

1 UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

2
3 FACULDADE DE FARMÁCIA

4
5
6
7
8 PROJETO DE PESQUISA

9
10
11
12
13
14
15
16 Estudo psicobiológico de óleo essencial de espécies de *Citrus* (Rutaceae)

17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30 PESQUISADOR:

31 Prof^a Dr Renata Pereira
32 Limberger (Farmacêutica,
33 Faculdade de Farmácia/
34 UFRGS)
35
36
37
38
39

SUMÁRIO

pág.

RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1.1. O Estado Emocional de Ansiedade e o Hormônio Metalonina (MEL) .	13
1.2. O Estado Emocional de Estresse e o Hormônio Cortisol (COR)	18
1.3. Inter-relações Entre os Hormônios	20
1.4. Testes Psicológicos	24
2. OBJETIVO	27
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. METODOLOGIA	29
3.1. Local de Realização dos Ensaios	34
3.2. Aplicação dos Testes Psicológicos.....	35
3.3. Ambiente de Inalação (salas no InTCC).....	36
3.4. Cadastramento dos Voluntários Humanos.....	36
3.5. Critérios de Exclusão dos Voluntários	37
3.6. Critérios para Estabelecimento do Tamanho Amostral por Grupo	37
3.7. Maneira de Exposição dos Voluntários nos Grupos	37
3.8. Riscos da Pesquisa e Segurança Toxicológica.....	38
3.8.1. Testes Psicológicos	38
3.8.2. Substâncias inaladas	38
3.8.2.1. Grupo Teste, Óleos Essenciais	39
3.8.2.2. Grupo Placebo, Acetato de Octila	39
3.8.2.3. Grupo controle, Solução Salina	40
3.9. Coleta de Amostra Fluido Oral	40
3.10. Integralidade das Amostras de Fluido Oral	40
3.11. Dosagens dos Hormônios no Fluido Oral	41
4. DESCARTE DE MATERIAIS	41
5. ESTATÍSTICA	41
6. RESULTADOS FINAIS	42
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES - 2015/2017	43
8. TERMOS DE CONCORDÂNCIA DE CO-PARTICIPAÇÃO	44
9. TERMO DE DOAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	48
10. REFERÊNCIAS	49

RESUMO

A ansiedade é um dos mais freqüentes distúrbios do sistema nervoso central (SNC). Esta desordem é considerada um significativo problema de saúde pública, afetando um amplo segmento da população e ocasionando grandes gastos relacionados diretamente com os cuidados da doença e hospitalizações ou, indiretamente, como no caso de mortalidades e morbidades (DUPONT *et al.*, 1996; BALLENGER, 2000).

O estresse está envolvido na etiologia de inúmeras doenças, incluindo transtornos psiquiátricos (depressão, ansiedade, psicoses) (TSIGOS e CHROUSOS, 2002). Nele ocorre a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) que desencadeia respostas mais lentas e prolongadas, desempenhando um papel crucial na adaptação do organismo ao estresse.

Recentemente, a indústria farmacêutica tem investido na avaliação da utilização de odores naturais no estado emocional humano, tal como calma, alerta e humor. Óleos essenciais (OE) de diversas plantas têm sido estudados (WEBER e HEUBERGER, 2008). As bases neurais para propriedades psicofarmacológicas desses óleos voláteis são conhecidas, visto que os receptores do olfato estão diretamente ligados ao sistema límbico; o que justifica a associação de odores com a emoção.

Através deste projeto pretende-se fazer uma avaliação psicofarmacológica e psicológica em voluntários humanos através dos sintomas dos estados de ansiedade e estresse, visando auxiliar nos estudos da ação ansiolítica e anti-estresse do OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e do OE *Citrus aurantium* Lineu absorvidos pela via inalatória.

Esta avaliação será mediante testes psicológicos - aplicação e análise do Protocolo BAI, Inventário de Sintomas de Stress para Adultos de LIPP, Inventário de Ansiedade Traço e Estado (IDATE), Escala de Afeto Positivo e Afeto Negativo (PANAS), Questionário de Saúde Geral de Goldberg (QSG) - bem como através de coleta e análise no fluido oral dos hormônios melatonina, cortisol, chromogranin A (Cg A), testosterona, leptina, grelina, serotonina, prolactina, hormônio de crescimento (GH), adreno corticotropina (ACTH), neuropéptido K (NPK), TNF alfa.

