

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO BIOLÓGICO PARA A AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL ANSOLÍTICO DE PLANTAS DO CERRADO UTILIZANDO O PEIXE  
*DANIO RERIO***

PÂMELA NASCIMENTO MENEZES DE OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PADRONIZAÇÃO DE MODELO BIOLÓGICO PARA A AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANSIOLÍTICO DE PLANTAS DO CERRADO UTILIZANDO O PEIXE *DANIO RERIO*

Pâmela Nascimento Menezes de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Carla Patrícia Bejo Wolkers

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Serra

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro – 2020

## RESUMO

No Brasil, estima-se que aproximadamente 10% da população apresente algum tipo de transtorno de ansiedade, sendo o índice quase três vezes maior que da população mundial. Em virtude da grande quantidade de efeitos colaterais observados nos tratamentos convencionais para estes transtornos, os tratamentos complementares e fitoterápicos ganham destaque. O presente estudo objetivou testar um protocolo para avaliação do potencial ansiolítico de substâncias extraídas de plantas medicinais. Para isto, aplicou-se no peixe *Danio rerio* o protocolo de estresse imprevisível, durante sete dias, para indução de estado ansioso, sendo avaliado o potencial ansiolítico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* por meio do teste de escototaxia. O protocolo de estresse imprevisível não alterou o tempo total gasto pelo peixe no compartimento branco. Além disso, os tratamentos com clonazepam e óleo essencial também não influenciaram a variável avaliada no tempo total de análise. Com relação ao número de cruzadas entre os compartimentos branco e preto, não houve diferença entre os peixes que foram submetidos ao protocolo de estresse imprevisível e testemunha, e entre os peixes tratados com clonazepam e óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. A latência para entrada no compartimento branco, também não diferiu significativamente entre os tratamentos. Em conclusão, o teste de escototaxia não se mostrou eficiente para a avaliação da ansiedade na espécie *D. rerio* já que não foi possível observar nenhuma preferência dos animais estudados com relação ao ambiente claro e escuro. É possível que animais criados em ambientes excessivamente claros e iluminados não demonstrem a mesma preferência pelo compartimento escuro, o que pode inviabilizar o uso do teste para a avaliação da ansiedade.

**Palavras chave:** Ansiedade; *Cymbopogon citratus*; Escototaxia; Estresse imprevisível.

## ABSTRACT

It is estimated that approximately 10% of Brazilian population has some type of anxiety disorder; an index three times higher than the world's population. Due to the large amount of side effects observed in conventional treatments for these disorders, complementary and phytotherapeutic treatments are highlighted. The present study aimed to evaluate the anxiolytic potential of the essential oil of *Cymbopogon citratus*, that was applied to the fish *Danio rerio*, assessed through the scototaxis protocol. Regarding the number of crosses between the white and black compartments, no change was observed among fish that were subjected to the unpredictable stress and control protocol or among fish treated with clonazepam and *Cymbopogon citratus* essential oil. The latency for entering the white compartment also showed no significant difference between treatments. In conclusion, the scototaxis test was not efficient for the evaluation of anxiety in the species *Danio rerio*, since it was not possible to observe any preference of the animals studied in relation to the light or dark environment. This way, it is possible that animals reared in excessively light and bright environments do not show the same preference for the dark compartment, which can make the test unfeasible for the assessment of anxiety.

**Keywords:** Anxiety; *Cymbopogon citratus*; Scototaxis; Unpredictable stress.

## **LISTAS DE FIGURAS**

FIGURA 1- Desenho esquemático dos procedimentos experimentais.....	12
FIGURA 2- Porcentagem de tempo gasto no compartimento branco de peixes submetidos ao teste de escototaxia.....	13
FIGURA 3 - Porcentagem de tempo gasto no compartimento branco de peixes submetidos ao teste de escototaxia estratificado por faixa de tempo.....	14
FIGURA 4- Número de cruzadas entre os compartimentos branco e preto de peixes submetidos ao teste de escototaxia.....	14
FIGURA 5- Latência (s) para a entrada no compartimento branco.....	15

## **LISTAS DE TABELA**

TABELA 1 - Linha do tempo da aplicação dos estressores.....	11
---	----

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>9</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>9</b>
3.1. Animais.....	9
3.2. Coleta da planta e extração do óleo essencial .....	10
3.3. Procedimentos experimentais .....	10
3.4. Análise de dados .....	12
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é um fenômeno de caráter fisiológico que tem como principal objetivo garantir a sobrevivência do animal. A definição de um conceito de ansiedade foi considerada impossível por alguns autores (BERNIK, 1999) e tem sido alvo de discussões no decorrer da história. Na segunda metade do século XIX, Darwin atribuiu a ansiedade a uma evolução do comportamento emocional dos homens (BRANDÃO et al., 2003). Mais tarde, em 1894, Freud associou a ansiedade a um fenômeno instintivo de conservação do indivíduo, sendo uma resposta herdada filogeneticamente, atribuindo ainda sua origem ao trauma do nascimento e ao medo da castração. Freud a classificava em duas categorias, a ansiedade normal e a neurótica, sendo a primeira uma resposta à percepção de um perigo real e eminente, como a morte, e a segunda à percepção de uma ameaça imaginária, não real (para revisão ver COSTA; BORUCHOVITCH, 2004). Logo depois, o psicólogo May (1980) descreveu a ansiedade como uma relação entre o indivíduo, o ambiente ameaçador e as respostas neurofisiológicas a esta relação (MAY, 1980 apud BRAGA et al., 2010). Trata-se, portanto de uma resposta adaptativa do organismo às ameaças futuras do ambiente, o que permite uma maior resiliência aos perigos que o ambiente possa apresentar.

