE-DF; CLAE-EM; RIA; ELISA	não especificado	humanos e animais	plasma, soro, urina, fluido oral	MIRICK e DAVIS, 2008
CLAE; RIA	pg/mL (unidade utilizada)	camundongos C57BL/6 (n = 5-6/grupo; n = 80)	hipocampo cerebral; plasma	RAMÍREZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2009
RIA; EIA, ELISA; CG/EM (derivatização com Pentafluorpropionico Anidro - PFP); CLAE-EM/EM; Quimioluminescência; CL-RIA; CLAE-detector de fluorescência (DF)	1-15 pg/mL ou 3-4 pg/mg (LD, de acordo com o método/matriz)	alimentos	alimentos	GARCIA-PARRILLA <i>et al.</i> , 2009
PCR-RT**	não especificado	camundongos WT, MelAABB	sangue, fígado, hipotálamo, pancreas, outros	MÜHLBAUER <i>et al.</i> , 2009
ELISA	pg/mL (unidade utilizada)	ratos Wistar (n = 6/grupo)	plasma (EDTA)	LUGO <i>et al.</i> , 2010
RIA	9,1 pg/mL (LD, soro); 7,3 pg/mL (LD, plasma)	camundongos C3H, C57BL, WT, MT1-/- e MT2-/- (n = 30)	plasma (EDTA), soro	WELP <i>et al.</i> , 2010
RIA	3 pg/mL (LD)	golfinhos (n = 4-8/grupo)	plasma (EDTA)	PANIN <i>et al.</i> , 2012
RIA	0,7 pg/tubo (LD)	camundongos C57BL/6J e CBA/N (n = 4/grupo)	plasma (não especificado), hipotálamo	GOTO <i>et al.</i> , 2013
imunoensaio; CLAE-EM/EM; CG-EM	pg/mL (unidade utilizada)	alimentos	variada	FENG <i>et al.</i> , 2014
CLAE-detector de fluorescência (DF); ELISA	3 ng/mL (LD, CLAE-DF); 1 pg/mL (LD, ELISA)	plantas	extrato vegetal	PADUMANONDA <i>et al.</i> , 2014

* do inglês *Ultrapformance Liquid Chromatography - Time of Flight Mass Spectrometry*** do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

Tabela 6 - Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de COR e CORT em diversas matrizes de humanos e de animais roedores.

Método analítico	unidade e dados de detecção	espécie	matriz (anticoagulante, quando houver)	referência bibliográfica
RIA	0,05 ng/mL (LD)	camundongos Balb machos (n = 10-50/grupo)	plasma (heparina)	MOCHEGIANI <i>et al.</i> , 1998
Fluorimétrico (espectrofotômetro de fluorescência)	µg/dL (unidade utilizada)	ratos <i>Rattus norvegicus/albinus</i> , Rodentia Mammalia), da linhagem EPM-1 Wistar, (n = 10/grupo)	plasma (citrato trisódico)	SOUZA <i>et al.</i> , 2001
RIA; CLAE-EM	ng/fração (unidade utilizada)	ratos Sprague-Dawley (n = 4-8/grupo; n = 72)	fezes	CAVIGELLI <i>et al.</i> , 2005
CG/EM	mg/g creatinina	crianças e adolescentes	urina	HOMMA <i>et al.</i> , 2007
RIA	25 ng/mL (LD)	ratos Wistar (n = 8/grupo)	plasma (não especificado)	CANO <i>et al.</i> , 2008
ELISA	1,7 ng/mL (LD)	camundongos <i>Mus domesticus</i> (n = 3-4/grupo; n = 193)	plasma (heparina)	MALISCH <i>et al.</i> , 2008
RIA	7,7 ng/mL (LD); 90 ng/mL (basal, em torno de)	camundongos Balb (n = 9-11)	soro	DETANICO <i>et al.</i> , 2009
HPLC (SPE-C18)	0,1 nmol/L (LD)	humanos	saliva	PALO <i>et al.</i> , 2009
RIA	6,76 ng/mL (média)	sapos (n = 24-29/grupo)	plasma (heparina)	ASSIS, 2010
RIA	0,23 ug/dL (LD); 8 ug/dL (basal)	camundongos Swiss (n = 5-9/grupo)	plasma (heparina)	MENDES-GOMES <i>et al.</i> , 2010
CLAE-deteção ultravioleta	0,02 ug/mL (LD)	ratos Wistar (n médio = 5/grupo)	plasma (heparina)	TOLEDO-PINTO, 2010
Imunoensaio (Rat Stress Hormon, Milliplex)	µg/dL (unidade utilizada)	ratos Wistar (n = 8/grupo)	plasma (EDTA)	CALVEZ <i>et al.</i> , 2011
ELISA	mol/L (unidade utilizada)	camundongos C57BL/6 (n = 6-10/grupo)	plasma (EDTA)	REBER <i>et al.</i> , 2011
RIA	ng/mL (unidade utilizada)	ratos Long Evans (n = 2/grupo)	plasma (não especificado)	SOLOMON <i>et al.</i> , 2011
Imunoensaio (Rat Stress Hormon, Milliplex)	ng/mL (unidade utilizada)	camundongos C57/BL6 (n = 7/grupo)	plasma (não especificado)	ZUPEKAN <i>et al.</i> , 2011
Imunoensaio Luminex® (Rat Stress Hormon, Milliplex)	ng/mL (unidade utilizada)	ratos Wistar (não especificado)	plasma (EDTA)	AIT-BELGNAOUI <i>et al.</i> , 2012
MEKC*** /UV (detector de ultravioleta, 254nm);	0,5 ng/mL (LD), 2,0 ng/mL (LQ)	humanos (n = 20)	urina	BACZEK <i>et al.</i> , 2012
ELISA; CL-EM/EM	ng/mL (unidade utilizada)	camundongos (não especificado)	plasma (não especificado)	KOSIR <i>et al.</i> , 2012
Imunoensaio (Rat Stress Hormon, Milliplex)	pg/mL (unidade utilizada)	ratos Wistar (n = 6-10/grupo)	plasma (EDTA)	WIEDMER <i>et al.</i> , 2012
Imunoensaio Milliplex Analyser System® (Rat Stress Hormon, Milliplex)	ng/mL (unidade utilizada)	ratos Wistar (n = 5/grupo)	soro	FARIA <i>et al.</i> , 2013
RIA	ng/mL	camundongos C3H/HeN (HeN) and C3H/HeJ (HeJ) (n = 6/grupo)	plasma (citrato trisódico)	GÁRATE <i>et al.</i> , 2013
Imunoensaio Luminex® (Rat Stress Hormon, Milliplex)	ng/mL (unidade utilizada)	camundongos C57BL/6 (n = 4-15/grupo)	plasma (EDTA)	JEW <i>et al.</i> , 2013
Quimioluminescence imunoensaio	nmol/L	camundongos ICR (n = 6/grupo)	plasma (heparina)	LIAO <i>et al.</i> , 2013
ELISA	ng/mL (unidade utilizada)	camundongos C57BL/6 N (n = 4/grupo)	plasma (heparina)	KIM <i>et al.</i> , 2013a
ELISA	ng/mL (unidade utilizada)	ratos Mandarin voles (n = 12/grupo)	soro	YU <i>et al.</i> , 2013
Imunoensaio Luminex® (Rat Stress Hormon, Milliplex)	1,6 pg/mL (LQ)	ratos Wistar (n = 9/grupo)	soro	BERGAMINI <i>et al.</i> , 2014
RIA	ng/mL (unidade utilizada)	camundongos BALB/c (n = 7-9/grupo)	soro	GEVEN <i>et al.</i> , 2014
CLAE-DAD (detector de arranjo de diodo, 240nm)	1,5 ng/mL (LD)	humanos (n = 22)	fluido oral, plasma (EDTA), sangue, urina, DBS* e DUS**	SARACINO <i>et al.</i> , 2014

* do inglês *Dried Blood Spots*

** do inglês *Dried Urine Spots*

*** do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*

Na Tabela 7, compilamos dados de concentrações basais de MEL e CORT de animais roedores, ao longo de 24 hs, em ciclo claro-escuro, onde os quadros sombreados são relativos aos horários do experimento sem luz. Consta-se que os dados variam entre as espécies de roedores, linhagens e estudo.

Tabela 7 - Concentrações de MEL e CORT em fluidos biológicos de roedores de acordo com o horário de 24 hs do ciclo claro-escuro segundo dados bibliográficos*.

analito	matriz / animal	horário da medição																								referência bibliográfica
		00:00	01:00	02:00	03:00	04:00	05:00	06:00	07:00	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00	22:00	23:00	
MEL (pg/mL)	plasma / camundongos Balb			65				45		26			26							27					30	MOCCHIGIANI <i>et al.</i> , 1998
	plasma / ratos	10 - 20										80-100										10-20	SIMONNEAUX e RIBELAYGA 2003			
	soro / camundongos C3H, C57BL, WT, MT1-/- and MT2-/-	20		40		60		20		15		16		20		15		15		16		16		16		WELP <i>et al.</i> , 2010
CORT (ng/mL)	plasma / camundongos Balb			120				150		180			220							250					140	MOCCHIGIANI <i>et al.</i> , 1998
	plasma / ratos Sprague-Dawley			60					90		340									250					60	CAVIGELLI <i>et al.</i> , 2005
	soro / camundongos Balb														80											DETANICO <i>et al.</i> , 2009
	plasma / camundongos Swiss													80												MENDES-GOMES <i>et al.</i> , 2011
	plasma / camundongos C57BL/6 N														350											KIM <i>et al.</i> , 2013a

* espaços não preenchidos são referentes aos horários em que não ocorreu medição. Os quadros sombreados significam sem iluminação.

3.11.1. Método de análise da MEL e da CORT por imunoenensaio com microesferas magnetizadas da tecnologia Luminex®

Entre os métodos analíticos citados nas Tabelas 5 e 6 destacamos o método de imunoenensaio da tecnologia Luminex®. Na última década, o emprego desta metodologia, tanto em diagnóstico como em pesquisa, avançou muito na área da biociência, abrangendo análises de hormônios, genoma, dentre outros (LIU *et al.*, 2005; MIAS *et al.*, 2008; CANO *et al.*, 2009; RUDNICK *et al.*, 2010; LUGO *et al.*, 2010 e 2011; AIT-BELGNAOUI *et al.*, 2012; JEW *et al.*, 2013; CABERLOTTO *et al.*, 2013; STAPLES *et al.*, 2013; CEN *et al.*, 2013; GE *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2013; ALAMILI *et al.*, 2014; BERGAMINI *et al.*, 2014).

Este método apresenta as seguintes vantagens: capacidade de análise simultânea da MEL e do CORT, elevada sensibilidade (na ordem do pg/mL), elevada seletividade, necessidade de reduzida quantidade de amostra (25 µl), rapidez na análise, não necessita de fases preparatórias como extração e derivatização (LUGO, 2011; STAPLES *et al.*, 2013).

A fundamentação do método se baseia na utilização de microesferas, com coloração específica em seu interior, variando do vermelho ao verde. Estas microesferas podem apresentar-se em 100 cores diferentes, permitindo assim que cada microesfera seja identificada por sua cor interna. Cada microesfera possui um anticorpo específico para um analito, ligado à sua superfície externa. O analito presente na amostra é capturado pela microesfera através deste anticorpo. Após esta etapa, outro anticorpo marcado com biotina é adicionado ao sistema, ligando-se na outra extremidade do analito. Adiciona-se então o conjugado streptavidina-ficoeritrina (L-SAPE), que liga-se à biotina através da streptavidina (Figura 34). A cada etapa, para que as reações de fixação ocorram, realiza-se incubação com posterior lavagem para a remoção do material em excesso que não participou da reação. No processo de lavagem, a placa é colocada sobre um ímã, que exerce uma força de atração sobre as microesferas, evitando que elas sejam removidas pela lavagem com perda de analito (LUGO, 2011).

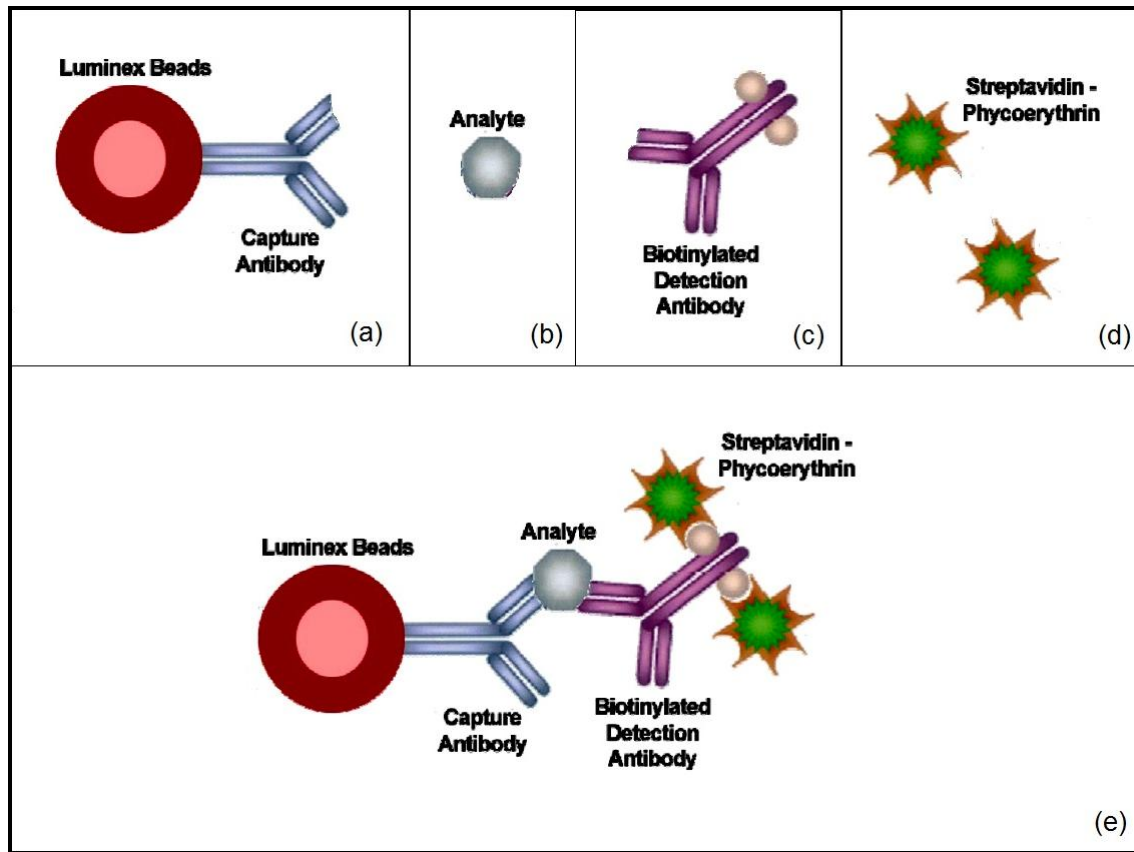


Figura 34 - Sistema de imunoenensaio Luminex[®] contendo microesfera colorida internamente com anticorpo aderido à superfície (a), analito da amostra (b), anticorpo com biotina (c), estreptavidina-ficoeritrina com afinidade à biotina (d), sistema pronto para a medição no equipamento, após incubações e lavagens entre cada uma das etapas anteriores (e) (Fonte: adaptado de www.luminexcorp.com . Acessado em 25/05/2014).

A detecção e quantificação dos hormônios ocorrem quando as microesferas já reagidas, são succionadas pelo equipamento Luminex[®], passando uma a uma, através de um tubo onde dois tipos de laser as atingem. O primeiro laser (vermelho, 635 nm) possui a função de excitar a cor interna da microesfera, a qual emite como resposta duas radiações, uma vez que esta cor interna é formada por dois pigmentos. Esta etapa tem por objetivo identificar a cor da microesfera e com isto a especificação do analito. O segundo laser (verde, 532 nm) excita a ficoeritrina unida à microesfera, que emite como

resposta uma radiação de fluorescência. Esta radiação fornece a concentração do analito (Figura 35). Tanto a especificação da microesfera (laser vermelho), quanto a concentração (laser verde) são realizadas em cada partícula individual pelo sistema Luminex[®], assegurando assim a precisão e a seletividade dos resultados nos ensaios múltiplos com mais de um analito.

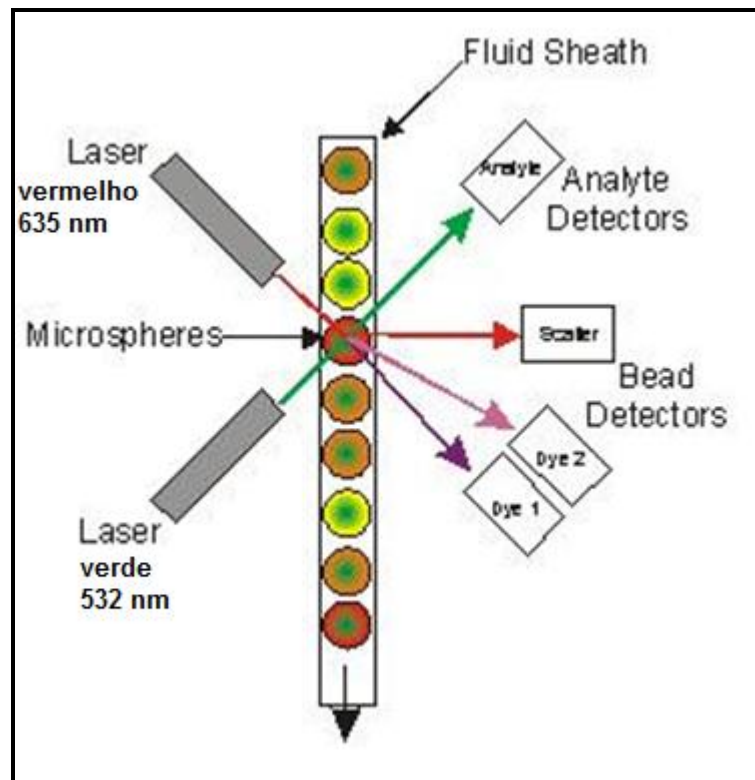


Figura 35 - Processo analítico de detecção e de quantificação no Luminex[®]: fluxo da amostra passa através do tubo, as microesferas são atingidas pelos dois raios de laser, vermelho 635 nm e verde 532 nm. O laser vermelho identifica a microesfera e portanto o analito. O laser verde quantifica o analito através da fluorescência emitida pela ficoeritrina aderida ao sistema-microesfera (Fonte: adaptado de www.luminexcorp.com . Acessado em 25/05/2014).

Face ao exposto, esta tese estudou a ação psicofarmacológica dos OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis* após a inalação por camundongos. Realizou a avaliação através de testes comportamentais e da medição dos níveis plasmáticos de MEL e CORT, bem como pesquisou a presença dos constituintes químicos dos OE no plasma, especialmente o mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila. A Figura 36 mostra de forma esquemática a dinâmica deste estudo.

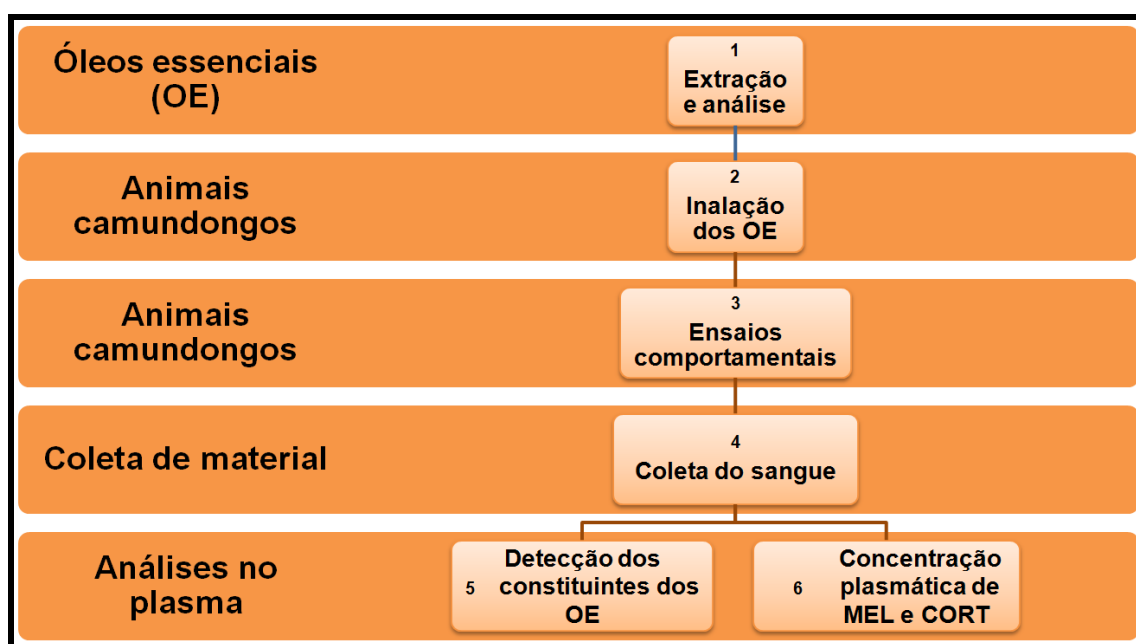


Figura 36 - Fluxograma desta tese: 1- extração e análise dos OE de *C. aurantium* e *C. sinensis*; 2- inalação dos OE por camundongos; 3- realização de ensaios comportamentais após a inalação; 4- coleta do sangue; 5- detecção dos constituintes dos OE inalados no plasma; 6- determinação da concentração plasmática dos hormônios MEL e CORT.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Extração e análise dos componente dos OE

Materiais: As amostras foram identificadas segundo o código identificador do Quadro 3. Os OE analisados de *C. aurantium* e de *C. sinensis* encontram-se descritos no Quadro 4 e Quadro 5, respectivamente, onde há um destaque, por sombreamento, para os dois OE utilizados nos ensaios comportamentais com os animais. Os OE comerciais foram doados pelas empresas Laszlo Ltda, Ferquima Ltda e Verbhena Ltda. As espécies vegetais, das quais os OE foram extraídos por vidraria de *clevenger* em laboratório, foram coletadas em Porto Alegre/RS e em Cristal/RS. A Figura 37 apresenta o pericarpo dos frutos e as folhas das espécies *C. aurantium* e *C. sinensis* utilizadas nos processos de extração nesta tese. Pode-se constatar a diferenciação entre as folhas das duas espécies vegetais com relação ao pecíolo (CALIXTO *et al.*, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2004). A Figura 38 mostra o mapa do Brasil, com a localização dos municípios nas regiões centro-sul e sul, onde as espécies *C. aurantium* e *C. sinensis* foram cultivadas. Para os OE extraídos em laboratório utilizou-se vidraria de *clevenger* modificada por suporte para destilação por arraste de vapor e tradicional por balão para hidrodestilação (Figura 39). Os padrões utilizados foram: (*R*)-(+)-linomeno (pureza 97%, Sigma-Aldrich, EUA), linalol (pureza 97%, Sigma-Aldrich, EUA), mirceno (pureza acima de 95%, Sigma-Aldrich, EUA).

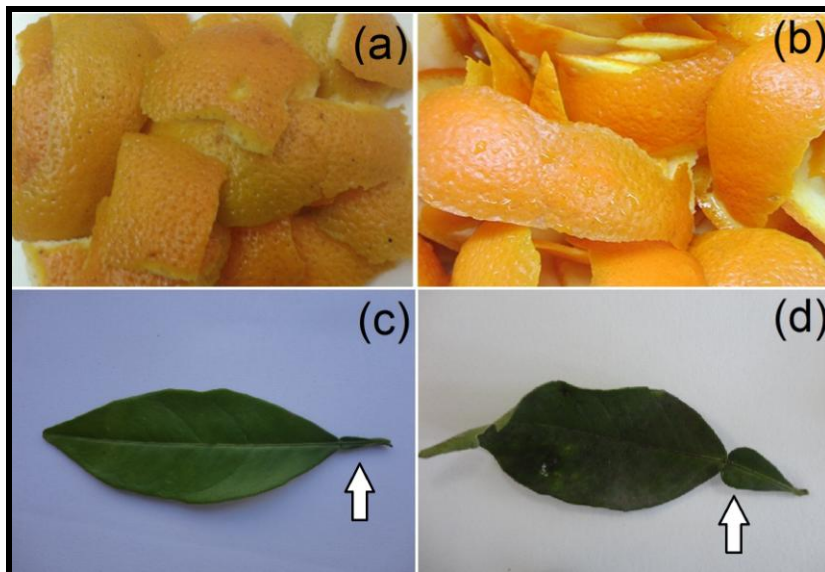


Figura 37 - Fotografias do pericarpo e das folhas utilizados para a extração dos OE nesta tese: pericarpo de *C. sinensis* (a) e *C. aurantium* (b), no modo picotado; folhas de *C. sinensis* (c) e *C. aurantium* (d), com destaque para a diferenciação do pecíolo.



Figura 38 - Mapa do Brasil com a localização dos municípios Dois Córregos/SP, São Paulo/SP, Montenegro/RS, Porto Alegre/RS e Cristal/RS, onde as espécies *C. aurantium* e *C. sinensis* foram cultivadas.

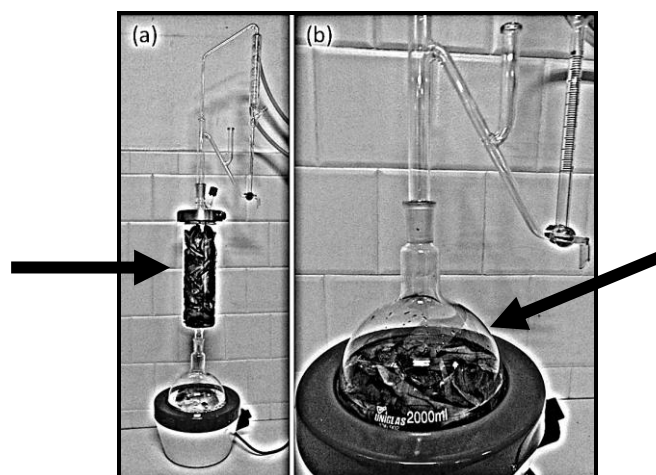


Figura 39 - Vidraria de *cleverger*: (a) modificada por suporte para destilação por arraste de vapor; (b) tradicional por balão para hidrodestilação. As setas mostram a localização da espécie vegetal.

Quadro 3 - Código identificador dos OE analisados.

seqüência da identificação	espécie vegetal	parte da planta	tipo de extração
A	<i>Citrus aurantium</i> = Ca	folha = f	arraste de vapor = v
B			hidrodestilação = h
C			prensagem a frio = p
D	<i>Citrus sinensis</i> = Cs	pericarpo = p	arraste de vapor = v
E			hidrodestilação = h
F			prensagem a frio = p

Exemplo: ACafv = identificação A, *Citrus aurantium*, folha, arraste de vapor

Quadro 4 – Dados dos OE de *Citrus aurantium* Lineu analisados.

Código identificador	Espécie vegetal*	parte da planta	método de extração	origem ou marca comercial	localização geográfica do plantio
ACafv	<i>C. aurantium</i> Lineu	folhas (<i>petitgrain</i>)	destilação por arraste de vapor	Ferquima Ltda (São Paulo/SP)	centro-sul do Brasil
BCafv	<i>C. aurantium</i> Lineu	folhas (<i>petitgrain</i>)	destilação por arraste de vapor	coletada em Cristal/RS	sul do Brasil latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m
CCafv	<i>C. aurantium</i> Lineu	folhas (<i>petitgrain</i>)	destilação por arraste de vapor	Laszlo Ltda (Dois Córregos/SP)	centro-sul do Brasil latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m
DCapv	<i>C. aurantium</i> Lineu	pericarpo	destilação por arraste de vapor	coletada em Cristal/RS	sul do Brasil latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m
ECaph	<i>C. aurantium</i> Lineu	pericarpo	hidrodestilação	coletada em Cristal/RS	sul do Brasil latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m
FCapp	<i>C. aurantium</i> Lineu	pericarpo	prensagem a frio	Laszlo Ltda (Dois Córregos/SP)	centro-sul do Brasil latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m

* Koller, 2006.

Quadro 5 – Dados dos OE de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck analisados.

Código identificador	Espécie vegetal*	parte da planta	método de extração	origem ou marca comercial	localização geográfica do plantio
ACsfv	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	folhas	destilação por arraste de vapor	coletada em Porto Alegre/RS	sul do Brasil latitude 30° 2' 51" S; longitude 51° 5' 47" W; altitude 3 m
BCsph	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarpo	hidrodestilação	coletada em Porto Alegre/RS	sul do Brasil latitude 30° 2' 51" S; longitude 51° 5' 47" W; altitude 3 m
CCspp	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarpo	prensagem a frio	Ferquima Ltda (São Paulo/SP)	centro-sul do Brasil
DCspp	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarpo	prensagem a frio	Laszlo Ltda (Dois Córregos/SP)	centro-sul do Brasil latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m
ECspp	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarpo	prensagem a frio	Verbhena Ltda (Montenegro/RS)	sul do Brasil latitude 29° 41' 21" S; longitude 51° 28' 1" W; altitude 115 m

* Koller, 2006.

4.1.1. Método de extração dos OE e cálculo do rendimento

Inicialmente os OE foram obtidos mediante extração em vidraria de *clevenger*, seguindo metodologia preconizada pela FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010). Após a otimização do processo, as extrações foram realizadas durante 2 horas e o cálculo do percentual de rendimento foi efetuado em relação ao volume extraído de OE (mL) e a massa de matéria vegetal fresca utilizada (mg), sem descontar a umidade (TIRADO *et al.*, 1995; CHOI *et al.*, 2003; NJOROGE *et al.*, 2005; HOSNI *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; SARROU *et al.*, 2013). Em média utilizaram-se 500 gramas de pericarpo ou de folhas (Figuras 33 e 34), tanto para o método de destilação por arraste de vapor (Figura 35(a)), como para hidrodestilação (Figura 35(b)).

4.1.2. Método de identificação dos componentes químicos dos OE através de CG/EM

Os OE foram injetados diretamente em diluição 2:100 (v/v) em acetato de etila anidro (pureza 99,8%, Sigma-Aldrich, EUA), por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massa (CG/EM). As análises foram realizadas em um CG 5975C acoplado a um detector de ionização de chamas e um detector de espectrometria de massa 7890A (Agilent Technologies, CA, USA), utilizando-se um sistema de EM quadrupolo, operando a 70 eV. Empregou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Método em modo split 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 300 °C, a uma taxa de aquecimento de 3 °C/min, e gás hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min). As temperaturas da interface, da fonte e do quadrupolo foram 280 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente. As composições percentuais correspondentes às áreas foram obtidas a partir de integração eletrônica, sem levar em conta os fatores de resposta relativos. A tentativa de identificação dos constituintes foi pelos Índices de Retenção (IR) calculados através da injeção de uma mistura padrão de *n*-alcanos de nove a vinte e quatro carbonos (VAN

DEN DOOL e KRATZ, 1963), pelos seus IK (índices de Kovats), pelos espectros de massas de todos os componentes presentes (ADAMS, 2007) e pelos dados da biblioteca NIST (NIST-LIBRARY NIST/EPA/NIH Mass Spectral, 2005), considerando-se um valor mínimo de similaridade espectral de 75% para as análises realizadas. A equação de Van den Dool e Kratz para o IR é:

$$IR = 100 \cdot N \frac{[t_x - (t_{n-1})]}{[t_n - (t_{n-1})]} + 100(C_{n-1})$$

Onde: $N = C_n - (C_{n-1})$ C_n é o número de carbonos do n -alcano que elui após a substância analisada. C_{n-1} é o número de carbonos do n -alcano que elui antes da substância analisada; t_x é o tempo de retenção da substância analisada; t_n é o tempo de retenção do n -alcano que elui após a substância analisada; t_{n-1} é o tempo de retenção do n -alcano que elui antes da substância.

O IR calculado foi comparado aos IR da literatura (ADAMS, 2007). A identificação ocorreu de acordo com o procedimento: ao valor obtido pela equação através dos tempos de retenção dos constituintes dos cromatogramas, buscou-se o espectro de massas da literatura com maior semelhança. A margem de erro aceitável para o índice de retenção foi de 10 unidades, ou seja, para um índice de retenção calculado de 991, buscou-se na literatura os índices de retenção e os espectros de massas presentes de 981 a 1001. A análise semiquantitativa dos analitos foi realizada pelo método da normalização interna de área, considerando-se o somatório das áreas normalizadas dos componentes voláteis da amostra líquida do OE como sendo 100 %. A identificação dos componentes pode ser realizada através do índice de retenção segundo TABACCHI e colaboradores (1997), MENARY (1999), LIMBERGER e colaboradores (1998, 2001a, 2001b, 2001c, 2002, 2004, 2008), BRITISH PHARMACOPEIA (2011).

4.1.3. Método de determinação do percentual dos enantioméricos quirais do limoneno e do linalol

A tentativa de identificação dos componentes químicos (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol foi mediante injeção líquida de solução do OE em concentração de 2:100 (v/v) à 2:1000 (v/v) em acetato de etila anidro (pureza 99,8%, Sigma-Aldrich, EUA), em cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao detector de espectrometria de massa, CG-17A e CG/EM QP5000 (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com quadrupolo cilíndrico, operando com energia de ionização de 70 eV. A ionização foi obtida pela técnica de impacto eletrônico. Método em modo split 1:20. Empregou-se uma coluna capilar quiral HP-quiral-10B, cuja fase estacionária contém 10% *permetiylated beta-cyclodextrin* (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), sob as condições: temperatura inicial do forno foi de 70 °C durante 3 min, aumento da temperatura com uma taxa de 2 °C/min, até atingir 110 °C, permanecendo nesta temperatura durante 2 min, aumento da temperatura com uma taxa de 40 °C/min, até atingir 200 °C e permanecendo nesta temperatura durante 2,75 min. As temperaturas do injector e do detector foram fixadas em 220 °C e 250 °C, respectivamente, e gás hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min). A temperatura da interface foi de 230 °C. A análise qualitativa ocorreu de acordo com a descrição no item 4.1.2, co-injeção de padrões e amostras referências. A análise semiquantitativa dos enantioméricos quirais foi realizada pelo método da normalização interna de área, considerando-se o somatório das áreas normalizadas dos 2 componentes quirais em análise como sendo 100 % (STEPHANY *et al.*, 2012; WARD e WARD, 2012; SMELCEROVIC *et al.*, 2013).

4.1.4. Método de determinação da rotação óptica dos OE

Foi realizada a medição da rotação óptica dos OE utilizando-se um polarímetro Polarimeter 341 (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), lâmpada Na/Halogênio, comprimento de onda 589 nm, temperatura 20°C (ANVISA, Consulta Pública nº 29 de 18 de julho de 2013). As medições foram realizadas

em OE sem diluição e em solução 1% OE (v/v) em acetato de etila anidro (pureza 99,8%, Sigma-Aldrich, EUA) nos OE em quantidade insuficiente para preencher o volume do cilindro do percurso da luz do equipamento, 1 mL. Foi estabelecida a calibração do polarímetro com acetato de etila anidro (FARMACOPEIA BRASILEIRA, item 5.2.8, 2010).

4.2. Ensaaios comportamentais em camundongos e análise em material biológico

4.2.1. Animais

Foram usados camundongos Swiss, linhagem CF1, albinos, machos, adultos, pesando entre 30-45 g, em número de 6 a 12 por experimento (n=6-12), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) de Porto Alegre/RS e do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas/RS (UFPel). Antes do início dos experimentos, os animais foram adaptados por 15 dias no camundongário do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS, mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), 10 camundongos por caixa, com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12 horas, início da luz às 07:00 h e mantidos à temperatura de 22° C.

4.2.2. Critérios de escolha dos óleos essenciais

A escolha de 2 OE, entre os 11 OE analisados, para serem administrados inalatoriamente aos camundongos teve os critérios:

- (1) ter quantidade suficiente de OE de modo a executar todos os ensaios comportamentais, levando em consideração possíveis repetições e a ampliação futura do estudo com outros ensaios;
- (2) um OE obtido a partir de *C. aurantium* e outro OE obtido a partir de *C. sinensis*;

- (3) um OE obtido a partir das folhas e outro OE obtido a partir do pericarpo;
- (4) um OE com quantidade percentual elevada de linalol e outro OE com quantidade percentual elevada de limoneno.

Os OE de *C. aurantium* Lineu (código identificador CCafv - Quadro 4) e de *C. sinensis* (L.) Osbeck (código identificador DCspp - Quadro 5), foram os OE escolhidos, para posterior realização dos testes comportamentais. Os ensaios foram realizados separadamente com o OE *C. aurantium* Lineu (obtido por arraste de vapor a partir das folhas, rico em linalol) e com o OE *C. sinensis* (L.) Osbeck (obtido por prensagem a frio a partir do pericarpo, rico em limoneno).

4.2.3. Câmara de inalação

O aparato de inalação (Figura 40) consiste em uma câmara de vidro com formato cilíndrico, com diâmetro interno de 15 cm. Na parte superior possui dois borrifadores acoplados (um de cada lado) que nebulizam a mistura em fluxo contínuo para dentro da câmara, garantido pela saída de ar localizada na parte inferior. Na região central inferior existem 4 orifícios esmerilhados onde são conectados 4 tubos de contenção de 20 cm com vários furos na parte superior para saída de ar, onde os animais são colocados individualmente para inalação. Conforme dados da literatura (LINCK *et al.*, 2009), a câmara é ambientada por nebulização durante 15 minutos, para saturar sua atmosfera, somente após esse período os animais entram na câmara para inalação e permanecem por 30 minutos. As nebulizações foram: (a) Solução teste 1: 10% de OE *C. aurantium* Lineu em sol. aquosa 1% tween-80; (b) Solução teste 2: 10% de OE *C. sinensis* (L.) Osbeck em sol. aquosa 1% tween-80; (c) Solução controle tween-80 (polissorbato 80, agente dispersante-surfactante derivado do sorbitol, fabricante Dellaware): sol. aquosa 1% tween-80; (c) Solução controle ar atmosférico: ar atmosférico.