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O uso dos óleos essenciais (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 *Citrus aurantium* em camundongos.

O OE de néroli, obtido por arraste de vapor das flores de *Citrus 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 benzodiazepínico alprazolam (CHEN et al., 2008). Relevantes também, foram os resultados obtidos por LEITE e colaboradores (2008), relativos à diminuição da ansiedade em ratos submetidos à inalação do OE de *Citrus aurantium* rico em limoneno e mirceno.

A ação ansiolítica do OE de *Citrus sinensis* foi estudada mediante ensaios com pacientes, que inalaram este aroma na ante-sala de consultório dentário (LEHRNER et al., 2000, 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 *Citrus 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 *Citrus 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 *Citrus sinensis*.

A ação ansiolítica do OE de *Citrus sinensis*, constatada através da redução do nível de Cortisol 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

1 apresenta ação ansiolítica, de alívio da tensão emocional (YAMADA *et al.*, 2005),
2 efeito sedativo e anticonvulsivante (LINCK *et al.*, 2009). A ação ansiolítica do linalol
3 também foi demonstrada pela administração tanto por via oral como por via
4 intraperitoneal em camundongos (ELISABETSKY *et al.*, 1995; BARROS e
5 ELISABETSKY, 1996; ELISABETSKY *et al.*, 1999; LINCK *et al.*, 2010).

6 Em 2010, um laboratório da Alemanha registrou e lançou no mercado o
7 medicamento Silexan®, cuja composição de cada cápsula varia de 80 mg ou 160 mg
8 de OE de lavanda *Lavandula officinalis*, contendo como principais constituintes o
9 linalol e o acetato de linalila (Silexan®, register 2009). Os resultados das
10 investigações evidenciaram a ação ansiolítica deste medicamento, ao ser ingerida 01
11 (uma) cápsula diariamente por período de 14 dias consecutivos, demonstrando que
12 Silexan® é tão eficaz quanto o benzodiazepínico lorazepam, em adultos com
13 desordem de ansiedade generalizada (WOELK e SCHLÄFKE, 2010; KASPER, 2013).
14 No estudo de SCHUWALD e colaboradores. (2013) foi demonstrado que o Silexan®,
15 atua de forma semelhante ao medicamento pregabalina, inibindo o influxo de cálcio
16 nos neurônios pré-sinápticos do hipocampo. Deste modo eles indicam seu uso clínico
17 por via oral para tratar ansiedade. A ação ansiolítica do Silexan® não se caracteriza
18 como a ação de um benzodiazepínico, o que pode explicar a ausência de tolerância,
19 dependência e síndrome de abstinência pelo OE de lavanda (SILENIEKS *et al.*,
20 2013). UEHLEKE e colaboradores (2012), em seus resultados, constataram a ação do
21 Silexan® também em situações de estresse pós-traumático, vindo ao encontro da
22 investigação de TODA e MORIMOTO (2008), relativa à redução do estresse em
23 voluntários humanos quando submetidos à inalação do óleo essencial de lavanda
24 (*Lavandula officinalis*). Uma das hipóteses do mecanismo da ação ansiolítica do OE
25 de *Lavandula officinalis* sustentam que este OE, através de seus componentes, é uma
26 potente droga ansiolítica, semelhante ao fármaco pregabalina, que reduz o influxo de
27 cálcio nos terminais pré-sinápticos em neurônios hiperexcitados, reduzindo desta
28 forma a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (SIMONNET,
29 2008; CARRASCO *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2013).

30 TODA e MORIMOTO (2008) constataram a redução do estresse em voluntários
31 humanos, através da medição do hormônio Cortisol no fluído oral, quando estes
32 voluntários foram submetidos à inalação do OE de lavanda (*Lavandula officinalis*). O
33 estudo experimental submetia os voluntários a uma situação de estresse e

1 imediatamente após, à inalação de um papel embebido com o OE durante 10 min.
2 Mesmo sugerindo a necessidade de aprofundamento nas investigações, os autores
3 concluíram que o OE de lavanda apresenta um efeito de alívio do estresse.