Apesar de ser um evento natural desencadeado pelo sistema nervoso central, a ansiedade pode se tornar patológica, sendo, neste caso, considerada um transtorno mental. Quando patológica, as respostas fisiológicas e comportamentais ocorrem sem haver um perigo eminente ou, ainda, a resposta ao estímulo é exagerada, não condizendo com a ameaça identificada, podendo apresentar uma duração prolongada. Neste contexto, a ansiedade torna-se prejudicial ao indivíduo, desencadeando perda na qualidade de vida, interferindo no estado emocional e atrapalhando as atividades do cotidiano (CASTILLO et al., 2000; BRAGA et al., 2010).

A neurobiologia da ansiedade ainda é pouco compreendida devido à sua alta complexidade. A geração do sentimento da ansiedade tem relação com o sistema de defesa do organismo, sendo possível identificar diversos circuitos neurais envolvidos nesta resposta. Em mamíferos, de modo geral, dois sistemas principais de defesa estariam envolvidos na geração da ansiedade, o Sistema Cerebral de Defesa (SCD) e o Sistema de Inibição do Comportamento (SIC). O SCD é formado

por importantes regiões encefálicas, a amígdala, o hipotálamo medial (HM) e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A amígdala apresenta um papel significativo, já que possui uma ligação com o neocórtex e está profundamente relacionada com o sistema límbico, responsável pelas emoções; ela irá classificar o tipo e intensidade do estímulo, enviando o resultado ao HM e MCP, os quais desencadearão a resposta fisiológica e comportamental adequada, incluindo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com o estímulo à produção de cortisol e catecolaminas. Já o SIC tem como principal substrato neural o sistema septo-hipocampal, responsável por identificar situações ameaçadoras ou novas, inibindo o comportamento e aumentando o estado de vigília (GRAEFF, HETEM, 2004; SILVA, 2001 apud BRAGA et al., 2010).

A ativação destes sistemas de forma patológica desencadeia quatro manifestações: as cognitivas, responsáveis pelos pensamentos apreensivos, causando sentimentos de irritabilidade, insegurança, tensão, entre outros; as somáticas, responsáveis pelos sintomas físicos ou hiperatividade autônoma, hiperventilação e tensão muscular; as comportamentais, responsáveis pela insônia, agitação, comportamentos repetitivos, entre outros; e as emocionais, que causam sensação de desconforto e desprazer (BRAGA et al., 2010). Os sintomas apresentados em quadros patológicos de ansiedade podem ser desencadeados por alterações em diferentes neurotransmissores de acordo com o tipo de transtorno de ansiedade em que se enquadram. De acordo com o Código Internacional de Doenças 10 (CID 10), os transtornos de ansiedade podem ser classificados em cinco tipos: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos fóbicos e transtorno de estresse pós-traumático, sendo a noradrenalina, serotonina e GABA os neurotransmissores envolvidos (BRAGA et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), 3,6% da população mundial apresenta algum tipo de transtorno de ansiedade, acometendo homens e mulheres de diversas faixas etárias. Este índice se torna ainda maior quando se analisa a população da América que atinge 5,6%. Entretanto, o dado mais preocupante é observado no Brasil, onde atinge 9,3% da população, o maior índice registrado em todo o mundo.

Comumente, o tratamento dos transtornos de ansiedade é feito com o uso de medicamentos da categoria dos benzodiazepínicos, que embora sejam eficazes,



apresentam um grande número de efeitos colaterais e por esse motivo 43% das pessoas afirmam necessitar de alguma forma de tratamento complementar (SOUSA et al., 2008).

Compostos naturais extraídos de plantas medicinais que tem efeitos sobre o comportamento e o humor vêm sendo cada vez mais procurados para auxiliar no tratamento destes transtornos (SOUSA et al., 2008). O Brasil, devido a sua biodiversidade, apresenta grande potencial na exploração destes compostos, e esta área do conhecimento vem sendo explorada pela ciência nos últimos anos. Apesar do crescente conhecimento sobre a aplicação de fitoterápicos no tratamento da ansiedade (BORTOLIZZI; SCHMITT; MUZUR, 2020), muitas vezes, as plantas acabam sendo utilizadas sem indicação científica adequada (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001), levando ao uso baseado principalmente em saberes populares, que podem levar à utilização equivocada, imprimindo possíveis riscos à saúde do paciente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Neste contexto, é essencial a ampliação de estudos buscando compreender os mecanismos fisiológicos associados a estes transtornos, bem como encontrar alternativas para o tratamento, principalmente por meio do estudo de novos princípios ativos que podem, futuramente, ser explorados pela indústria farmacêutica de fitoterápicos. Atualmente, o modelo animal mais utilizado para estudos associados aos mecanismos de gênese dos transtornos de ansiedade e avaliação de novas moléculas para seu tratamento são os roedores (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETTO FILHO, 2001). Entretanto, devido às dificuldades no uso destes animais, incluindo o alto custo, bem como a necessidade de amplos espaços para sua manutenção, modelos alternativos tem ganhado destaque. O *zebrafish* (*Danio rerio*) é uma espécie cada vez mais presente do meio científico em substituição ou complementação aos modelos animais mamíferos. Esse animal possui grande semelhança genética com o ser humano (70%), sendo fisiologicamente homólogo, além de ter baixo custo, baixa necessidade de manutenção e fácil reprodução, sendo uma ótima alternativa para as pesquisas atuais, considerando a restrição de recursos financeiros (MONTALTI, 2015).