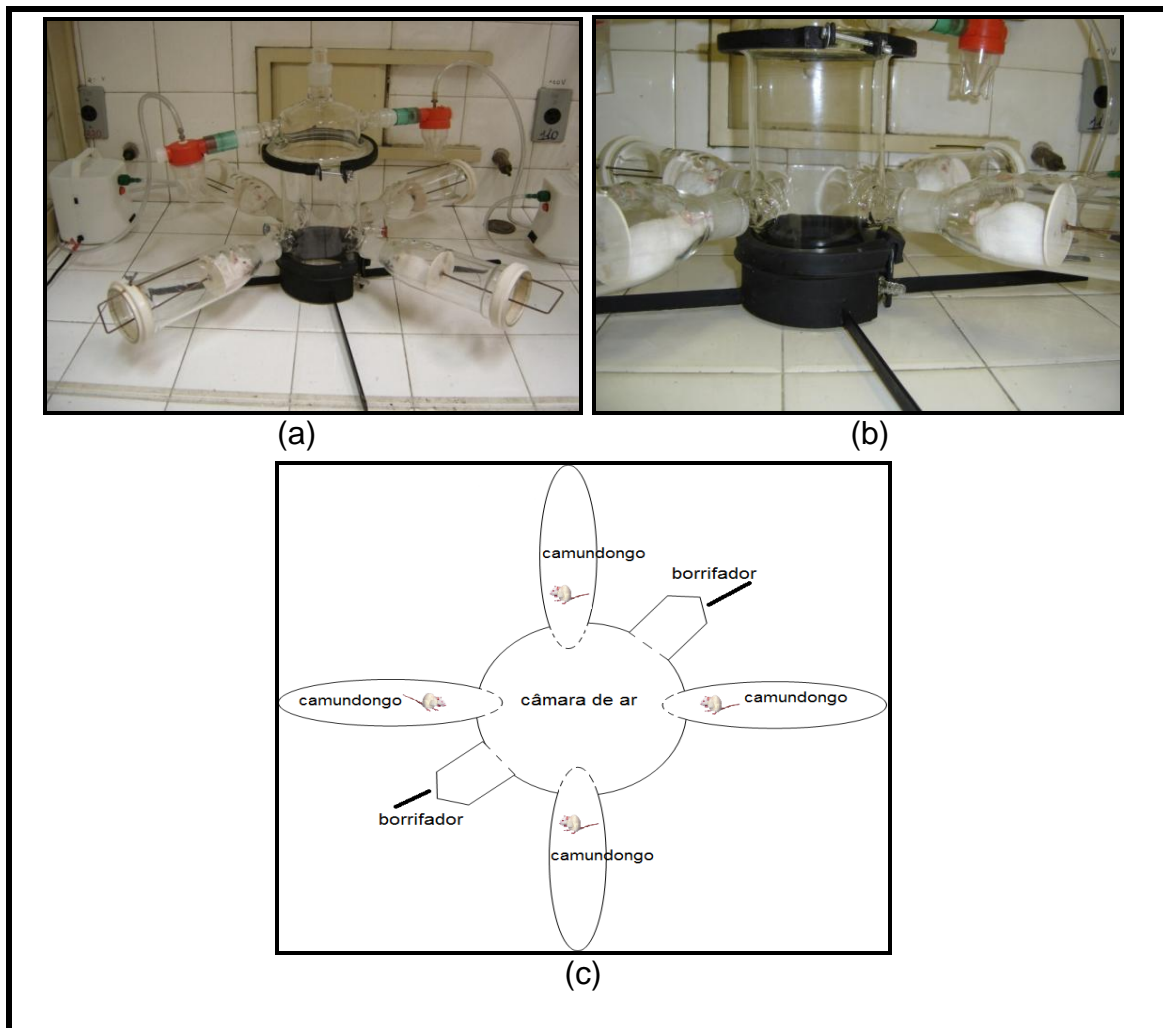


Figura 40 – (a) e (b) fotografias da câmara de inalação com os 4 camundongos dentro dos tubos individuais de vidro conectados a região central, onde existem 2 borrifadores na parte superior da câmara conectados a pequenos motores elétricos; (c) desenho da vista superior da câmara de inalação.

4.2.4. Materiais e equipamentos utilizados

Foram utilizados os medicamentos diazepam (ampola 5,0 mg/mL, Cristália/Compraz, São Paulo), imipramina (pureza acima de 99%, Sigma-Aldrich, EUA) e solução salina (0,9% NaCl), os aparatos de caixa de teste claro-escuro (Albarsch Electronic Equipment, Brasil), caixa de teste de avaliação da atividade locomotora (Albarsch Electronic Equipment, Brasil), caixa de teste de suspensão pela cauda e sistema de gravação de vídeo

automatizado (software The Observers XT5.0, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands).

4.2.5. Avaliação da atividade ansiolítica

Os camundongos foram ambientados durante 2 hs em uma sala escura. Os animais foram tratados por via inalatória, durante 30 min, na câmara de inalação separadamente com: (a) controle ar (AR), (b) controle sol. aquosa 1% tween-80 (TWEEN), (c) 10% de OE *C. aurantium* Lineu (código identificador CCafv) em sol.aquosa 1% tween-80, (d) 10% de OE *C. sinensis* (L.) Osbeck (código identificador DCspp) em sol.aquosa 1% tween-80. Os grupos controles positivos foram tratados i.p. com solução salina (SAL) e diazepam (DZP, 2,0 mg/kg). Imediatamente após a inalação e 30 min após a administração i.p., os animais foram colocados na caixa de teste claro-escuro (Albarsch Electronic Equipment, Brasil), que consiste em uma caixa retangular (46 x 27 x 30 cm) dividida em uma área pequena (18 x 27 cm) e uma área grande (27 x 27cm) interligadas por uma abertura de (7,5 x 7,5 cm) localizada no centro da divisória entre as duas áreas. A área pequena possui as paredes pintadas de preto enquanto que a área maior possui as paredes pintadas de branco e duas lâmpadas frias de 45 watts. Cada animal foi individualmente colocado no centro da área clara, com as costas voltadas para a abertura (Figuras 25 e 41). O comportamento do animal foi gravado durante 5 minutos e analisado pelo sistema de vídeo automatizado (Noldus), quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro cruzamento entre os compartimentos, número de cruzamentos e tempo total de permanência no lado claro (LI e QUOCK, 2001). O teste foi realizado em uma sala escura e sem barulho. Os resultados foram analisados através de ANOVA/LSD.

4.2.6. Avaliação da atividade locomotora

Imediatamente após o término do teste na caixa claro-escuro, os animais foram retirados e colocados na caixa de atividade locomotora (Albarsch

Electronic Equipment, Brasil), a qual consiste em uma caixa de 45 x 25 x 20 cm, com quatro foto-células que contam automaticamente o número de cruzamentos do animal no feixe de luz. A número de cruzamentos foi contado por 15 minutos. A medida dos primeiros 5 minutos não foi considerada, pois trata-se da atividade exploratória do animal. Para atividade locomotora foi considerado o número de cruzamentos dos 10 minutos finais do teste (CREESE *et al.*, 1976; LINCK *et al.*, 2009 e 2010). O teste foi realizado em uma sala escura e sem barulho. Os resultados foram analisados através de ANOVA/LSD (Figuras 26 e 41).

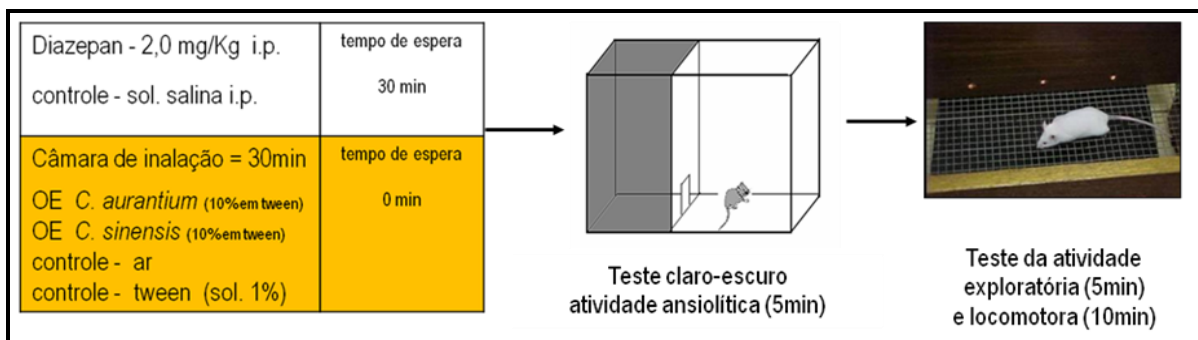


Figura 41 - Sequência do ensaio comportamental da avaliação da atividade ansiolítica (teste claro-escuro) e da atividade locomotora.

4.2.7. Avaliação da atividade tipo antidepressiva

Os camundongos foram ambientados durante 2 hs em uma sala escura. Os animais foram tratados por via inalatória, durante 30 min, na câmara de inalação separadamente com: (a) controle ar (AR), (b) controle sol. aquosa 1% tween-80 (TWEEN), (c) 10% de OE *C. aurantium* Lineu (código identificador CCafv) em sol.aquosa 1% tween-80, (d) 10% de OE *C. sinensis* (L.) Osbeck (código identificador DCspp) em sol.aquosa 1% tween-80. Os grupos controles positivos foram tratados i.p. com solução salina (SAL) e imipramina (IMI, 20,0 mg/kg). Imediatamente após a inalação e 30 min após administração i.p. os animais foram colocados na caixa de suspensão pela cauda por 6 minutos. Cada um deles foi individualmente colocado na caixa, suspenso através da

cauda com fita adesiva, de modo a ficar dependurado. No teste, os animais são suspensos pela porção terminal da cauda a uma altura de 20 cm acima do piso. A duração da imobilidade é cronometrada durante 6 minutos. Os animais são considerados imóveis apenas quando se balançam passivamente ou permanecem com pouca movimentação (STERU *et al.*, 1985; CRYAN e HOLMES, 2005). O teste foi realizado em uma sala escura e sem barulho. Os resultados foram analisados através de ANOVA/LSD (Figuras 27 e 42).

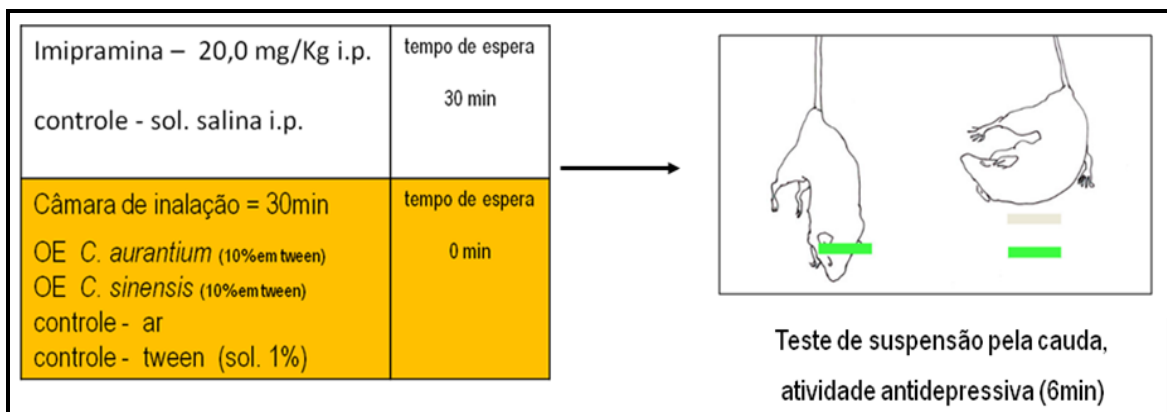


Figura 42 - Sequência do ensaio comportamental da avaliação da atividade tipo antidepressiva (teste de suspensão pela cauda).

4.2.8. Coleta do plasma

O plasma dos camundongos foi coletado entre 12:00 h - 13:00 h, imediatamente após eles terem sido submetidos ao teste suspensão pela cauda. Foram eutanasiados por decaptação e o seu sangue foi coletado em tubo contendo anticoagulante heparina (BD Vacuntainer[®], volume 4 mL, paredes com heparina de lítio 15 unidades/mL, EUA), sendo feito um *pool* (junção do material) de cada 2 animais. O plasma foi obtido após centrifugação a 3000 rpm, por 30 minutos em centrífuga refrigerada em temperatura de 4°C (Centrífuga Refrigerada NT 815, Nova Técnica Equipamentos para Laboratório). As amostras foram armazenadas em freezer - 80 °C até a análise. O plasma dos camundongos foi coletado de acordo com o Conselho Federal de Medicina Veterinária/Resolução RE nº 714 (2002).

4.3. Pesquisa dos componentes dos OE inalados no plasma

O plasma dos camundongos foi submetido a análise por HS-CG/EM e os OE inalados foram analisados por injeção direta por CG/EM. As condições cromatográficas foram: temperatura do forno programada de 50 °C (permanecendo durante 1 min) à 290 °C (permanecendo durante 1 min), a uma taxa de aquecimento de 15 °C/min, visando obter uma análise em menor tempo. As condições do headspace foram: aquecimento do vial de headspace a temperatura de 78 °C durante 10min, agitação do vial em 500 rpm, vial de headspace com volume de 10 mL, alíquota de plasma no interior do vial em volume de 0,5 mL, volume injetado da amostra de headspace foi de 1,0 mL no CG/EM. A identificação dos compostos foi realizada de acordo com a descrição no item 4.1.2, utilizando um sistema automatizado de headspace.

4.4. Análise simultânea de MEL e CORT no plasma por imunoensaio sistema Luminex®

Esta etapa foi executada no Laboratório do Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, da Facultad de Medicina, da Universidad Complutense de Madrid, sob coordenação e orientação da Catedrática Prof^a Dr. Ana Isabel Esquifino e da Prof^a Dr. Maria Pilar Cano.

Os níveis plasmáticos de MEL e CORT foram determinados utilizando a técnica de imunoensaio no sistema Luminex® 200™IS (Luminex Corporation, Osterhout, The Netherlands) e kit comercial Milliplex® MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, USA). O kit utilizado para a medição dos hormônios neste estudo foi #RSHMAG-69K (Rat Stress Hormone, Magnetic Bead Panel Kit, 96-Well Plate Assay). Os dados de fluorescência foram analisados com o *software* Master Plex™ QT. Todas as análises se realizaram de acordo com os protocolos e especificações do kit mencionado.

4.4.1. Materiais e reativos

Luminex 200™ IS, por Luminex Corporation

Líquido do sistema (Luminex # 40-50000)

Sonicador (Branson Ultrasonic Cleaner Model #B200)

Agitador de placa em orbital (Lab-Line Instruments Model #4625)

Base magnética para placa (EMD Millipore Catalog # 40-285)

kit comercial (Millipore, Watford, UK): Rat Stress Hormone (#RSHMAG-69K). A especificação dos materiais que compõe o kit está descrita nos Quadros 6 e 7.

Quadro 6 - Dados das microesferas do kit comercial Rat Stress Hormone (#RSHMAG-69K).

Bead/Analyte Name	Luminex Bead Region	Customizable Analytes (20X concentration, 200 µL) Available	Cat. #
Anti-Corticosterone Bead	21M	✓	RCCS-MAG
Anti-Melatonin Bead	34M	✓	RMLT-MAG

Quadro 7 - Dados dos reagentes do kit comercial Rat Stress Hormone (#RSHMAG-69K).

REAGENTS SUPPLIED	CATALOG NUMBER	VOLUME	QUANTITY
Rat Stress Hormone Standard	RSHMAG-8069	lyophilized	1 vial
Rat Stress Hormone Quality Controls 1 and 2	RSHMAG-6069	lyophilized	2 vials
Serum Matrix Note: Contains 0.08% Sodium Azide	LRSH-SM	lyophilized	1 vial (required for serum and plasma samples only)
Set of one 96-Well Plate with 2 sealers	-----	-----	1 plate 2 sealers
Assay Buffer	LE-ABGLP	30 mL	2 bottles
10X Wash Buffer Note: Contains 0.05% Proclin	L-WB	30 mL	2 bottles
Rat Stress Hormone Primary Antibodies	RSHMAG-PA	3.5 mL	1 bottle
Rat Stress Hormone Detection Antibodies	RSHMAG-1069	5.5 mL	1 bottle
Streptavidin-Phycoerythrin	L-SAPE	5.5 mL	1 bottle
Mixing Bottle	-----	-----	1 bottle

Na Figura 43 apresentamos algumas imagens do sistema Luminex®.

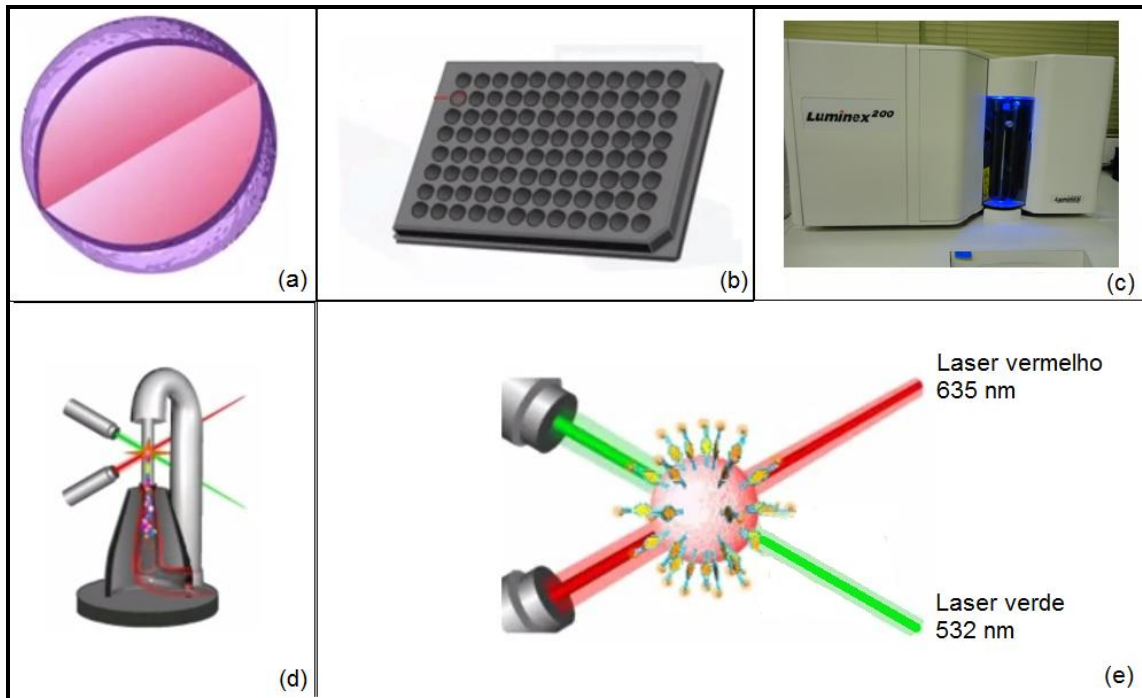


Figura 43 - (a) imagem ampliada da microesfera contendo duas cores distintas, uma na parte exterior e outra no interior; (b) placa com 96 poços, cada poço para uma amostra, *standard* ou controle; (c) vista frontal do equipamento Luminex® 200™ IS; (d) imagem da amostra sendo succionada pelo duto do sistema Luminex® e submetida aos dois lasers; (e) imagem ampliada do sistema microesfera-anticorpo submetida aos dois lasers vermelho (635 nm) e verde (532 nm) (Fonte: adaptado de Luminex xMAP® University Training).

4.4.2. Preparação dos reativos

1. Preparação das microesferas: sonifica-se o recipiente original que contém as microesferas por 30 s e após agita-se em vortex durante 1 min. Em um vial, adiciona-se 150 µL da microesfera de MEL e 150 µL da microesfera CORT e se eleva ao volume final de 3 mL com solução tampão (*Assay Buffer*).

2. Preparação dos controles: reconstituir cada Controle (1 e 2) com 250 μL de água deionizada, inverter várias vezes o vial até a completa solubilização. Deixar em repouso por 10 min antes de usar.
3. Preparação do tampão de lavagem (*Wash Buffer*): misturar em vortex para homogenizar, diluir 60 mL do tampão de lavagem com 540 mL de água deionizada.
4. Preparação do soro-matriz (indicada para matrizes de soro e de plasma): adiciona-se 1 mL de água deionizada no recipiente que contém o soro-matriz. Misturar em vortex. Deixar em repouso por 10 min para a completa reconstituição. Adicionar 3 mL da solução tampão (*Assay Buffer*) ao recipiente (diluição final 1:4) e misturar em vortex.
5. Preparação do padrão *Rat Stress Hormone*: reconstituir o padrão com 250 μL de água deionizada, para o ponto 7 (*Standard #7*). Inverter o vial várias vezes para misturar. Agitar em vortex por 10 min. Deixar em repouso por 10 min.
6. Preparo das soluções padrões de trabalho: identificar 6 tubos de polipropileno com padrão 1 (*Standard #1*), padrão 2 (*Standard #2*), padrão 3 (*Standard #3*), padrão 4 (*Standard #4*), padrão 5 (*Standard #5*), padrão 6 (*Standard #6*). Proceder as diluições de acordo com o Quadro 8 e diagrama da Figura 44, misturando mediante inversão do tubo após cada diluição.

Quadro 8 - Soluções padrão de trabalho.

Standard #	Volume of Assay Buffer to Add	Volume of Standard to Add
Standard #6	200 μL	100 μL of Standard #7
Standard #5	200 μL	100 μL of Standard #6
Standard #4	200 μL	100 μL of Standard #5
Standard #3	200 μL	100 μL of Standard #4
Standard #2	200 μL	100 μL of Standard #3
Standard #1	200 μL	100 μL of Standard #2

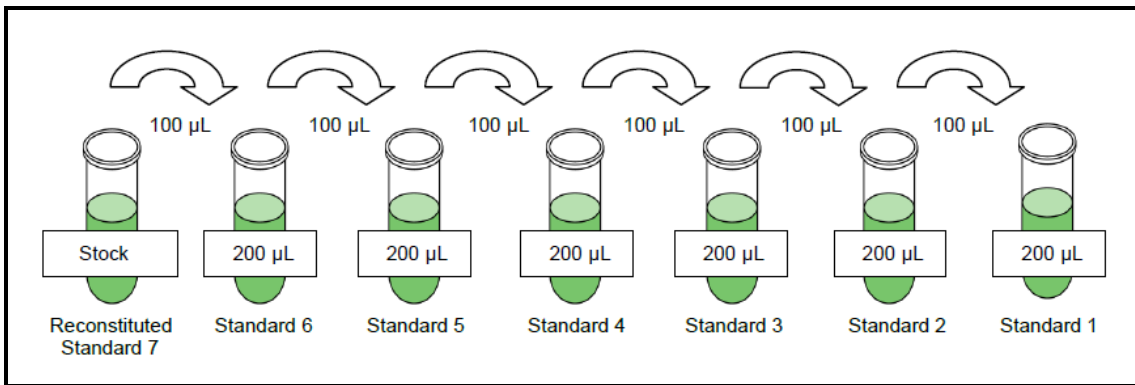


Figura 44 - Diagrama das diluições da solução padrão ponto 7 (*Standard #7*), até a solução padrão ponto 1 (*Standard #1*) (Fonte: adaptado do manual do kit #RSHMAG-69K).

Após as diluições, cada tubo terá as concentrações de CORT e de MEL de acordo com o Quadro 9.

Quadro 9 - Concentrações das soluções padrão de CORT e de MEL.

Dilution	Corticosterone (pg/mL)	Melatonin (pg/mL)
Standard #7 (Original)	500,000	400
Standard #6	166,666.7	133.3
Standard #5	55,555.6	44.4
Standard #4	18,518.5	14.8
Standard #3	6,172.8	4.94
Standard #2	2,057.6	1.64
Standard #1	685.9	0.55

4.4.3. Ajuste do *software*

O *software* é ajustado de acordo com os dados do Quadro 10, onde:

Events: é o número de microesferas de cada analito que o sistema contabiliza (50 microesferas de MEL e 50 microesferas de CORT);

Sample size: é o volume que a agulha succiona de cada poço;

Gate Setting: é a região do software onde será observada a fluorescência emitida pelo sistema de microesferas;

Reporter gain: é o ajuste da fluorescência;

Time out: é o tempo máximo para contabilizar as 50 microesferas de MEL e as 50 microesferas de CORT;

Bead set: é a identificação da microesfera da CORT e da MEL. CORT tem identificação 21 e MEL tem identificação 34.

Quadro 10 - Ajuste do *software*.

Events:	50, per bead	
Sample Size:	50 µL	
Gate Settings:	8,000 to 15,000	
Reporter Gain:	Default (low PMT)	
Time Out:	60 seconds	
Bead Set:	Customizable	Plex Beads
	Corticosterone	21
	Melatonin	34

Antes do início do procedimento de preparo das amostras, padrões e controles para a leitura no sistema Luminex[®], são inseridos no *software* os dados de localização dos poços da placa e as concentrações das soluções padrões.

4.4.4. Procedimento de preparo

1. Todos os reativos devem estar à temperatura ambiente (20-25°C).
2. Adicional 200 µL de solução tampão em cada poço da placa. Selar e misturar por 10 min no agitador de placa em orbital.
3. Decantar a solução tampão. Remover o excesso, mediante inversão da placa sobre papel absorvente, realizar este procedimento várias vezes.
4. Adicionar 25 µL de cada solução tampão e dos controles nos poços apropriados.
5. Adicional 25 µL de solução tampão nos poços das amostras.
6. Adicionar 25 µL de cada amostra de plasma, previamente diluída com solução tampão (diluição 1:4), para cada um dos poços apropriados.
7. Adicional 25 µL do anticorpo primário em cada poço.
8. Misturar 25 µL da solução contendo as microesferas de MEL+CORT em cada poço dos padrões, controles e amostras. Manter o frasco das microesferas sob agitação, para evitar que elas decantem durante este procedimento.
9. 1ª incubação: Selar a placa com a lâmina seladora. Cobrir a placa com a lâmina de alumínio. Incubar com agitação, a 4°C, durante uma noite (16-18 horas).
10. Cuidadosamente remover a placa do agitador, a lâmina de alumínio e a lâmina seladora.
11. Realizar 3 vezes este procedimento: colocar a placa na base magnética para placa e lavar os poços da placa com tampão de lavagem. Remover o tampão de lavagem, mediante inversão da placa sobre papel absorvente, realizar este procedimento várias vezes.
12. Adicionar 50 µL do *Rat Stress Hormone Detection Antibodies* em cada poço.

13. 2ª incubação: Selar a placa com a lâmina seladora. Cobrir a placa com a lâmina de alumínio. Incubar com agitação, à temperatura ambiente (20-25°C), durante 1 hora.
14. Cuidadosamente remover a placa do agitador, a lâmina de alumínio e a lâmina seladora.
15. Adicionar 50 µL de Streptavidin-Phycoerythrin em cada poço.
16. 3ª incubação: Selar a placa com a lâmina seladora. Cobrir a placa com a lâmina de alumínio. Incubar com agitação, à temperatura ambiente (20-25°C), durante 30 min.
17. Cuidadosamente remover a placa do agitador, a lâmina de alumínio e a lâmina seladora.
18. Realizar 3 vezes este procedimento: colocar a placa na base magnética para placa e lavar os poços da placa com tampão de lavagem. Remover o tampão de lavagem, mediante inversão da placa sobre papel absorvente, realizar este procedimento várias vezes.
19. Adicionar 100 µL de líquido do sistema em cada poço.
20. Agitar a placa no agitador em orbital durante 5 min.
21. Colocar a placa no equipamento sistema Luminex® 200™ IS, utilizando o *software* Master Plex™ QT, com os dados do kit Milliplex® MAP. Ler a intensidade média de fluorescência das amostras e obter a concentração dos analitos MEL e CORT de acordo com a curva de calibração dos padrões *Standards*.

Na Figura 45 apresentamos um esquema do procedimento enumerado anteriormente.

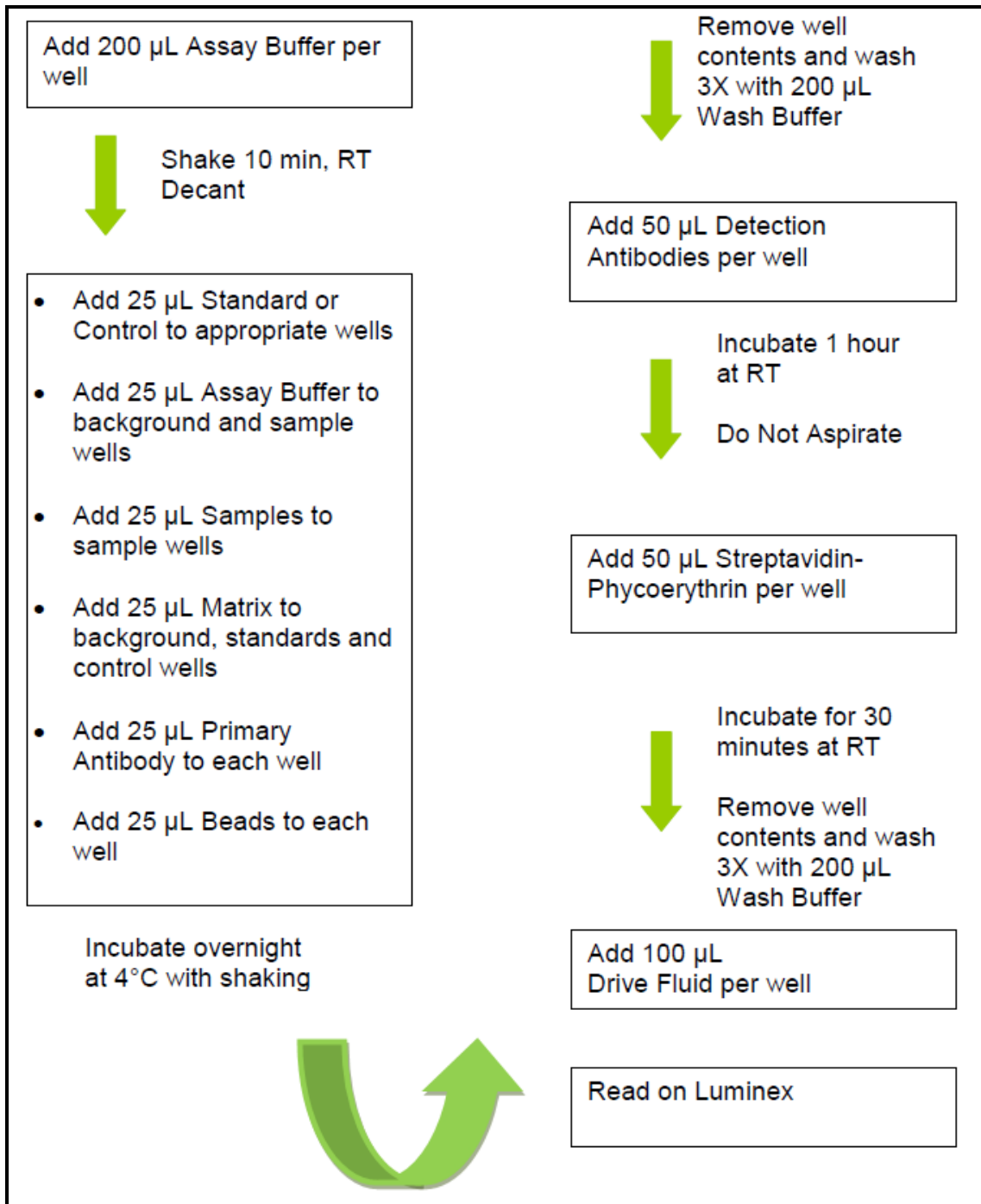


Figura 45 - Fluxograma do procedimento de preparo das amostras, padrões e controles para a leitura no sistema Luminex® (Fonte: adaptado do manual do kit #RSHMAG-69K).

4.4.5. Dados de validação da metodologia

Os parâmetros analíticos de validação Limite de Detecção (LD), Desvio Padrão (DP), % Coeficiente de Variação (CV) intra e inter ensaios, e % Recuperação (Recup) encontram-se no Quadro 11. O LD mede os verdadeiros limites de detecção para um ensaio, onde a extrapolação matemática empírica seria se um número infinito de concentrações-padrão fossem executadas para o ensaio sob as mesmas condições. O LD é a concentração do analito que produz um sinal de tres vezes a razão sinal/ruído do equipamento. A precisão intra-ensaio é gerada a partir da média do % CV de 8 resultados reportados através de duas concentrações diferentes de analitos num único ensaio. Precisão inter-ensaio é gerada a partir da média do % CV em duas diferentes concentrações de analitos em 8 ensaios diferentes. % de Recup são os dados que representam a média percentual de recuperação dos padrões de baixa, média e alta concentração em amostras de plasma (n = 5).

Quadro 11 - Dados de validação do método no sistema Luminex®.

Analito	sensibilidade		precisão		recuperação
	n=8	n=8	n=8	n=8	n=5
	LD (pg/mL)	LD+2DP (pg/mL)	% CV intra-ensaio	% CV inter-ensaio	% Recup
CORT	1796	2914	<10	<10	61
MEL	0,9	1,52	<10	<10	108



5. RESULTADOS

5.1. Extração e análise dos componentes dos OE de *C. aurantium* e *C. sinensis* por CG/EM.

Na Tabela 8 apresentamos os resultados das quantidades relativas dos OE analisados por CG/EM. Nesta tabela constam: a espécie vegetal, a parte da planta, o método de extração do OE, o código identificador (de acordo com os Quadros 3, 4 e 5), o rendimento das extrações realizadas em vidraria de *cleverger* no laboratório, as quantidades relativas de cada componente analisado por CG/EM, os IR obtidos na coluna cromatográfica DB5 e os dados da referencia bibliográfica (ADAMS, 2007), o somatório dos componentes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila, o somatório dos demais componentes identificados, o somatório dos componentes não identificados. Destacamos, através de sombreamento, as colunas dos OE utilizados nos ensaios comportamentais com camundongos e as linhas dos componentes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila.

Na Tabela 9 apresentamos os resultados das análises dos OE por CG/EM com coluna quiral, quanto às quantidades relativas dos isômeros ópticos (*S*)-(-)-limoneno e (*R*)-(+)-limoneno, (*R*)-(-)-linalol e (*S*)-(+)-linalol e o excesso enantiomérico (*ee*); além da rotação óptica do OE medida com polarímetro.

Tabela 8 - Resultados das quantidades relativas dos componentes dos OE analisados por CG/EM.

	espécie vegetal		<i>C. aurantium</i> Lineu					<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck							
	parte da planta		folhas			pericarpo		folhas		pericarpo					
	método de extração do OE		d. arraste de vapor			d. arraste de vapor	hidro d.	prensagem a frio	d. arraste de vapor	hidro d.	prensagem a frio				
	código identificador		ACafv	BCafv	CCafv	DCapv	ECaph	FCapp	ACsvf	BCsph	CCspp	DCspp	ECspp		
	% rendimento da extração		-	0,44	-	0,05	0,05	-	0,12	0,15	-	-	-		
	IR* (ADAMS, 2007)	IR** _{DB5}	% componente												
1	931	926	alfa-tujeno	tr	tr	tr	nd	0,1	0,1	0,7	tr	tr	tr	tr	
2	939	934	alfa-pineno	0,2	0,1	0,3	0,6	0,5	2,2	3,8	1,1	0,9	2,2	1,4	
3	976	969	sabineno	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	0,6	0,5	0,5	0,4	3,1	0,9	
4	980	972	beta-pineno	1,4	2,6	2,2	1,9	1,7	4,2	1,5	0,6	0,2	3,1	0,1	
5	991	985	beta-mirceno	2,4	6,9	7,8	2,8	2,5	4,8	5,2	4,5	0,8	3,1	1,0	
6	1001+1005	999	octanal + alfa-felandreno	tr	tr	0,1	1,3	1,3	0,2	tr	5,9	tr	1,0	nd	
7	1011	1007	delta 3 carene	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,6	0,2	tr	0,8	nd	
8	1031	1030	limoneno	1,3	2,1	2,6	82,5	82,3	73,6	5,9	67,7	78,2	78,3	76,8	
9	1040	1037	(Z)-beta-ocimeno	0,5	3,1	3,5	0,1	0,2	0,1	1,1	tr	nd	0,2	tr	
10	1050	1047	(E)-beta-ocimeno	1,4	5,5	4,6	0,6	0,6	0,3	0,8	0,4	tr	tr	tr	
11	1062	1059	gamma-terpineno	nd	0,1	0,2	0,1	0,1	1,3	4,6	0,3	tr	0,8	tr	
12	1070	1069	n-octanol	nd	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,3	0,3	tr	0,1	nd	
13	1074	1071	cis-linalol oxido	nd	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,3	tr	nd	0,1	tr	
14	1088	1085	terpinoleno	0,2	0,8	1,2	0,1	0,1	0,3	4,9	0,1	tr	0,1	tr	
15	1088	1086	trans-linalol oxido	nd	tr	0,2	tr	nd	0,2	0,1	tr	nd	tr	tr	
16	1098	1095	linalol	24,8	14,2	22,4	2,3	1,1	0,6	23,0	5,2	0,5	1,7	1,2	
17	1102	1100	nonanal	nd	nd	tr	0,2	0,2	0,1	tr	0,6	0,6	0,2	1,3	
18	1134	1133	cis-limoneno oxido	nd	tr	tr	tr	tr	0,8	tr	0,1	4,4	0,1	4,0	
19	1139	1135	trans-limoneno oxido	nd	tr	nd	tr	tr	0,8	0,3	tr	3,4	0,1	4,0	
20	1146	1146	isopulegol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	tr	tr	tr	
21	1153	1149	citronelal	nd	tr	nd	tr	tr	tr	1,2	0,7	nd	0,2	nd	
22	1177	1174	terpineol-4	nd	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	5,6	0,2	tr	tr	0,6	
23	1189	1186	alfa-terpineol	6,1	6,8	8,1	0,6	0,2	0,9	0,7	0,3	0,6	0,2	0,2	
24	1192	1190	dihidro-carveol	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	tr	tr	0,1	tr	tr	
25	1193	1192	decanal	nd	nd	tr	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,6	
26	1199	1195	n-dodecano	nd	nd	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	
27	1204	1201	n-decanal	nd	nd	tr	0,5	0,6	0,2	0,2	2,0	0,6	1,1	0,4	
28	1211	1210	octanol acetato	nd	nd	tr	0,3	0,3	0,1	tr	0,2	tr	tr	tr	
29	1217	1215	trans-carveol	nd	nd	tr	nd	nd	0,2	0,1	nd	1,7	tr	2,0	
30	1228	1224	nerol	0,8	0,1	0,5	0,1	0,1	tr	0,1	nd	nd	tr	tr	
31	1228	1225	citronelol	nd	nd	nd	nd	nd	tr	0,1	0,3	nd	nd	nd	
32	1229	1227	cis-carveol	nd	nd	0,5	nd	nd	0,6	0,1	nd	0,8	tr	1,3	
33	1237	1235	pulegona	nd	tr	nd	nd	nd	nd	tr	tr	tr	tr	tr	
34	1240	1238	neral (E-citral)	nd	tr	0,2	0,1	0,1	0,1	1,0	0,9	nd	0,2	tr	
35	1242	1239	carvona	nd	nd	tr	0,1	0,1	tr	0,4	0,1	0,1	2,0	0,1	1,8
36	1255	1250	geraniol	nd	1,3	tr	nd	tr	nd	0,1	0,1	nd	nd	nd	
37	1257	1255	acetato de linalila	51,8	42,6	28,0	1,0	0,7	0,7	30,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
38	1270	1266	geranial (Z-citral)	tr	1,5	0,4	tr	0,1	0,2	1,2	1,7	nd	0,4	nd	
39	1271	1268	perila aldeído	nd	tr	nd	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	nd	0,1	tr	
40	1273	1270	isopulegol acetato	nd	tr	0,4	tr	nd	tr	tr	tr	nd	nd	tr	
41	1277	1276	trans-carvona oxido	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd	nd	tr	
42	1285	1285	trans-linalol oxido acetato	nd	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	nd	nd	tr	
43	1290	1290	timol	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd	nd	tr	
44	1295	1293	alcool perílico	nd	tr	nd	nd	nd	0,1	0,1	tr	1,0	0,1	0,4	
45	1337	1336	trans-carveol acetato	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	tr	tr	tr	nd	tr	
46	1350	1340	alfa-terpineol acetato	nd	0,4	0,6	0,1	tr	0,3	0,1	0,1	0,6	tr	0,7	
47	1354	1352	citronelol acetato	nd	tr	tr	tr	tr	0,1	0,3	tr	nd	tr	nd	
48	1362	1360	cis-carveol acetato	tr	nd	nd	nd	nd	0,1	tr	tr	tr	nd	nd	
49	1365	1364	nerol acetato	2,9	3,2	4,1	0,2	0,2	0,2	0,4	tr	1,3	tr	0,2	
50	1383	1373	geraniol acetato	5,0	5,8	6,9	0,6	0,7	0,2	0,5	tr	0,8	tr	tr	
51	1391	1389	beta-elemene	nd	0,2	tr	nd	0,1	nd	2,6	0,3	nd	nd	nd	
52	1407	1398	dodecanal	0,5	tr	nd	nd	tr	0,2	0,1	0,1	nd	0,2	nd	
53	1418	1408	(E)-cariofileno	nd	0,4	0,8	0,1	0,2	0,2	0,9	0,2	nd	0,1	nd	
54	1436	1430	alfa-trans-bergamoteno	nd	nd	nd	0,1	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	
55	1480	1478	germacreno D	nd	nd	nd	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	nd	0,1	0,2	
56	1491	1489	valenceno	nd	nd	tr	tr	0,1	tr	0,1	1,4	nd	0,3	nd	
57	1494	1490	alfa-selineno	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5	nd	nd	tr	nd	
58	1508	1498	alfa-(E,E)-farneseno	nd	0,2	nd	nd	nd	nd	nd	0,1	nd	0,1	nd	
59	1509	1499	beta-bisaboleno	nd	nd	nd	tr	nd	nd	tr	0,1	nd	tr	nd	
60	1513	1510	alfa-cadineno	nd	tr	nd	tr	nd	0,1	tr	nd	nd	0,1	nd	
61	1564	1554	(E)-nerolidol	nd	tr	nd	0,2	0,5	nd	tr	tr	nd	nd	nd	
62	1581	1580	cariofileno oxido	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	
63	1683	1673	alfa-bisabolol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	nd	nd	
64	1800	1790	nootkatone	nd	nd	nd	1,1	3,1	nd	nd	0,2	nd	0,1	nd	
% soma dos componentes: mirceno+limoneno+linalol+acetato de linalila				80,3	65,8	60,8	88,7	86,6	79,7	64,2	77,4	79,7	83,2	79,1	
% soma dos demais componentes identificados				19,6	33,0	35,5	10,1	11,7	16,5	35,7	19,2	19,5	15,4	20,1	
% soma dos componentes não identificados				0,1	1,2	3,7	1,2	1,7	3,8	0,1	3,4	0,9	1,4	0,8	

- OE comerciais, sem dados de rendimento

tr: traços

nd: não detectado

* coluna DB5

** Índice de retenção relativo obtido na coluna DB5

Tabela 9 - Resultados das quantidades relativas dos componentes limoneno e linalol, percentuais dos isômeros ópticos (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol, excesso enantiomérico (ee) e rotação óptica dos OE analisados por CG/EM e polarímetro.

espécie vegetal	<i>C. aurantium</i> Lineu						<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck					
	folhas			pericarpo			folhas	pericarpo				
parte da planta	d. arraste de vapor			d. arraste de vapor	hidro d.	prensagem a frio	d. arraste de vapor	hidro d.	prensagem a frio			
método de extração do OE	ACafv	BCafv	CCafv	DCapv	ECaph	FCapp	ACsvf	BCsph	CCspp	DCspp	ECspp	
código identificador	ACafv	BCafv	CCafv	DCapv	ECaph	FCapp	ACsvf	BCsph	CCspp	DCspp	ECspp	
% limoneno	1,3	2,1	2,6	82,5	82,3	73,6	5,9	67,7	78,2	78,3	76,8	
% linalol	24,8	14,2	22,4	2,3	1,1	0,6	23,0	5,2	0,5	1,7	1,2	
%	(S)-(-)-limoneno	22	31	29	6	6	13	40	9	1	5	4
	(R)-(+)-limoneno	78	69	71	94	94	87	60	91	99	95	96
	ee limoneno	56	38	42	88	88	74	20	82	98	90	92
quirais	(R)-(-)-linalol	62	59	64	63	63	60	11	13	7	7	1
	(S)-(+)-linalol	38	41	36	37	37	40	89	87	93	93	99
	ee linalol	24	18	28	26	26	20	78	74	86	86	98
rotação óptica	*	**	**	**	**	*	**	**	**	**	*	**
	- 4,00	- 0,20	- 6,90	+ 0,10	+ 0,37	+ 68,60	+ 1,80	+ 0,25	+ 0,78	+ 88,40	+ 2,05	

* 100% OE

** 1% OE em acetato de etila

ee excesso enantiomérico

Apresentamos na Figura 46 o percentual médio dos componentes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila dos OE provenientes do pericarpo e das folhas, de acordo com os resultados da Tabela 8.