4 Os resultados de investigações mostram que alguns constituintes químicos dos
5 OE possuem ação diferenciada de acordo com a sua quiralidade, ou seja, além da
6 sensibilidade olfativa de fragrância diferenciada, os isômeros ópticos atuam
7 distintamente em relação à ansiedade (PADRAYUTTAWAT *et al.*, 1997; SMITH,
8 2009). NÖLDNER e colaboradores (2011) atribuem a ação terapêutica do
9 medicamento ansiolítico Silexan®, aos componentes quirais (*R*)-(-)-linalol e (*R*)-(-)-
10 acetato de linalila, presentes majoritariamente no OE de lavanda (*Lavandula*
11 *angustifolia*, sinônimo de *Lavandula officinalis*).

12 Os efeitos fisiológicos da inalação dos isômeros quirais (*R*)-(-)-linalol e (*S*)-(+)-
13 linalol, separadamente, foram estudados por HÖFERL e colaboradores (2006) através
14 dos parâmetros de avaliação do estresse. O estudo submeteu voluntários humanos a
15 estes componentes em concentração inferior ao limite de detecção olfativa no ar
16 inspirado, assim eles não percebiam o que estavam inalando. Durante a sessão de
17 teste, os voluntários não foram informados sobre qual dos componentes e em que
18 momento estavam sendo expostos a eles, evitando assim influências subjetivas de
19 suas expectativas. Os resultados indicaram claramente que ambos os isômeros
20 exercem efeitos no sistema endócrino, com a redução do nível do COR no fluido oral,
21 demonstrando um relaxamento. Neste estudo o isômero (*S*)-(+)-linalol demonstrou ser
22 um agente ativador, quando avaliado frente à atividade eletrodérmica, aumentando o
23 estado de alerta; e o isômero (*R*)-(-)-linalol demonstrou ser um agente de
24 relaxamento, quando avaliado frente à frequência cardíaca, provocando o alívio do
25 estresse. Em outros estudos CHIOCA e colaboradores (2013a, 2013b) observaram o
26 efeito ansiolítico do OE de *Lavandula angustifolia*, rico em linalol e acetato de linalila,
27 mesmo em camundongos com anosmia, ou seja, sem a percepção olfativa, levando à
28 conclusão de que sua ação dá-se sem levar em conta a sensação aromática.

29 NAKAMURA e colaboradores (2009) em relação ao (*R*)-(-)-linalol, e
30 YAMAMOTO e colaboradores (2013) em relação ao (*S*)-linalol, avaliaram o efeito da
31 sua inalação em ratos submetidos ao estresse por isolamento durante 2 hs.
32 Constataram alterações de parâmetros hormonais (corticosterona e
33 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 Corticosterona 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 benzodiazepínicos 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.

WOLFFENBÜTTEL (2014) demonstrou a ação ansiolítica e sedativa do OE de *Citrus sinensis* rico em (*R*)-(+)-limoneno através da inalação por camundongos.

Vários ensaios experimentais em voluntários humanos geraram resultados significativos em relação a diminuir os sintomas de ansiedade, estresse e em gerar

1 sensação de bem-estar. Na Tabela 1 apresentamos uma breve revisão destas
2 publicações, as quais utilizaram OE de *Citrus*, seus componentes linalol e limoneno,
3 *Lavandula officinalis* rica em linalol, em voluntários humanos.

4

5

6

7

8

1
2
3

Tabela 1 - Revisão bibliográfica das ações psicofarmacológicas atribuídas aos OE *Citrus*, *Lavandula officinalis* (rica em linalol e acetato de linalila) 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; parametros 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

Tabela 1 - continuação

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
(R)-(-)-linalol e (S)-(+)-linalol (separadamente)	POSITIVO (estresse)	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> , <i>bergamota</i> , 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

Tabela 1 - continuação

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>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 SCHLÄFKE, 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 (bergamota)</i>	POSITIVO (ansiedade)	inalação (sala aromatizada)	30 min	não especificado	109 pacientes	State Trait Anxiety Inventory (STAI)	NI <i>et al.</i> , 2013

1.1. 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 benzodiazepínicos 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