Embora existam estudos demonstrando indução de quadros de ansiedade utilizando o *D. rerio* (MAXIMINO et al., 2010; PIATO et al., 2011), não há um protocolo padronizado para o estudo de substâncias com potencial ansiolítico neste

modelo biológico. Sendo assim, o presente estudo objetiva testar um protocolo para avaliação o potencial ansiolítico de substâncias extraídas de plantas medicinais. Para isso, foi escolhida uma planta com efeito ansiolítico já descrito em modelos roedores, o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (BLANCO et al., 2009; COSTA et al., 2011). O *C. citratus* é muito utilizado pela medicina popular, principalmente nos países tropicais, onde é nativo, para o tratamento de distúrbios nervosos. Estudo com camundongos demonstra que a aplicação do óleo essencial desta planta reduz a ansiedade, além de funcionar como sedativo e anticonvulsivo (BLANCO et al., 2009).

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi testar um protocolo para avaliação o potencial ansiolítico de substâncias extraídas de plantas medicinais utilizando o peixe *D. rerio* como modelo biológico.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados 32 juvenis de *zebrafish*, de ambos os sexos, obtidos a partir de criadores de peixes ornamentais, distribuídos em dois experimentos. Antes do início dos experimentos, os peixes foram mantidos em aquários de 12 L (1 peixe por litro) durante, pelo menos, duas semanas, para adaptação às condições laboratoriais. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 h (dia subjetivo) e com temperatura de 25°C. A iluminação foi promovida por sistema composto por temporizador e lâmpada fluorescente 20 W de intensidade luminosa 1200 lx. O oxigênio dissolvido, através de sistema aerador, foi mantido em ~ 8 mg/L e o pH da água na faixa de 6,5 a 8. Oxigênio dissolvido e pH foram mensurados diariamente por meio de oxímetro e pHmetro, respectivamente. A limpeza dos tanques e alimentação foram realizadas diariamente utilizando ração comercial contendo 28% de proteína bruta e 3.100 kcal de energia digestível por quilo.

### 3.2. Coleta da planta e extração do óleo essencial

Amostras da planta *Cymbopogon citratus* foram coletadas de matrizes existentes no CT-Infra I da Universidade Federal de Uberlândia - *Campus* Pontal e previamente identificadas pela botânica xxx. Inicialmente, foi realizado o processo de secagem, deixando a amostra em ambiente seco e escuro por aproximadamente 24 horas. Com o auxílio de uma tesoura, a amostra foi cortada em pedaços menores, a fim de facilitar a pesagem e aumentar a superfície de contato com o balão volumétrico no processo de fervura. Após, pesou-se 30 g da amostra e o conteúdo foi adicionado em um balão volumétrico de 1000 mL, e adicionou-se água. Por fim, o balão foi colocado no destilador tipo *Clevenger*. Para realizar a extração do óleo essencial optou-se pela técnica de extração de destilação por arraste a vapor. Para a retirada do óleo, quando atingida a temperatura necessária, utilizou-se um tubo de ensaio e uma pipeta descartável. O material coletado foi armazenado no congelador para manter suas características.

### 3.3. Procedimentos experimentais

Após o período de aclimação às condições experimentais, os peixes *D. rerio* de três aquários (n=8) foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível adaptado do estudo de Piato et al. (2011) (Grupos Experimentais), enquanto os peixes de um aquário (n=8) foram mantidos nas mesmas condições experimentais sem a aplicação dos estressores (Controle). Os grupos experimentais foram submetidos durante sete dias, duas vezes ao dia, a um dos seguintes estressores (Tabela 1): estresse de restrição, que consiste em manter os animais com espaço de natação restrito por 90 minutos; aquecimento da água à temperatura acima de 33°C por 30 minutos; isolamento social, mantendo os animais sozinhos por 45 minutos em Becker de 250 mL; resfriamento da água a 23°C por 30 minutos; aglomeração de 10 animais por 50 minutos em Becker de 250 mL; exposição aérea utilizando rede de captura por 2 minutos; e perseguição por 8 minutos com rede de captura. A ordem em que os estressores foram aplicados foi aleatória, escolhida por meio de sorteio.