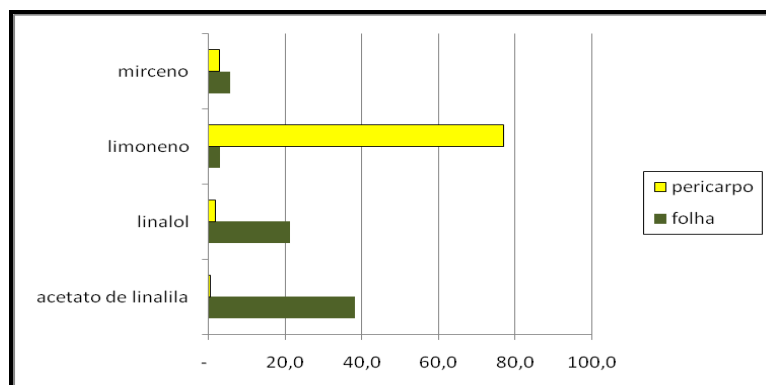


Figura 46 - Percentual médio dos componentes mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila dos OE provenientes do pericarpo e das folhas de *C. aurantium* e de *C. sinensis* de acordo com os resultados da Tabela 8.

As Figuras 47 e 48 apresentam parte dos cromatogramas dos OE de *C. sinensis* (código identificador DCspp) e de *C. aurantium* (código identificador CCafv), mostrando os isômeros ópticos (*S*)-(-)-limoneno e (*R*)-(+)-limoneno e (*R*)-(-)-linalol e (*S*)-(+)-linalol, respectivamente.

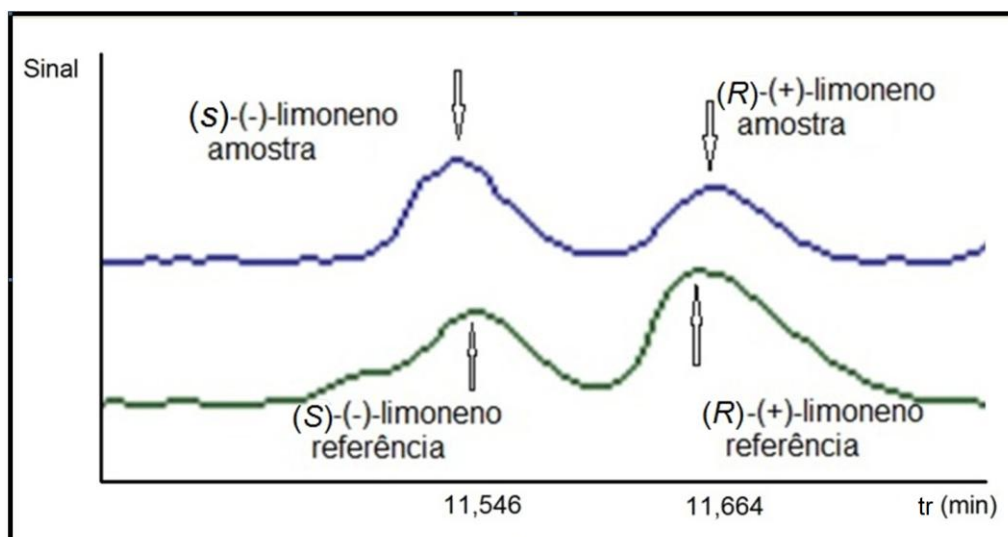


Figura 47 - Parte do cromatograma gasoso do OE *C. sinensis* (código identificador DCspp) em 0,02% v/v AE, que evidencia o enantiômero (S)-(-)-limoneno no tr = 11,546 min e o enantiômero (R)-(+)-limoneno no tr = 11,664 min.

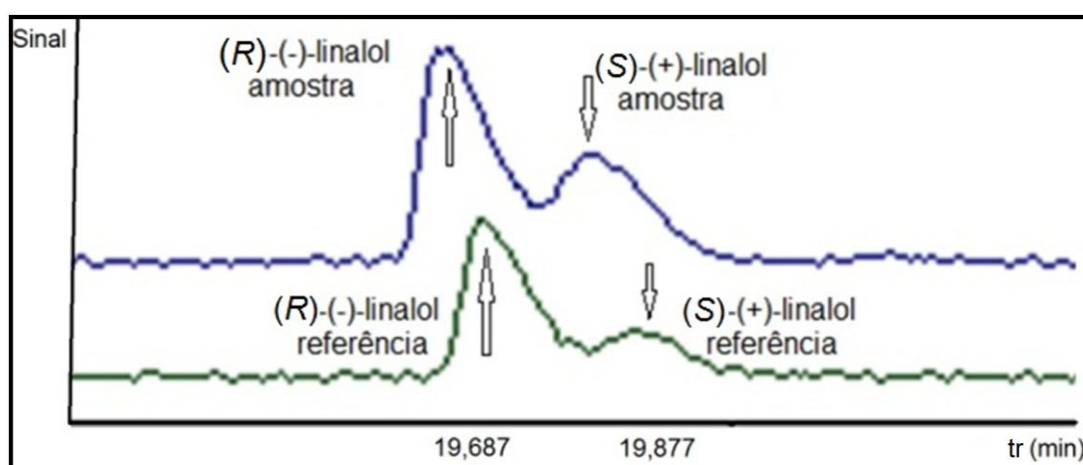


Figura 48 - Parte do cromatograma gasoso do OE *C. aurantium* (código identificador CCafv) em 0,02% v/v AE, que evidencia o enantiômero (R)-(-)-linalol no tr = 19,687 min e o enantiômero (S)-(+)-linalol no tr = 19,877 min.

5.2. Ensaio comportamentais em camundongos após a inalação dos OE de *C. sinensis* (código identificador DCspp) e de OE de *C. aurantium* (código identificador CCafv).

5.2.1. Avaliação da atividade ansiolítica no teste claro-escuro

Na Figura 49 apresentamos os resultados do teste claro-escuro. A análise dos dados mostraram que o tratamento com diazepam i.p. 2,0 mg/kg ($p < 0,01$) e com OE *C. sinensis* durante 30 min ($p < 0,01$), aumentaram o tempo de permanência na zona clara (Figura 49a) e o número de cruzamentos entre as zonas clara-escuro (Figura 49b). O tratamento com OE *C. aurantium* não provocou alteração.

Não ocorreu alteração no tempo de latência para o primeiro cruzamento, entre os dados de ambos os OE inalados e seus controles (dados não mostrados).

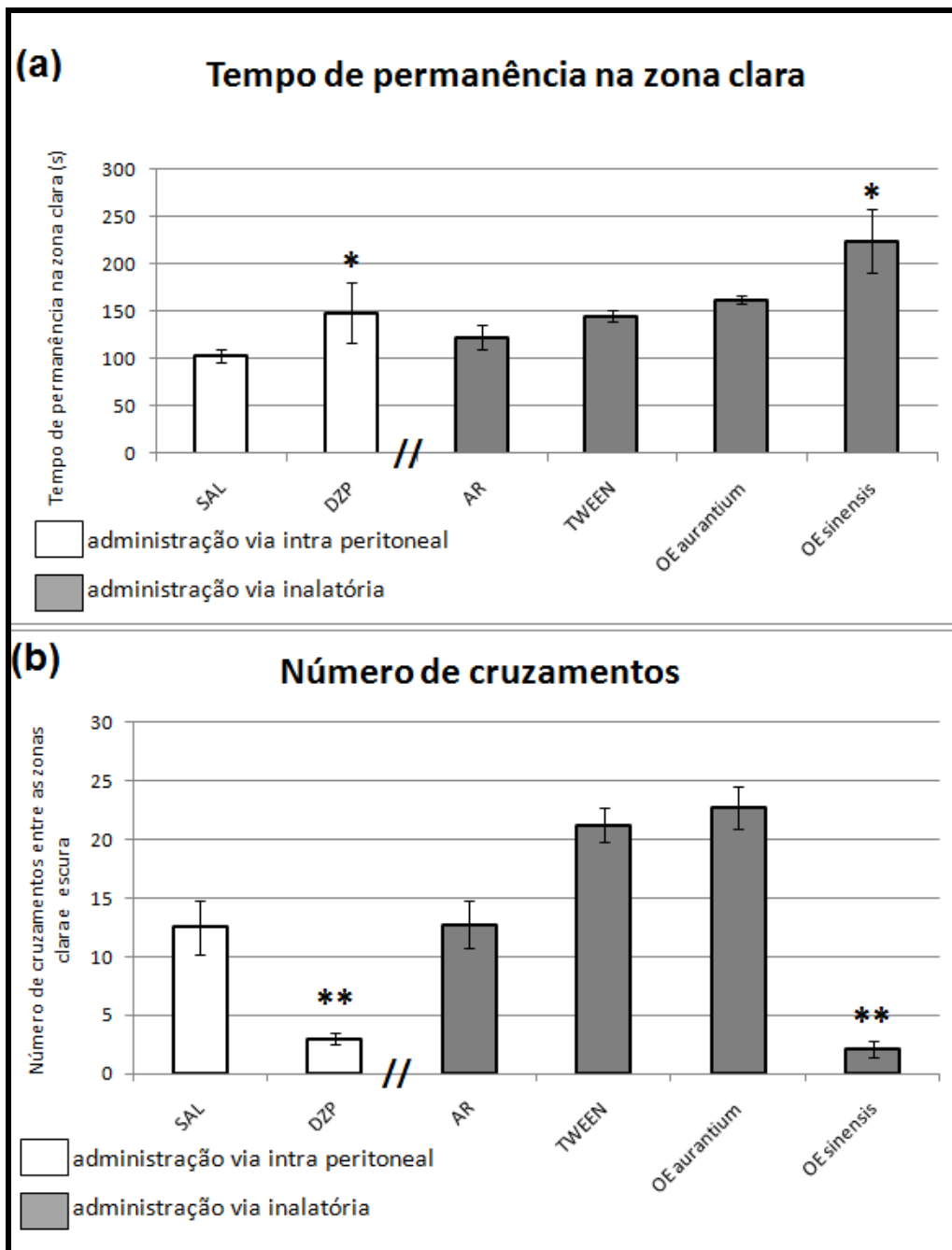


Figura 49 - Efeito da inalação de OE *C. aurantium* (10%, durante 30 min) e de *C. sinensis* (10%, durante 30 min) no teste claro-escuro (5 min). (a): Tempo gasto na zona claro (iluminada). (b): Número de cruzamentos entre as zonas claro e escuro. Cada coluna representa a média \pm EM (erro médio), $n=6-8$ camundongos. * $p<0,01$ e ** $p<0,01$, grupo OE *sinensis* e grupo diazepam 2,0 mg/Kg i.p. (DZP) comparados com seus controles, ar atmosférico (AR), TWEEN e solução salina (SAL), respectivamente, ANOVA/LSD.

5.2.2. Avaliação da atividade locomotora

A análise dos dados mostrou que a inalação do OE *C. sinensis* durante 30 min provocou decréscimo na atividade locomotora dos animais comparados com os controles grupo ar atmosférico (AR) e TWEEN. O diazepam (DZP) na concentração utilizada neste ensaio não desempenha função sedativa, demonstrando que o ensaio foi bem conduzido. O OE *C. aurantium* não alterou a atividade locomotora (Figura 50).

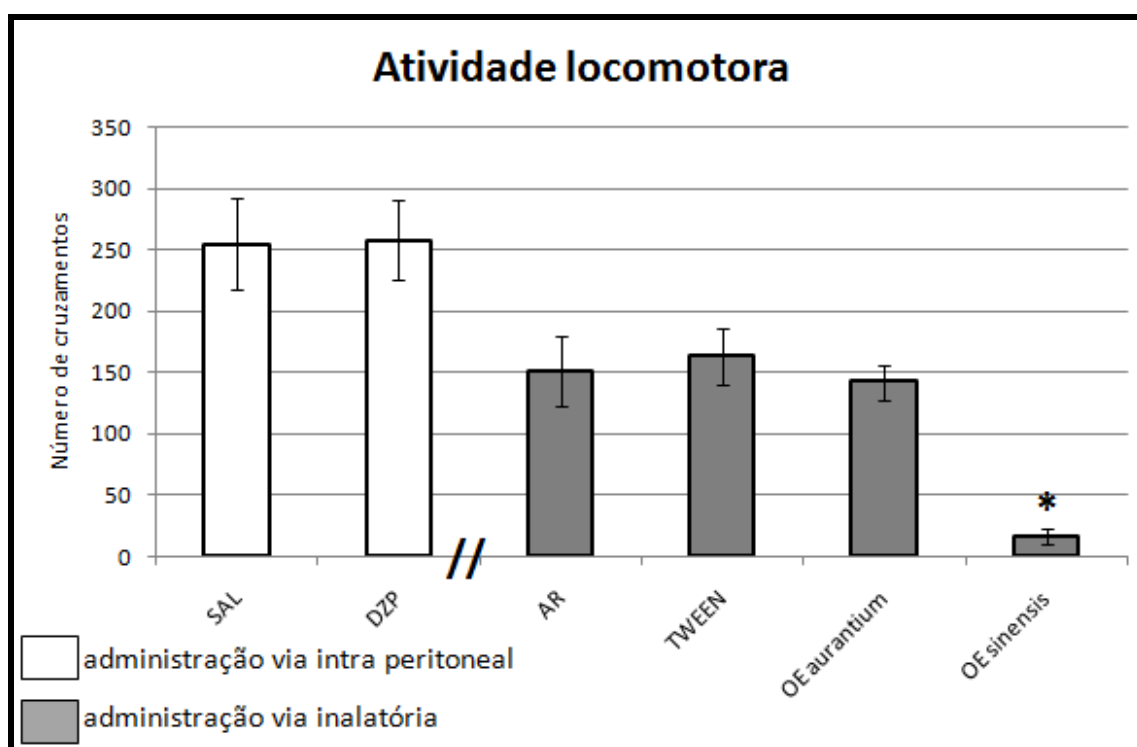


Figura 50 - Efeito da inalação do OE *C. aurantium* (10%, durante 30 min) e de *C. sinensis* (10%, durante 30 min) no teste da atividade locomotora (10 min). Cada coluna representa a média \pm EM (erro médio), $n=6-8$ camundongos. ** $p<0,01$, grupo OE *C. sinensis* comparado com grupo controle ar (AR) e TWEEN, ANOVA/LSD.

5.2.3. Avaliação da atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda

O resultado obtido após a inalação dos OE, nas concentrações de 10% durante 30 min, mostrou-se sem significância estatística frente aos controles AR e TWEEN. A imipramina (IMI) provocou diminuição do tempo de imobilidade frente ao controle solução salina, uma vez que é um agente antidepressivo (Figura 51).

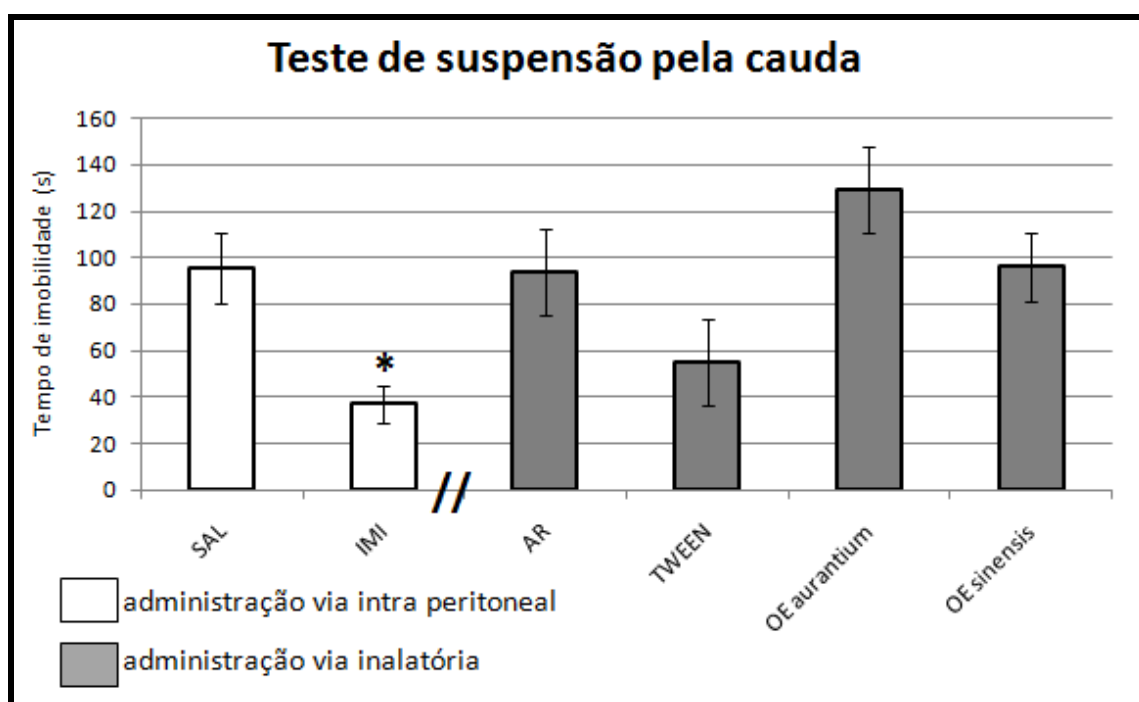


Figura 51 – Efeito da inalação dos OE *C. aurantium* (10%, durante 30 min) e de OE *C. sinensis* (10%, durante 30 min) no teste de suspensão pela cauda (6 minutos). Cada coluna representa a média \pm EM (erro médio), $n=12$ camundongos. * $p<0,01$, grupo imipramina (IMI, 20,0 mg/kg i.p.) comparado ao grupo controle SAL, ANOVA/LSD.

5.3. Análise do plasma dos camundongos

5.3.1. Análise por HS-CG/EM

Foi possível detectar por HS-CG/EM, no plasma dos camundongos, a presença dos componentes químicos dos OE inalados. Procedimento que ocorreu na câmara de inalação (Figura 39), com o OE a 10%, durante 30 minutos. Apresentamos na Figura 52, os cromatogramas (CG/EM) dos OE inalados *C. sinensis* (a) e *C. aurantium* (b), bem como os cromatogramas do plasma dos camundongos após a inalação dos respectivos OE (c) e (d), analisados por HS-CG/EM. Na Tabela 10 apresentamos os percentuais dos componentes registrados nestes cromatogramas.

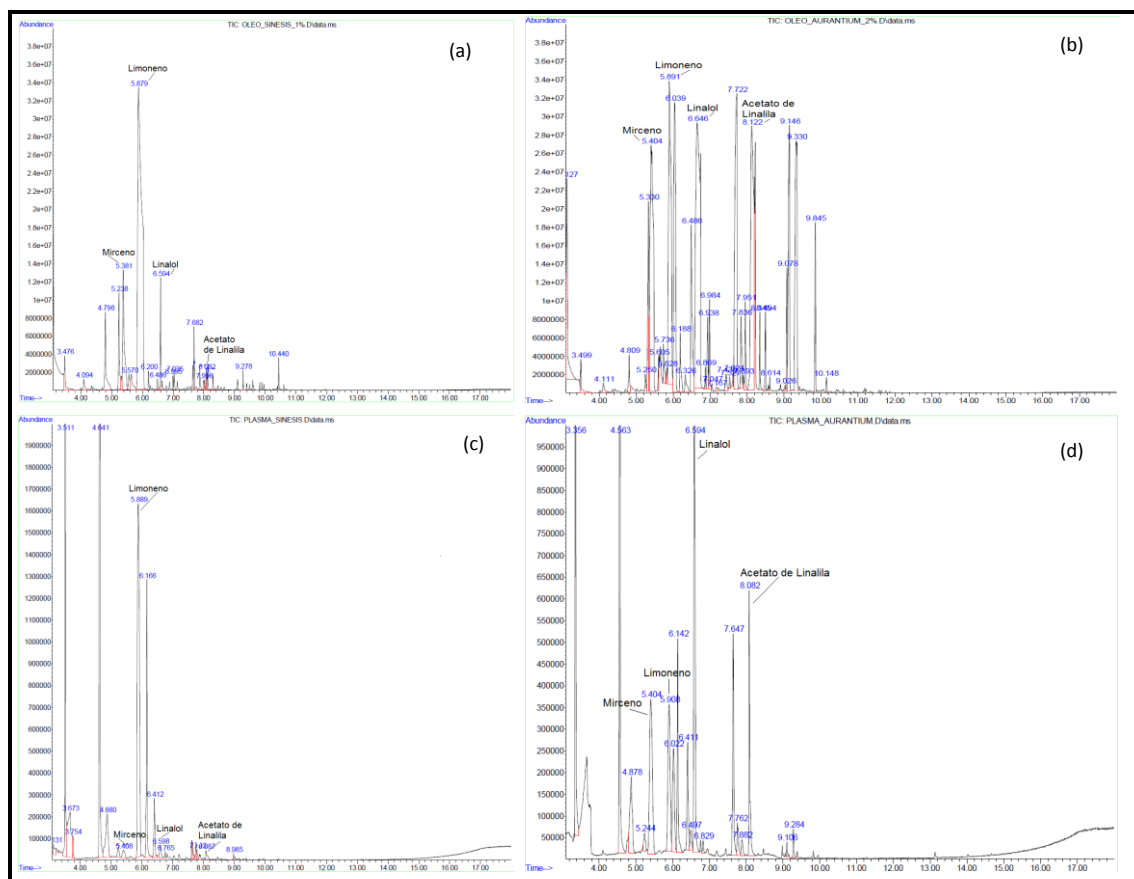


Figura 52 - Cromatogramas: (a) OE de *C. sinensis* analisado por CG/EM; (b) OE de *C. aurantium* analisado por CG/EM; (c) plasma de camundongo analisado por HS-CG/EM após a inalação do OE de *C. sinensis* (10%, durante 30 min); (d) plasma de camundongo analisado por HS-CG/EM após a inalação do OE de *C. aurantium* (10% OE, durante 30 min). Destacamos alguns componentes dos OE.

Tabela 10 - Resultados das quantidades relativas dos componentes dos OE de *C. sinensis* e *C. aurantium* no plasma dos camundongos analisados por HS-CG/EM, e nos respectivos OE analisados por CG/EM.

componente	<i>C. sinensis</i>		<i>C. aurantium</i>	
	plasma	OE DCspp	plasma	OE CCafv
1 <i>alfa</i> -pineno	nd	2,2	nd	0,3
2 sabineno	nd	3,1	nd	0,1
3 <i>beta</i> -pineno	nd	3,1	nd	2,2
4 <i>beta</i> -mirceno	0,5	3,1	6,7	7,8
5 octanal + <i>alfa</i> -felandreno	nd	1,0	nd	0,1
6 <i>delta</i> 3 carene	nd	0,8	nd	0,4
7 limoneno	20,3	78,3	5,1	2,6
8 (<i>Z</i>)- <i>beta</i> -ocimeno	nd	0,2	3,0	3,5
9 (<i>E</i>)- <i>beta</i> -ocimeno	nd	tr	nd	4,6
10 <i>gama</i> -terpineno	nd	0,8	nd	0,2
11 terpinoleno	nd	0,1	0,5	1,2
12 <i>trans</i> -linalol oxido	nd	tr	nd	0,2
13 linalol	0,6	1,7	10,1	22,4
16 <i>alfa</i> -terpineol	0,4	0,2	3,8	8,1
17 <i>n</i> -decanal	nd	1,1	nd	tr
18 nerol	nd	tr	nd	0,5
19 <i>cis</i> -carveol	nd	tr	nd	0,5
20 neral (<i>E</i> -citral)	nd	0,2	0,4	0,2
21 acetato de linalila	0,3	0,1	3,5	28,0
22 geranial (<i>Z</i> -citral)	nd	0,4	nd	0,4
23 isopulegol acetato	nd	nd	nd	0,4
24 <i>alfa</i> -terpineol acetato	nd	tr	nd	0,6
25 nerol acetato	nd	tr	nd	4,1
26 geraniol acetato	nd	tr	0,3	6,9
27 dodecanal	nd	0,2	nd	nd
28 (<i>E</i>)-cariofileno	nd	0,1	nd	0,8
29 valenceno	nd	0,3	nd	tr

tr: traços (<0,1%)
nd: não detectado

Na Figura 53 estão os espectros de massa dos componentes mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila, com os seus fragmentos m/z e abundâncias (NIST/MS 2.0).

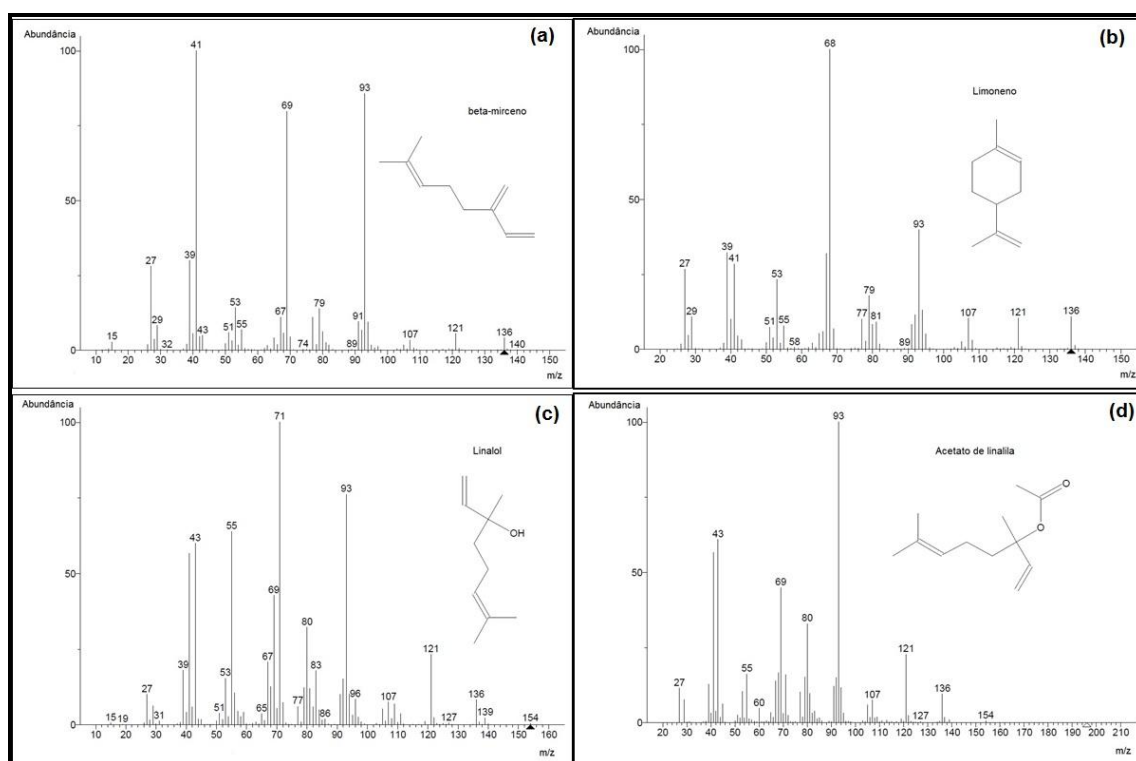


Figura 53 - Espectros de massa de identificação e principais fragmentos m/z (abundância %): (a) beta-mirceno, m/z 41 (99,9), 93 (85,5), 69 (79,6), 39 (29,9), 27 (28,0), 53 (14,1), 79 (13,8), 67 (11,0), 77 (11,0), 91 (95,0); (b) limoneno, m/z 68 (99,9), 93 (39,7), 39 (32,2), 67 (31,8), 41 (28,3), 27 (26,6), 53 (23,2), 79 (17,7), 94 (13,1), 92 (11,4); (c) linalol, m/z 71 (99,9), 93 (76,0), 55 (63,7), 43 (59,8), 41 (56,4), 69 (42,6), 80 (32,1), 121 (23,2), 67 (20,6), 39 (17,9) e (d) acetato de linalila m/z 93 (99,9), 43 (60,7), 41 (56,4), 69 (44,8), 80 (32,8), 121 (22,6), 68 (16,6), 55 (16,1), 71 (15,9), 79 (15,1).

Na Figura 53(a) podemos ver a fragmentação do beta-mirceno, cuja massa molecular é 136 e fórmula linear $H_2C=CHC(=CH_2)CH_2CH_2CH=C(CH_3)_2$. A fragmentação gera o íon altamente estável de isopropila com elevada abundância, $m/z = 41$. Provavelmente o íon $m/z = 93$ é gerado pela estrutura $C_7H_9^+$, formada por dupla ligação de isomerização, devido ao aumento de conjugação, e então uma clivagem alílica. Este íon, devido a sua ressonância em duas formas, possui elevada estabilidade, o que resulta em elevada abundância. Os fragmentos $m/z = 69$ e $m/z = 67$ são os obtidos da clivagem da ligação bialílica. A Figura 53(b) corresponde ao limoneno, cuja fórmula é $C_{10}H_{18}$ e massa molecular igual a 136. Pode-se constatar o íon molecular $m/z = [M]^+$ 136. Inicialmente ocorre a ruptura do anel e a perda de uma metila, dando

origem ao fragmento $m/z = 121$ [$M - 15$]. A perda de um metileno gera o fragmento $m/z = 107$ [$M - 15 - 14$]. Seguida de outra perda de metileno que resulta em $m/z = 93$ [$M - 15 - 14 - 14$], o que é característico de hidrocarbonetos. O limoneno, por ser um alceno cíclico, possui o mecanismo de clivagem Retro-Diels-Alder, gerando o pico $m/z = 68$ ($[C_5H_8]^+$), que por rearranjo gera uma molécula neutra de isopreno. Através da Figura 53(c), vemos que o componente linalol, cuja massa molecular é de 154 e fórmula linear $(CH_3)_2C=CHCH_2CH_2C(CH_3)(OH)CH=CH_2$, por ser um álcool terciário, quase não há visualização do pico do seu íon molecular $m/z [M]^+ = [154]^+$. Os demais fragmentos são: o pico $m/z = 136$ [$M - 18$] corresponde à perda de água e o pico $m/z = 121$ [$M - 18 - 15$] correspondente à perda de água e grupo metila. O linalol por ser um álcool terciário, ocorre a ruptura de ligação carbono-carbono vizinha ao átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z = 71$ ($H_2C=CH-COH^+-CH_3$), fragmento este com maior estabilidade, evidenciado pela abundância do fragmento. O outro fragmento corresponde ao pico de $m/z = 83$ [$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2$], que por ser um alceno, vai perdendo unidades de 14 [CH_2], correspondentes à perda de grupos metilenos. Para o pico $m/z = 121$, os picos derivados de perdas de [CH_2] seriam 107, 93, 79, 65 e 41. Na Figura 53(d) podemos ver o espectro de massa característico do componente acetato de linalila, cuja massa molecular é 196 e fórmula linear $CH_3CO_2C(CH=CH_2)(CH_3)CH_2CH_2CH=C(CH_3)_2$. Levando em consideração a ruptura característica dos ésteres, o acetato de linalila sofre um rearranjo McLafferty gerando os fragmentos $m/z = 154$ e $m/z = 42$ (ceteno, $CH_2=C=O$), resultantes da transferência de um hidreto do radical acetato para o radical oxigênio da carbonila. O pico $m/z = 43$, resulta da fragmentação alfa do radical etoxil [CH_3CO]. O pico $m/z = 93$, provavelmente refere-se à estrutura [$C_7H_9^+$], formada por dupla ligação de isomerização, devido ao aumento de conjugação, e então uma clivagem alílica. Este íon, devido a sua ressonância em duas formas, possui elevada estabilidade, o que resulta em elevada abundância. A presença dos íons $m/z = 60$ [HO^+COCH_3] e $m/z = 136$ [$C_{10}H_{16}^+$] pode ser devido à ruptura alfa-clivagem e rearranjo McLafferty (MCLAFFERTY, 1993; LINDON,

2000; PAVIA, 2001; GROSS, 2004; SMITH, 2004; ADAMS, 2007; HOFFMANN, 2007; SILVERSTEIN, 2007)

5.3.2. Medição de MEL e CORT no plasma dos camundongos por imunoensaio Luminex®

As curvas de calibração da MEL e da CORT, a partir das soluções padrões do Quadro 9, estão apresentadas nas Figuras 54 e 55, respectivamente, com destaque pelas setas para os limites dos valores encontrados no plasma dos camundongos.