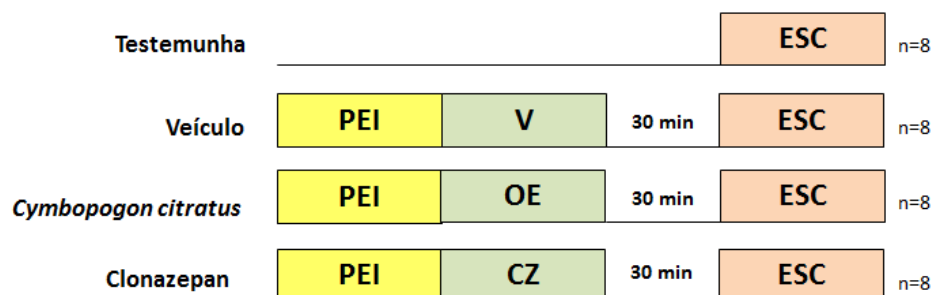
Vinte quatro horas depois da aplicação do último estressor, os peixes foram tratados, por meio de injeção intraperitoneal, com veículo (0,01% (v/v) *polyoxyethylene sorbitan monooleate* (Tween 80<sup>®</sup>, Sigma–Aldrich) (n=8), óleo essencial de *C. citratus* (OE: 10 mg/kg, n=8) (COSTA et al., 2011) ou clonazepam (CZ: 0,05 mg/kg: Rivotril<sup>®</sup>, Roche, Brazil, n=8) (MAXIMINO et al., 2011). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram colocados, individualmente, no aparato de escototaxia, para avaliação dos níveis de ansiedade. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições experimentais, sem, contudo, passar pelo protocolo de estresse imprevisível, sendo, também, colocados no aparato de escototaxia para avaliação dos níveis de ansiedade basais.

Tabela 1. Linha do tempo da aplicação dos estressores

Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Exposição aérea 9:30	Aquecimento da água 8:30	Perseguição 10:00	Isolamento social 8:00	Troca de tanque 9:00	Resfriamento da água 9:30	Aglomerção 8:30
Estresse de restrição 16:00	Resfriamento da água 17:00	Troca de tanque 17:30	Perseguição 16:30	Aquecimento da água 17:00	Aglomerção 16:00	Estresse de restrição 15:30

Fonte: As autoras.

O teste de escototaxia, baseado no protocolo desenvolvido por Maximino et al. (2010; 2011), consistiu em introduzir o peixe no compartimento central de uma caixa metade preta/metade branca. Após um período de 5 minutos de habituação, o compartimento central foi aberto, permitindo que o peixe explorasse o tanque por 15 minutos. O número e a duração de entradas em cada compartimento (preto ou branco) foram filmados e contabilizados, servindo de indicativo de ansiedade. O resumo dos procedimentos experimentais é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Desenho esquemático dos procedimentos considerando os quatro grupos experimentais. PEI: Protocolo de estresse imprevisível; V: veículo (0.01% (v/v) tween 80); OE: óleo essencial (10 mg/kg); CZ: clonazepan (0,05 mg/kg); ESC: teste de escototaxia; min: minutos. *Fonte: As autoras.*

### 3.4. Análise de dados

Os dados de tempo total gasto no ambiente branco, número de cruzadas entre compartimentos branco e preto, e latência para entrada no compartimento branco foram submetidos à análise de normalidade (teste Kolmogorov–Smirnov,  $P > 0,05$ ) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene,  $P > 0,05$ ). Após considerados normais e homogêneos, os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (One way ANOVA), com nível de significância de  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

O protocolo de estresse imprevisível não alterou o tempo total gasto pelo peixe *D. rerio* no compartimento branco, e os tratamentos com clonazepam e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* também não influenciaram esta variável no tempo total de análise ( $F_{3,24} = 0,376$ ;  $P = 0,771$ ) (Figura 2). Além disso, não houve diferença significativa no tempo gasto no compartimento branco quando analisado por período (0 - 5, 5 - 10 e 10 - 15 minutos) ( $F_{6,72} = 0,586$ ,  $P = 0,740$ ) (Figura 3).

Com relação ao número de cruzadas entre os compartimentos branco e preto, não foi observada alteração entre os peixes que foram submetidos ao protocolo de estresse imprevisível e testemunha, e entre os peixes tratados com clonazepam e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* ( $F_{3,24} = 0,055$ ;  $P = 0,982$ ) (Figura 4). A latência

para entrada no compartimento branco também não diferiu significativamente entre os tratamentos ( $F_{3, 24} = 0,520$ ;  $P = 0,673$ ) (Figura 5).

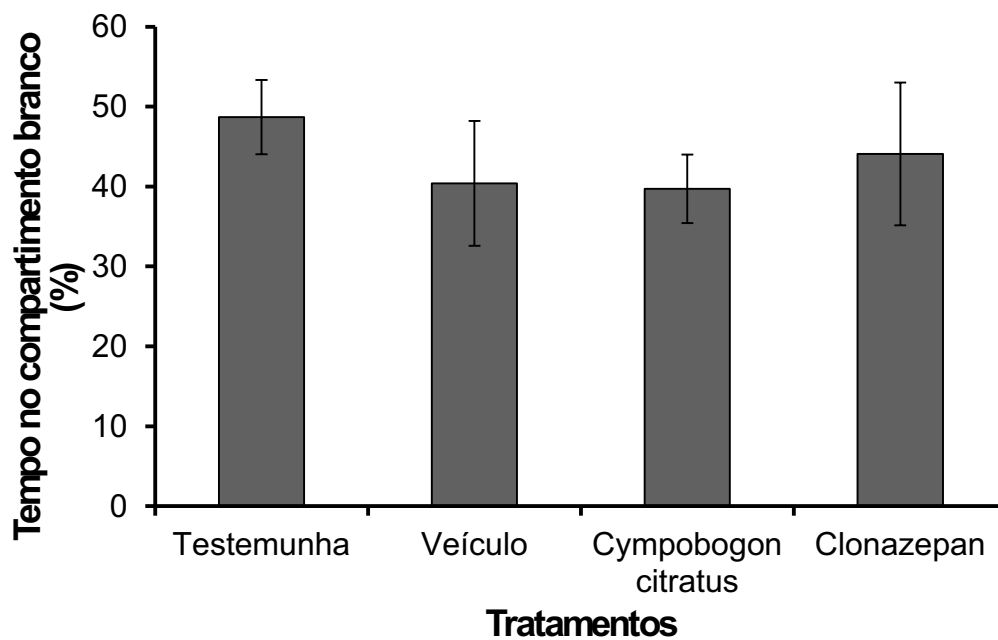


Figura 2. Porcentagem de tempo gasto no compartimento branco de peixes submetidos ao teste de escototaxia. *Fonte: As autoras.*

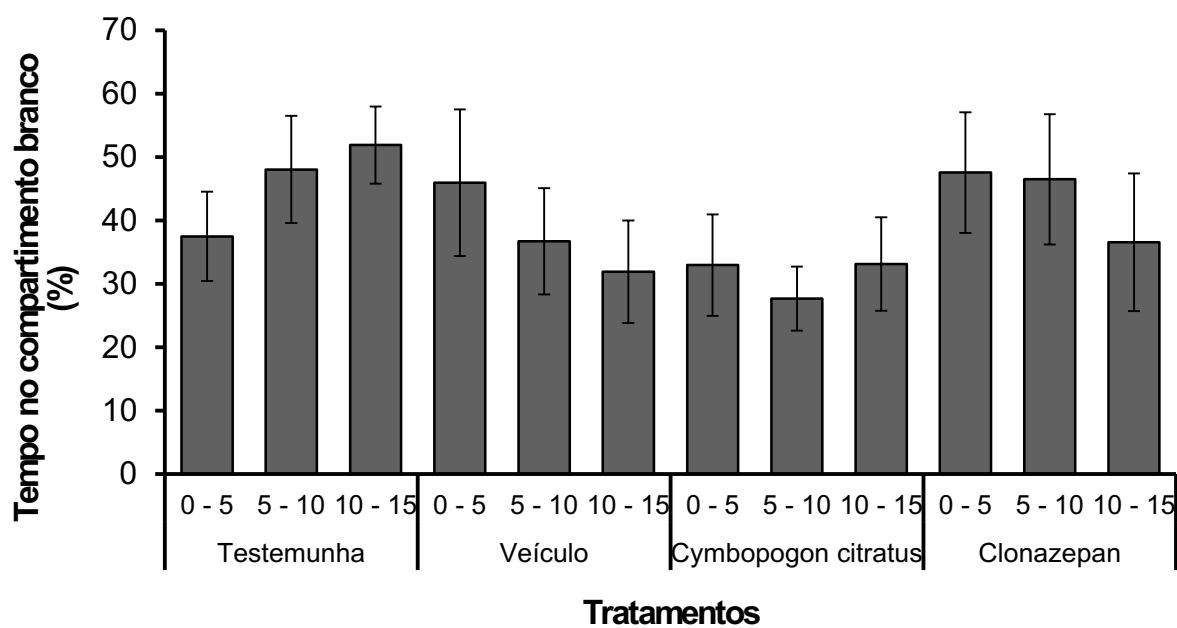


Figura 3. Porcentagem de tempo gasto no compartimento branco de peixes submetidos ao teste de escototaxia estratificado por faixa de tempo (0 – 5, 5 – 10, 10 – 15 minutos). *Fonte: As autoras.*