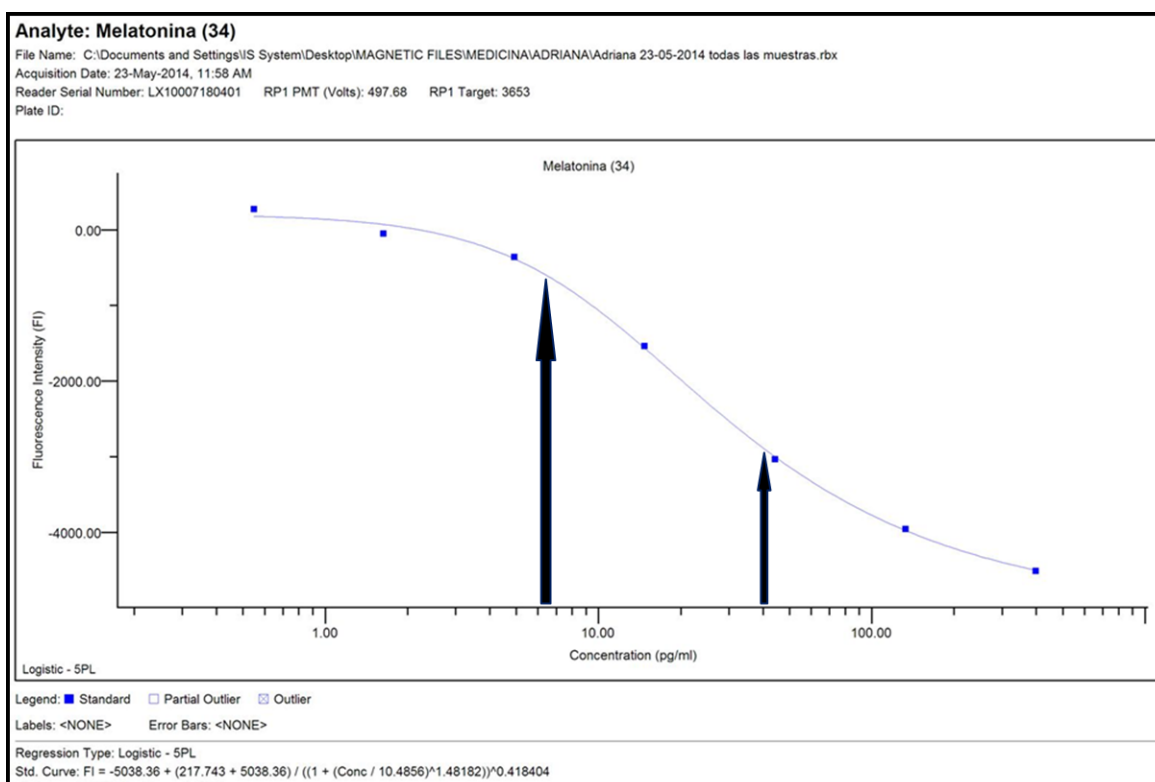


Figura 54 - Curva de calibração da MEL no equipamento Luminex® referente ao kit Milliplex® #RSHMAG-69K, com destaque pelas setas para os limites dos valores encontrados no plasma dos camundongos.

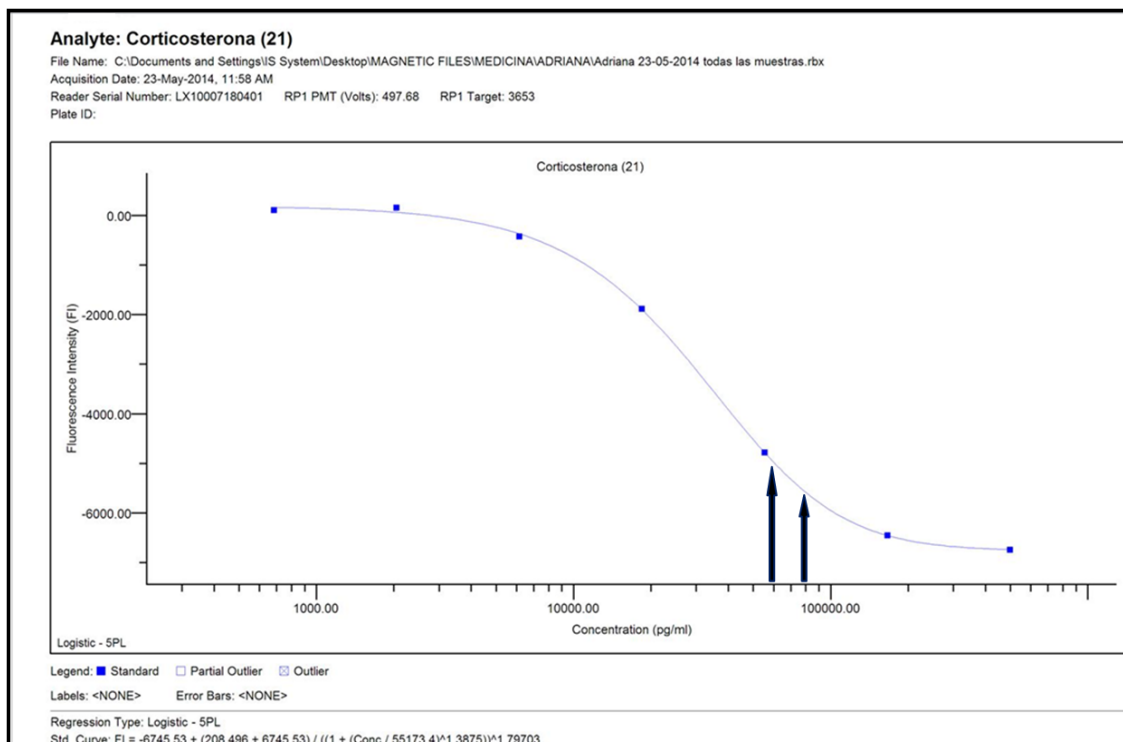


Figura 55 - Curva de calibração da CORT no equipamento Luminex[®] referente ao kit Milliplex[®] #RSHMAG-69K, com destaque pelas setas para os limites dos valores encontrados no plasma dos camundongos.

Apresentamos nas Figuras 56 e 57 os resultados das concentrações plasmáticas da MEL e do CORT, respectivamente, medidos por imunoenensaio no equipamento Luminex[®] no plasma dos camundongos, após a inalação dos OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis*.

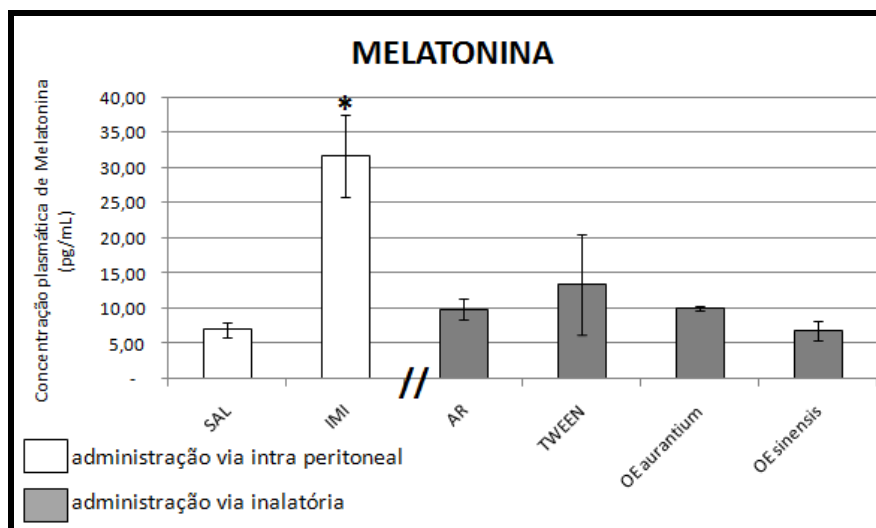


Figura 56 - Concentrações plasmáticas da MEL obtidas por imunoenensaio no equipamento Luminex[®] no plasma dos camundongos após a inalação durante 30 min do OE de *C. aurantium* (10%) e de *C. sinensis* (10%), frente aos controles ar atmosférico (AR), TWEEN, solução salina (SAL) e imipramina (IMI, 20 mg/Kg i.p.). * $p < 0,01$ em relação ao controle salina, ANOVA/LSD.

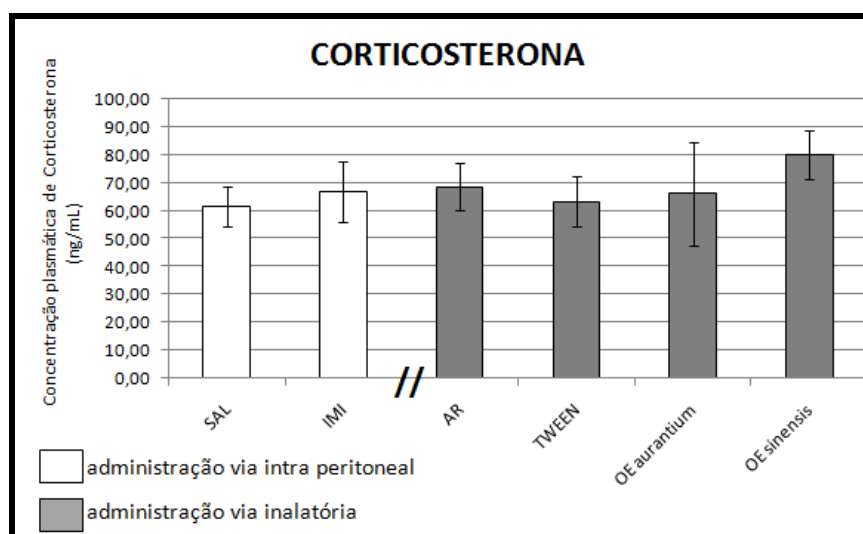


Figura 57 - Concentrações plasmáticas da CORT obtidas por imunoenensaio no equipamento Luminex[®] no plasma dos camundongos após a inalação durante 30 min dos OE de *C. aurantium* (10%) e de *C. sinensis* (10%), frente aos controles ar atmosférico (AR), TWEEN, solução salina (SAL) e imipramina (IMI, 20 mg/Kg i.p.), ANOVA/LSD.



6. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo analisou OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis* provenientes do pericarpo e de folhas (Figura 37), de acordo com a descrição nos Quadros 4 e 5. Tanto os OE de marcas comerciais como os das espécies vegetais extraídas no laboratório tiveram sua origem de plantio nas regiões sul e centro-sul do Brasil (Figura 38) de acordo com as coordenadas geográficas apresentadas nestes Quadros. Os OE de folhas foram obtidos através do método de destilação de arraste de vapor. Os OE de pericarpo, pelos métodos de destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio (exclusivamente os OE de marcas comerciais). Os métodos de extração dos OE analisados nesta tese para as espécies de *C. aurantium* e de *C. sinensis* está de acordo com as metodologias empregadas em projetos de investigações, com vidraria de *cleveger*, e em plantas industriais, como os registrados por TIRADO (1995), CACCIONI e colaboradores (1998), CARVALHO-FREITAS e COSTA (2002), CHOI (2003), BANDONI (2003), PEYRON (2004), NJOROGÉ e colaboradores (2005), PULTRINI e colaboradores (2006), FRAATZ e colaboradores (2009), BAGETTA e colaboradores (2010), FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010), HOSNI e colaboradores (2010), SIMÕES e colaboradores (2010), SINGH e colaboradores (2010), WOLFFENBÜTTEL (2011), EZEJIOFOR e colaboradores (2011), ELLOUZE e colaboradores (2012), OLIVEIRA e colaboradores (2012a) e VELAZQUES-NUNES e colaboradores (2013).

A metodologia utilizada neste estudo para a análise da composição química dos OE foi a CG/EM, injeção direta com coluna capilar de sílica fundida DB5, para os componentes onde não pesquisou-se seus isômeros ópticos, e com coluna capilar quiral HP-quiral-10B, para as análises dos enantiômeros quirais, está de acordo com os métodos utilizados pelos autores TIRADO (1995), JUCHELKA e colaboradores (1996), TABACCHI e colaboradores (1997), BLANCH e NICHOLSON (1998), BICCHI e

colaboradores (1999), LÜCKER e colaboradores (2002), PULTRINI e colaboradores (2006), ROCHA e colaboradores (2007), TKACHEV (2007), BISHT e colaboradores (2009), DEWICK (2009), SCIARRONE e colaboradores (2010), BONACCORSI e colaboradores (2011), CHEONG e colaboradores (2011), TRANCHIDA e colaboradores (2012), WELKE e ZINI (2011), STEPHANY e colaboradores (2012), WARD e WARD (2012), PRAGADHEESH e colaboradores (2013), QIN e colaboradores (2013), SMELCEROVIC e colaboradores (2013), TUREK (2013), KUPSKA e colaboradores (2014), WELKE e colaboradores (2014).

Os resultados da composição química dos 11 (onze) OE analisados, de *C. aurantium* e de *C. sinensis*, apresentados nas Tabelas 8 e 9 são característicos da espécie *Citrus*. Estes constituintes químicos estão de acordo com aqueles obtidos pelos mecanismos e rotas de biossíntese (1) a partir do ácido mevalônico (C₈) e pirofosfato de isoprenila (C₉) na condensação *cabeça-cauda*, apresentado na Figura 17; (2) a partir da unidade monoterpênica GPP (pirofosfato de geranila) e seus isômeros (LPP = pirofosfato de linalila; NPP = pirofosfato de nerila) na obtenção dos monoterpênicos lineares geraniol, citronelol, linalol, nerol, geranial, citronelal, *beta*-mirceno, neral e outros (Figura 19); (3) a partir do cátion terpinila na obtenção dos monoterpênicos cíclicos carveol, carvona, sabineno, alfa-terpineol, terpinoleno, terpineol-4, alfa-pineno, bem como dos isômeros quirais do limoneno e outros (Figuras 20, 21 e 22).

Constatamos que outros estudos de composição química do OE *C. aurantium* (Tabela 1) e *C. sinensis* (Tabela 2) também registram dados semelhantes aos resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9, tanto em composição como em percentagem principalmente em relação aos componentes majoritários. Variações naturais de composição ocorrem decorrentes da sazonalidade ou estação do ano em que a espécie vegetal foi plantada, mantida e colhida, segundo BONACCORSI e colaboradores (2011) e ELLOUZE e colaboradores (2012); do grau de amadurecimento da espécie vegetal, segundo registros de TIRADO e colaboradores (1995); da localização geográfica do plantio (latitude, longitude, altitude, umidade relativa do ar, constituição química do solo, ventos, outros), do manejo das espécies vegetais,

do método e do tempo do processo de extração, fatores influentes que foram detalhadamente registrados em BANDONI (2013) e por JUCHELKA e colaboradores (1996) em relação às variações das quantidades dos enantiômeros limoneno e linalol.

Na Tabela 8, em relação aos OE obtido a partir das folhas, constata-se que o percentual de acetato de linalila é superior ao percentual de linalol. Este resultado é compatível com OE a partir de plantas adultas, uma vez que o OE a partir de folhas jovens esta relação é de menor valor, segundo os registros de SARROU e colaboradores (2013). Possivelmente no processo de amadurecimento da folha, ocorra o mecanismo e rota de biotransformação onde o linalol é convertido à acetato de linalila através de acetilação pela coenzima acetil-CoA-tioéter (CH_3COSCoA), representada na Figura 58.

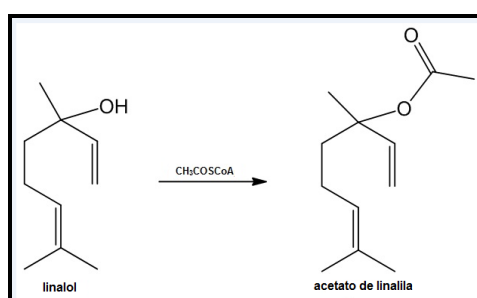


Figure 58 - Biotransformação na espécie vegetal de linalol à acetato de linalila através da acetilação pela co-enzima acetil-CoA-tioéter (CH_3COSCoA) (DEWICK, 2009).

Na Tabela 8, destacamos por sombreado cinza as linhas dos constituintes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila.

Em relação ao mirceno, a quantidade percentual nos OE dos *Citrus* analisados variou desde 0,8% (código identificador CCspp) a 7,8% (código identificador CCafv). Este componente encontra-se em maior quantidade nos OE obtidos das folhas do *C. aurantium* e do *C. sinensis*, por destilação de

arraste de vapor, variando de 2,4% (código identificador ACafv) a 7,8% (código identificador CCafv). Nos OE obtidos do pericarpo do *C. aurantium* e do *C. sinensis*, por destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio, a quantidade de mirceno variou de 0,8% (código identificador CCspp) a 4,8% (FCapp).

O componente majoritário em percentual em todos os OE analisados obtidos do pericarpo é o limoneno, variando de 67,7% (código identificador BCsph) a 82,5% (código identificador DCapv). Estes dados levam em consideração os OE de *C. aurantium* e *C. sinensis*, obtidos por destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio, demonstrando que apesar da variação, o limoneno é o constituinte químico em maior percentual do pericarpo destes *Citrus*. Por outro lado, o limoneno está presente em menor percentual nos OE obtidos por destilação de arraste de vapor das folhas de *C. aurantium* e *C. sinensis*, variando de 1,3% (código identificador ACafv) a 5,9% (código identificador ACsfv).

O linalol é um dos componentes em maior percentual nos OE das folhas dos *Citrus* analisados, obtidos por destilação de arraste de vapor, variando de 14,2% (código identificador BCafv) a 24,8% (código identificador ACafv). Por outro lado sua quantidade nos OE do pericarpo, obtidos por destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio, está em um percentual menor, variando de 0,6% (código identificador FCapp) a 5,2% (código identificador BCsph). Estes resultados demonstram um comportamento semelhante tanto nos OE de *C. aurantium*, como nos de *C. sinensis*, ou seja, o linalol está em maior quantidade nas folhas e em menor quantidade no pericarpo.

Em relação ao componente químico acetato de linalila, este é o componente majoritário, nos OE provenientes das folhas dos *Citrus* analisados, obtidos por destilação de arraste de vapor, variando de 28,0% (código identificador CCafv) a 51,8% (código identificador ACafv). Nos OE provenientes do pericarpo, obtidos por destilação de arraste de vapor, hidrodestilação e prensagem a frio, a quantidade variou de 0,1% (encontrado em todos os OE do

pericarpo de *C. sinensis*: códigos identificadores BCsph, CCSpp, DCspp e Esp) a 1,0% (*C. aurantium*: código identificador DCapv).

A soma das quantidades percentuais dos componentes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila atingiu valores elevados nos OE dos *Citrus* analisados, variando de 60,8% (código identificador CCafv) a 88,7% (código identificador DCapv). Os OE dos *Citrus* analisados são há muitos anos investigados e por isso sua composição química é conhecida, entretanto na Tabela 8 lançamos na última linha a soma dos componentes não-identificados, o que se deve a existência de outros componentes presentes em nível de traços, e que não foram o foco deste estudo.

De acordo com os dados da Tabela 8, observou-se que os métodos de extração utilizados neste estudo não influenciaram significativamente a composição química dos OE, tanto para a espécie de *C. aurantium* como para a de *C. sinensis*. A variação significativa dos percentuais da composição química ocorre em relação à parte da planta de onde foi obtido este OE: folha ou pericarpo. Pode-se visualizar melhor estes dados através da Figura 46, onde apresentamos no gráfico de barras os componentes químicos mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila, nos OE oriundos das folhas e do pericarpo. Assim, pode-se visualizar que os OE obtidos a partir das folhas possuem como componente majoritário o acetato de linalila, seguido pelo linalol, mirceno e limoneno; os OE obtidos do pericarpo possuem como componente majoritário o limoneno, seguido pelo mirceno, linalol e acetato de linalila.

Os rendimentos das extrações realizadas por destilação por arraste de vapor e por hidrodestilação, através de vidraria de *clevenger* no laboratório (Figura 39), estão apresentados na Tabela 8. O maior rendimento foi obtido por destilação por arraste de vapor das folhas de *C. aurantium* (código identificador BCafv) igual a 0,44%, frente a 0,12% das folhas de *C. sinensis* (código identificador ACsfv), com o mesmo método de extração. O rendimento obtido na hidrodestilação do pericarpo de *C. sinensis* (código identificador BCsph) foi de 0,15%. As extrações por arraste por vapor e por hidrodestilação do

pericarpo de *C. aurantium*, obtiveram o mesmo rendimento de 0,05%. Os valores de rendimentos de extração dos OE obtidos nesta tese, vem ao encontro dos dados de outros pesquisadores apresentados nas Tabela 1 e 2, sendo que as diferenças podem estar relacionadas ao preparo da amostra submetida a extração, como as etapas preparatórias de secagem e moagem, o que segundo HOSNI e colaboradores (2010), quando estas etapas são realizadas, o rendimento de extração aumenta. Os resultados reportados por BLANCO e colaboradores (2000a, 2000b), SANTOS e INNECCO (2003) registram a influência da temperatura de secagem no teor e na composição dos OE. KAMAL e colaboradores (2011), em seus estudos com *C. sinensis*, determinou que o OE obtido do pericarpo sem processo de secagem possui percentual mais elevado de mircenol e de limoneno, e que quando o pericarpo é submetido a secagem por passagem de ar a 30 °C, o percentual deste componentes no OE diminui, sendo que o percentual de linalol aumenta. Eles concluíram que com o processo de secagem por aquecimento aumenta o percentual dos monoterpenos oxigenados e diminui o percentual dos monoterpenos não oxigenados. Nesta tese, o pericarpo e as folhas utilizados foram retirados da espécie vegetal e imediatamente submetidos aos métodos de extração de destilação por arraste de vapor e por hidrodestilação. Não realizamos etapas preparatórias de secagem e moagem para evitar alteração da constituição química do OE por aquecimento e exposição ao oxigênio durante o processo de moagem, assegurando a preservação dos constituintes químicos originais dos OE estudados. Este procedimento de utilizar o material de forma fresca, logo após a sua retirada da espécie vegetal, vem ao encontro do registro de TIRADO e colaboradores (1995), CHOI e colaboradores (2003), NJOROGE e colaboradores (2005), COSTA e colaboradores (2013), SARROU e colaboradores (2013) que estudaram os OE do pericarpo e das folhas de *C. aurantium* e de *C. sinensis*, respectivamente. TIRADO e colaboradores (1995), CHOI e colaboradores (2003), NJOROGE e colaboradores (2005), HOSNI e colaboradores (2010), COSTA e colaboradores (2013), SARROU e colaboradores (2013) obtiveram o percentual de rendimento da extração do OE em relação a matéria vegetal fresca, ou seja, sem levar em consideração o

percentual de umidade, do mesmo modo que foram calculados os rendimentos das extrações dos OE desta tese.

A partir dos resultados obtidos e apresentados na Tabela 8, buscamos conhecer melhor os componentes limoneno e linalol, investigando seus enantiômeros quirais. Estes resultados estão apresentados na Tabela 9, onde recolocamos os valores de percentagem relativa dos componentes limoneno e linalol, e os isômeros ópticos encontrados, respectivamente. Detectamos em todos os OE analisados a existência dos isômeros ópticos: (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, bem como (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol. Nas Figuras 47 e 48 apresentamos parte dos cromatogramas gasosos obtidos com coluna quiral, onde vê-se a separação entre os dois isômeros ópticos do limoneno e do linalol, respectivamente. A partir do percentual de cada enantiômero, obteve-se o valor do ee de limoneno e de linalol, constatando deste modo que os OE analisados não são racêmicos.

Todos os OE analisados de *C. aurantium* e de *C. sinensis* possuem o ee do isômero (R)-(+)-limoneno. Os OE de *C. aurantium* possuem o ee do isômero (R)-(-)-linalol. Os OE de *C. sinensis* possuem o ee do isômero (S)-(+)-linalol. Os resultados encontrados, em relação ao ee de limoneno e linalol, vem ao encontro dos resultados reportados por JUCHELKA e colaboradores (1996), DEWICK (2009), BICCHI e colaboradores (1999), CSEKE e colaboradores (2007), TKACHEV (2007), SCIARRONE e colaboradores (2010) e BONACCORSI e colaboradores (2011).

Na última linha da Tabela 9, constam os resultados da medição da rotação óptica dos OE. A medição da rotação óptica do OE integral teve por objetivo confirmar os resultados obtidos por CG/EM dos enantiômeros analisados, sendo que a metodologia utilizada está baseada nas normas oficiais da FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010), WHO (2011), ANVISA (2013) e publicações de TUREK e STINTZING (2013) e GOLDBERG e WEISSMAN (2014). Optou-se por executar algumas medidas sob diluição do OE em 1% v/v em acetato de etila (AE), devido à pouca quantidade de amostra, especialmente as obtidas por extração de destilação por arraste de vapor com vidraria de *cleverger* no laboratório. O solvente escolhido foi o mesmo utilizado

na diluição das amostras para a injeção no CG. Neste caso, os resultados obtidos apresentam importância devido ao seu sinal (+) ou (-), e não em relação ao valor da rotação óptica. Levando em consideração os enantioméricos determinados, (S)-(-)-limoneno e (R)-(+)-limoneno, bem como (R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol, os resultados demonstraram que nos OE onde o componente linalol é majoritário e ee é o (R)-(-)-linalol, a rotação óptica é (-); nos OE onde o componente linalol é majoritário e ee é o (S)-(+)-linalol, a rotação óptica é (+); nos OE onde o componente limoneno é majoritário e ee é o (R)-(+)-limoneno, a rotação óptica é (+). Os resultados de rotação óptica encontrados, em relação a (+) e (-), são compatíveis com os indicados nas farmacopéias consultadas JAPANESE PHARMACOPOEIA (2007), BRITANISH PHARMACOPOEIA (2011), EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2012), THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (2008) e THE MERCK INDEX (2013).

O solvente utilizado para a diluição dos OE, tanto na análise de CG/EM como na medição da rotação óptica, foi o acetato de etila. Optou-se por este solvente devido às seguintes características: não reage quimicamente com os componentes do OE, possui menor toxicidade do que os solventes derivados do petróleo e do que os solventes halogenados, volatilidade adequada para o propósito, custo moderado e solubilidade dos componentes dos OE analisados. O AE foi o solvente utilizado nos estudos de INOUE e colaboradores (2001), LÜCKER e colaboradores (2002), CHENG e colaboradores (2004), ALMEIDA e colaboradores (2010) e SILVA e colaboradores (2013).

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nas Tabelas 8 e 9, constatamos semelhanças entre os OE das marcas comerciais e os extraídos por vidraria de *clevenger* em laboratório. A partir destes resultados e daqueles reportados nas publicações de HEUBERGER e colaboradores (2001), HÖFERL e colaboradores (2006), LEITE e colaboradores (2008), NAKAMURA e colaboradores (2009), SMITH (2009), LINCK e colaboradores (2010), NÖLDNER e colaboradores (2011), COSTA e colaboradores (2013), CHIOCA e colaboradores (2013a, 2013b), LIMA e colaboradores (2013), SUGAWARA e colaboradores (2013), YAMAMOTO e colaboradores (2013) e YUN (2014) em

relação aos componentes limoneno, linalol e seus isômeros ópticos, bem como dos constituintes mirceno e acetato de linalila, este estudo prosseguiu com a escolha de dois (2) OE, entre os onze (11) analisados, para serem submetidos à inalação de camundongos. Escolheu-se dois OE, levando em consideração aqueles que tínhamos maior quantidade de volume disponível. Um OE rico em linalol, o OE de folhas de *C. aurantium* (código identificador CCafv): 28,0% acetato de linalila, 22,4% linalol (ee 28% (*R*)-(-)-linalol), 7,8% mirceno, 2,6% limoneno (ee 42% (*R*)-(+)-limoneno); e um OE rico em limoneno, o OE de pericarpo de *C. sinensis* (código identificador DCspp): 78,3% limoneno (ee 90% (*R*)-(+)-limoneno), 3,1% mirceno, 1,7% linalol (ee 86% (*S*)-(+)-linalol) e 0,1% acetato de linalila. Estes OE encontram-se com a sua constituição química destacada por sombreado nas Tabelas 8 e 9.

Após a inalação dos OE, os animais foram submetidos aos ensaios comportamentais.

Em relação ao OE de *C. sinensis*, na avaliação da atividade ansiolítica (teste claro-escuro), cujo resultado está reportado na Figura 49, observa-se a existência de um indicativo de efeito ansiolítico após a inalação deste OE, uma vez que os animais tiveram comportamento semelhante ao controle positivo do medicamento ansiolítico diazepam, em relação aos parâmetros de "tempo na zona clara" (Figura 49a) e "número de cruzamentos" (Figura 49b). No teste da atividade locomotora (Figura 50) observamos que os animais após a inalação do OE de *C. sinensis* diminuíram a atividade locomotora, o que pode ser indicativo de depressão do SNC, demonstrando um efeito sedativo. Podemos atribuir tal fato principalmente ao componente majoritário deste OE, vaporizado em diluição de 10% por 30 min. O limoneno, nas condições deste experimento, encontrava-se na concentração de 7,8% de limoneno, ou seja, de 7,4% de (*R*)-(+)-limoneno. Cabe aqui salientar que além do limoneno detectado em 20,3% no plasma dos camundongos, os componentes mirceno, linalol, acetato de linalila e alfa-terpineol também foram detectados em percentuais menores (Tabela 10).

Estes resultados vem ao encontro dos registros reportados por outros

pesquisadores. LIMA e colaboradores (2013) atribuíram ao componente químico enantiômero (*R*)-(+)-limoneno os efeitos ansiolíticos quando camundongos inalaram por aproximadamente 30 min emulsões variando de 0,5%, 1,0% e 2,5% deste componente. CARVALHO-FREITAS e COSTA (2002) também reportaram em seus resultados, a ação ansiolítica do OE de *Citrus*, tendo como constituinte majoritário 90,4% de limoneno, em camundongos tratados por via oral (*gavage*). COSTA e colaboradores (2013) registraram o efeito ansiolítico quando camundongos foram submetidos à ingestão oral de OE de *C. aurantium* rico em limoneno e do componente químico limoneno, separadamente, através do teste claro-escuro. SATOU e colaboradores (2011) também constataram o efeito ansiolítico em seu estudo, quando camundongos inalaram durante 30 min a 150 min OE com constituição química de pineno, mirceno, limoneno, linalol, dentre outros. Além disso, encontraram a presença destes constituintes químicos nos órgãos fígado, rins e cérebro, o que demonstra a absorção do OE e distribuição no organismo. FATURI e colaboradores (2010) também demonstraram efeito ansiolítico no teste claro-escuro após a inalação durante 5 min do OE de *C. sinensis* por camundongos. Em relação ao efeito sedativo, o resultado desta tese vem ao encontro dos registros de CARVALHO-FREITAS e COSTA (2002), LEITE e colaboradores (2008) e YUN (2014). CARVALHO-FREITAS e COSTA (2002) obtiveram a ação sedativa e hipnótica do OE de *Citrus*, tendo como constituinte majoritário 90,4% de limoneno, em camundongos tratados por via oral (*gavage*). LEITE e colaboradores (2008) também atribuíram a ação depressora do SNC aos componentes limoneno (96,24%) e mirceno (2,24%) do OE do pericarpo de *Citrus*. YUN (2014) registrou em seus resultados o efeito sedativo do (*R*)-(+)-limoneno administrado via i.p.

Em relação ao OE de *C. aurantium*, os resultados reportados na Figura 49 (a e b) e Figura 50, indicam que não ocorreu efeito ansiolítico e também não ocorreu a diminuição da atividade locomotora, após a inalação deste OE pelos camundongos. Este OE apresenta como constituintes majoritários o linalol (22,4%) e o acetato de linalila (28,0%), além do mirceno (7,8%), limoneno (2,6%) e outros. Levando em consideração o linalol, podemos supor que a

quantidade de linalol no OE vaporizado, em diluição de 10% por 30 min, que foi de 2,2% de linalol, ou seja, de 1,4% de (*R*)-(-)-linalol, tenha sido insuficiente para provocar os efeitos de ansiolítico e de sedação. Cabe aqui salientar que além do linalol detectado em 10,1% no plasma dos camundongos, os componentes mirceno, limoneno, acetato de linalila e alfa-terpineol também foram detectados em percentuais menores (Tabela 10).

Esta constatação, está baseada nos registros de LINCK e colaboradores (2010), sobre a atividade ansiolítica do linalol no teste do claro-escuro, onde ocorreu a vaporização de linalol em concentração de 3% durante 1 hora. ALMEIDA e colaboradores (2009), obtiveram resultados de efeito ansiolítico do linalol nos ensaios comportamentais com ratos, quando um extrato vegetal foi aplicado via i.p. BRADLEY e colaboradores (2007) registram em seus resultados o efeito ansiolítico, quando animais *gerbils* inalaram durante 24 horas o OE de *Lavandula angustifolia*, contendo acetato de linalila (43,98%), linalol (38,47%), mirceno (1,44%), terpinenol-4 (1,25%), *alfa*-terpineol (1,05%), *cis*-linalol oxido (0,77%), *trans*-linalol oxido (0,66%), *beta*-ocimeno (0,55%). Em relação a propriedade sedativa, constatamos que os estudos que registraram sedação atribuída ao linalol, foram executados em condições experimentais de maior concentração ou maior tempo de exposição, como por exemplo os estudos de BUCHBAUER e colaboradores (1991) e LINCK e colaboradores (2009). BUCHBAUER e colaboradores (1991) constataram o efeito sedativo, ao submeter camundongos à inalação do OE de *Lavandula officinalis*, bem como à inalação de seus constituintes químicos majoritários linalol e acetato de linalila, separadamente, durante 90 min. LINCK e colaboradores (2009) observaram sedação dos camundongos no teste da atividade locomotora, após a inalação de linalol vaporizado em concentração de 3% durante 1 hora. Nos dois estudos de LINCK e colaboradores (2009, 2010), nenhuma atividade ansiolítica ou sedativa foi obtida quando foi vaporizado o linalol em concentração de 1% durante 1 hora.

Fica afastada a suposição de que os animais que inalaram os OE permaneceram por período maior de tempo na zona clara, devido ao efeito

sedativo dos OE, porque não ocorreu diferença entre os grupos na latência para o primeiro cruzamento entre a zona clara e a zona escura.

No teste de suspensão pela cauda (Figura 51), a inalação dos OE não provocou alteração comportamental, podendo indicar que não ocorreu ação tipo antidepressiva. Este resultado vem ao encontro dos resultados reportados por COSTA e colaboradores (2013), quando submeteram camundongos ao ensaio comportamental para avaliação de efeito tipo antidepressivo, através do teste de nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1977), após à ingestão oral e a inalação de OE de *C. aurantium* com 98,66% de limoneno.

Após o ensaio suspensão pela cauda, o sangue foi coletado e então analisado. Em relação à análise cromatográfica do plasma dos camundongos, a metodologia HS-CG/EM possibilitou a detecção dos constituintes dos OE inalados pelos camundongos, após a vaporização dos OE na câmara de inalação (Figura 40). O plasma foi coletado imediatamente após o término do teste de suspensão pela cauda, que teve duração de 6 min. Com este procedimento asseguramos a obtenção do perfil dos constituintes químicos do OE inalado, presentes no plasma dos camundongos no momento subsequente ao teste. Nas Figuras 52 e 53, e Tabela 10 apresentamos estes resultados. Os cromatogramas da Figura 52 mostram os picos dos constituintes químicos dos OE vaporizados na câmara de inalação, OE *C. sinensis* (Figura 52a) e OE *C. aurantium* (Figura 52b), e nos respectivos plasmas dos camundongos após a inalação de cada OE (Figura 52c e Figura 52d). Analisamos os espectros de massas dos picos dos cromatogramas da Figura 52 e confirmamos os constituintes químicos. Na Figura 53 apresentamos os espectros do mirceno, limoneno, linalol e acetato de linalila. Na Tabela 10 apresentamos os percentuais de maior valores dos cromatogramas da Figura 52. Constatou-se que no plasma dos camundongos estão presentes alguns dos componentes químicos dos respectivos OE de *C. sinensis* e de *C. aurantium*, vaporizados separadamente e inalados pelos camundongos, em concentração de 10% OE durante 30 min.

BUCHBAUER e colaboradores (1991), JÄGER e colaboradores (1992) e MUCHTARIDI e MUSFIROH (2012) também reportaram em seus estudos a presença de constituintes de OE em matriz biológica. BUCHBAUER e colaboradores (1991) determinaram o valor de 3 ng/mL de linalol no plasma de camundongos, após inalação da vaporização de OE de *Lavandula officinalis* em câmara fechada, e também constataram que os constituintes químicos do OE, os quais pertencem ao grupo dos terpenóides lipofílicos, se fixam no tecido adiposo do camundongo, reduzindo a sua concentração plasmática. JÄGER e colaboradores (1992) determinaram a curva farmacocinética do linalol e do acetato de linalila, incluindo absorção, eliminação, tempo de meia-vida no plasma de voluntários humanos, após seção de massagem de 10 min com OE de *Lavandula officinalis*, em uma área abdominal de 376 cm². Após 5 min do término da massagem, os componentes químicos linalol e acetato de linalila puderam ser detectados no plasma dos voluntários, sendo que o pico da concentração plasmática do linalol foi de 100 ng/mL em 13,76 min e para o acetato de linalila, foi de 121 ng/mL, permanecendo por 90 min após o término da seção de massagem a detecção destes compostos (Figura 23a). MUCHTARIDI e MUSFIROH (2012) detectaram no plasma de camundongo, os componentes químicos do OE após vaporização e inalação (Figura 23b).

Estes estudos auxiliam na compreensão dos dados da Tabela 10, onde constata-se percentuais diferentes entre os constituintes químicos nos OE inalados e os percentuais dos constituintes químicos presentes no plasma. O OE de *C. aurantium*, apresentou um percentual de 28% de acetato de linalila e de 22,4% de linalol, sendo que no plasma dos camundongos detectamos 3,5% de acetato de linalila e 10,1% de linalol. Tal fato pode estar associado a hidrólise que o acetato de linalila sofre transformando-se em linalol no organismo do camundongo (LETIZIA *et al.*, 2003) (Figura 59). Outro fator é que cada constituinte possui uma farmacocinética, com velocidade e afinidade de absorção-eliminação distintos. O objetivo desta investigação foi comprovar que o OE inalado foi absorvido pelo organismo do animal. Destacamos na Tabela 10, por sombreamento, os constituintes químicos mircenol, limoneno, linalol e acetato de linalila, devido a associação de ação psicofarmacológica destes.

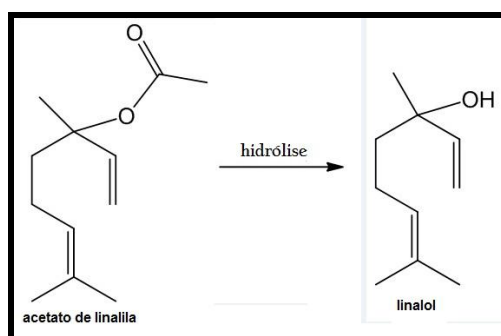


Figure 59 - Metabolização do linalol à acetato de linalila através de hidrólise no organismo do camundongo (LETIZIA *et al.*, 2003).

Deste modo, podemos atribuir os resultados dos ensaios comportamentais principalmente ao componente (*R*)-(+)-limoneno presente no plasma dos camundongos que inalaram o OE de *C. sinensis* e ao componente (*R*)-(-)-linalol presente no plasma dos camundongos que inalaram o OE de *C. aurantium*; entretanto não podemos deixar de considerar a possibilidade de que estes resultados são devido a ação psicofarmacológica do limoneno e do linalol em sinergia com os demais componentes detectados em menor quantidade no plasma, como por exemplo o mirceno, acetato de linalila, alfa-terpineol e geraniol acetato.

A medição simultânea da MEL e do CORT em plasma de camundongos após a inalação dos OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis*, até então não havia sido reportada em publicações.

De acordo com as Tabelas 3 e 4, muitas metodologias podem ser utilizadas para a medição dos hormônios MEL e CORT: cromatografia em fase gasosa, cromatografia líquida, imunoenensaio; sendo que cada uma delas possui vantagens e desvantagens de utilização. Optamos pela medição da MEL e da CORT no plasma dos camundongos, após a inalação dos OE, pela metodologia de imunoenensaio Luminex[®] porque é uma técnica de alta sensibilidade, principalmente em relação à MEL, que está presente na ordem

de pg/mL; é possível a análise simultânea de MEL e CORT, reduzindo assim o tempo de análise e o volume necessário de amostra (25 μ L), uma vez que a quantidade de plasma obtido de cada camundongo é também reduzida; não necessita de técnica preparatória ou preliminar de extração ou derivatização. Como desvantagem citamos o custo relativamente elevado e o sistema Luminex[®] ainda não estar presente na maioria dos laboratórios de pesquisa no Brasil.