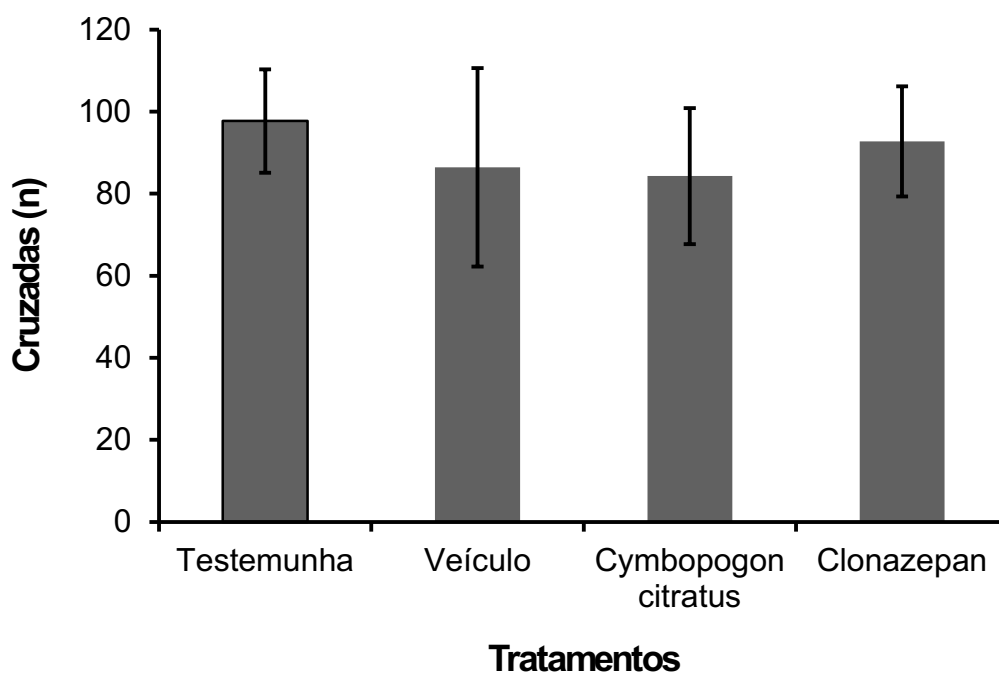


Figura 4. Número de cruzadas entre os compartimentos branco e preto de peixes submetidos ao teste de escototaxia. *Fonte: As autoras.*

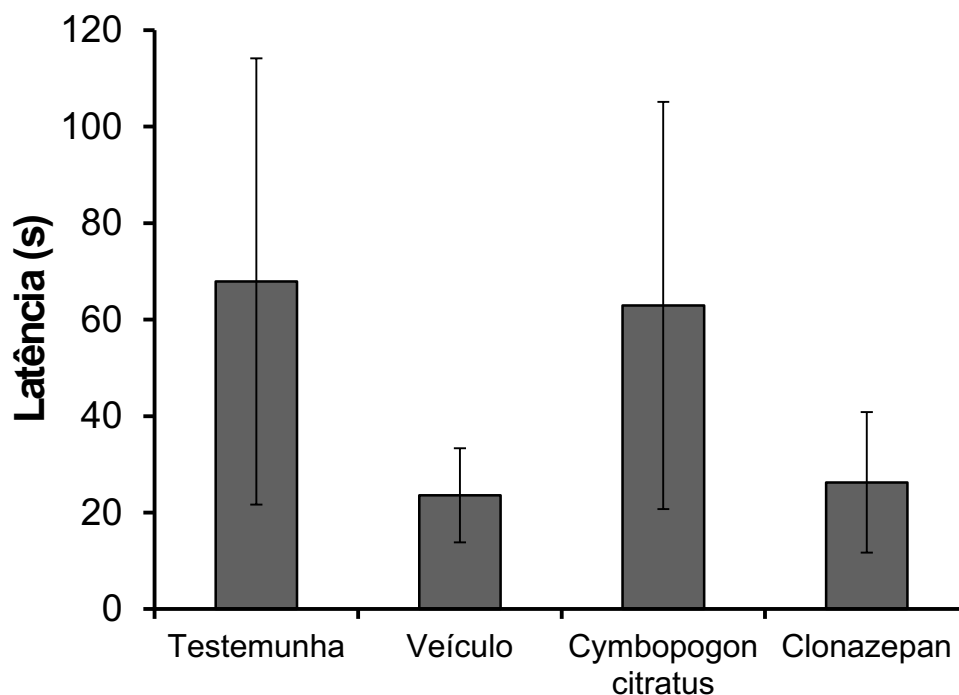


Figura 5. Latência (s) para a entrada no compartimento branco. Fonte: As autoras.

## 5. DISCUSSÃO

O protocolo de estressores imprevisíveis crônicos, quando aplicado em *zebrafish* (*D. rerio*), possibilita a avaliação de respostas fisiológicas, incluindo comportamentos e alterações bioquímicas, que podem estar associados à ansiedade, de maneira similar ao encontrado em estudos empregando roedores e permitindo um paralelo com as respostas observadas em seres humanos submetidos a condições correlatas. De acordo com estudo realizado por Piato et al. (2011), sinais de ansiedade já podem ser observados em *D. rerio* submetidos a estressores imprevisíveis, duas vezes ao dia, durante 7 e 14 dias. O presente estudo empregou um protocolo de estresse imprevisível baseado naquele descrito no estudo de Piato et al. (2011), durante sete dias, e avaliou os níveis de ansiedade dos animais no oitavo dia, por meio do teste de escototaxia. Os resultados demonstraram que não houve sinais de ansiedade nos peixes submetidos ao protocolo de estressores imprevisíveis quando comparados aos peixes não submetidos aos estressores.



A ausência de alterações comportamentais nos peixes submetidos ao protocolo de estressores imprevisíveis pode estar associada ao teste de escototaxia utilizado no presente estudo. No estudo de Piato et al. (2011), para a avaliação do estado ansioso, foram empregados os testes de campo aberto (locomoção, posição e coesão de cardume) e coloração da pele. O teste de campo aberto tem como pressuposto a tendência do peixe em se manter no fundo do aquário, onde se sente mais protegido e o paradigma da exploração ambiental. De maneira análoga, o teste de escototaxia aplicado no presente estudo, impõe aos peixes um paradigma similar: exploração ambiental x neofobia, entretanto, o teste da escototaxia depende de outro atributo, a preferência ambiental do animal. O teste de escototaxia foi criado por Bourin e Hascoët (2003) para roedores e adaptado para o uso em peixes por Maximino et al. (2007) e avalia a preferência do animal a dois compartimentos, um branco e um preto. O pressuposto deste teste é baseado no comportamento natural do *D. rerio* adulto em um ambiente novo; neste contexto, o animal tem preferência pelo compartimento escuro, pois representa um ambiente mais protegido (SERRA et al., 1999), ao mesmo tempo em que ele sofre o paradigma de querer explorar o ambiente novo, fazendo com que ele intercale os compartimentos preto/branco, correlacionando o comportamento exploratório com a neofobia. A diminuição da atitude de forrageamento indica apreensão, que é uma resposta desencadeada pelo sistema de inibição comportamental, o qual está ligado diretamente a respostas de “medo” e “ansiedade”. Com isso, o tempo gasto em cada um dos compartimentos indica o nível de aversão ao ambiente novo (MAXIMINO et al., 2010).

Para que o teste de escototaxia seja eficiente na avaliação da ansiedade, o pressuposto básico de preferência pelo ambiente escuro deve ser atendido, permitindo que alterações nesta preferência sejam utilizadas como indicadores do estado de ansiedade do animal. Estudos utilizando o teste de escototaxia para a avaliação da ansiedade demonstram que o *D. rerio*, em condições controle, permanece aproximadamente 80% do tempo no compartimento escuro do aparato (MAXIMINO et al., 2011; 2013; 2014). Entretanto, no presente estudo esta preferência pelo compartimento escuro e aversão ao ambiente claro não foi observada. De fato, os peixes “testemunha” permaneceram em torno de 50% do tempo no compartimento branco, não demonstrando, portanto, preferência clara por nenhum dos ambientes no aparato teste.

O presente estudo utilizou peixes *D. rerio* adultos e selvagens, sendo mantidos em aquários sem enriquecimento ambiental durante o período experimental, sendo que estes aquários foram envoltos com papel branco nas duas laterais e fundo. É possível que o ambiente claro em que os animais foram mantidos em laboratório possa ter influenciado em sua resposta comportamental ao aparato. Peixes mantidos em ambientes claros tendem a sofrer agregação dos melanossomos dos melanócitos, tornando a pele mais clara do que animais mantidos em ambientes escuros. Estudos indicam que este processo de camuflagem está ligado diretamente aos circuitos neurais de liberação de corticotrofina,  $\alpha$ -MSH e noradrenalina, os quais podem influenciar a dispersão do pigmento nos melanócitos, dependendo da quantidade de luz ambiental (WAGLE; MATHUR; GUO, 2011).

Em larvas de *D. rerio*, foi demonstrado que a corticotrofina é um regulador essencial do mecanismo de camuflagem, agindo na promoção da dispersão dos melanossomos, corpúsculos intracelulares que armazenam a melanina, em resposta ao escuro, e sofre *downregulation* na presença de luz. Além disso, foi demonstrado que a presença da *pomc* (pro-opiomelanocortina) também é necessária para a dispersão dos melanossomos em resposta ao escuro (WAGLE; MATHUR; GUO, 2011). Neste contexto, considerando a ausência de preferência pelo ambiente escuro apresentada pelos animais do presente estudo, o teste de escototaxia não se mostrou adequado para a análise da indução de ansiedade pelo protocolo de estressores imprevisíveis.

Outra diferença importante a ser levantada entre o teste de campo aberto aplicado por Piato et al. (2011) e de escototaxia de Maximino et al. (2010) é que o primeiro avaliou animais em grupos, enquanto o segundo avalia animais individualmente. O *D. rerio* é um peixe que naturalmente apresenta comportamento de cardume, preferindo nadar em grupo, o que é explorado no teste de coesão de cardume, pois a organização do grupo pode mudar com a identificação de uma ameaça no ambiente, como por exemplo, um predador (MILLER; GERLAI, 2007). Sendo assim, o comportamento expresso pelo peixe em grupo pode diferir daquele apresentado pelo organismo individualmente.

Embora o objetivo do presente estudo fosse testar um protocolo para avaliação do potencial ansiolítico de substâncias extraídas de plantas medicinais, tendo como base a eficiência do OE de capim-limão (*C. citratus*), a ausência de

preferência pelo compartimento claro ou escuro impediu a avaliação do estado de ansiedade. Todavia, foi observado que a aplicação do OE não promoveu alterações no comportamento exibido no aparato de escototaxia, o que poderia levar à conclusão de que este tratamento não influenciou nos níveis de ansiedade dos animais. Entretanto, os dados obtidos no presente estudo não são suficientes para suportar esta conclusão, já que foram detectados problemas metodológicos com o teste utilizado para avaliação de ansiedade.