Nesta tese, testamos também o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) para a análise simultânea de MEL e CORT, entretanto não obtivemos bons resultados, devido à necessidade de elevada quantidade de plasma de camundongos para fins de validação (ANVISA, RE n.º 899/2003; RDC n.º 27/2012) e de etapa preparatória de concentração da amostra, extração por fase sólida (SPE, do inglês: *solid phase extraction*), para obter a sensibilidade necessária em relação à MEL. A etapa de SPE provocou um manuseio excessivo do plasma, demandando um tempo analítico longo, o que dificultou a preservação da amostra em relação à proteção da luz para evitar a degradação dos analitos, cuidados estes reportados por RAMÍREZ-RODRÍGUEZ e colaboradores (2009) e TOLEDO-PINTO e colaboradores (2010). A constatação da necessidade de etapas preparatórias, objetivando a concentração da amostra para o emprego da metodologia CLAE foi reportada por WELP e colaboradores (2010).

Tendo em vista que cada um destes hormônios possui a sua curva de concentração plasmática (Figuras 30 e 33), variando ao longo do dia, pois são regidos pelo ciclo circadiano, com os seus respectivos picos plasmáticos em horários distintos, escolhemos um horário que não priorizasse nenhum dos hormônios MEL ou CORT, onde ambos estivessem no meio de suas curvas de concentração, sem priorizar nenhum deles. A MEL possui pico plasmático em torno de 02:00 h - 04:00 h, segundo MOCCHEGIANI e colaboradores (1998) e WELP e colaboradores (2010); a CORT possui pico plasmático em torno das 20:00 h, segundo MOCCHEGIANI e colaboradores (1998), MALISCH e

colaboradores (2008) e YU e colaboradores (2013), ambos em ciclo claro-escuro de 12 horas iniciando a luz em 07:00 h (Tabela 7).

Nesta tese realizamos a coleta do sangue entre 11:00 h - 13:00 h, imediatamente após o ensaio comportamental suspensão pela cauda, que teve a duração de 6 min.

Os resultados das análises de imunoensaio no sistema Luminex[®] encontram-se nas Figuras 54 a 57. Constata-se que os valores de MEL e CORT encontrados no plasma dos camundongos, estão adequadamente localizados nas suas respectivas curvas de calibração, porque uma pequena variação em pg/mL, corresponde a uma elevada variação da intensidade de fluorescência, sendo que os valores de concentração de MEL (setas da Figura 54) estão melhores posicionados do que os valores de concentração de CORT (setas da Figura 55).

Os resultados registrados no gráfico da Figura 56, demonstram que ocorreu significância estatística na alteração dos níveis plasmáticos de MEL entre o grupo SAL e o de IMI. Os animais após a inalação dos OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis* não apresentaram significância estatística quando comparados aos controles AR e TWEEN, mantendo os valores basais de MEL de 7 - 13 pg/mL. Assim, podemos supor que os OE inalados não atuam no sistema que envolve a síntese da MEL. Ao confrontar a Figura 51 com a Figura 55, verifica-se que os camundongos sob o efeito da IMI, apresentam comportamento compatível com ação antidepressiva da IMI e apresentam elevação de MEL plasmática frente aos demais grupos testados. Deste modo pode-se estabelecer uma relação entre a elevação da concentração plasmática da MEL e o estado tipo antidepressivo. Podemos supor a seguinte relação entre a ingestão de IMI e a elevação dos níveis de MEL: a IMI por ser um antidepressivo tricíclico inibidor da recaptação dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina, leva a uma maior disponibilidade de ambos (HEYDORN *et al.*, 1982; SAENZ *et al.*, 2006; BHATTACHARYA, 2010). A noradrenalina, através dos receptores β -adrenérgicos nos pinealócitos, ativa a proteína cinase-A, que aumenta a síntese de adenosina monofosfato cíclico

(AMPC). Este por sua vez, ativa a enzima N-acetiltransferase (NAT) que catalisa a síntese da melatonina a partir da serotonina (REITER, 1991), mecanismo mostrado na Figura 29. Portanto a IMI propicia a maior produção de quantidade de noradrenalina, levando assim a formação de serotonina, e consequentemente a formação de MEL.

Em relação aos resultados das concentrações plasmáticas da CORT, registrados na Figura 57, observamos que não ocorreu significância estatística entre os valores de CORT plasmática nos grupos testados SAL, IMI, AR, TWEEN, OE de *C. aurantium* e de *C. sinensis*. Podemos supor que este resultado é porque o ensaio comportamental de suspensão pela cauda não é estressante para ocasionar a alteração nos níveis plasmáticos de CORT. Os valores medidos de CORT plasmática, foram de 60 ng/mL à 80 ng/mL, o equivalente ao valor basal para camundongos não-estressados, de acordo com DETANICO e colaboradores (2009), para a coleta de sangue no mesmo horário. Segundo DAS e colaboradores (2000) e NAKAMURA e colaboradores (2010) o ensaio de imobilização causa o estresse em camundongos.

Deste modo, embora THIERRY e colaboradores (1986) e LIU e colaboradores (2007) tenham considerado o ensaio comportamental de suspensão pela cauda como um modelo para roedores, direcionado a avaliar a resposta antidepressiva e de vulnerabilidade ao estresse, através dos resultados desta tese não foi constatado o estresse dos animais após terem sido submetidos a este ensaio. Assim verificou-se que o ensaio comportamental de suspensão pela cauda não é um ensaio estressor capaz de atuar no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em relação a liberação da CORT.

Através desta investigação comprovamos que o protocolo utilizado nos ensaios comportamentais desta tese, onde o animal foi mantido em câmara de vidro (Figura 40) inalando o OE vaporizado por meio de dois pequenos motores elétricos durante 30 minutos, bem como a injeção i.p. nos animais dos grupos controle, não são eventos estressantes, uma vez que a CORT plasmática permaneceu no valor basal.



7. CONCLUSÕES

Neste trabalho extraímos e analisamos os OE provenientes do pericarpo e das folhas de *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga) e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce) e realizamos ensaios comportamentais associados à ansiedade e depressão em camundongos expostos por via inalatória aos OE. O plasma dos camundongos também foi analisado após os tratamentos.

A avaliação da constituição química dos OE, demonstrou semelhança entre os provenientes de empresas comerciais e aqueles extraídos em nosso laboratório, e também que estes OE, todos provenientes de plantações das regiões sul e centro-sul do Brasil, possuem constituintes de importância comercial e farmacológica.

Constatamos que os OE provenientes do pericarpo, tanto o *C. aurantium* como o *C. sinensis*, possuem o componente limoneno em maior percentual que os demais componentes. Por outro lado, os OE provenientes das folhas, tanto o *C. aurantium* como o *C. sinensis*, possuem os componentes acetato de linalila e linalol em maior percentual que os demais componentes.

Investigamos também a isomeria quiral dos componentes limoneno e linalol e verificamos que o isomero (*R*)-(+)-limoneno é ee em todos os OE. Já em relação ao linalol, verificamos que o isomero (*R*)-(-)-linalol é ee nos OE *C. aurantium*, e que o (*S*)-(+)-linalol é ee nos OE *C. sinensis*.

Escolhemos para a inalação dos camundongos, o OE das folhas de *C. aurantium* (rico em linalol) e o OE do pericarpo de *C. sinensis* (rico em limoneno). Após a inalação do OE de *C. sinensis*, os camundongos apresentaram comportamento indicativo de redução da ansiedade através do teste claro-escuro e diminuição da sua atividade locomotora no teste de atividade locomotora, indicando um efeito depressor do SNC. No teste de suspensão pela cauda, não apresentaram alteração de comportamento, demonstrando que estes OE não efetuam ação tipo antidepressiva.

Ao analisar o plasma dos camundongos, detectamos a presença dos componentes químicos dos OE inalados, comprovando assim que eles foram absorvidos. Pesquisamos também as concentrações plasmáticas dos hormônios MEL e CORT, e verificamos que os OE inalados não atuam no sistema que envolve a síntese da MEL, bem como no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal da CORT, pois não ocorreu alteração dos valores basais destes hormônios. Por outro lado, comprovamos que o protocolo aplicado aos camundongos e o ensaio comportamental de suspensão pela cauda não são eventos estressantes.

A pesquisa simultânea da presença dos constituintes dos OE inalados no plasma, das concentrações plasmáticas de MEL e CORT, bem como correlacionar com os resultados dos ensaios comportamentais até então não haviam sido investigadas.

Os resultados alcançados nesta tese instigam o prosseguimento da pesquisa da constituição química dos OE por cromatografia bidimensional, de determinações enantioméricas do componente químico acetato de linalila e de outros, de ensaios comportamentais com os OE em outras concentrações, da coleta do sangue em horário noturno, bem como a avaliação dos tratamentos em camundongos no ensaio de estresse por imobilização, para então avaliar os hormônios MEL e CORT.



8. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. *Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Carol Stream: Allured Publ., New York, 2007, 804p.

AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. *Neuroanatomia Funcional: Texto e Atlas*. Roca, São Paulo, 2ª ed, 2008, 526 p.

AIT-BELGNAOUI, A.; DURAND, H.; CARTIER, C.; CHAUMAZ, G.; EUTAMENE, H.; FERRIER, L.; HOUDEAU, E.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L.; THEODOROU, V. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 37, p. 1885—1895, 2012.

AKHLAGHI, M.; SHABANIAN, G.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; PARVIN, N.; SAADAT, M.; AKHLAGHI, M. Flor de *Citrus aurantium* e Ansiedade Pré-Operatória. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, p. 702-712, 2011.

ALAMILI, M.; BENDTZEN, K.; LYKKESFELDT, J.; ROSENBERG, J.; GÖGENUR, I. Melatonin suppresses markers of inflammation and oxidative damage in a human daytime endotoxemia model. *Journal of Critical Care*, v. 29, p. 184.e9–184.e13, 2014.

ALGHASHAM, A.; RASHEED, N. Stress-mediated modulations in dopaminergic system and their subsequent impact on behavioral and oxidative alterations: An update. *Pharmaceutical Biology*, v. 52, p.368-377, 2014.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JONGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. *Química Orgânica*, editora Guanabara Dois, RJ, 2ª ed., 1976, 961 p.

ALMEIDA, A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; SILVA, O.A.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Potential antioxidant and anxiolytic effects of (+)-limonene epoxide in mice after marble-burying test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 118, p. 69–78, 2014.

ALMEIDA, E.R.; RAFAEL, K.R.O.; COUTO, G.B.L.; ISHIGAMI, A.B.M. Anxiolytic and Anticonvulsant Effects on Mice of Flavonoids, Linalool, and α -Tocopherol Presents in the Extract of Leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-6, 2009. Article ID 274740, doi:10.1155/2009/274740.

- ALMEIDA, M.C.S.; ALVES, L.A.; SOUZA, L.G.S.; MACHADO, L.L.; MATOS, M.C.; OLIVEIRA, M.C.F.; LEMOS, T.L.G. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Quimica Nova*, v. 33, p. 1877-1881, 2010.
- AMMAR, A.H.; BOUAJILA, J.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; ROMDHANE, M.; ZAGROUBA, F. Chemical composition and in vivo antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (neroli oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 15, p. 1034-1040, 2012.
- ANISIMOV, V.N. Effects of Exogenous Melatonin, A Review. *Toxicologic Pathology*, v. 31, p. 589–603, 2003.
- ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
- ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil – Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Anexo: Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, 2007.
- ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil – Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012.
- ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária/Brasil. Consulta Pública nº 29 de 18 de julho de 2013. MERCOSUL/XL SGT Nº 11/P.RES. Nº 08/13. Farmacopeia Mercosul: método geral para a determinação de rotação óptica. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de julho de 2013.
- ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, L.P.; MACHADO, M.A. What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe *Citreae* (Rutaceae subfamily Aurantioideae). *Organisms diversity and evolution*, v. 3, p. 55-62, 2003.
- yARENDT, J.; SKENE, D. J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, v.9, p.25-39, 2005.
- ASSIS, V.R. *Relação entre os níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona no comportamento vocal e territorial no Sapo Martelo (Hypsiboas faber)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociencias da Universidade de São Paulo, 2010, 97p.
- AUCHEWSKI, L.; ANDREATINI, R.; GALDURÓZ, J.C.F.; LACERDA, R.B. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, p. 24-31, 2004.
- AZIMOVA, S.S.; GLUSHENKOVA, A.I.; VINOGRADOVA, V.I. *Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources*. Springer Science & Business Media, 2012, 992 p.

- BACZEK, T.; OLEDZKA, I.; KONIECZNA, L.; KOWALSKI, P.; PLENIS, A. Biomedical Evaluation of Cortisol, Cortisone, and Corticosterone along with Testosterone and Epitestosterone Applying Micellar Electrokinetic Chromatography. *The Scientific World Journal*, v. 2012, ID 268120, p. 1-8, 2012. Disponível em: <doi:10.1100/2012/268120>. Acessado em 20/02/2014.
- BAGETTA, G.; MORRONE, L.A.; ROMBOLÀ, L.; AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BERLIOCCI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; ROTIROTI, D.; CORASANITI, M.T. Review, Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, v. 81, p. 453–461, 2010.
- BALLENGER, J. C. Anxiety and Depression: Optimizing Treatments. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, v. 2, p. 71-79, 2000.
- BANDONI, A. L. *Los recursos vegetales aromáticos em Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 2003, 417 p.
- BARROS, D. M., ELISABETSKY, E. *Atividade anticonvulsivante do Linalol em convulsões induzidas por picrotoxina e estricnina*. In: Annals of the XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Florianópolis, pp.120, EDEME, Brazil, 1996.
- BASSANI, T.B. *Efeitos neuroprotetor e tipo-antidepressivo da melatonina em modelo animal de doença de parkinson induzido por rotenona em ratos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, 2013, 63p.
- BASTARD, J.; TIRAN, D. Reprint of: Aromatherapy and massage for antenatal anxiety: Its effect on the fetus. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, v. 15, p. 230–233, 2009.
- BEDROSIAN, T.A.; HERRING, K.L.; WALTON, J.C.; FONKEN, L.K.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Evidence for feedback control of pineal melatonin secretion. *Neuroscience letters*, v. 542, p.123-125, 2013.
- BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. *Secondary Plant Products: Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, v.8, New York: Springer-Verlag, reprint 1st ed. 1980, 2011, 696 p.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiology and Behavior*, v. 56, p. 623-628, 1994.
- BENNICI, A., TANI, C. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: Evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora*, v. 199, p. 464-475, 2004.
- BERGAMASCHI, J.M. Desengraxante verde, uma realidade. *Tratamento de superfície*, v. 168, p. 64-66, 2011.

- BERGAMINI, M.R.; BERNARDI, M.M.; SUFREDINI, I.B.; CIARAMICOLI, M.T.; KODAMA, R.M.; KABADAYAN, F.; SARACENI, C.H.C. Dentin hypersensitivity induces anxiety and increases corticosterone serum levels in rats. *Life Sciences*, v. 98, p. 96–102, 2014.
- BHATTACHARYA, S.K.; SEN, P.; RAY, A. *Pharmacology*. Elsevier, India, 2010, 625 p.
- BICCHI, C.; D'AMATO, A.; RUBIOLO, P. Review, Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *Journal of Chromatography A*, v. 843, p. 99–121, 1999.
- BISHT, D.; CHANOTIYA, C.S.; RANA, M.; SEMWAL, M. Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpene compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. *Industrial Crops and Products*, v. 30, p. 422–426, 2009.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. OE no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quimica Nova*, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BLANCH, G.P.; NICHOLSON, G.J. Determination of the Enantiomeric Composition of Limonene and Limonene-1,2-epoxide in Lemon Peel by Multidimensional Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection and Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, v. 36, p. 37-43, 1998.
- BLANCHARD, C.D.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, p. 205-218, 2001.
- BLANCHARD, C.D.; GRIEBEL, G.; POBBE, R.; BLANCHARD, R.J. Review, Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, p. 991–998, 2011.
- BLANCO, M.C.S.G.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; BOVI, O.A. Influência da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de menta. *Horticultura Brasileira*, v. 18, p. 901-903, 2000a.
- BLANCO, M.C.S.G.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; BOVI, O.A. Influência da temperatura de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de alecrim. *Horticultura Brasileira*, v. 18, p. 903-905, 2000b.
- BONACCORSI, I.; SCIARRONE, D.; COTRONEO, A.; MONDELLO, L.; DUGO, P.; DUGO, G. Enantiomeric distribution of key volatile components in *Citrus* essential oils. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 841-849, 2011.
- BORRULL, N.C. El perfume del vino como poema químico. *Enoviticultura*, nº 15, p. 62-65, 2012.

- BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test, *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 55 – 65, 2003.
- BOUTIN, J.A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *TRENDS in Pharmacology Sciences*, v. 26, p. 412-419, 2005.
- BOWLES, E.J. *The chemistry of aromatherapeutic oils*. Allen and Unwin, Australia, 3ª ed, 2003, 236 p.
- BRADLEY, B. F.; STARKEY, N. J.; BROWN, S. L.; LEA, R.W. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 517-525, 2007.
- BRANDÃO, M.L. *As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência*, Editora Pedagógica e Universitária, São Paulo, 4ªed, 2004, 223 p.
- BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). Herbal Drugs, 3455-3456, London, England, 2011.
- BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; JÄGER, W.; DIETRICH, H.; PLANK, C. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Zeitschrift für Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie*, v. 46, p. 1067–1072, 1991.
- BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: K.G. RAMAWAT, J.M. MERILLON (eds.), *Handbook of Natural Products*. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013. v. 5, p. 4109-4159.
- BUFFET-JERROTT, S. E.; STEWART, S. H.; BIRD, S.; TEEHAN, M .D. An examination of differences in the time course of oxazepam's effects on implicit vs explicit memory. *Journal of Psychopharmacology*, v.12, p.338-347, 1998.
- BURNETT, K.M.; SOLTERBECK, L.A.; STRAPP, C.M. Scent and mood state following an anxiety-provoking task. *Psychological reports*, v. 95, p. 702–722, 2004.
- BURNS, E.E.; BLAMEY, C.; ERSSER, S.J. An investigation into the use of aromatherapy on intrapartum midwifery practice. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 6, p. 141–147, 2000.
- BUTJE, A.; REPEDE, E.; SHATTELL, M. Healing scents: An overview of clinical aromatherapy for emotional distress. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, v. 46, p. 46-52, 2008.
- CABERLOTTO, L.; CARBONI, L.; ZANDERIGO, F.; ANDREETTA, F.; ANDREOLI, M.; GENTILE, G.; RAZZOLI, M. Differential effects of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibition by lithium or selective inhibitors in the

- central nervous system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 386, p. 893–903, 2013.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; AGATINO, G. R.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of *Citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 43, p. 73–79, 1998.
- CAHN, R.S.; INGOLD, S.C.; PRELOG, V. Spezifikation der molekularen Chiralität, *Angewandte Chemie*, v. 78, p. 413–447, 1966.
- CALIXTO, M.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; VIEIRA, M.L.C. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, p. 721-724, 2004.
- CALVEZ, J.; FROMENTIN, G.; NADKARNI, N.; DARCEL, N.; EVEN, P.; TOMÉ, D.; BALLEST, N.; CHAUMONTET, C. Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiology and Behavior*, v. 104, p. 675-683, 2011.
- CANO, P.; CARDINALI, D.P.; LUGO, M.J.R.; MATEOS, M.P.F.; TOSO, C.F.R.; ESQUIFINO, A.I. Effect of a High-fat Diet on 24-Hour Pattern of Circulating Adipocytokines in Rats. *Obesity*, v. 17, p. 1866–1871, 2009.
- CANO, P.; JIMÉNEZ-ORTEGA, V.; LARRAD, A.; TOSO, C.F.R.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrinology*, v. 33, p. 118–125, 2008.
- CARLILE, E.L.; SHIRACHI, D.Y.; QUOCK, R.M. An anxiolytic-like effect of hyperbaric oxygen in the mouse light/dark exploration test. *Life Sciences*, v. 90, p. 267-271, 2012.
- CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D.. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 235-272, 2003.
- CARRASCO, J.L.; ALVAREZ, E.; OLIVARES, J.M.; REJAS, J. Análisis comparativo de costes del inicio de terapia con pregabalina o ISRS/ISRN en pacientes resistentes a las benzodiazepinas con trastorno de ansiedad generalizada en España. *Actas Españolas de Psiquiatría*, v. 41, p. 164-74, 2013. Disponível em: <<http://actaspsiquiatria.es/repositorio/15/83/ESP/15-83-ESP-164-174-677858.pdf>>. Acessado em 09/02/2014.
- CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, p.1629-1633, 2002.
- CASES, J.; IBARRA, A.; FEUILLERE, N.; ROLLER, M.; SUKKAR, S.G. Pilot trial of *Melissa officinalis* L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering

from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 4, p. 211–218, 2011.

CASTRO, R.J.A.; LEAL, P.C.; SAKATA, R.K. Tratamento da dor em queimados. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 63, p. 149-158, 2013.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 55, p. 57-60, 2006.

CAVIGELLI, S.A.; MONFORT, S.L.; WHITNEY, T.K.; MECHREF, Y.S.; NOVOTNY, M.; MCCLINTOCK, M.K. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *Journal of Endocrinology*, v. 184, p. 153–163, 2005.

CEN, H.; WINDLER, S.L.; RICE, L.S.; ZHANG, A.; ZHOU, H. Multiplex epitope detection: A new method overcomes limitations of antibody arrays. *Proteomics*, v. 13, p. 1696–1700, 2013.

CHABRA, A.; SHOKRZADEH, M.; NAGHSHVAR, F.; SALEHI, F.; AHMADI, A. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Human and Experimental Toxicology*, v. 33, p. 185–195, 2014.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMEDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*, v. 85, p. 27-35, 1997.

CHEN, Y.; WU, H. Programmed cell death involved in the schizolysigenous formation of the secretory cavity in *Citrus sinensis* L. (Osbeck). *Chinese Science Bulletin*, v. 55, p. 2160–2168, 2010.

CHEN, Y-J; CHENG, F.; SHIH, Y.; CHANG, T-M; WANG, M-F; LAN, S-S. Inhalation of Neroli Essential Oil and Its Anxiolytic Effects. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 5, article 13, p. 1-10, 2008.

CHENG, S.-S.; LIU, J.-Y.; TSAI, K.-H.; CHEN, W.-J.; CHANG, S.-T. Chemical Composition and Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from Leaves of Different *Cinnamomum osmophloeum* Provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4395-4400, 2004.

CHEONG, K. W.; TAN, C.P.; MIRHOSSEINI, H.; CHIN, S.T.; MAN, Y.B.C.; HAMID, N.S.A.; OSMAN, A.; BASRI, M. Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds of malaysian soursop (*Annona muricata*): Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). *Food Chemistry*, v. 125, p. 1481–1489, 2011.

CHIOCA, L.R.; ANTUNES, V.D.C.; FERRO, M.M.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. *Life Sciences*, v. 92, p. 971–975, 2013a.

- CHIOCA, L.R.; FERRO, M.M.; BARETTA, I.P.; OLIVEIRA, S.M.; SILVA, C.R.; FERREIRA, J.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect to lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABA_A/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, p. 412–418, 2013b.
- CHOI, H.S. Character Impact Odorants of *Citrus* Hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] Cold-Pressed Peel Oil. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 2687-2692, 2003.
- CITRUSBR, Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. *Suco de laranja brasileiro: na rota da sustentabilidade*, 2012, 9 p.
- COHEN, S.; KESSLER, R.C.; GORDON, L.U. *Measuring stress, a guide for health and social scientists*. New York, Oxford University Press, 1997, 237 p.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA/Brasil. Resolução RE nº 714. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 de junho de 2002.
- CORAZZA-NUNES, M.J.; NOVELLI, V.M.; NUNES, W.M.C.; MOREIRA, A.L.O.R.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. Aurantioideae: a review on taxonomy and phylogeny, with contributions from molecular systematics. *Laranja, Cordeirópolis*, v. 26, p. 359-374, 2005.
- CORBALAN-TUTAU, D.; MADRIR, J.A.; NICOLÁS, F.; GARAULET, M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiology and Behavior*, v. 123, p. 231-235, 2014.
- COSTA, C.A.R.A.; CURY, T.C.; CASSETTARI, B.O.; TAKAHIRA, R.K.; FLÓRIO, J.C.; COSTA, M. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BioMedCentral Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/42>>. Acessado em 05/02/2014.
- COVACI, A.; DONEANU, C.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; SCHEPENS, P. Determination of melatonin in pharmaceutical formulations and human plasma by gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 13, p. 431-436, 1999.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 13, p.167-170, 1980.
- CREESE, I., BURT, D.R., SNYDER, S.H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, v. 192, p. 481–483, 1976.

- CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Review*, v. 87, p. 929-954, 1987.
- CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety: review. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 775-790, 2005.
- CSEKE, L.J.; KAUFMAN, P.B.; KIRAKOSYAN, A. The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers. *Natural Product Communications*, v. 2, p. 1317-1336, 2007.
- CUESTA, M.; CERMAKIAN, N.; BOIVIN, D.B. Circadian clock genes and psychiatric. In: SHAW, P.; TAFTI, M.; THORPY, M.J. (ed.). *The Genetic Basis of Sleep and Sleep Disorders*. Cambridge University Press, 2013, p. 351.
- DAS, A.; KAPOOR, K.; SAYEERPRIYADARSHINI, A.T.; DIKSHIT, M.; PALIT, G.; NATH, C. Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. *Pharmacology Research*, v. 42, p. 213-217, 2000.
- DETANICO, B.C.; PIATO, A.L.; FREITAS, J.J.; LHULLIER, F.L.; HIDALGO, M.P.; CAUMO, W.; ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology*, v. 607, p. 121-125, 2009.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. England: John Wilwy and Sons, 3^aed., 2009, 539p.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 165–170, 2001.
- DIAS, F.R.C.; BASTOS, J.M.M; SAMPAIO, M.F.S.; CAREY, R.J.; CARRERA, M.P. Opposite effects of typical and atypical anti-psychotic drugs on sensitized dopamine receptors: Sub-chronic low dose Olanzapine exposure reverses sensitization but a similar regimen of low dose haloperidol potentiates sensitization effects. *Psychopharmacology*, v. 230, p. 579-588, 2013.
- DOMINGUES, E.T.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; TULMANN NETO, A. Caracterização de onze clones de laranja 'pêra' e seis variedades assemelhadas. *Revista Laranja*, v. 25, p. 111-138, 2004.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds, *New Phytologist*, v. 198, p. 16–32, 2013.
- DUPONT, R. L.; RICE, D. P.; MILLER, L. S. Economic costs of anxiety disorders. *Anxiety*, v. 2, p.167-172, 1996.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 308–323, 2007.

ELIEL, E.L.; WILEN, S. *Stereochemistry of organic compounds*. ed Wiley India Pvt. Limited, 2008, 1286 p.

ELISABETSKY, E., SILVA BRUM, L.F., SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of Linalol in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, v. 6, p. 107-113, 1999.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.P.C.; SANTOS, M. A. C.; SIQUEIRA, I. R.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. Sedative properties of Linalol. *Fitoterapia*, v. 15, p. 407-414, 1995.

ELLOUZE, I.; ABDERRABBA, M.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; BOUJILA, J. Season's Variation Impact on *Citrus aurantium* Folhas Essential Oil: Chemical Composition and Biological Activities Impact. *Journal of Food Science*, v. 77, p. T173-T180, 2012.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine*, v. 13, p. 205-208, 2006.

ESQUIFINO, A.I.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNANDEZ-MATEOS, P.; CARDINALI, D.P. Neuroendocrine-immune correlates of circadian physiology: studies in experimental models of arthritis, ethanol feeding, aging, social isolation, and calorie restriction. *Endocrinology*, v. 32, p. 1–19, 2007.

ETAIN, B.; MILHIET, V.; BELLIVIER, F.; LEBOYER, M. Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *European Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. S676–S682, 2011.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (EP). COUNCIL OF EUROPE - (EDQM), 2012.

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

FAO - Food and Agriculture Organization (FAO) Statistics Division, 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em 06/02/2014.

FARIA, J.A.; KINOTE, A.; IGNACIO-SOUZA, L.M.; ARAÚJO, T.M.; RAZOLLI, D.S.; DONEDA, D.L.; PASCHOAL, L.B.; LELLIS-SANTOS, C.; BERTOLINI, G.L.; VELLOSO, L.A.; BORDIN, S.; ANHÉ, G.F. Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 305, p. E230–E242, 2013.

- FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz. 5ª ed., v. 1, item 5.4.2.7. Brasília: Anvisa, 2010.
- FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 34, p. 605-609, 2010.
- FENG, X.; WANG, M.; ZHAO, Y.; HAN, P.; DAI, Y. Review, Melatonin from different fruit sources, functional roles and analytical methods. *Trends in food science and technology*, v. 13, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.001>>. Acessado em 03/03/2014.
- FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; SMADJA, J.; CHEMAT, F. An improved microwave cleverger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, p. 121–126, 2006.
- FISCHER, E. Über die Konfiguration des Traubenzuckers und seiner Isomeren. II *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 24, p. 2683–2687, 1891.
- FISMER, K.L.; PILKINGTON, K. Lavender and sleep: A systematic review of the evidence. *European Journal of Integrative Medicine*, v.4, n.4, p.E436-E447, 2012.
- FLACK, H. D. Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work. *Acta Crystallographica Section A*, v. 65, p. 371-389, 2009.
- FONSECA, I.C.L.; PORTO, M.M. Relações entre Luz e Produção Hormonal no Homem. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Arquitetura, *Cadernos do Proarq*, v. 8, p. 1-2013, 2004.
- FRAATZ, M.A.; BERGER, R.G.; ZORN, H. Nootkatone, a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 83, p. 35-41, 2009.
- FRANZ, C.M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.
- FROCHOSO, S.S. *Estudio perfumístico*. Dissertação de Mestrado (Master Thesis). Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 2004, 168p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2099.1/5205>>. Acessado em 04/02/2014.
- FUSTINONI, S.; POLLEDRI, E.; MERCADANTE, R. High-throughput determination of cortisol, cortisone, and melatonin in oral fluid by on-line turbulent flow liquid chromatography interfaced with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 27, p. 1450-1460, 2013.
- GÁRATE, I.; GARCIA-BUENO, B.; MADRIGAL, J.L.M.; CASO, J.R.; ALOU, L.; GOMEZ-LUS, M.L.; MICÓ, J.A.; LEZA, J.C. Stress-Induced Neuroinflammation:

- Role of the Toll-Like Receptor-4 Pathway. *Biological Psychiatry*, v. 73, p. 32–43, 2013.
- GARCIA-LOR, A.; CURK, F.; SNOUSSI-TRIFA, H.; MORILLON, R.; ANCILLO, G.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true *Citrus* fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany*, v. 111, p. 1–19, 2013.
- GARCIA-PARRILLA, M.C.; CANTOS, E.; TRONCOSO, A.M. Study Review, Analysis of melatonin in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 177–183, 2009.
- GARGANO, A.C. *Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do OE das cascas de frutos de espécies do gênero Citrus*. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, 2007, 54p.
- GAWANDE, R.K.; TARE, H.L.; SHENDE, V.S.; BONGIRWAR, A.A.; DEORE, S.R.; DAMA, G.Y. Anxiolytic and CNS depressant activity of extracts obtained from seeds of *Ziziphus rugosa*. *International Journal of Current Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 1, p. 21-32, 2011.
- GE, H.-X.; XUE, R.; LI, Y.-F.; WEI, H.-W.; ZHANG, Y.-Z. Long term regular physical exercise improve chronic unpredictable stress induced depression and cognitive impairment in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, Supplement S10.17, p. 104, 2013.
- GEVEN, E.J.W.; ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; VOGL, T.; ROTH, J.; FOELL, D.; VAN DEN BERG, W.B.; VAN LENT, P.L.E.M. Serum levels of S100A8/A9 complex and corticosterone correlate to synovial inflammation and cartilage/bone damage in IL-1RA^{-/-} mice, a model system for seronegative arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 73, A5.13, p. A68, 2014.
- GMITTER Jr., F.G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Economic Botany*, v. 44, p. 267-277, 1990.
- GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; ALVES, P.B.; TEIXEIRA-SILVA, F. Effect of Sweet Orange Aroma on Experimental Anxiety in Humans. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 18, p. 798-804, 2012.
- GOLDBERG, D.; WEISSMAN, Z. Compact, high-resolution, self-referenced, optical activity polarimeter for high-pressure liquid chromatography systems. *Applied Optics*, v. 52, p. 577-587, 2014.
- GOMES, M. S.; CARDOSO, M. G.; MACHADO, S. M. F.; MALLET, A. C. T.; MIRANDA, C. A. S. F.; ANDRADE, J.; SILVA, L. F.; TEIXEIRA, M. L. *Caracterização Química do Óleo Essencial Extraído das Cascas de Laranja e Atividade Antioxidante Utilizando Dois Métodos de Análise*. 50º Congresso Brasileiro de Química. Cuiabá, MT. 2010.

GOTO, M.; MATSUO, H.; IIGO, M.; FURUSE, M.; KORF, H.-W.; YASUO, S. Melatonin-induced changes in the expression of thyroid hormone-converting enzymes in hypothalamus depend on the timing of melatonin injections and genetic background in mice. *General and Comparative Endocrinology*, v. 186, p. 33–40, 2013.

GOUNARIS, Y. Biotechnonology for the production of essential oil, flavous and volatile isolates, a reiew. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 25. p. 367-386, 2010.

GRAHAM, P.H.; BROWNE, L.; COX, H.; GRAHAM, J. Inhalation Aromatherapy During Radiotherapy: Results of a Placebo-Controlled Double-Blind Randomized Trial. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, p. 2372-2376, 2003.

GROSS, J.H. *Mass spectrometry, a textbook*. Springer, Germany, 1ª ed., 2004, 534p.

GUÉNOLÉ, F.; GODBOUT, R.; NICOLASC, A.; FRANCO, P.; CLAUSTRAT, B.; BALEYTE, J-M. Melatonin for disordered sleep in individuals with autism spectrum disorders: Systematic review and discussion. *Sleep Medicine Reviews*, v. 15, p. 379-387, 2011.

HALL, F.G. A spectroscopic comparison of foetal and maternal blood of the rabbit and goat. *The Journal of Physiology*, v. 82, p. 33-37, 1934.

HANSEN, V.H.; ANDERSEN, L.T.; MADSEN, M.T.; HAGEMAN, I.; RASMUSSEN, L.S.; BOKMAND, S.; ROSENBERG, J.; GÖGENUR, I. Effect of melatonin on depressive symptoms and anxiety in patients undergoing breast cancer surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 145, p. 683–695, 2014.

HEYDORN, W.E.; BRUNSWICK, D.J.; FRAZER, A. Effect of treatments of rats with antidepressants on melatonin concentrations in the pineal gland and serum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 222, p. 534-543, 1982.

HELLHAMMER, D. H.; WÜST, S.; KUDIELKA, B. M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* , v. 34, p. 163-171, 2009.

HERZ, R.S. Aromatherapy Facts and Fictions: A Scientific Analysis of Olfactory Effects on Mood, Physiology and Behavior. *International Journal of Neuroscience*, v. 119, p. 263-290, 2009.

HEUBERGER, E.; HONGRATANAWORAKIT, T.; BÖHM, C.; WEBER, R.; BUCHBAUER, G. Effects of Chiral Fragrances on Human Autonomic Nervous System Parameters and Self-evaluation. *Chemical Senses*, v. 26, p. 281-292, 2001.

HEUBERGER, E.; NUNES, D. S.; LINCK, V. M.; SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; ELISABETSKY, E. Effects of Essential Oils in the Central Nervous System.

- In: BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (Org.). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. London: CRC Press, 2010. p. 281-314.
- HÖFERL, M.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. *Planta Medica*, v. 72, p.1188-1192, 2006.
- HOFFMANN, H.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry, principles and applications*. John Wiley and Sons Ltd, England, 3^a ed, 2007, 502p.
- HOMMA, K.; SATO, A.; WATANABE, H.; HASEGAWA, T. The Circadian Variation of Cortisol Secretion in Patients with Anorexia Nervosa in Childhood and Adolescence after Recovery of Body Weight by Treatment Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry in Selected Ion Monitoring. *Clinical Pediatric Endocrinology*, v. 16, p. 17-22, 2007.
- HOPPE, J.B. *Investigação do efeito neuroprotetor da melatonina em modelo in vitro de toxicidade do peptídeo β -amilóide*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2009, 102p.
- HORII, Y.; NAGAI, K.; NAKASHIMA, T. Order of exposure to pleasant and unpleasant odors affects autonomic nervous system response. *Behavioral Brain Research*, v. 243, p.109-117, 2013.
- HOSNI, K.; ZAHED, N.; CHRIF, R.; ABID, I.; MEDFEI, W.; KALLEL, M.; BRAHIM, N.B.; SEBEI, H. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, v. 123, p. 1098–1104, 2010.
- HOWARD, S.; HUGHES, B.M. Expectancies, not aroma, explain impact of lavender aromatherapy on psychophysiological indices of relaxation in young healthy women. *British Journal of Health Psychology*, v. 13, p. 603–617, 2008.
- IBARRA, A.; FEUILLERE, N.; ROLLER, M.; LESBURGERE, E.; BERACOCHEA, D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*, v. 17, p. 397-403, 2010.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Org: CAVARARO, R. *Produção Agrícola Municipal, culturas temporárias e permanentes*, v. 39, p. 1-101, 2012.
- IMURA, M.; MISAO, H.; USHIJIMA, H. The psychological effects of aromatherapy-massage in healthy postpartum mothers. *Journal Midwifery Womens Health*, v. 51, p. 21–26, 2006.
- INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity os essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, p. 565-573, 2001.

- ISO/DIS 9235.2. *Aromatic Natural Raw Materials Vocabulary*. Geneva, International Standard Organization, p. 2, 1997.
- JAFARZADEH, M.; ARMAN, S.; FARAHBAKHS, F. Effect of aromatherapy with orange essential oil on salivary cortisol and pulse rate in children during dental treatment: A randomized controlled clinical trial. *Advanced Biomedical Research*, v. 6, p. 2-10, 2013.
- JÄGER, W.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; FRITZER, M. Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, v. 43, p. 49-54, 1992.
- JAMES, A.C.; JAMES, G.; COWDREY, F.A.; SOLER, A.; CHOKE, A. *Cognitive behavioural therapy for anxiety disorders in children and adolescents (Review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, John Wiley and Sons Ltd., 2013, 104p. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD004690.pub3/pdf>>. Acessado em 20/02/2014.
- JAPANESE PHARMACOPOEIA (JP), 15th, 2007.
- JEW, C.P.; WU, C.-S.; SUN, H.; ZHU, J.; HUANG, J.-Y.; YU, D.; JUSTICE, N.J.; LU, H.-C. mGluR5 Ablation in Cortical Glutamatergic Neurons Increases Novelty-Induced Locomotion. *PLoS ONE*, v. 8, p. 1-19, 2013. Disponível em: <[doi:10.1371/journal.pone.0070415](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070415)>. Acessado em 05/05/2013.
- JOUE, Jornal Oficial da União Europeia, Capítulo 33: Óleos Essenciais e Resinóides; Produtos de Perfumaria ou de Toucador Preparados e Preparações Cosméticas, p. 259-262, 2013. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:290:FULL:PT:PDF>>. Acessado em 06/02/2014.
- JUCHELKA, D.; STEIL, A.; WITT, K.; MOSANDL, A. Chiral compounds of essential oils. XX. Chirality evaluation and authenticity profiles of neroli and petitgrain oils. *Journal Essential Oil Research*, v. 8, p. 487-497, 1996.
- KAMAL, G. M.; ANWAR, F.; HUSSAIN, A. I.; SARRI, N.; ASHRAF, M. Y. Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, v. 18, p. 1275-1282, 2011.
- KASPER, S. An orally administered lavender oil preparation (Silexan) for anxiety disorder and related conditions: an evidence based review. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, v. 17, p. 15-22, 2013.
- KELLEHER, F.C.; RAOA, A.; MAGUIRE, A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Letters*, v. 342, p. 9-18, 2014.
- KELLER, B. *Estudo comparativo dos níveis de cortisol salivar e estresse em atletas de luta olímpica de alto rendimento*. Dissertação de Mestrado em

Ciências Biológicas – Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006, 68p.

KIM, J.-G.; JUNG, H.-S.; KIM, K.-J.; MIN, S.-S.; YOON, B.-J. Basal blood corticosterone level is correlated with susceptibility to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters*, v. 555, p. 137– 142, 2013a.

KIM, M.; HWANGBO, H.H. Randomized Trial Evaluating the Aroma Inhalation on Physiological and Subjective Anxiety Indicators of the Nursing Students Experiencing the First Intravenous Injection. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, v. 2, p. 29-37, 2010.

KIM, T.-K.; KLESZCZYNSKI, K.; JANJETOVIC, Z.; SWEATMAN, T.; LIN, Z.; LI, W.; REITER, R.J.; FISCHER, T.W.; SLOMINSKI, A.T. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cells. *Faseb Journal*, v. 27, p. 2754-2755, 2013b.

KIRSCHBAUM, C.; PIRKE, K.-M.; HELLHAMMER, D.H. The 'Trier Social Stress Test' - a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, v. 28, p. 76-81, 1993.

KLERMAN, E. B. Clinical aspects of human circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, v. 20, p. 375-86, 2005.

KOBAYASHI, H.; KROMMINGA, A.; DUNLOP, T.W.; TYCHSEN, B.; CONRAD, F.; SUZUKI, N.; MEMEZAWA, A.; BETTERMANN, A.; AIBA, S.; CARLBERG, C.; PAUS, R. A role of melatonin in neuroectodermal-mesodermal interactions: the hair follicle synthesizes melatonin and expresses functional melatonin receptors. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB Journal)*, vol. 19, p. 1710-1712, 2005.

KOLLER, O.C. (Org.). *Citricultura: 1. Laranja: Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Industrialização e Comercialização*. Cinco Continentes Editora Ltda, 2006. 396 p.

KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*, v.172, p. 240-249, 2006.

KONRATH, C.A.; SILVA, D.L.D.; MOREIRA JUNIOR, N.L.; MONTEIRO, C.A.; AUZANI, J.A.S.; CAUMO, W.; HIDALGO, M.P L. Avaliação do impacto da melatonina pré-operatória na dor e ansiedade pós-operatórias de pacientes submetidas a histerectomia abdominal. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, v. 25, p. 59-60, 2005.

KOOP, C.; VOGEL, E.; RETTORI, M.C.; DELAGRANGE, P.; MISLIN, R. Anxiolyticlike properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of MT1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. *Neuropharmacology*, v.39, p.1865-1871, 2000.

- KOSIR, R.; ZMRZLJAK, U.P.; BELE, T.; ACIMOVIC, J.; PERSE, M.; MAJDIC, G.; PREHN, C.; ADAMSKI, J.; ROZMAN, D. Circadian expression of steroidogenic cytochromes P450 in the mouse adrenal gland – involvement of cAMP-responsive element modulator in epigenetic regulation of Cyp17a1. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, v. 279, p. 1584–1593, 2012.
- KRITSIDIMA, M., NEWTON, T., ASIMAKOPOULOU, K. The effects of lavender scent on dental patient anxiety levels: a cluster randomised-controlled trial. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, v.38, p. 83–87, 2010.
- KUPSKA, M.; CHMIEL, T.; JEDRKIEWICZ, R.; WARDENCKI, W.; NAMIESNIK, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. *Food Chemistry*, v. 152, p. 88–93, 2014.
- KUTLU, A.K., YILMAZ, E., ÇEÇEN, D. Effects of aroma inhalation on examination anxiety. *Teaching and Learning in Nursing*, v. 3, p. 125–130, 2008.
- LAHIRI, D.K.; GE, Y.-W.; SHARMAN, E.H.; BONDY, S.C. Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. *Journal of Pineal Research*, v. 36, p. 217-223, 2004
- LASKOWSKI, L.E.; GARCIA-LUIS, A.; TORRES, J. Desarrollo del fruto del *Citrus sinensis* var. salustiana. *Bioagro*, v. 18, p. 15-23, 2006 .
- LASZLO, P. *Citrus: a history*. University of Chicago Press, USA, 2008, 252 p.
- LEE, Y.-L.; WU, Y.; TSANG, H.W.H.; LEUNG, A.Y.; CHEUNG, W.M. A Systematic Review on the Anxiolytic Effects of Aromatherapy in People with Anxiety Symptoms. *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine*, v. 17, p. 101–108, 2011.
- LEHRNER, J.; ECKERSBERGER, C.; WALLA, P.; POTSCHE, G.; DEECKLE, L. Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients. *Physiology and Behavior*, v.71, p.83-86, 2000.
- LEHRNER, J.; MARWINSKI, G.; LEHR, S.; JOHREN, P.; DEECKE, L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiology and Behavior*, v.86, p. 92-95, 2005.
- LEITE, M.P.; FASSIN JR., J.; BAZILONI E. M. F., ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18 (Supl.), p. 661-666, 2008.
- LEMON, K. An assessment of treating depression and anxiety with aromatherapy. *The International Journal of Aromatherapy*, v. 14, p. 63–69, 2004.

- LETIZIA, C.S.; COCCHIARA, J.; LALKO, J.; API, A.M. Fragrance material review on linalyl acetate. *Food and chemical toxicology*, v. 41, p. 965-976, 2003.
- LEWY, A. J.; CUTLER, N. L.; SACKER, R. L. The endogenous melatonin profile as a marker for circadian phase position. *Journal of Biological Rhythms*, v.14, p.227-236, 1999.
- LI, S., QUOCK, R.M. Comparison of N₂O - and chlordiazepoxide-induced behaviors in the light/dark exploration test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 68, p. 789-796, 2001.
- LIAO, J-C.; TSAI, J-C.; LIU, C-Y.; HUANG, H-C.; WU, L-Y.; PENG, W-H. Antidepressant-like activity of turmerone in behavioral despair tests in mice. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, p. 1-8, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/299>>. Acessado em 20/02/2014.
- LIM, K.F. Amazing shapes: chirality. *Australian journal of education in chemistry*, v. 71, p. 13-14, 2011.
- LIMA, N. G. P. B.; SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C. F.; ALVES, M. F.; SOUZA, F. S.; MACEDO, R. O.; CARDOSO, R. B.; MORAIS, L. C.; DINIZ, M. F. M.; ALMEIDA, R. N. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 103, p. 450-454, 2013.
- LIMBERGER, R. P.; ABOY, A. L.; RITTER, M. R.; BASSANI, V. L.; MORENO P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). *Journal Essential Oil Research*, v. 13, p. 225-228, 2001.
- LIMBERGER, R. P.; APEL, M.; CORDEIRO, I.; LIMA, M. E. L.; MORENO P. R. H.; HENRIQUES A. T. Essential oil from folhas and stem barks of Southeastern *Drimys brasiliensis* Miens (Winteraceae). *Journal Essential Oil Research*, v. 20, p. 504-506, 2008.
- LIMBERGER, R. P.; APEL, M.; MENUT, C.; SOBRAL, M.; MORENO P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Aromatic plants from Brazil: Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal Essential Oil Research*, v. 13, p. 113-115, 2001.
- LIMBERGER, R. P.; MORENO P. R. H.; FARIAS, F.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Essential oil of *Myrrhinium atropurpureum* Schott (Myrtaceae) folhas. *Journal Essential Oil Research*, v. 13, p. 47-48, 2001.
- LIMBERGER, R. P.; PIRES, C. A. S.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Essential oils of *Marlierea* species. *Journal Essential Oil Research*, v. 16, n. 5, p. 479-482, 2004.

- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from six Southern Brazilian *Myrceugenia* species (Myrtaceae). *Journal Essential Oil Research*, v. 14, p. 302-304, 2002.
- LIMBERGER, R. P.; SUYENAGA, E. S.; LAMATY, G.; MENUT, C.; VERIN, P.; BESSIERE, J.; HENRIQUES, A. T. Chemical Composition of essential oils from three Southern Brazilian species of *Mikania* (Asteraceae). *Journal Essential Oil Research*, v. 10, p. 363-367, 1998.
- LIN, C.-M.; SHEU, S.-R.; HSU, S.-C.; TSAI, Y.-H. Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*, v. 21, p. 1710-1715, 2010.
- LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.; BIRCK, F.D.; CARAMÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, v. 16, p. 303-307, 2009.
- LINCK, V.M.; SILVA, A.L.; FIGUEIRO, M.; CAMARÃO, E.B.; MORENO, P.R.H.; ELISABETSKY, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, v. 17, p. 679-683, 2010.
- LINDON, J.C.; TRANTER, G.E.; HOLMES, J.L. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, v. 1, Academic Press, UK, 2000, 2667p.
- LIU, M.Y.; XYDAKIS, A.M.; HOOGEVEEN, R.C.; JONES, P.H.; SMITH, E.O.; NELSON, K.W.; BALLANTYNE, C.M. Multiplexed analysis of biomarkers related to obesity and the metabolic syndrome in human plasma, using the Luminex-100 system. *Clinical Chemistry*, v. 51, p. 1102-1109, 2005.
- LIU, X.; STANCLIFFE, D.; LEE, S.; MATHUR, S.; GERSHENFELD, H.K. Genetic Dissection of the Tail Suspension Test: A Mouse Model of Stress Vulnerability and Antidepressant Response. *Biological Psychiatry*, v. 62, p. 81-91, 2007.
- LÜCKER, J.; TAMER, M.K.; SCHWAB, W.; VERSTAPPEN, F.W.A.; VAN DER PLAS, L.H.W.; BOUWMEESTER, H.J.; VERHOEVEN, H.A. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, p. 3160-3171, 2002.
- LUGO, M.J.R.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNANDEZ-MATEOS, M.P.; SCACCHI, P.A.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *Journal of Pineal Research*, v. 49, p. 342-348, 2010.
- LUGO, M.J.R.; *Possible papel de La melatonina em La inducción de obesidad por dieta hipercalórica: efectos metabólicos em ratas macho*. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y

- Biologia Molecular III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2011, 179p.
- LV, X.N.; LIU, Z.J.; ZHANG, H.J.; TZENG, C.M. Aromatherapy and the Central Nerve System (CNS): Therapeutic Mechanism and its Associated Genes. *Current Drug Targets*, v.14, p.872-879, 2013.
- MA, X.; CHEN, C.; KRAUSZ, K.W.; IDLE, J.R.; GONZALEZ, F.J. A Metabolomic Perspective of Melatonin Metabolism in the Mouse. *Endocrinology*, v. 149, p. 1869–1879, 2008.
- MA, X.; IDLE, J.R.; KRAUSZ, K.W.; TAN, D.-X.; CERAULO, L.; GONZALEZ, F.J. Urinary metabolites and antioxidant products of exogenous melatonin in the mouse. *Journal of Pineal Research*, v. 40, p. 343–349, 2006.
- MABBERLEY, D.J. *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea*, v. 49, p. 481–498, 2004.
- MAGANHIN, C.C.; CARBONEL, A.A.F.A.; HATTY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J.; SIMÕES, R.S.; BARACAT, E.C.; SOARES-JR, J.M. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, p. 267-271, 2008.
- MALISCH, J.L.; BREUNER, C.W.; GOMES, F.R.; CHAPPELL, M.A.; GARLAND JR., T. Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *General and Comparative Endocrinology*, v. 156, p. 210–217, 2008.
- MARTIN, G. N.; The effect of exposure to odor on the perception of pain. *Psychosomatic Medicine*. v. 68, p. 613-616, 2006.
- MARTINS, A.P.; NOGUEIRA, M.T.; COSTA, M.C.; SALGUEIRO, L. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. *Revista de Fitoterapia*, v. 11, p. 131-146, 2011.
- MARWAH, A.; MARWAH, P.; LARDY, H. Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric analysis of corticosterone in rat plasma using selected ion monitoring . *Journal of Chromatography B*, v. 757, p. 333–342, 2001.
- MCLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. *Interpretation of Mass Spectra*. University Science Books, USA, 4 ed. 1993, 329p.
- MENARY, R.C.; GARLAND, S.M. *Authenticating Essential Oil Flavours and Fragrances: Using Enantiomeric Composition Analysis*. Report for the Rural Industries Research and Development Corporation RIRDC publication, 1999, 39 p.

- MENDES-GOMES, J.; MIGUEL, T.T.; AMARAL, V.C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. *Hormones and Behavior*, v. 60, p. 408–413, 2011.
- MIAS, C.; TROUCHE, E.; SEGUELAS, M.-H.; CALCAGNO, F.; DIGNAT-GEORGE, F.; SABATIER, F.; PIERCECCHI-MARTI, M.-D.; DANIEL, L.; BIANCHI, P.; CALISE, D.; BOURIN, P.; PARINI, A.; CUSSAC, D. Ex Vivo Pretreatment with Melatonin Improves Survival, Proangiogenic /Mitogenic Activity, and Efficiency of Mesenchymal Stem Cells Injected into Ischemic Kidney. *Stem Cells*, v. 26, p. 1749–1757, 2008.
- MIRICK, D.K.; DAVIS, S.; Melatonin as a Biomarker of Circadian Dysregulation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v. 17, p. 3306-3313, 2008.
- MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P.L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, p.791-804, 2013.
- MOCHEGANI, E.; SANTARELLI, L.; TIBALDI, A.; MUZZIOLI, M.; BULIAN, D.; CIPRIANO, K.; OLIVIERI, F.; FABRIS, N. Presence of links between zinc and melatonin during the circadian cycle in old mice: effects on thymic endocrine activity and on the survival. *Journal of Neuroimmunology*, v. 86, p. 111–122, 1998.
- MUCHTARIDI, M.; MUSFIROH, I. Off-Line SPE-GC/MS Analysis of Lead Compounds Aromatherapy in Blood Plasma of Mice of Essential Oils Materials from Indonesian Aromatic Plants. *Asian Journal of Chemistry*, v. 24, p. 5124-5128, 2012.
- MUGUNTHAN, K.; MCGUIRE, T.; GLASZIOU, P. Minimal interventions to decrease long-term use of benzodiazepines in primary care: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of General Practice*, v. 61, p. e573-e578, 2011.
- MÜHLBAUER, E.; GROSS, E.; LABUCAY, K.; WOLGAST, S.; PESCHKE, E. Molecular and Cellular Pharmacology, Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *European Journal of Pharmacology*, v. 606, p. 61–71, 2009.
- MUZZARELLI, L.; FORCE, M., SEBOLD, M. Aromatherapy and reducing preprocedural anxiety: a controlled prospective study. *Gastroenterology Nursing*, v.29, p. 466–471, 2006.
- NAJAFIAN, S.; ROWSHAN, V. Comparative of HS SPME and HD techniques in *Citrus aurantium* L. *International Journal os Medicinal and Aromatic Plants*, v. 2, p. 488-494, 2012.
- NAKAMURA, A.; FUJIWARA, S.; MATSUMOTO, I.; ABE, K. Stress Repression in Restrained Rats by (R)-(-)-Linalool Inhalation and Gene Expression Profiling

- of Their Whole Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 5480–5485, 2009.
- NAKAMURA, A.; FUJIWARA, S.; ISHIJIMA, T.; OKADA, S.; NAKAI, Y.; ICHIRO MATSUMOTO, I.; MISAKA, T.; ABE, K. Neuron Differentiation-Related Genes Are Up-regulated in the Hypothalamus of Odorant-Inhaling Rats Subjected to Acute Restraint Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 7922–7929, 2010.
- NIST-LIBRARY NIST/EPA/NIH Mass Spectral, 2005.
- NIST/MS 2.0, National Institute of Standards and Technology/Mass Spectroscopy, 2.0v.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. *O retrato da citricultura brasileira*. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia (Markestrat), FEA/USP, Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010, 138 p.
- NI, C.-H.; HOU, W.-H.; KAO, C.-C.; CHANG, M.-L.; YU, L.-F.; WU, C.-C.; CHEN, C. The Anxiolytic Effect of Aromatherapy on Patients Awaiting Ambulatory Surgery: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, ID 927419, p.1-5, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/927419>>. Acessado em 20/02/2014.
- NICOLAU, P.F.M. *Psiquiatria Geral. Cérebro e Mente*, v.1, 2010. Disponível em: <<http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/texto13.htm>>. Acessado em 20/02/2014.
- NJOROGE, S.M.; KOAZE, H.; KARANJA, P.N.; NYOTA, P.; MASAYOSHI, S. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, p. 80–85, 2005.
- NÖLDNER, M.; GERMER, S.; KOCH, E. Pharmacokinetics of linalool and linalyl acetate, the two main constituents of silexan, an essential oil from *Lavandula angustifolia* flowers, in rats. *Planta Medica*, v. 77, pm 44, 2011.
- OLIVEIRA, A.R.M.F.; JEZLER, C.N.; OLIVEIRA, R.A.; MIELKE, M.S.; COSTA, L.C.B. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. *Horticultura Brasileira*, v. 30, p. 155-159, 2012a.
- OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, L.C.; MOURA, C.S.F.T. Frutas cítricas. *Revista Faculdade Montes Belos*, v. 5, p. 78-94, 2012b. Disponível em: <<http://revista.fmb.edu.br/index.php/fmb/article/view/67/60>>. Acessado em 06/02/2014.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. *Relatório Mundial da Saúde, Saúde mental: nova concepção, nova esperança*, 1.^a edição, Português, Lisboa, 2001, 206p.

- ÖZEK, T.; TABANCA, N.; DEMIRCI, F.; WEDGE, D.E.; BASER, K.H.C. Enantiomeric Distribution of Some Linalool Containing Essential Oils and Their Biological Activities. *Records of Natural Products*, v.4, p. 180-192, 2010.
- PACCHIEROTTI, C.; IAPICHINO, S.; BOSSINI, L.; PIERACCINI, F.; CASTROGIOVANNI, P. Melatonin in Psychiatric Disorders, a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 22, p.18-32, 2001.
- PADRAYUTTAWAT, A.; YOSHIKAWA, T.; TAMURA, H.; TOKUNAGA, T. Optical Isomers and Odor Thresholds of Volatile Constituents in *Citrus sudachi*. *Food Science and Technology International Tokyo*, v. 3, p. 402-408, 1997.
- PADUMANONDA, T.; JOHNS, J.; SANGKASAT, A.; TIYAWORANANT, S. Determination of melatonin content in traditional Thai herbal remedies used as sleeping aids. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p. 1-5, 2014.
- PALO, E.F.; ANTONELLI, G.; BENETAZZO, A.; PREARO, M.; GATTI, R. Human Saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC technique. *Clinica Chimica Acta*, v. 405, p. 60-65, 2009.
- PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. *Melatonin: from molecules to therapy*. Ed.Nova Publishers, 2007. 906 p.
- PANDI-PERUMAL, S.R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. (2006), Melatonin, Nature's most versatile biological signal?, *The FEBS Journal*, v. 273, p. 2813–2838, 2006.
- PANIN, M.; GABAI, G.; BALLARIN, C.; PERUFFO, A.; COZZI, B. Evidence of melatonin secretion in cetaceans: Plasma concentration and extrapineal HIOMT-like presence in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 177, p. 238–245, 2012.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy, a guide for students of organic chemistry*. Thomson Learning, USA, 3^a ed., 2001, 680p.
- PEREIRA, D.S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Revisão: Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 31, p. 63-71, 2009.
- PERRY, N.; PERRY, E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. *CNS Drugs*. v. 20, p. 257-280, 2006.
- PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L.K.; ERNST, E. Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. *Phytomedicine*, v. 19, p. 825–835, 2012.
- PESCHKE, E.; FRESE, T.; CHANKIEWITZ, E.; PESCHKE, D.; PREISS, U.; SCHNEYER, U.; SPESSERT, R.; MÜHLBAUER, E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin

- level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *Journal of Pineal Research*, v. 40, p.135–143, 2006.
- PEYRON, L. Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. In: DUGO, G.; GIACOMO, A.D. *Citrus: The Genus Citrus, medicinal and aromatic plants, industrial profiles*, 2 ed. London: Taylor and Francis e-Library. cap 9, p. 148-152, 2004, 656 p.
- POYARES, D.; PINTO JR, L.R.; TAVARES, S.; BARROS-VIEIRA, S. Hipnoindutores e insônia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27, p. 2-7, 2005.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, v. 229, p. 327–336, 1977.
- PRAGADHEESH, V.S.; YADAV, A.; SINGH, S.C.; GUPTA, N.; CHANOTIYA, C.S. Leaf Essential Oil of Cultivated *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore from North India: Distribution of Phenylpropanoids and Chiral Terpenoids, *Medicinal and Aromatic Plants*, v. 2, p. 1-4, 2013.
- PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, v.78, p.1720-1725, 2006.
- QIN, K.; ZHENG, L.; CAI, H.; CAO, G.; LOU, Y.; LU, T. ; SHU, Y.; ZHOU, W.; CAI, B. Characterization of Chemical Composition of Pericarpium Citri Reticulatae Volatile Oil by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 237541, 11 p., 2013. DOI:10.1155/2013/237541
- RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; KLEMPIN, F.; BABU, H.; BENITEZ-KING, G.; KEMPERMANN, G. Melatonin Modulates Cell Survival of New Neurons in the Hippocampus of Adult Mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, p. 2180–2191, 2009.
- REBER, S.O.; PETERS, S.; SLATTERY, D.A.; HOFMANN, C.; SCHÖLMERICH, J.; NEUMANN, I.D.; OBERMEIER, F. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 25, p. 1153–1161, 2011.
- REITER, R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 79, p. C153-C158, 1991.
- REITER, R.J.; BENITEZ-KING, G. Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal deterioration: implications for Psychiatry. *Salud Ment*, v. 32, p. 3-11, 2009.

- RHO, K.; HAN, S.; KIM, K.; LEE, M. Effects of aromatherapy massage on anxiety and self-esteem in korean elderly women: a pilot study. *International Journal of Neuroscience*, v.116, p.1447-1455, 2006.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e Biotecnologia*, Ed. Premier, São Paulo, 1997, 372 p.
- ROCHA, S. M.; COELHO, E.; ZROSTLÍKOVÁ, J.; DELGADILLO, I.; COIMBRA, M. A. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability. *Journal of Chromatography A*, v. 1161, p. 292–299, 2007.
- RODRÍGUEZ, D.A.L.; DUEÑAS, Z. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. *PLoS ONE*, v. 6, p.1-8, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0068010>. Acessado em 20/02/2014.
- ROLLS, E.T. Emotion and decision-making explained: Précis. *Cortex*, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2014.01.020>>. Acessado em 02/05/2014.
- ROUT, S.K.; KAR, D.M.; ROUT, B. Study of CNS activity of leaf extracts of *Nerium oleander* in experimental animal models. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, p. 378-382, 2012.
- RUDNICK, C.C.C.; GUELSIN, G.A.S.; MARANGON, A.V.; FRANCESCHI, D.S.A.; SELL, A.M.; VISENTAINER, J.E.L. Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR, Methodology optimization for KIR genotyping. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, p. 215-224, 2010.
- SADOCK, B.J.; SADOCK, V.A.; KAPLAN, H.I. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. NEW YORK: LIPPINCOTT WILLIAMS and WILKINS, 2005, 4179 p.
- SAENZ, R.E.; SEARS, B.W.; DABISCH, P.A. *Hardcore Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins, EUA, 2006, 175 p.
- SALUNKHE, D.K.; KADAM, S.S. *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage and processing*. CRC Press Ltda, NY, USA, 1995, 632 p.
- SANGUINETTI, E. E. *Plantas que curam*. 2.ed. Porto Alegre: Rígel, 1989. p.140.
- SANTOS, A. C.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Mandarin (*Citrus deliciosa tenore*) From South Brazil. *Perfumer Flavorist*, v. 25, p. 26-36, 2000.
- SANTOS, C.A.; TORRES, K. R.; LEONART, R. *Plantas medicinais*. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1988. p.115

- SANTOS, G.B. *Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos submetidos ao exercício de natação*, 2010, 75 f. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Ciência Agrônômica*, v. 34, p. 19-25, 2003.
- SARACINO, M.A.; IACONO, C.; SOMAINI, L.; GERRA, G.; GHEDINI, N.; RAGGI, M.A. Multi-matriz assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 88, p. 643-648, 2014.
- SARKER S.D; LATIF, Z.; GRAY, A.I. *Natural Products isolations*. Second edition. Totowa , New Jersey, USA: Human Press, 2006, 529 p.
- SARROU, E.; CHATZOPOULOU, P.; DIMASSI-THERIOU, K.; THERIOS, I. Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. *Molecules*, v. 18, p. 10639-10647, 2013.
- SATOU, T.; KASUYA, H.; TAKAHASHI, M.; MURAKAMI, S.; HAYASHI, S.; SADAMOTO, K.; KOIKE, K. Relationship between duration of exposure and anxiolytic-like effects of essential oil from *Alpinia zerumbet*. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 26, p. 180–185, 2011.
- SAYEED, M.S.B.; SHAMS, T.; HOSSAIN, S.F.; RAHMAN, M.R.; MOSTOFA, A.G.M.; KADIR, M.F.; MAHMOOD, S.; ASADUZZAMAN, M. *Nigella sativa* L. seeds modulate mood, anxiety and cognition in healthy adolescent males. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 152, p. 156–162, 2014.
- SCHER, A.; HALL, W.A.; ZAIDMAN-ZAIT, A.; WEINBERG, J. Sleep Quality, Cortisol levels, and Behavioral Regulation in Toddlers. *Developmental Psychobiology*, v. 52, p. 44-53, 2010.
- SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Atheneu, p.265-283, 2004.
- SCHUWALD, A.M.; NÖLDNER, M.; WILMES, T.; KLUGBAUER, N.; LEUNER, K.; MÜLLER, W.E. Lavender Oil-Potent Anxiolytic Properties via Modulating Voltage Dependent Calcium Channels. *PLoS ONE*, v. 8, p. e59998, 2013. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0059998>. Acessado em 20/02/2014.
- SCIARRONE, D.; SCHIPILLITI, L.; RAGONESE, C.; TRANCHIDA, P.Q.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Thorough evaluation of the validity of conventional enantio-gas chromatography in the analysis of volatile chiral compounds in mandarin essential oil: A comparative investigation with multidimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1101–1105, 2010.

SHAW, D.; ANNETT, J.M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J.C. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine*, v.14, p. 613-620, 2007.

SHAW, P.E. Review of Quantitative Analyses of *Citrus* Essential Oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 27, p. 246-257, 1979.

SHIMADA, T.; MATSUMOTO, K.; OSANAI, M.; MATSUDA, H.; TERASAWA, K.; WATANABE, H. The Modified Light/Dark Transition Test in Mice: Evaluation of Classic and Putative Anxiolytic and Anxiogenic Drugs. *General Pharmacology*, v. 26, p. 205-210, 1995.

SHIRNESHAN, E.; BAILEY, J.; RELYEA, G.; FRANKLIN, B.E.; SOLOMON, D.K.; BROWN, L.M. Incremental direct medical expenditures associated with anxiety disorders for the U.S. adult population: Evidence from the Medical Expenditure Panel Survey. *Journal of Anxiety Disorders*, v. 27, p. 720-727, 2013.

SILENIEKS, L.B.; KOCH, E.; HIGGINS, G.A. Silexan, an essential oil from flowers of *Lavandula angustifolia*, is not recognized as benzodiazepine-like in rats trained to discriminate a diazepam cue. *Phytomedicine*, v.20, p.172-177, 2013.

SILEXAN[®], register 2009: International Standard Randomised Controlled Trial Number ISRCTN74386009. Disponível em: <<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN74386009>>. Acessado em 02/09/2013.

SILVA, C.E.L.; COSTA, W.F.C.; MINGUZZI, S.; SILVA, R.C.L.; SIMIONATTO, E. Assessment of Volatile Chemical Composition of the Essential Oil of *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill by HS-SPME-GC-MS Using Different Fibers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 352606, p. 1-8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/352606>>. Acessado em 05/05/2014.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L.A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.8, p.14-22, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons Ltd, USA, 7 ed., 2005, 550p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. cap. 18, 2010, 1104 p.

SIMONIN, G.; BRU, L.; LELIÈVRE, E.; JEANNIOT, J-P.; BROMET, N.; WALTHER, B.; BOURSIER-NEYRET, C. Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison

of immunological techniques and GC-MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p.591–601, 1999.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacological Reviews*, v. 55, p. 325–395, 2003.

SIMONNET, G. Preemptive antihyperalgesia to improve preemptive analgesia. *Anesthesiology*, v. 108, p. 352-354, 2008.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGHL, S.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N.K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limoneno. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 1734–1740, 2010.

SINHA, N.; SIDHU, J.; BARTA, J.; WU, J.; CANO, M.P. *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, John Wiley & Sons Ltda, UK, 2^a ed., 2012, 748 p.

SMELCEROVIC, A.; DJORDJEVIC, A.; LAZAREVIC, J.; STOJANOVIC, G. Recent Advances in Analysis of Essential Oils. *Current Analytical Chemistry*, v. 9, p. 61-70, 2013.

SMITH, R.M. *Understanding mass spectra, a basic approach*. John Wiley and Sons Ltd, USA, 2^a ed., 2004, 387p.

SMITH, S.W. Review, Chiral Toxicology: It's the Same Thing, Only Different. *Toxicological Sciences*, v. 110, p. 4–30, 2009.

SOARES, A.J.A.; ALVES, M.G.P. Cortisol como variável em psicologia da saúde. *Psicologia, Saúde e Doenças*, v. 7, p. 165-177, 2006.

SODEN, K.; VINCENT, K.; CRASKE, S.; LUCAS, C.; ASHLEY, S. A randomized controlled trial of aromatherapy massage in a hospice setting. *Palliative Medicine*, v.18, p. 87–92, 2004.

SOLOMON, M.B.; JANKORD, R.; FLAK, J.N.; HERMAN, J.P. Chronic stress, energy balance and adiposity in female rats. *Physiology and Behavior*, v. 102, p. 84–90, 2011.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.; SNYDER, S. *Organic Chemistry*, ed. 11, Wiley Global Education, 2012, 1272 p.

SOUSA NETO, J.A.; DE CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 44, p. 5-11, 2008.

SOUZA, E.; KOBAYASHI, S.; SIMÕES, M.J.; CAMANO, L.; JÚNIOR, L.K. Ação da Betametasona em Ratas Prenhes: Impacto sobre os Níveis de

- Corticosterona e Glândulas Adrenais Maternas e Fetais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 23, p. 667-673, 2001.
- SOUZA, A.R.L.; OPALEYE, E.S.; NOTO, A.R. Contexts and patterns of undue use benzodiazepine among women. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 18, p. 1131-1140, 2013.
- SPENCE, D.W.; KAYUMOV, L.; CHEN, A.; LOWE, A.; JAIN, U.; KATZMAN, M.A.; SHEN, J.; PERELMAN, B.; SHAPIRO, C.M. Acupuncture Increases Nocturnal Melatonin Secretion and Reduces Insomnia and Anxiety: A Preliminary Report. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 16, p.19–28, 2004.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. Reproductive physiology: flowering and fruiting. *Biology of Citrus, biology of horticultural crops*. Cambridge University Press. New York, p. 70-125, 1996.
- STAPLES, E.; INGRAM, R.J.M.; ATHERTON, J.C.; ROBINSON, K. Optimising the quantification of cytokines present at low concentrations in small human mucosal tissue samples using Luminex assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 394, p. 1–9, 2013.
- STEPHANY, O.; TISSE, S.; COADOU, G.; BOUILLON, J.P.; PEULON-AGASSE, V.; CARDINAEL, P. Influence of amino acid moiety accessibility on the chiral recognition of cyclodextrin-amino acid mixed selectors in enantioselective gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1270, p. 254-261, 2012.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367-370, 1985.
- SUGAWARA, Y.; SHIGETHO, A.; YONEDA, M.; TUCHIYA, T.; MATUMURA, T.; HIRANO, M. Review, Relationship between Mood Change, Odour and Its Physiological Effects in Humans While Inhaling the Fragrances of Essential Oils as well as Linalool and Its Enantiomers. *Molecules*, v. 18, p. 3312-3338, 2013.
- SUTOH, M.; ITO, S.; KASUYA, E.; YAYOU, K. Effects of exposure to plant-derived odorants on behavior and the concentration of stress-related hormones in steers isolated under a novel environment. *Animal Science Journal*, v. 84, p.159-164, 2013.
- TABACCHI, R.; SATURNIN, G. C.; PORRET, C.-L.; BIEDERMANN, M.; SPONSLER, S.; BITZER, L. *A Guide to the Analysis of Chiral Componentes by GC*, Restek, cat. 59889, 1997.
- TAKEDA, H.; TSUJITA, J.; KAYA, M.; TAKEMURA, M.; OKU, Y. Differences Between the Physiologic and Psychologic Effects of Aromatherapy Body Treatment. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 14, p. 1-7, 2008.

- TAN, W.; ZHOU, W.; LUO, H.-S.; LIANG, C.-B.; XIA, H. The inhibitory effect of melatonin on colonic motility disorders induced by water avoidance stress in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.17, p. 3060-3067, 2013.
- THE MERCK INDEX, 15th, 2013, EDITION SEARCH GUIDE, The Royal Society of Chemistry, U.S.A.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2008. v. I. p. 1185.
- THIERRY B.; STERU L, SIMON P.; PORSOLT R.D. The Tail Suspension Test:ethical considerations. *Psychopharmacology*, v. 90, p. 284-285, 1986.
- THIRUPATHY, K.; TULSHKAR, A.; VIJAYA, C. Neuropharmacological activity of *Lippia nodiflora* Linn. *Pharmacognosy Research*, v. 3, p. 194-200, 2011.
- TIRADO, C.B.; STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, M.Y.; MARTINEZ, J.R. Comparative study of Colombian *Citrus* oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 697, p. 501-513, 1995.
- TIWARI, B.K.; BRUNTON, N.P.; BRENNAN, C. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. John Wiley and Sons, UK, 2013, 528 p.
- TKACHEV, A.V. Chirospecific analysis of volatile plant substances. *Uspekhi Khimii*, v. 76, p. 1014-1033, 2007.
- TODA, M.; MORIMOTO, K. Effect of lavender aroma on salivary endocrinological stress markers. *Archives of Oral Biology*, v. 53, p. 964-968, 2008.
- TOLEDO-PINTO, E.A.; MENEZES, M.L.; PEREIRA, O.C.M. Desenvolvimento de um método analítico rápido e eficiente para a determinação de corticosteroides plasmáticos por injeção direta em coluna cromatográfica ISRP-C18 por CLAE. *Eclética Química*. v. 35, n. 2, 2010.
- TOWE-GOODMAN, N.R.; FRANZ, L.; COPELAND, W.; ANGOLD, A.; EGGER, H. Perceived Family Impact of Preschool Anxiety Disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v. 53, p. 437-446, 2014.
- TRANCHIDA, P.Q.; BONACCORSI, I.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; DUGO, G. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 27, p. 98–123, 2012.
- TRELLAKIS, S. FISCHER, C.; RYDLEUSKAYA, A.; TAGAY, S.; BRUDEREK, K.; GREVE, J.; LANG, S.; BRANDAU, S. Subconscious olfactory influences of stimulant and relaxant odors on immune function. *European Archives of Oto-rhino-laryngology*, v.269, n.8, p.1909-1916, 2012.

- TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, v.53, p.865-871, 2002.
- TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, p. 40-53, 2013.
- UEHLEKE, B.; SCHAPER, S.; DIENEL, A. SCHLAEFKE, S.; STANGE, R. Phase II trial on the effects of Silexan in patients with neurasthenia, post-traumatic stress disorder or somatization disorder. *Phytomedicine*, v. 19, p. 665-671, 2012.
- UMEZU, T. Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 64, p. 35-40, 1999.
- UMEZU, T.; ITO, H.; NAGANO, K.; YAMAKOSHI, M.; OOUCHI, H.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sciences*, v. 72, p. 91-102, 2002.
- UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; YAMAKOSHI, M.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, p. 713-721, 2006.
- UMEZU, T. Evaluation of the Effects of Plant-derived Essential Oils on Central Nervous System Function Using Discrete Shuttle-type Conditioned Avoidance Response in Mice. *Phytotherapy Research*, v. 26, p. 884-891, 2012.
- UNIDO (United Nations Industrial Development Organization)/FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *Herbs, spices and essential oils*, Viena International Center, Viena, Austria, 2005.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 11, p. 463–471, 1963.
- VARGAS, R.M.F.; BARROSO, M.S.T.; GÓES NETO, R.; SCOPEL, R.; FALCÃO, M.A.; SILVA, C.F.; CASSEL, E. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO₂. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 430–435, 2013.
- VÁSQUEZ, F.M.; SUAREZ, M.A.; PÉREZ, A. Medicinal plants used in the Barros Área, Badajoz Province (Spain). *Journal of ethnopharmacology*, v.55, p.81-85, 1997.
- VELAZQUEZ-NUNEZ, M. J.; AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, v. 31, p. 1-4, 2013.