De fato, nem mesmo o tratamento com clonazepan, uma droga reconhecidamente ansiolítica em dose já aplicada com sucesso em *D. rerio* (MAXIMINO et al., 2011), promoveu alterações no padrão comportamental avaliado pelo teste, sugerindo que o teste de escototaxia não foi eficiente para avaliação do estado de ansiedade dos animais.

O OE de *C. citratus* se mostra eficiente na redução da ansiedade em mamíferos, sendo que ratos e camundongos tratados de forma aguda com 1.0 g/kg de OE testados no aparato claro/escuro aumentaram significativamente seu tempo na porção clara do aparato, resposta essa similar a dos animais tratados com diazepam, droga com seu potencial ansiolítico já comprovado (BLANCO et al. 2009; COSTA et al. 2011). O mesmo foi encontrado em animais testados no labirinto de cruz elevada, que ao serem tratados com o OE passaram mais tempo nos braços abertos do aparato, o que indica um potencial ansiolítico do OE de *C. citratus* (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002).

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o teste de escototaxia não se mostrou eficiente para a avaliação da ansiedade na espécie *D. rerio* já que não foi possível observar nenhuma preferência dos animais estudados ao ambiente claro e escuro. É possível que animais criados em ambientes excessivamente claros e iluminados não demonstrem a mesma preferência pelo compartimento escuro, o que pode inviabilizar o uso do teste para a avaliação da ansiedade. Neste contexto, novos estudos utilizando o mesmo protocolo e aplicando outros testes de avaliação de ansiedade, como o teste de campo aberto, são necessários para avaliar o potencial ansiolítico de plantas medicinais.

## 7. REFERÊNCIAS

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

BERNIK, M. A. Ansiedade normal e patológica. **Benzodiazepênicos**, São Paulo: EDUSP. p. 59-68, 1999.

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

BORTOLIZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E., Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n.1, 2020.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 55-65, 2003.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, p. 93-100, 2010.

BRANDÃO, M. L.;VIANNA, D. M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 25, p. 36- 41, 2003.

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, n. 12, p. 1629-1633, 2002.

CASTILLO, A. R. GL; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G. G. Transtornos de ansiedade. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 22, p. 20-23, 2000.

COSTA, C. A. R. A.; KOHN, D. O.; LIMA, V. M.; GARGANO, A. C.; FLÓRIO, J. C.; COSTA, M. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 828-836, 2011.

COSTA, E. R.; BORUCHOVITCH, E. Compreendendo relações entre estratégias de aprendizagem e a ansiedade de alunos do Ensino Fundamental de Campinas. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 17, n. 1, p. 15-24, 2004.

GRAEFF FG, HETEM LAB. *Transtornos da Ansiedade*. São Paulo: Atheneu, p. 434, 2004.

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M.; DIAS, C. A. G. M.; GOUVEIA JR, A.; MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221-228, 2010.

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M.; MORAES, F. D.; OLIVEIRA, F. V. C.; TACCOLINI, I. B.; PEREIRA, P. M.; COLMANETTI, R.; LOZANO, R.; GAZOLLA, R. A.; TENÓRIO, R.; LACERDA, R. I. T.; RODRIGUES, S. T. K.; LAMEIRÃO, S. V. O. C.; PONTES, A. A.; ROMÃO, C. F.; PRADO, V. M.; GOUVEIA JR, A. A. Comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 20, p. 351-367, 2007.

MAXIMINO, C.; LIMA, M. G.; COSTA, C. C.; GUEDES, I. M. L.; HERCULANO, A. M. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 425-433, 2014.

MAXIMINO, C.; PUTY, B.; BENZECRY, R.; ARAÚJO, J.; LIMA, M. G.; BATISTA, E. J. O.; OLIVEIRA, K. R. M.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and parachlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83-97, 2013.

MAXIMINO, C.; SILVA, A.W.B.; GOUVEIA JR, A.; HECULANO, A.M.; Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624-631, 2011.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, p. 157-166, 2007.

MONTALTI, E. Zebrafish, um peixe com vocação para pesquisas genéticas e muito mais. **Boletim da FCM**, 16 de set. 2015. Disponível em: [https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/images/user228/\\_pesquisa\\_zebrafish.pdf](https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/images/user228/_pesquisa_zebrafish.pdf). Acesso em: 24 de nov. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. Depression and Other Common Mental Disorders. Geneva: WHO, 2017.

PIATO, A. L.; CAPIOTTI, K. M.; TAMBORSKI, A. R.; OSES, J. P.; BRACELLOS, BOGO, M. R.; LARA, D. R.; VIANNA, M. R.; BONAN, C. D. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 561-567, 2011.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Natural reference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1551-1553, 1999.

SILVA FT. Alterações psicológicas e fisiológicas em voluntários saudáveis submetidos à situação ansiogênica do “Vídeo-recorded Stroop color-word test”: efeitos do diazepam. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 223p. 2001.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas

medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WAGLE, M.; MATHUR, P.; GUO, S. Corticotropin-releasing factor critical for zebrafish camouflage behavior is regulated by light and sensitive to ethanol. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 214-224, 2011.