- WARD, T.J.; WARD, K.D. Chiral Separations: A Review of Current Topics and Trends. *Analytical Chemistry*, v. 84, p. 626–635, 2012.
- WARRENBURG, S. Effects of fragrance on emotions: Moods and Physiology. *Chemical Senses*, v. 30, p. i248-i249, 2005.
- WEBER, S. T.; HEUBERGER, E. The Impact of Natural Odors on Affective States in Humans. *Chemical Senses*, v.33, p.433-440, 2008.
- WELKE, J.E.; ZINI, C.A. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Analysis of Volatile Compounds in Foods and Beverages. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 609-622, 2011.
- WELKE, J.E.; ZANUS, M.; LAZZAROTTO, M.; ZINI, C.A. Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine. *Food Research International*, v. 59, p. 85–99, 2014.
- WELP, A.; MANZ, B.; PESCHKE, E. Review, Development and validation of a high throughput direct radioimmunoassay for the quantitative determination of serum and plasma melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) in mice. *Journal of Immunological Methods*, v. 358, p. 1–8, 2010.
- WHO, World Health Organization, International Consortium in Psychiatric Epidemiology. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 78, p. 413-426, 2000 (resumo em francês).
- WHO, World Health Organization. *Mental health action plan 2013-2020*, 2013, 50 p.
- WHO, World Health Organization, *Quality control methods for herbal materials: Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials 1998*. 2011, 187 p.
- WIEBE, E.E. A randomized trail of aromatherapy to reduce anxiety before abortion. *Effective Clinical Practice*, v. 3, p. 166–169, 2000.
- WIEDMER, P.; CHAUDHARY, N.; RATH, M.; YI, C.X.; ANANTHAKRISHNAN, G.; NOGUEIRAS, R.; WIRTH, E.K.; KIRCHNER, H.; SCHWEIZER, U.; JONAS, W.; VEYRAT-DUREBEX, C.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; SCHÜRMAN, A.; HANS-GEORG JOOST, H.; TSCHÖP, M.H.; PEREZ-TILVE, D. The HPA axis modulates the CNS melanocortin control of liver triacylglyceride metabolism. *Physiology and Behavior*, v. 105, p. 791-799, 2012.
- WINK, M. *Annual plant reviews, functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. John Wiley and Sons Ltda, UK, 2nd. ed., v. 39, 2010, 424 p.
- WINK, M. *Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism*. John Wiley and Sons Ltda, UK, 2nd. ed., v. 40, 2011, 464 p.

- WOELK, H.; SCHLÄFKE, S. A multi-center, double-blind, randomised study of the lavender oil preparation silexan in comparison to lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine*, v. 17, p. 94–99, 2010.
- WOLFFENBÜTTEL, A. N. *Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica*. São Paulo: Roca, 2011, 292 p.
- WREGGE, M.S.; OLIVEIRA, R.P.; JOÃO, P.L.; HERTER, F.G.; STEINMETZ, S.; MATZENAUER, R.; MALUF, J.R.T.; FERREIRA, J.S.A.; PEREIRA, I.S. *Zoneamento Agroclimático para a Cultura dos Citros no RS*. Documentos nº 117, EMBRAPA, PELOTAS, RS, 2004, 23p.
- WÜST, M.; CROTEAU, R.B. Hydroxylation of Specifically Deuterated Limonene Enantiomers by Cytochrome P450 Limonene-6-Hydroxylase Reveals the Mechanism of Multiple Product Formation, *Biochemistry*, v. 41, p. 1820-1827, 2002.
- XIAO, Z.-Y.; CHONG, Y.-T.; ZHOU, W.-X.; ZHANG, Y.-X. Acidic polysaccharose CA4-3 inhibits amyloid β 1-42 induced BV2 microglia chemotaxis *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, Supplement S10.82, P. 117, 2013.
- YAMADA, K.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y. Effects of inhaling the vapor of *Lavandula burnatii* super-derived essential oil and linalol on plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental menopausal female rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.28, p.378–379, 2005.
- YAMAMOTO, N. FIJIWARA, S.; SAITO-JIZUMI, K.; KAMEI, A.; SHINOZAKI, F.; WATANABE, Y.; ABE, K.; NAKAMURA, A. Effects of Inhaled (S)-Linalool on Hypothalamic Gene Expression in Rats under Restraint Stress. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 77, p. 2413-2418, 2013.
- YU, P.; AN, S.; TAI, F.; WANG, J.; WU, R.; WANG, B. Early social deprivation impairs pair bonding and alters serum corticosterone and the NAcc dopamine system in mandarin voles. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, p. 3128–3138, 2013.
- YUN, J. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release. *Phytomedicine*, v. 21, p. 883–887, 2014.
- ZHDANOVA, I.V.; WURTMAN, R.J.; REGAN, M.M.; TAYLOR, J.A.; SHI, J.P.; LECLAIR, O.U. Melatonin Treatment for Age-Related Insomnia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 86, p. 4727–4730, 2001.
- ZUPEKAN, T.; DUNN, J.C.Y. Adrenocortical cell transplantation reverses a murine model of adrenal failure. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 46, p. 1208–1213, 2011.



9. ANEXOS

ANEXO I - Carta de Aprovação na CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do projeto n.º 18717 e adendo.

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
CARTA DE APROVAÇÃO			
Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:			
Número: 18717			
Título: Avaliação psicofarmacológica e toxicológica de óleos essenciais de Citrus aurantium L. e Citrus deliciosa Ten. (Rutaceae)			
Pesquisadores:			
Equipe UFRGS:			
MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 01/06/2010 ELAINE ELISABETSKY - pesquisador desde 01/06/2010 RENATA PEREIRA LIMBERGER - pesquisador desde 01/06/2010 ELIANE DALLEGRAVE - pesquisador desde 01/06/2010			
<i>Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, ad referendum, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.</i>			
Porto Alegre, Quinta-Feira, 14 de Abril de 2011			
 <hr style="width: 20%; margin: 0 auto;"/> FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO Coordenador da comissão de ética			
1			



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

A Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o adendo ao projeto:

Número: 18717

TÍTULO: AVALIAÇÃO PSICOFARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRUS AURANTIUM L. E CITRUS DELICIOSA TEN. (RUTACEAE)

Pesquisador (es)

Nome: MIRNA BAINY LEAL

Coordenador - Início: 01/06/2010 Previsão de término: 30/12/2014

Nome: ELAINE ELISABETSKY

Pesquisador - Início: 01/06/2010 Previsão de término: 30/12/2014

Nome: ELIANE DALLEGRAVE

Pesquisador - Início: 01/06/2010 Previsão de término: 30/12/2014

Nome: RENATA PEREIRA LIMBERGER

Pesquisador - Início: 01/06/2010 Previsão de término: 30/12/2014

Nome: Adriana Nunes Wolffenbüttel

Pesquisador - Início: 01/08/2010 Previsão de término: 30/12/2014

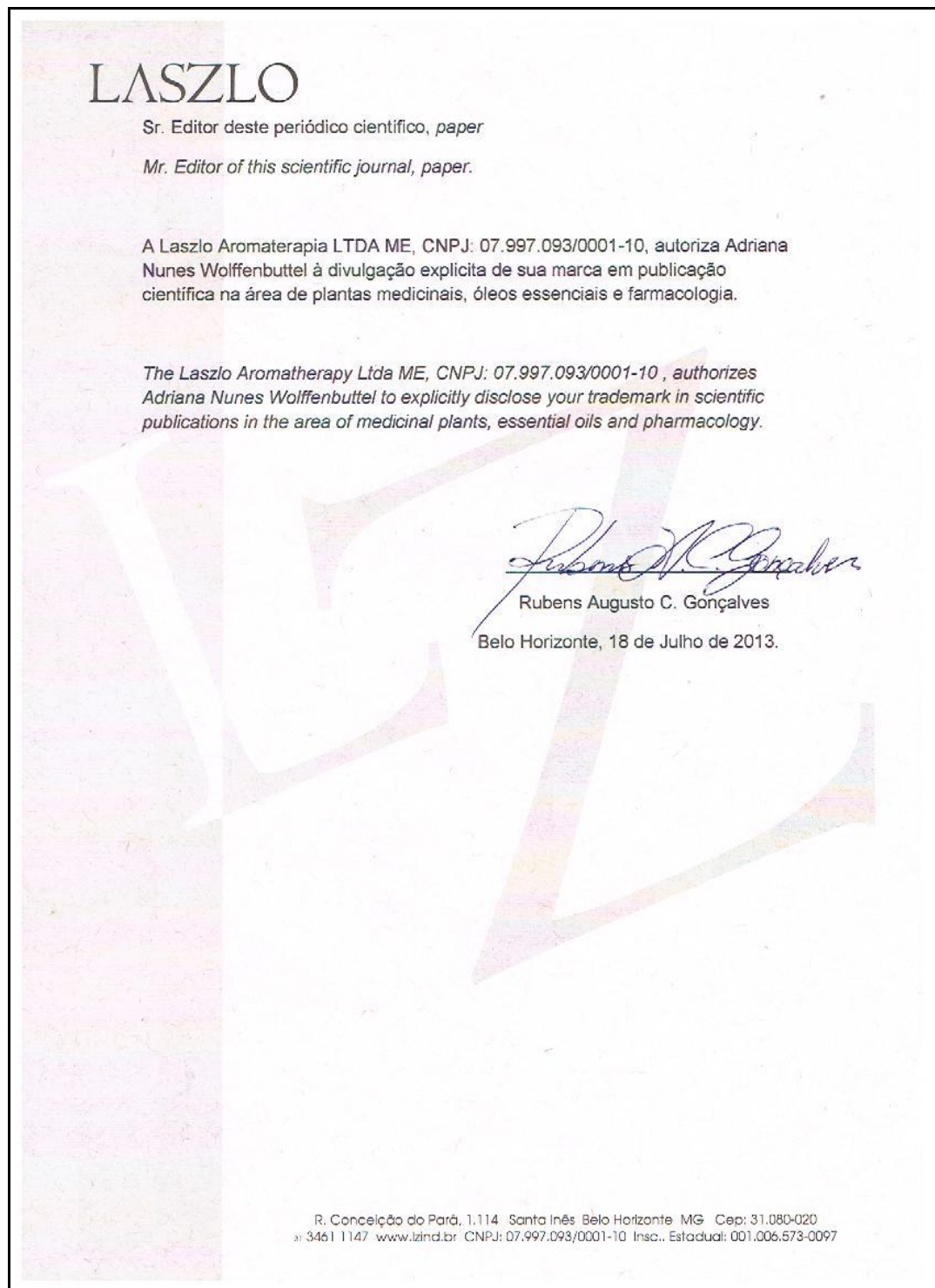
A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para uso de uma amostra comercial de óleo essencial de Citrus sinensis (L.) Osbeck no lugar do óleo essencial de C. deliciosa Ten. (mexerica) coletados no rs, que apresenta constituição química similar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, 05 de Março de 2015.


Cristiane Matté

Vice Coordenadora da CEUA/UFRGS

ANEXO II - Autorizações para utilização dos OE e divulgação das marcas das empresas Laszlo Aromaterapia Ltda, Ferquima Ind. e Com. Ltda, Verbhena Ltda.





Vargem Grande Paulista, 5 de Julho de 2013.

DECLARAÇÃO

Autorizo a inclusão explícita da marca Ferquima em publicação científica na área de plantas medicinais, óleos essenciais, farmacologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Sem Mais,

Alice Lasthaus
Ferquima Ind Com Ltda.


Sr. Editor deste periódico científico

Sr. editor of this scientific journal (*paper*)

A empresa Verbhena Ltda, CNPJ 04.535.664/0001-06, autoriza Adriana Nunes Wolffenbittel a publicar explicitamente em seus resultados de pesquisa a marca **Verbhena** em periódicos científicos da área de plantas medicinais, óleos essenciais, farmacologia e afins.

The Verbhena Ltda, CNPJ 04.535.664/0001-06, authorizes Adriana Nunes Wolffenbittel to explicitly disclose your trademark in scientific publications in the area of medicinal plants, essential oils and pharmacology.

Porto Alegre, 20 de julho de 2013.


Eliane Roseli Matter da Silva - sócia gerente

**ANEXO III - Intercâmbio com a Universidad Complutense de Madrid -
Facultad de Medicina**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
Facultad De Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid
España
Telef. 913947189
Eax. 913941691
E-mail: pelayos@ucm.es

Madrid, 12th May 2014

To whom it may concern:

This is to inform that Mrs. Adriana Nunes Wolffenbittel has been working in my laboratory from 21th of April to 9th of May of the current year.

During her stay, she showed great interest in learning the technique of Luminex X-MAP to measure melatonin and corticosterone.

I hope that this will be the base for future collaborations between both laboratories.

Sincerely



Ana Esquivino
Ana Esquivino, Ph, D
Professor

ANEXO IV - Manuscrito do artigo "*Chemical Components of Citrus Essential Oils from Brazil*".

Aceito para publicação no *The Natural Products Journal* (ISSN: 2210-3163), in press, 2015.

Chemical Components of Citrus Essential Oils from Brazil

Adriana Nunes Wolffenbüttel¹, Amanda Zamboni¹, Máira Kerpel dos Santos¹, Bruna Tassi Borille¹, Otavio Americo Augustin¹, Kristiane de Cassia Mariotti¹, Mirna Bainy Leal², Renata Pereira Limberger¹

¹ *Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil.*

² *Pharmacology Department, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil.*

Abstract

Essential oils (EO) are major products in the world economy. *Citrus* species (Rutaceae) EO, present in the pericarp of the fruit and leaves, provide raw material for a wide variety of industries such as resin products for paper and textiles, binders to manufacture insecticides, antiseptics, pharmaceuticals, perfumes and food. This study determines the chemical components monoterpenes, sesquiterpenes, plus limonene and linalool enantiomeric distribution of *Citrus aurantium* Lineu, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus reticulata* Blanco EO, through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). All EO were acquired and collected in South and South-Central Brazil. Samples were obtained by steam distillation, hydrodistillation or cold pressing extraction. The results showed that limonene (39.5 to 92.7%) is the main component of the pericarp and linalool (14.2 to 24.8%) is the main component of the leaves. It was shown that the extraction method did not change this distribution. The (*R*)-(+)-limonene was 60 to 99% in all *Citrus* EO analyzed. The (*R*)-(-)-linalool was 59 to 64% in *Citrus aurantium* and (*S*)-(+)-linalool was 76 to 99% in *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata*. The hydrolate of *Citrus aurantium* (orange water) was also analyzed and presented as the main components nootkatone (17%), alpha-terpineol (10%), linalool (10%) with *ee* (*R*)-(-)-linalool, limonene (0.8%) with *ee* (*R*)-(+)-limonene. These results confirm the interesting quality of *Citrus* EO from Brazil, ensuring their applications in many industries, products categories, including medical applications owing your physiological and psychopharmacological properties, which shows similarities with *Citrus* EO from other countries.

Keywords

Citrus, enantiomeric distribution, essential oil, hydrolate, limonene, linalool.

1. INTRODUCTION

Essential oils (EO) are major economic products [1,2]. Brazil is outstanding internationally due to the extraordinary diversity of its flora, especially those species that produce EO. The agricultural sector of *Citrus sp* is very important in Brazil and produced 19,811,064 tons of orange in 2011, with 30% of the business worldwide [3,4]. Considering the methods employed to extract EO, steam distillation is most used in industrial processes to extract *Citrus* EO from leaves, cold pressing to extract *Citrus* EO from pericarp and hydrodistillation in laboratory research [5].

It is useful to determine the chemical components of *Citrus* EO, because it has many applications in the pharmaceutical, food and cosmetic industry [6-16]. Limonene-rich EO are especially valuable because limonene is isolated and used as an industrial degreaser due to its ecological, non-toxic and biodegradable characteristics [17]. Linalool-rich EO also have special value. It is estimate that about 1,000 metric tons of linalool is used per year. Linalool can be isolated from EO and used as an ingredient for fragrances, household cleaners and detergents [18]. Lately its action on the central nervous system has been investigated in medicine and psychopharmacology, for the treatment of anxiety and stress, as well as in research of emotional states such calm, sedation and maintaining good mood [6,14,19-25].

Therefore, we compiled a review of chemical components of *Citrus* EO from many countries of world, including the limonene and linalool enantiomeric distribution, compiled in Table 1. Limonene is the component with the highest percentage of EO in the pericarp of the fruit, ranging from 74-98% in *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis*, and 46-74% in *Citrus reticulata* EO. The extraction method did not have a significant influence on the composition of these EO. The EO obtained from leaves have a higher percentage of linalool (36-66%), followed by linalyl acetate. The components terpenes, alcohols, aldehydes and acetate are also present in *Citrus* EO, as beta-myrcene, beta-pinene, sabinene, ocimene, terpinene, terpinolene, neral, geranial, geraniol, linalool, nerol, alpha-terpineol, linalyl acetate, neryl acetate, geranyl acetate.

Concerning the enantiomeric distribution of components of limonene and linalool, (*R*)-(+)-limonene is the enantiomeric excess (*ee*) in *Citrus aurantium* and *Citrus*

sinensis EO. The (*R*)-(-)-linalool is ee in *Citrus aurantium* EO and (*S*)-(+)-linalool is ee in *Citrus sinensis* EO. Recent research has demonstrated significant therapeutic properties of these components to treat mental health, with the anxiolytic-like activity of (*R*)-(+)-limonene and decreased states of stress of (*R*)-(-)-linalool [26,27]. This *Citrus* enantiomeric distribution is an interesting feature in order to highlight their clinical and commercial applications and allows using this parameter for identification, characterization, genuineness and pharmacological activity assessment. For example, (*R*)-(+)-limonene and (*S*)-(-)-limonene, (*R*)-(-)-linalool and (*S*)-(+)-linalool have a distinct odor threshold, physiological and psychopharmacological effects [26,28-34].

Thus, some of biological properties and applications of *Citrus* EO have been studied, especially those related to limonene, linalool and linalyl acetate. The anxiolytic and sedative action of limonene and linalool were investigated by other authors through light/dark paradigm and locomotor activity test, with mice treated through inhalation or by intraperitoneal (ip) route. The antinociceptive property and antiallodynic principle effect were assigned to linalool, as well as the therapeutic action of anxiolytic commercial drugs, attributed to linalool and linalyl acetate [20,26,35-39].

(please insert Table 1 here)

Table 1

This study proposes to determinate the percentage of chemical constituents of EO plus the limonene and linalool enantiomeric distribution in *Citrus aurantium* Lineu, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus reticulata* Blanco. The EO were obtained from leaves and from pericarp by steam distillation and hydrodistillation extraction, respectively. After hydrodistillation of *Citrus aurantium* pericarp, we also analyzed their hydrolate. The EO of trademarks were obtained from pericarp by cold pressing extraction and from leaves by steam distillation extraction.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials, samples and apparatus

A total of fourteen samples of Brazilian *Citrus* species including *Citrus aurantium* Lineu, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus reticulata* Blanco were analyzed. The plant species, plant part, extraction method, plant collection and trademark information on each studied species are shown in Table 2.

(please insert Table 2 here)

Table 2

The leaves or pericarp (500 g) were collected from mature plants and then extracted during 2 h by hydrodistillation (using a Clevenger-type apparatus) and steam distillation (using a modified clevenger-type apparatus, as shown in Figure 1). The hydrolate was obtained by liquid-liquid extraction, using ethyl acetate as the extractor solvent.

(please insert Figure 1 here)

Figure 1

2.2 Analytical procedure

The analyses were performed on a 5975C gas chromatograph coupled with a 7890A mass detector (Agilent Technologies, CA, USA). A silica DB-5 column, 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm, was employed for chromatographic separation.

The mass detector was operating at 70 eV and source temperature, quadrupole and injector were set at 230 °C, 150 °C and 220 °C, respectively. Detector temperature was set at 250 °C and the oven temperature was programmed to start at 60 to 300 °C, with an increase of 3 °C/min. Helium (1 ml/min) was employed as the carrier gas.

The percentage compositions of EO were obtained from electronic signal integration software without taking the detector responses into account. The compounds were identified by similarity of retention indices, retention times of series of *n*-alkanes, mass spectra of literature, data software and authentic

samples [61,62]. The EO were injected directly into dilution 2:100 (v/v) in anhydrous ethyl acetate (99.8%), Sigma-Aldrich, USA). The enantiomeric distribution was analyzed with HP-chiral 10B column - 10% permethylated beta-cyclodextrin with the following specifications: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m [63-65].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Extraction yields and chemical composition of EO

The chemical composition of fourteen *Citrus* EO samples including *Citrus aurantium* Lineu (six samples), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (five samples) and *Citrus reticulata* Blanco (three samples), was analyzed by GC/MS. Nine samples of EO were from trademark and five samples of EO were extracted in our laboratory.

The results of extraction yields of EO obtained in the laboratory are shown in Table 3, ranging from 0.1 to 0.4%, which is in agreement with data reviewed in Table 1. Some differences may be due to sample preparation submitted to the extraction and to preparatory steps as drying and grinding, which may increase the extraction yield [47,66]. In this investigation, the leaves and the pericarp were taken off plant species and immediately subjected to extraction. We did not perform preparatory stages of drying and grinding to avoid changing the chemical constitution of the EO, by heating and exposure to oxygen. It was observed that an increase of the percentage of chemical constituents myrcene, limonene and linalool occurs in EO from pericarp after drying at 30 °C [66]. We ensure that the original chemical constituents of EO analyzed in this article with fresh material are preserved soon after their removal from plant species [51].

(please insert Table 3 here)

Table 3

Our results of composition of *Citrus* EO from Brazil (Table 3) agree with results of EO *Citrus* composition from other countries, as shown in Table 1. The oils are characterized by the presence of terpenes, alcohols, aldehydes and acetate, as beta-myrcene, beta-pinene, sabinene, ocimene, terpinene, terpinolene, neral, geranial, geraniol, linalool, nerol, alpha-terpineol, linalyl acetate, neryl acetate, geranyl acetate, independent of the extraction procedure employed namely steam distillation, hydrodistillation and cold pressing [67].

Natural differences in chemical composition are commonly observed due to the season or seasonality in which the plant species was collected, the degree of maturity of the plant species, the geographical location of planting (latitude, longitude, altitude, relative humidity, soil chemicals, winds), and the management of plant species [24,49,52]. Regarding the EO obtained from the leaves, in Table 3, it is observed that the percentage of linalyl acetate is higher than the percentage of linalool. This result it is in accordance with the EO acquired from mature plants. The EO extracted from new leaves have a higher percentage of linalool than of linalyl acetate [24]. We can assume that this occurs because as the leaf matures, linalool is converted to linalyl acetate in a biosynthesis acetylation by co-enzyme acetyl-CoA (CH_3COSCoA), as shown in Figure 2 [68].

(please insert Figure 2 here)

Figure 2

According to Table 3, all *Citrus* EO from the pericarp have a large percentage of limonene compound (average 71.9 %), followed by beta-myrcene (average 3.2 %) and linalool (average 1.5 %). Regarding *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis*, we observed that the different parts of the plant, leaves or pericarp, directly influence the chemical composition of EO. The average percentage of chemical components of EO from leaves and pericarp can be seen in Figure 3. The EO obtained from leaves have as major average percentage component linalyl acetate (38.1 %), followed by linalool (21.1 %), beta-myrcene (5.6 %), alpha-terpineol (5.4 %) and limonene (3.0 %).

(please insert Figure 3 here)

Figure 3

The results shown in Table 3 and Figure 3 demonstrate that the *Citrus* EO have a great importance due your medicinal and commercial applications [20, 26, 35-39, 66].

3.2 Enantiomeric distribution

The limonene and linalool enantiomeric distribution are present in all EO analyzed, as shown in Table 4. Considering the enantiomeric distribution of limonene and linalool we observed that (*R*)-(+)-limonene was 60-99% in all *Citrus* EO (Table 4). The (*R*)-(-)-linalool was 59-64% in *Citrus aurantium*, while (*S*)-(+)-linalool was 76 - 99% in *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata* [24,31]. The optical isomerism characteristics are related to the pharmacological activity and flavorings properties of bitter orange (*Citrus aurantium*), sweet orange (*Citrus sinensis*) and tangerine (*Citrus reticulata*) [5,48].

Thus, (*R*)-(+)-limonene has an orange odor, with a 200 ppb odor threshold, and causes a physiological effect with a slight increase in systolic blood pressure and a psychopharmacological effect, leading to a decrease in anxiety when inhaled. (*S*)-(-)-limonene has a lemon odor, with a 500 ppb odor threshold, and causes a physiological effect with a slight increase in systolic blood pressure, although without significant psychopharmacological effect when inhaled. Also, (*R*)-(-)-linalool has a floral odor, with a 0.8 ppb odor threshold, and causes a physiological effect with a decreased heart rate, cardiovascular system depression and psychopharmacological relaxation effect when inhaled. Still, (*S*)-(+)-linalool has a citrus fruit odor, with a 7.4 ppb odor threshold, and causes a physiological effect at the electrodermal activity, stimulation of the cardiovascular system and psychopharmacological effects with an increased in alertness when inhaled [24,26-32,69,70].

(please insert Table 4 here)

Table 4

3.3 Hydrolate of *Citrus aurantium*

The hydrolate composition obtained by hydrodistillation of pericarp *Citrus aurantium* is shown in Table 5.

(please insert Table 5 here)

Table 5

The chemical components of the hydrolate, as shown in Table 5, present as major compound nootkatone (17.6%), instead of limonene. This is considered a marker of hydrolate authenticity [71,72]. The others compounds present are linalool (10.0%), alpha-terpineol (10.1%), geraniol (4.0%), geranial (3.2%), limonene (0.8%), and the enantiomers (*R*)-(+)-limonene (84%) and (*R*)-(-)-linalool (56%). Their chemical composition is similar to the composition of EO (sample E), presented in Table 3. We believe that this occur because the compounds with hydrophilic characteristics are present in the hydrolate at a higher percentage than in the lipophilic EO. These results give the hydrolate of *Citrus aurantium* a high value on the commercial market, because it is a product for aromatic and pharmacological purposes.

CONCLUSION

Our research showed that the main components of *Citrus* EO are from pericarp, characterized by presence of limonene (average value 71.9%), and from leaves, characterized by presence of linalyl acetate and linalool, with average values of 38.1 and 21.1%, respectively. The extraction method does not influence its composition. The (*R*)-(+)-limonene was ee in all EO of *Citrus* analyzed and (*R*)-(-)-linalool predominates in *Citrus aurantium* EO, while (*S*)-(+)-linalool in *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata* EO. The hydrolate of *Citrus aurantium* has value on the commercial market due your chemical composition. This study showed that the *Citrus* EO from Brazil presents a very important chemical composition, ensuring

their applications in many industries, products categories, including medical applications due your physiological and psychopharmacological properties, mainly attributed to the limonene, linalool and linalyl acetate. These EO have a similar chemical composition when compared to *Citrus* EO from other countries, justifying the inclusion of EO production from Brazil in the world trade economy.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest in this manuscript.

REFERENCES

- [1] UNIDO (United Nations Industrial Development Organization)/FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). "Herbs, spices and essential oils", http://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Herbs_spices_and_essential_oils.pdf (Accessed July 25, **2014**).
- [2] WTO, World Trade Organization, International Trade Statistics. http://www.wto.org/english/res_e/statis_e/its2013_e/its2013_e.pdf (Accessed July 25, **2014**).
- [3] Bizzo, H.R; Hovell, A.M.C; Rezende, C.M. Óleos Essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas [Essential Oils in Brazil: general aspects, developments and prospects]. *Quimica Nova*, **2009**, 32(3), 588-594.
- [4] FAO, Food and Agriculture Organization, Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QV/E> (Accessed July 25, **2014**).
- [5] Tranchida, P.Q; Bonaccorsi, I; Dugo, P; Mondello, L; Dugo, G. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives - A Review. *Flavour and Fragrance Journal*, **2012**, 27(2), 98–123.
- [6] Edris, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, **2007**, 21(4), 308–323.
- [7] Limberger, R.P; Suyenaga, E.S; Lamaty, G; Menut, C; Verin, P; Bessiere, J; Henriques, A.T. Chemical Composition of essential oils from three Southern Brazilian species of *Mikania* (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, **1998**, 10(4), 363-367.
- [8] Limberger, R.P; Aboy, A.L; Ritter, M.R; Bassani, V.L; Moreno, P.R.H; Henriques, A.T. Essential oils from four *Mikania* species (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, **2001**, 13(4), 225-228.

- [9] Limberger, R.P; Apel, M; Menut, C; Sobral, M; Moreno, P.R.H; Henriques, A.T. Aromatic plants from Brazil: Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **2001**, 13(4), 113-115.
- [10] Limberger, R.P; Moreno, P.R.H; Farias, F; Sobral, M; Henriques, A.T. Essential oil of *Myrrhinium atropurpureum* Schott (Myrtaceae) folhas. *Journal of Essential Oil Research*, **2001**, 13(1), 47-48.
- [11] Limberger, R.P; Sobral, M; Menut, C; Bessiere, J; Henriques, A.T. Essential oils from six Southern Brazilian *Myrceugenia* species (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, **2002**, 14(4), 302-304.
- [12] Limberger, R.P; Pires, C.A.S; Sobral, M; Henriques, A.T. Essential oils of *Marlierea* species. *Journal of Essential Oil Research*, **2004**, 16 (5), 479-482.
- [13] Limberger, R.P; Apel, M; Cordeiro, I; Lima, M.E.L; Moreno, P.R.H; Henriques, A.T. Essential oil from leaves and stem barks of Southeastern *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, **2008**, 20(6), 504-506.
- [14] Singh, P; Shukla, R; Prakash, B; Kumar, A; Singh, I.S; Mishra, P.K; Dubey, N.K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48(6), 1734–1740.
- [15] Buchbauer, G; Ilic, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine, In: *Handbook of Natural Products*; Ramawat KG, Merillon JM; (Eds) Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2013**.
- [16] Tongnuanchan, P; Benjakul, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, **2014**, 79(7), R1231–R1249.
- [17] Trivedi, S; Fluck, D; Sehgal, A; Osborne, A; Damahanayake, M.S; Talingting-Pabalan, R; Ruiz, J; Aymes, C. Cleaning compositions incorporating green solvents and methods for use. U.S. Patent 8,222,194, 2012.
- [18] Lapczynski, A; Letizia, C.S; Api, A.M. Addendum to fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46(11), S190-S192.
- [19] Höferl, M; Krist, S; Buchbauer, G. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. *Planta Medica*, **2006**, 72(13), 1188-1192.
- [20] Linck, V.M; Silva, A.L; Figueiro, M; Camarão, E.B; Moreno, P.R.H; Elisabetsky, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, **2010**, 17(8), 679–683.

- [21] Lin, C.M; Sheu, S.R; Hsu, S.C; Tsai, Y.H. Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*, **2010**, 21(12), 1710-1715.
- [22] Tankam, J.M; Ito, M. Inhalation of the Essential Oil of *Piper guineense* from Cameroon Shows Sedative and Anxiolytic-Like Effects in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2013**, 36(10), 1608-1614.
- [23] Perry, N; Perry, E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. *CNS Drugs*, **2006**, 20(4), 257-280.
- [24] Sarrou, E; Chatzopoulou, P; Dimassi-Theriou, K; Therios, I; Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. *Molecules*, **2013**, 18(9), 10639-10647.
- [25] Velázquez-Nuñez, M.J; Avila-Sosa, R; Palou, E; Lopez-Malo, A. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. *valencia*) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, **2013**, 31(1), 1-4.
- [26] Lima, N.G.P.B; Sousa, D.P; Pimenta, F.C.F; Alves, M.F; Souza, F.S; Macedo, R.O; Cardoso, R.B; Morais, L.C; Diniz, M.F.M; Almeida, R.N. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (*R*)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, **2013**, 103(3), 450–454.
- [27] Yamamoto, N; Fujiwara, S; Saito-Jizumi, K; Kamei, A; Shinozaki, F; Watanabe, Y; Abe, K; Nakamura, A. Effects of Inhaled (*S*)-Linalool on Hypothalamic Gene Expression in Rats under Restraint Stress. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **2013**, 77(12), 2413-2418.
- [28] Boelens M.H; Boelens H; Van Gemert L.J. *Perfumer & Flavorist*, **1993**, 18(6), 1-15.
- [29] Padrayuttawat, A; Yoshizawa, T; Tamura, H; Tokunaga, T. Optical Isomers and Odor Thresholds of Volatile Constituents in Citrus sudachi. *Food Science and Technology International Tokyo*, 1997, 3(4), 402-408.
- [30] Boonbumrung, S; Tamura, H; Mookdasanit, J; Nakamoto, H; Ishihara, M; Yoshizawa, T; Varayanond, W. Characteristic Aroma Components of the Volatile Oil of Yellow Keaw Mango Fruits Determined by Limited Odor Unit Method. *Food Science and Technology Research*, 7(3), 200-206
- [31] Heuberger, E; Hongratanaworakit, T; Böhm, C; Weber, R; Buchbauer, G. Effects of Chiral Fragrances on Human Autonomic Nervous System Parameters and Self-evaluation. *Chemical Senses*, **2001**, 26(3), 281-292.
- [32] Santos, M.R; Moreira, F.V; Fraga, B.P; Souza, D.P.D; Bonjardim, L.R; Quintans-Junior, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2011**, 21(4), 764-771.
- [33] Bentley, R. The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. *Chemical reviews*, **2006**, 106(9), 4099-4112.
- [34] Nakamura, A; Fujiwara, S; Matsumoto, I; Abe, K. Stress Repression in Restrained Rats by (*R*)-(-)-Linalool Inhalation and Gene Expression

- Profiling of Their Whole Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57(12), 5480–5485.
- [35] Almeida, E.R; Rafael, K.R.O; Couto, G.B.L; Ishigami, A.B.M. Anxiolytic and Anticonvulsant Effects on Mice of Flavonoids, Linalool, and α -Tocopherol Presents in the Extract of Leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2009**, 1-6. Article ID 274740, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/274740> (Accessed February 25, **2015**).
- [36] Linck, V.M; Da Silva, A.L; Figueiró, M.; Piato, A.L; Herrmann, A.P; Birck, F.D; Caramão, E.B; Nunes, D.S; Moreno, P.R; Elisabetsky, E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, **2009**, 16(4), 303-307.
- [37] Bagetta, G; Morrone, L.A.; Rombolà, L; Amantea, D; Russo, R; Berliocchi, L; Sakurada, S; Sakurada, T; Rotiroti, D; Corasaniti, M.T. Review, Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, **2010**, 81(6), 453–461.
- [38] Nöldner, M; Germer, S; Koch, E. Pharmacokinetics of linalool and linalyl acetate, the two main constituents of silexan, an essential oil from *Lavandula angustifolia* flowers, in rats. *Planta Medica*, 2011, 77(12), PM44.
- [39] Yun, J. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release. *Phytomedicine*, **2014**, 21(6), 883–887.
- [40] Shaw, P.E. Review of Quantitative Analyses of *Citrus* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27(2), 246-257.
- [41] Juchelka, D; Steil, A; Witt, K; Mosandl, A. Chiral compounds of essential oils. XX. Chirality evaluation and authenticity profiles of neroli and petitgrain oils. *Journal of Essential Oil Research*, **1996**, 8(5), 487-497.
- [42] Caccioni, D.R.L; Guizzardi, M; Biondi, D.M; Agatino, G.R; Ruberto, G. Relationship between volatile components of *Citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, **1998**, 43(1), 73–79.
- [43] Carvalho-Freitas, M.I.R; Costa M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2002**, 25(12), 1629-1633.
- [44] Pultrini, A.M; Galindo, L.A; Costa, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, **2006**, 78(15), 1720-1725.
- [45] Gargano, A.C. MSc Dissertation, *Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do OE das cascas de frutos de espécies do gênero*, Universidade Estadual Paulista, **2007**.
- [46] Leite, M.P ; Fassin, JrJ ; Baziloni, E.M.F; Almeida, R.N; Mattei, R; Leite, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2008**, 18(suppl.), 661-666.

- [47] Hosni, K; Zahed, N; Chrif, R; Abid, I; Medfei, W; Kallel, M; Brahim, N.B; Sebei, H. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, **2010**, 123(4), 1098–1104.
- [48] Bonaccorsi, I; Sciarrone, D; Cotroneo, A; Mondello, L; Dugo, P; Dugo, G. Enantiomeric distribution of key volatile components in *Citrus* essential oils. *Revista Brasileira Farmacognosia*, **2011**, 21(5), 841-849.
- [49] Ellouze, I; Abderrabba, M; Sabaou, N; Mathieu, F; Lebrihi, A; Boujila, J. Season's Variation Impact on *Citrus aurantium* Leaves Essential Oil: Chemical Composition and Biological Activities. *Journal of Food Science*, **2012**, 77(9), T173-T180.
- [50] Najafian, S; Rowshan, V. Comparative of HS SPME and HD techniques in *Citrus aurantium* L. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, **2012**, 2(3), 488-494.
- [51] Costa, C.A.R.A; Cury, T.C; Cassettari, B.O; Takahira, R.K; Flório, J.C; Costa, M. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 13(42), 1-10.
- [52] Tirado, C.B; Stashenko, E.E; Combariza, M.Y; Martinez, J.R. Comparative study of Colombian *citrus* oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1995**, 697(1-2), 501-513.
- [53] Choi, H.S. Character Impact Odorants of *Citrus* Hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] Cold-Pressed Peel Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51(9), 2687-2692.
- [54] Lehrner, J; Marwinski, G; Lehr, S; Jöhren, P; Deecke, L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiology and Behavior*, **2005**, 86(1-2), 92-95.
- [55] Njoroge, S.M; Koaze, H; Karanja, P.N; Nyota, P; Masayoshi, S; Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and Fragrance Journal*, **2005**, 20(1), 80–85.
- [56] Ferhat, M.A; Meklati, B.Y; Smadja, J; Chemat, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1112 (1-2), 121–126.
- [57] Faturi, C.B; Leite, J.R; Alves, P.B; Canton, A.C; Teixeira-Silva, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **2010**, 34(4), 605-609.
- [58] Jafarzadeh, M; Arman, S; Farahbakhsh, F. Effect of aromatherapy with orange essential oil on salivary cortisol and pulse rate in children during dental treatment: A randomized controlled clinical trial. *Advanced Biomedical Research*, **2013**, 6, 2-10.

- [59] Chutia, M; Bhuyan, P.D; Pathak, M.G; Sarma, T.C; Boruah, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, **2009**, 42(3), 777–780.
- [60] Kostadinovic, S; Jovanov, D; Mirhosseini, H. Comparative investigation of cold pressed essential oils from peel of different mandarin varieties. *The Journal of Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology*, **2011**, 3(2), 7-14.
- [61] Van Den Dool, H; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1963**, 11, 463–471.
- [62] Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Edn; Allured Publishing Corporation: Illinois, **2007**.
- [63] Bicchi, C; D'amato, A; Rubiolo, P. Review, Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 843(1-2), 99–121.
- [64] Sciarrone, D; Schipilliti, L; Ragonese, C; Tranchida, P.Q; Dugo, P; Dugo, G; Mondello, L. Thorough evaluation of the validity of conventional enantio-gas chromatography in the analysis of volatile chiral compounds in mandarin essential oil: A comparative investigation with multidimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217(7), 1101–1105.
- [65] Stephany, O; Tisse, S; Coadou, G; Bouillon, J.P; Peulon-Agasse, V; Cardinael, P. Influence of amino acid moiety accessibility on the chiral recognition of cyclodextrin-amino acid mixed selectors in enantioselective gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1270, 254-261.
- [66] Kamal, G.M; Anwar, F; Hussain, A.I; Sarri, N; Ashraf, M.Y. Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, **2011**, 18(4), 1275-1282.
- [67] Ferhat, M.A; Meklati, B.Y; Chemat, F. Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, **2007**, 22(6), 494–504.
- [68] Dewick, P.M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, 3th Edn; John Wiley and Sons Ltda Publication: England, **2009**.
- [69] Sousa, D.P; Nóbrega, F.F; Santos, C.C; Almeida, R.N. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Natural product communications*, **2010**, 5(12), 1847-1851.
- [70] Monsef-Esfahani, H.R; Amanzade, Y; Alhani, Z; Hajimehdipour, H; Faramarzi, M.A. GC/MS Analysis of *Citrus aurantium* L. Hydrolate and its

Comparison with the Commercial Samples. *Iranian Journal Pharmaceutical Research*, **2004**, 3(3), 177-179.

[71] Fraatz, M.A; Berger, R.G; Zorn, H. Nootkatone - a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2009**, 83(1), 35-41.

[72] Leffingwell and Associates, <http://www.leffingwell.com>. (Accessed February 25, **2015**).

Table 1- Review of chemical components and limonene and linalool enantiomeric distribution of *Citrus* essential oils from many countries worldwide, analyzed using GC/MS.

<i>Citrus aurantium</i>																
reference	40	41	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	24	24	24
plant part	p	l	l	p	p	p	p	p	p	p	l	l	p	p	new l	old l
country of origin	USA	Italy	Morocco	Italy	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil	Tunisia	Italy	Tunisia	Iran	Brazil	Greece	Greece	Greece
extraction method	cp	sd	sd	hd	sd	hd	hd		hd	cp	hd	hd	hd	hd	hd	hd
extraction yield %									1.24				0.5	1.67	0.27	0.45
compound %																
alpha-tujene				tr				nd		0-0.02						
alpha-pinene				0.4				0.57	0.53	0.3	0.29- 0.89	0.16 -0.44		0.53	0.19	nd
camphene										tr- 0.01						
sabinene				0.08				nd	0.27	0.3	0.09- 0.45	nd- 3.62		0.18	0.37	0.22
beta-pinene	0.9-5.5			0.33				1.16		1.4	0.10- 0.18		0.41	0.62	3.58	1.9
beta-myrcene				1.88		1.43	1.09	2.24	nd			nd-1.99	0.53	2	1.63	2.74
octanal + alpha-phellandrene	1.4-2.2			0.1		0.45					tr- 0.08			0.24	nd	nd
beta-phellandrene											tr					
delta-3-carene				0.01						nd				nd	nd	nd
limonene	74-86			94.27	90.4	97.83	87.01	96.24	96.9	91.54- 96.52	nd-1.70		98.66	94.67	0.53	0.77
(S)-(-)-limonene		29.2 - 35.1	3.7 - 39.2							0.5						
(R)-(+)-limonene		70.8 - 64.9	96.3 - 60.8							99.5						
camphor																
(Z)-beta-ocimene				tr					nd		0.05- 2.19	tr		0.3	0.71	1.22
(E)-beta-ocimene				0.23					tr					nd	4.08	3.11
gamma-terpinene				0.02			nd		nd		0.20- 1.46			nd	nd	nd
alpha-terpinene																
n-octanol				0.33												
cis-linalool oxide				tr							nd- 0.99	tr		nd	nd	nd
terpinolene				0.02					nd	nd				nd	0.4	0.7
trans-linalool oxide				0.05							0.57- 1.64	tr				
linalool	0.5-1.0			0.78			2.76	0.44	0.2	0.06- 0.37	43.2- 65.97	48.7		0.76	58.21	36.03
(R)-(-)-linalool		70.9 - 90.2	70.1 - 82.4							89.8						
(S)-(+)-linalool		29.1 - 9.8	29.9 - 17.6							10.2						

Table 1- continued

<i>Citrus aurantium</i>																
reference	40	41	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	24	24	24
plant part	p	l	l	p	p	p	p	p	p	p	l	l	p	p	new l	old l
country of origin	USA	Italy	Morocco	Italy	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil	Tunisia	Italy	Tunisia	Iran	Brazil	Greece	Greece	Greece
extraction method	cp	sd	sd	hd	sd	hd	hd		hd	cp	hd	hd	hd	hd	hd	hd
extraction yield %									1.24				0.5	1.67	0.27	0.45
compound %																
nonanal																
cis-limonene oxide																
trans-limonene oxide																
isopulegol	0.3-0.4			nd												
citronellal				nd												
terpin-4-ol	0.3-0.4			0.06			nd		nd	tr- 0.03	nd-0.31	0.2		nd	0.17	0.13
alpha-terpineol	0.2-0.3			0.26			1.26			0.03- 2.94	9.29- 12.12	21.6		0.13	7.11	12.89
n-decenal				0.11				0.25						0.16	nd	nd
octanyl acetate				0.05												
trans-carveol																
nerol				0.06							nd-1.19	3.4		nd	1.45	2.89
citronellol																
neral (E-citral)				0.03			nd					0.2				
canone																
geraniol														nd	nd	nd
linalyl acetate	0.3-1.0								nd	0.18- 1.17	0.77- 24.77	18.8		0.18	12.42	23
geranial (Z-citral)				0.11			nd		nd			0.3				
perilla aldehyde																
thymol				nd								0.2				
perilla alcohol																
alpha-terpinyl acetate																
citronellyl acetate																
neryl acetate				nd			nd		nd			1.7		0.1	2.18	4.46
geranyl acetate				nd					nd		0.53- 3.44	3.5		nd	4.49	8.7
beta-elemene				0.01					tr							

Table 1- continued

<i>Citrus aurantium</i>																
reference	40	41	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	24	24	24
plant part	p	l	l	p	p	p	p	p	p	p	l	l	p	p	new l	old l
country of origin	USA	Italy	Morocco	Italy	Brazil	Brazil	Brazil	Brazil	Tunisia	Italy	Tunisia	Iran	Brazil	Greece	Greece	Greece
extraction method	cp	sd	sd	hd	sd	hd	hd		hd	cp	hd	hd	hd	hd	hd	hd
extraction yield %									1.24				0.5	1.67	0.27	0.45
compound %																
(E)-beta-caryophyllene				0.07								0.2		nd	1.09	0.22
alpha-trans-bergamotene				nd					nd							
germacrene D									tr		nd- 0.21			nd	nd	nd
valencene				nd												
alpha-(E,E)-farnesene				nd							nd- tr			nd	0.13	nd
alpha-sinensal																
beta-bisabolene				nd												
alpha-cadinene																
(E)-nerolidol														nd	nd	0.1
caryophyllene oxide											nd- 2.82					
alpha-bisabolol								nd								
nootkatone	0.01			nd												

p: pericarp

l: leaves

cp: cold pressing

sd: steam distillation

hd: hydrodistillation

* The unfilled spaces are no data provided in the publication of reference

Table 1- continued

<i>Citrus sinensis</i>															<i>Citrus reticulata</i>	
reference	40	52	52	41	53	54	55	56	57	47	14	48	58	25	59	60
plant part	p	p	p	p	p		p	p		p	p	p		p	p	p
country of origin	USA	Colombia	Colombia	Italy	Korea		Kenya	Algeria	Brazil	Tunisia	India	Italy	Iran	Mexico	India	South Africa
extraction method	cp	sd	cp	hd	cp		cp	hd		hd	hd	cp		sd	hd	cp
extraction yield %		0.17	0.79		1.02		0.1	0.39		1.49-2.31					0.6	
compound %																
alpha-tujene		nd	nd	tr-0.01								0.46- 0.6				0.02- 1.23
alpha-pinene	0.1- 0.6	0.28- 0.32	0.29-0.53	0.40-0.50	0.53		0.3	1.6		0.2	0.36	0.36- 1.40		0.47	0.1	2.09- 7.20
camphene																0.03- 0.20
sabinene	0.1- 0.6	0.02	0.02-0.03	0.13-0.83	2.15		0.2	1.2	0.11	0.2	0.37	0.24- 0.80			0.1	0.00- 1.86
beta-pinene		0.63- 1.05	0.63-0.76	tr-0.06	0.1		nd	2.7		1.6	0.03	tr- 0.11	d	0.53		0.00- 5.27
beta-myrcene	0.9- 2.1	0.01	nd	1.74-1.98	1.86	1.88	nd	5.3	1.11	0.2	1.71		3	1.72	0.3	3.13- 7.15
octanal + alpha-phellandrene		1.52- 1.68	1.59-1.94	0.12-0.59			nd		0.16		0.47					0.00- 1.43
beta-phellandrene												0.40- 1.40				
delta-3-carene		0.04- 0.08	0.05-0.07	nd- 0.22				0.1		tr						0.00- 0.28
limonene	83- 97	91.63- 92.57	93.77- 94.55	91.14- 94.95	90.68	95.3	92.5	78.5	97.66	96.5	90.66	91.15- 96.10	92	96.62	46.7	46.71- 74.29
(S)-(-)-limonene												0.5				
camphor																
(Z)-beta-ocimene		nd	nd	tr	0.16		nd			nd			d		tr	0.11- 0.41
(E)-beta-ocimene		0.02- 0.03	0.02	0.01-0.05						tr	0.21				0.4	
gamma-terpinene	0.1	0.41- 1.09	0.02-0.04	0.04-0.18	0.88		nd	0.2		tr						0.17- 19.97
alpha-terpinene																0.13- 0.43
n-octanol		0.02- 0.03	0.02-0.04	0.03-0.24	tr		0.2	0.5	0.02							

Table 1-continued

<i>Citrus sinensis</i>															<i>Citrus reticulata</i>	
reference	40	52	52	41	53	54	55	56	57	47	14	48	58	25	59	60
plant part	p	p	p	p	p		p	p		p	p	p		p	p	p
country of origin	USA	Colombia	Colombia	Italy	Korea		Kenya	Algeria	Brazil	Tunisia	India	Italy	Iran	Mexico	India	South Africa
extraction method	cp	sd	cp	hd	cp		cp	hd		hd	hd	cp		sd	hd	cp
extraction yield %		0.17	0.79		1.02		0.1	0.39		1.49-2.31					0.6	
compound %																
cis-linalool oxide				nd	0.81		tr									
terpinolene		1.83- 2.61	0.58-0.78	0.01-0.07	0.11		tr			tr	0.18					0.19- 2.92
trans-linalool oxide				nd			tr									
linalool	0.3- 5.3	nd	nd	0.61-2.56	0.47		0.2	2	0.28	0.13		0.17- 0.8	d		0.7	0.60- 1.90
(R)-(-)-linalool												7.8 - 17.9				
(S)-(+)-linalool												82.1				
nonanal		nd	nd	tr-0.03			tr	0.1	0.02						0.4	0.00- 0.38
cis-limonene oxide				nd	tr		0.3		0.04						tr	0.09- 0.44
trans-limonene oxide				nd	tr		tr	0.1	0.03						tr	0.07- 0.61
isopulegol	0.03- 0.05	nd	nd	nd								0.26				
citronellal	nd	nd	nd	0.02-0.04	0.19		tr	0.3					tr- 0.11		1.3	0.02- 0.50
alpha-terpineol	nd	nd	nd	0.12-0.25			0.1	0.4					0.02- 0.15		tr	0.21- 0.87
n-decenal	0.35	0.26-0.39	0.11-0.26	tr			tr	1.7			0.02					
octanyl acetate				nd				0.1								0.00- 0.05
trans-carveol				nd				0.3								0.00- 0.03
nerol	0.07- 0.13	nd	nd	0.01-0.09				0.3							2.3	
citronellol	nd	nd	nd								0.17					
neral (E-citral)	0.12- 0.15	0.08	0.04-0.18	tr			tr	0.3							14.5	0.00- 0.19
carvone								0.1				0.05			tr	0.10- 0.19
geraniol	0.14- 0.17	0.10-0.11	0.01-0.09	tr				0.1						d	3.5	
linalyl acetate				tr				0.1		tr	2.8					
geranial (Z-citral)	0.15- 0.23	0.02		tr			tr	0.5	0.01	tr	0.09				19.0	0.00- 0.26
perilla aldehyde	0.01- 0.03	nd		tr			tr					0.03				0.00- 0.17
thymol				nd												0.00- 0.11
perilla alcohol				tr				0.1	nd							
alpha-terpinyl acetate				nd	tr											
citronellyl acetate	nd	nd	nd	tr											tr	0.05- 0.13
neryl acetate				nd				0.1		ts					1.1	0.02- 0.27
geranyl acetate				nd	tr			tr		nd					3.9	0.04- 0.11
beta-elemene	0.07- 0.09	0.03-0.08	nd	tr				0.1		tr						0.04- 0.12
(E)-beta-caryophyllene	0.02- 0.15	nd	tr- 0.04												2.6	0.10-0.35

Table 1- continued

<i>Citrus sinensis</i>															<i>Citrus reticulata</i>	
reference	40	52	52	41	53	54	55	56	57	47	14	48	58	25	59	60
plant part	p	p	p	p	p		p	p		p	p	p			p	p
country of origin	USA	Colombia	Colombia	Italy	Korea		Kenya	Algeria	Brazil	Tunisia	India	Italy	Iran	Mexico	India	South Africa
extraction method	cp	sd	cp	hd	cp		cp	hd		hd	hd	cp			hd	cp
extraction yield %		0.17	0.79		1.02		0.1	0.39		1.49-2.31					0.6	
compound %																
alpha-trans-bergamotene		0.02- 0.15	nd	tr- 0.04											2.6	0.10-0.35
germacrene D		nd	nd	nd						tr					0.1	0.00- 0.24
valencene		0.02-	0.02		tr		tr	0.1		tr					tr	0.00- 0.14
alpha-(E, E)-farnesene				tr-0.03				0.4								0.00- 0.13
alpha-sinensal				nd	tr			0.1								0.00- 0.30
beta-bisabolene																0.00- 1.09
alpha-cadinene		nd	nd	nd												0.00- 0.78
(E)-nerolidol				nd												
caryophyllene oxide				nd			tr									0.00- 0.03
alpha-bisabolol															0.2	0.01- 0.44
nootkatone																

p: pericarp l: leaves cp: cold pressing sd: steam distillation hd: hydrodistillation

* The unfilled spaces are no data provided in the publication of reference nd: not detected tr: traces d: detected

Table 2- Identification of plant part and species, essential oils extraction method, origin and localization of *Citrus* planting analyzed.

Code sample	Plant species	Plant part	Essential oil extraction method	Collected / trade mark	Location of planting
A	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	leaves (<i>petitgrain</i>)	steam distillation	Ferquima Ltda	South-central Brazil
B	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	leaves (<i>petitgrain</i>)	steam distillation	collected in Cristal city	Southern Brazil (latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m)
C	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	leaves (<i>petitgrain</i>)	steam distillation	Laszlo Ltda	South-central Brazil (latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m)
D	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	pericarp	steam distillation	collected in Cristal city	Southern Brazil (latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m)
E	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	pericarp	hydrodistillation	collected in Cristal city	Southern Brazil (latitude 30° 59' 59" S; longitude 52° 02' 54" W; altitude 500 m)
F	<i>Citrus aurantium</i> Lineu	pericarp	cold pressing	Laszlo Ltda	South-central Brazil (latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m)
G	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	leaves	steam distillation	collected in Porto Alegre city	Southern Brazil (latitude 30° 2' 51" S; longitude 51° 5' 47" W; altitude 3 m)
H	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarp	hydrodistillation	collected in Porto Alegre city	Southern Brazil (latitude 30° 2' 51" S; longitude 51° 5' 47" W; altitude 3 m)
I	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarp	cold pressing	Ferquima Ltda	South-central Brazil
J	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarp	cold pressing	Laszlo Ltda	South-central Brazil (latitude 22° 21' 58" S; longitude 48° 22' 48" W; altitude 669 m)
K	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	pericarp	cold pressing	Verbhena Ltda	Southern Brazil (latitude 29° 41' 21" S; longitude 51° 28' 1" W; altitude 115 m)
L	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	pericarp	cold pressing	Ferquima Ltda	South-central Brazil
M	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	pericarp	cold pressing	Laszlo Ltda (lot GL)	Southern Brazil (latitude 29° 41' 21" S; longitude 51° 28' 1" W; altitude 115 m)
N	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	pericarp	cold pressing	Laszlo Ltda	Southern Brazil (latitude 29° 41' 21" S; longitude 51° 28' 1" W; altitude 115 m)

Table 3- Chemical composition of *Citrus* essential oils from Brazil analyzed by GC/MS.

		plant species	<i>Citrus aurantium</i>						<i>Citrus sinensis</i>					<i>Citrus reticulata</i>		
		plant part	leaves			pericarp			leaves	pericarp				pericarp		
		extraction method	sd			sd	hd	cp	sd	hd	cp			cp		
		code sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
		extraction yields %	-	0.4	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
number of peak	KI* _{DB5}	compound %														
1	926	alpha-thujene	tr	tr	tr	nd	0.1	0.1	0.7	tr	tr	tr	tr	0.3	0.2	1.4
2	934	alpha-pinene	0.2	0.1	0.3	0.6	0.5	2.2	3.8	1.1	0.9	2.2	1.4	0.8	2.4	4.6
3	969	sabinene	0.2	0.3	0.1	0.3	0.3	0.6	0.5	0.5	0.4	3.1	0.9	0.5	0.4	1.9
4	972	beta-pinene	1.4	2.6	2.2	1.9	1.7	4.2	1.5	0.6	0.2	3.1	0.1	0.3	1.6	1.8
5	985	beta-myrcene	2.4	6.9	7.8	2.8	2.5	4.8	5.2	4.5	0.8	3.1	1.0	4.0	4.1	4.6
6	999	octanal + alpha-phellandrene	tr	tr	0.1	1.3	1.3	0.2	tr	5.9	tr	1.0	nd	0.6	nd	0.4
7	1007	delta-3-carene	0.4	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.6	0.2	tr	0.8	nd	0.1	0.1	0.2
8	1030	limonene	1.3	2.1	2.6	82.5	82.3	73.6	5.9	67.7	78.2	78.3	76.8	92.7	39.5	47.3
9	1037	(Z)-beta-ocimene	0.5	3.1	3.5	0.1	0.2	0.1	1.1	tr	nd	0.2	tr	tr	tr	tr
10	1047	(E)-beta-ocimene	1.4	5.5	4.6	0.6	0.6	0.3	0.8	0.4	tr	tr	tr	tr	tr	0.1
11	1059	gamma-terpinene	nd	0.1	0.2	0.1	0.1	1.3	4.6	0.3	tr	0.8	tr	tr	5.3	19.4
12	1069	n-octanol	nd	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.3	0.3	tr	0.1	nd	nd	0.1	nd
13	1071	cis-linalool oxide	nd	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.3	tr	nd	0.1	tr	tr	0.4	tr
14	1085	terpinolene	0.2	0.8	1.2	0.1	0.1	0.3	4.9	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	1.7
15	1086	trans-linalool oxide	nd	tr	0.2	tr	nd	0.2	0.1	tr	nd	tr	tr	tr	0.4	tr
16	1095	linalool	24.8	14.2	22.4	2.3	1.1	0.6	23.0	5.2	0.5	1.7	1.2	0.2	1.6	0.5
17	1110	nonanal	nd	nd	tr	0.2	0.2	0.1	tr	0.6	0.6	0.2	1.3	nd	tr	0.1
18	1133	cis-limonene oxide	nd	tr	tr	tr	tr	0.8	tr	0.1	4.4	0.1	4.0	tr	0.6	tr
19	1135	trans-limonene oxide	nd	tr	nd	tr	tr	0.8	0.3	tr	3.4	0.1	4.0	tr	1.0	tr
20	1146	isopulegol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr	2.3	0.9
21	1149	citronellal	nd	tr	nd	tr	tr	tr	1.2	0.7	nd	0.2	nd	nd	tr	0.1
22	1174	terpin-4-ol	nd	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	5.6	0.2	tr	tr	0.6	tr	0.1	0.1

Table 3- continued

plant species			<i>Citrus aurantium</i>						<i>Citrus sinensis</i>					<i>Citrus reticulata</i>		
plant part	leaves			pericarp			leaves	pericarp			pericarp					
extraction method	sd			sd	hd	cp	sd	hd	cp			cp				
code sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
%	-	0.4	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-		
23 1186 alpha-terpineol	6.1	6.8	8.1	0.6	0.2	0.9	0.7	0.3	0.6	0.2	0.2	tr	0.8	0.3		
24 1190 decenal	nd	nd	tr	0.1	tr	0.1	tr	0.1	tr	0.1	0.6	nd	0.5	tr		
25 1192 dihydro-carveol	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	0.6	0.1		
26 1195 n-dodecane	nd	nd	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.8	0.3		
27 1201 n-decanal	nd	nd	tr	0.5	0.6	0.2	0.2	2.0	0.6	1.1	0.4	nd	0.3	0.4		
28 1210 octanol acetate	nd	nd	tr	0.3	0.3	0.1	tr	0.2	tr	tr	tr	nd	tr	tr		
29 1215 trans-carveol	nd	nd	tr	nd	nd	0.2	0.1	nd	1.7	tr	2.0	tr	3.2	nd		
30 1224 nerol	0.8	0.1	0.5	0.1	0.1	tr	0.1	nd	nd	tr	tr	tr	0.1	nd		
31 1225 citronellol	nd	nd	nd	nd	nd	tr	0.1	0.3	nd	nd	nd	tr	0.3	nd		
32 1227 cis-carveol	nd	nd	0.5	nd	nd	0.6	0.1	nd	0.8	tr	1.3	tr	2.2	0.1		
33 1235 pulegone	nd	tr	0.2	0.1	0.1	nd	1.0	0.9	nd	0.2	tr	tr	0.1	tr		
34 1238 neral (E-citral)	nd	tr	nd	nd	nd	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.3	0.2		
35 1239 carvone	nd	nd	tr	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	2.0	0.1	1.8	tr	2.5	tr		
36 1250 geraniol	nd	1.3	tr	nd	tr	nd	0.1	0.1	nd	nd	nd	tr	tr	tr		
37 1255 linalyl acetate	51.8	42.6	28.0	1.0	0.7	0.7	30.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
geranial (Z-citral)	tr	1.5	0.4	tr	0.1	0.2	1.2	1.7	nd	0.4	nd	tr	0.4	tr		
39 1268 perilla aldehyde	nd	tr	nd	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	nd	0.1	tr	nd	0.3	nd		
isopulegol acetate	nd	tr	0.4	tr	nd	tr	tr	tr	nd	nd	tr	tr	tr	0.1		
40 1270 trans-carvone	nd	tr	0.4	tr	nd	tr	tr	tr	nd	nd	tr	tr	tr	0.1		
41 1276 oxide	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd	nd	tr	tr	1.3	0.8		

Table 3-continued

plant species			<i>Citrus aurantium</i>						<i>Citrus sinensis</i>					<i>Citrus reticulata</i>		
plant part			leaves			pericarp			leaves	pericarp				pericarp		
extraction method			sd			sd	hd	cp	sd	hd	cp			cp		
code sample			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
%			-	0.4	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
peak	KI* _{DB5}	compound %														
42	1285	oxide acetate	nd	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	nd	nd	tr	tr	0.9	0.3
43	1290	tymol	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd	nd	tr	tr	0.4	0.2
44	1293	perilla alcohol	nd	tr	nd	nd	nd	0.1	0.1	tr	1.0	0.1	0.4	nd	0.4	nd
45	1325	piperitone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	nd	tr	nd	0.1	nd
46	1336	acetate	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	tr	tr	tr	nd	tr	nd	1.2	0.3
		alpha-terpineol														
47	1340	acetate	nd	0.4	0.6	0.1	tr	0.3	0.1	0.1	0.6	tr	0.7	tr	8.5	tr
		citronellol														
48	1352	acetate	nd	tr	tr	tr	tr	0.1	0.3	tr	nd	tr	nd	nd	0.1	tr
		cis-carveol														
49	1360	acetate	tr	nd	nd	nd	nd	0.1	tr	tr	tr	nd	nd	tr	0.9	0.4
50	1364	neryl acetate	2.9	3.2	4.1	0.2	0.2	0.2	0.4	tr	1.3	tr	0.2	tr	0.2	tr
51	1373	geranyl acetate	5.0	5.8	6.9	0.6	0.7	0.2	0.5	tr	0.8	tr	tr	tr	0.3	tr
52	1389	beta-elemene	nd	0.2	tr	nd	0.1	nd	2.6	0.3	nd	nd	nd	nd	0.1	tr
53	1398	dodecanal	0.5	tr	nd	nd	tr	0.2	0.1	0.1	nd	0.2	nd	nd	1.9	0.2
		(E)-														
54	1408	caryophyllene	nd	0.4	0.8	0.1	0.2	0.2	0.9	0.2	nd	0.1	nd	nd	tr	tr
		alpha-														
55	1430	bergamotene	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	tr	0.2	0.1
56	1450	pentadecane	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.7	0.5
57	1478	germacrene D	nd	nd	nd	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	nd	0.1	0.2	nd	tr	tr
58	1489	valencene	nd	nd	tr	tr	0.1	tr	0.1	1.4	nd	0.3	nd	nd	0.1	nd

Table 3-continued

		plant species <i>Citrus aurantium</i>			plant species <i>Citrus sinensis</i>						plant species <i>Citrus reticulata</i>							
		plant part			pericarp			leaves			pericarp							
		extraction method			sd	hd	cp	sd	hd	cp	cp							
		code sample			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
		extraction yields %			-	0.4	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
number of peak	KI* _{DB5}	compound %																
59	1490	alpha-selinene	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	tr	nd	nd	nd	0.1	0.2	
60	1498	farnesene	nd	0.2	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	0.7	
61	1499	beta-bisabolene	nd	nd	nd	tr	nd	nd	tr	0.1	nd	tr	nd	nd	nd	0.2	tr	
62	1510	alpha-cadinene	nd	tr	nd	tr	nd	0.1	tr	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	0.1	0.1	
63	1554	(E)-nerolidol	nd	tr	nd	0.2	0.5	nd	tr	tr	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	
64	1574	spathulenol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	
65	1580	caryophyllene oxide	nd	nd	nd	nd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.3	0.1	
66	1673	alpha-bisabolol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	tr	tr	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	tr	
67	1790	nootkatone	nd	nd	nd	1.1	3.1	nd	nd	0.2	nd	0.1	nd	nd	nd	0.1	nd	
Sum of compounds total identified			99.9	98.8	96.3	98.8	98.3	96.2	99.9	96.6	99.1	98.6	99.2	99.6	90.9	90.6	90.6	

— commercial samples. without information of yields %

* KI: Kovats index on DB5 column nd: not detected

sd: steam distillation

hd: hydrodistillation

cp: cold pressing

Table 4- Relative amounts and enantiomeric excess (*ee*) of optical isomers (*S*)-(-)-limonene and (*R*)-(+)-limonene, (*R*)-(-)-linalool and (*S*)-(+)-linalool in essential oils of *Citrus*, through GC/MS analysis.

	Plant species	<i>Citrus aurantium</i> Lineu						<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck				<i>Citrus reticulata</i> Blanco			
	Plant part	leaves			pericarp			leaves		pericarp		pericarp			
	Code sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
% Enantiomeric distribution	(<i>S</i>)-(-)-limonene	22	31	29	6	6	13	40	9	1	5	4	4	5	8
	(<i>R</i>)-(+)-limonene	78	69	71	94	94	87	60	91	99	95	96	96	95	92
	<i>ee</i> * limonene	56	38	42	88	88	74	20	82	98	90	92	92	90	84
	(<i>R</i>)-(-)-linalool	62	59	64	63	63	60	11	13	7	7	1	24	4	10
	(<i>S</i>)-(+)-linalool	38	41	36	37	37	40	89	87	93	93	99	76	96	90
	<i>ee</i> * linalool	24	18	28	26	26	20	78	74	86	86	98	52	92	80

**ee* enantiomeric excess

Table 5- Chemical composition of *Citrus aurantium* hydrolate through GC/MS analysis.

peak number	KI* _{DB5}	compound	%	peak number	KI* _{DB5}	compound	%
1	926	alpha-thujene	tr	38	1276	trans-carvone oxide	1.7
2	934	alpha-pinene	0.1	39	1285	linalool oxide acetate	1.2
3	969	sabinene	0.1	40	1290	tymol	1.2
4	972	beta-pinene	tr	41	1293	perilla alcohol	1.2
5	985	beta-myrcene	0.1	42	1325	limonene aldehyde	0.7
6	999	octanal + alpha-phellandrene	1.0	43	1336	trans-carveol acetate	0.9
7	1007	delta 3 carene	tr	44	1340	alpha-terpineol acetate	tr
8	1030	limonene	0.8	45	1352	citronellol acetate	0.1
		(S)-(-)-limonene 8.0%		46	1360	cis-carveol acetate	0.8
		(R)-(+)-limonene 92.0%		47	1364	neryl acetate	0.3
9	1037	(Z)-beta-ocimene	0.4	48	1373	geranyl acetate	0.8
10	1047	(E)-beta-ocimene	0.1	49	1389	beta-elemene	0.3
11	1059	gamma-terpinene	0.2	50	1398	dodecanal	0.1
12	1071	cis-linalool oxide	7.6	51	1408	(E)-caryophyllene	tr
13	1085	terpinolene	tr	52	1443	beta-farnesene	1.3
14	1086	trans-linalool oxide	5.1	53	1478	germacrene D	0.1
15	1095	linalool	10.1	54	1489	valencene	tr
		(R)-(-)-linalool 78.0%		55	1490	alpha-selinene	0.1
		(S)-(+)-linalool 22.0%		56	1498	alpha-(E,E)-farnesene	tr
16	1110	nonanal	0.1	57	1499	beta-bisabolene	0.2
17	1133	cis-limonene oxide	1.2	58	1510	alpha-cadinene	0.1
18	1135	trans-limonene oxide	0.1	59	1554	(E)-nerolidol	0.5
19	1146	isopulegol	1.9	60	1574	spathulenol	0.9
20	1149	citronellal	tr	61	1580	caryophyllene oxide	0.2
21	1174	terpin-4-ol	2.2	62	1673	alpha-bisabolol	tr
22	1186	alpha-terpineol	10.1	63	1790	nootkatone	17.6
23	1190	decenal	1.9	Sum of compounds total identified			92.6
24	1195	n-dodecane	0.8				
25	1201	n-decanal	0.5				
26	1210	octanol acetate	0.4				
27	1215	trans-carveol	1.4				
28	1224	nerol	1.7				
29	1227	cis-carveol	2.5				
30	1235	pulegone	1.4				
31	1238	neral (E-citral)	0.8				
32	1239	carvone	1.1				
33	1250	geraniol	4.0				
34	1255	linalyl acetate	0.1				
35	1266	geranial (Z-citral)	3.2				
36	1268	perilla aldehyde	0.1				
37	1270	isopulegol acetate	1.2				
38	1276	trans-carvone oxide	1.7				

* KI: Kovats index on DB5 column tr: trace (<0.1%)

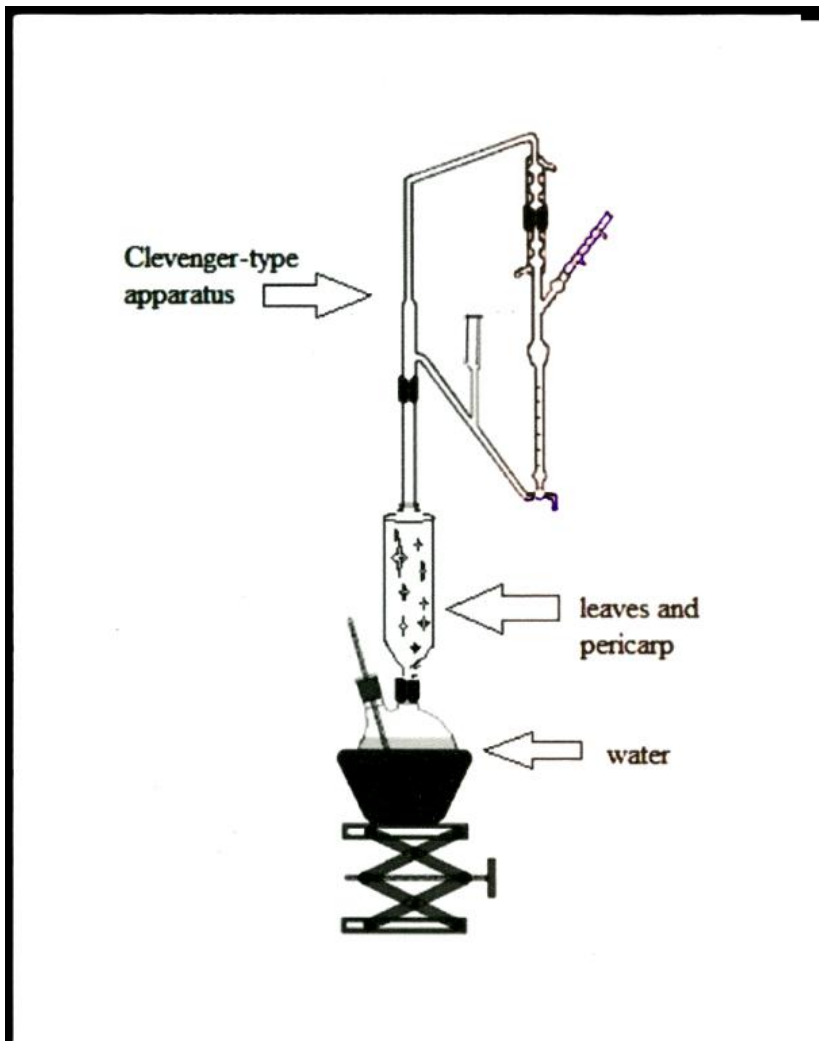


Figure 1- Modified clevenger-type apparatus.

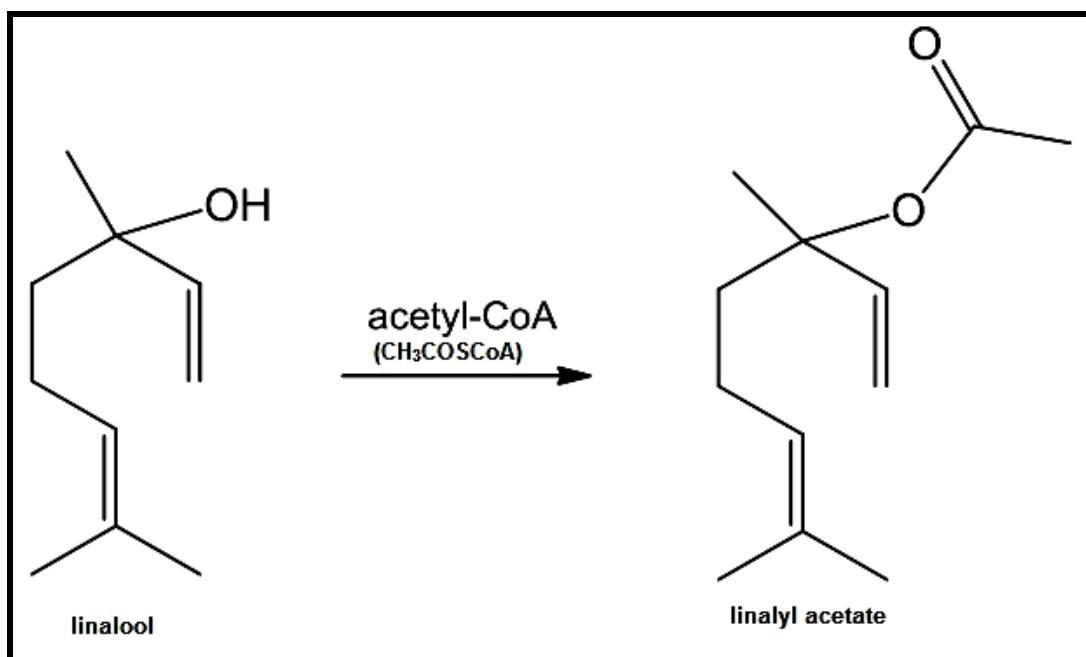


Figure 2- Biotransformation step of linalool to linalyl acetate by acetylation co-enzyme acetyl-CoA (CH₃COSCoA) [68].

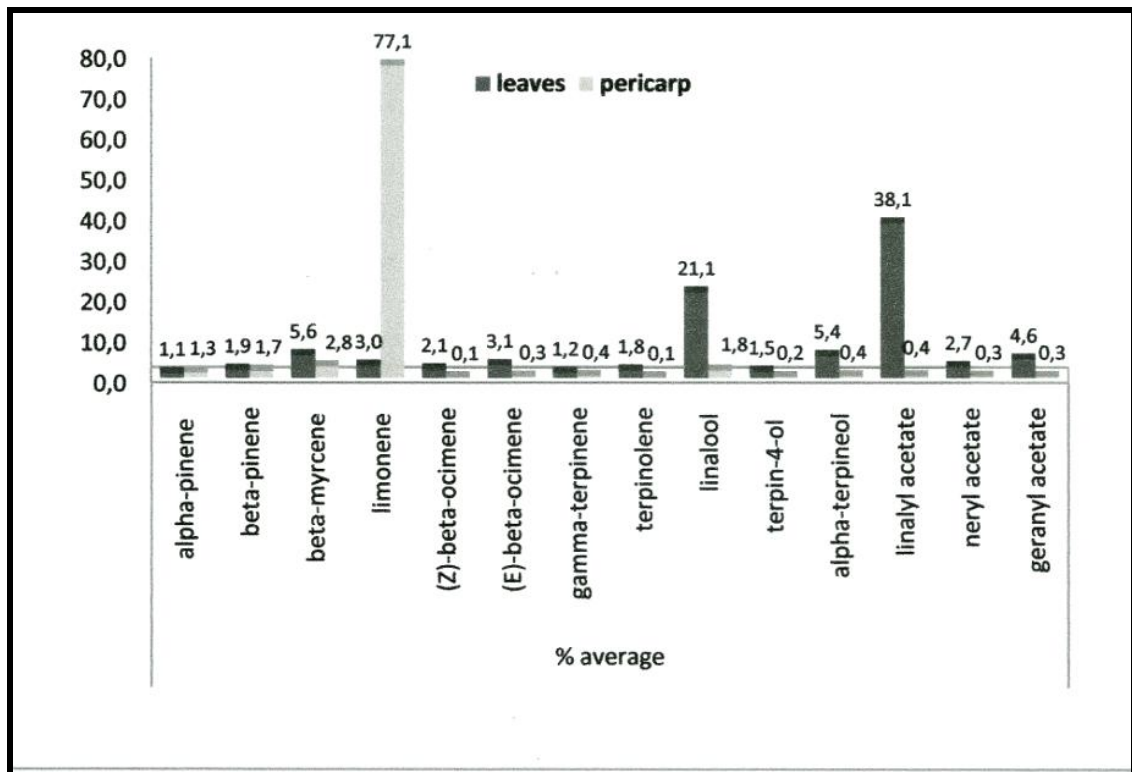


Figure 3-Average percentage of chemical components in EO of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* from leaves and pericarp.