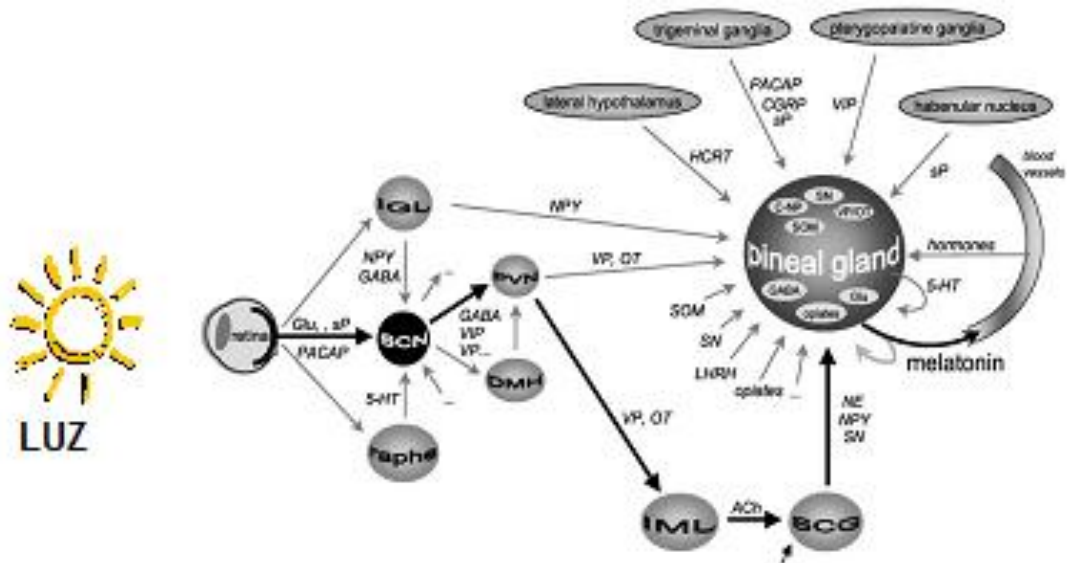
1 considerada um marcador do ciclo circadiano (LEWY *et al.*, 1999; ARENDT *et al.*,
2 2005; KLERMAN, 2005; PANDI-PERUMAL e CARDINALI, 2007; AFIFI e
3 BERGMAN, 2008; SOUSA NETO e CASTRO, 2008; BEDROSIAN *et al.*, 2013; KIM
4 *et al.*, 2013). Ela age através da ativação de receptores específicos, sendo que
5 inúmeros dados demonstram outras funções neuroendócrinas, além do ritmo noite-
6 dia. Embora a MEL não possa ser denominada de *hormônio do bem-estar*, estudos
7 demonstram que sua atividade está relacionada com inúmeras funções ligadas à
8 sensação de bem-estar, humor e saúde neuropsíquica tais como suas atividades
9 ansiolítica, antidepressiva, estabilizadora de humor e sedativa (KOOP *et al.*, 2000;
10 FONSECA e PORTO, 2004; POYARES *et al.*, 2005; GUÉNOLÉ *et al.*, 2011; REITER
11 *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2014), além da ação de controle neuroendócrino
12 (ESQUIFINO *et al.*, 2007; LUGO *et al.*, 2010; ETAIN *et al.*, 2011; LUGO, 2011; KIM
13 *et al.*, 2013). Os estudos na área da saúde mental seguem investigando a MEL, pois
14 verifica-se a alteração de sua secreção rítmica em quase todas as patologias
15 psíquicas de transtorno afetivo sazonal, depressão unipolar, desordem bipolar,
16 comportamento suicida, bulimia, anorexia, esquizofrenia, desordem do pânico e
17 desordem obsessiva compulsiva (PACCHIEROTTI *et al.*, 2001; CUESTA *et al.*,
18 2013).

19 Estudos apontam também a atuação da MEL na melhora de estados de
20 depressão leve induzidos por estresse crônico (DETANICO *et al.*, 2009; TAN *et al.*,
21 2013). Estes resultados indicam que a MEL: (a) *In vitro*, aumenta o número de novos
22 neurônios derivados de células neuronais do hipocampo do adulto; (b) *In vitro*,
23 aumenta a sobrevivência de células progenitoras neurais e neurônios imaturos pós-
24 mitóticas. Sugerem que a MEL administrada por meio do seu receptor, pode
25 modular a sobrevivência dos neurônios recém-nascidos no hipocampo de adultos,
26 tornando-se a primeira substância exógena com tal especificidade (MIRICK e
27 DAVIS, 2008; KELLEHER *et al.*, 2014). Este efeito neuroprotetor está sendo
28 estudado com resultados positivos em patologias de desordem neurodegenerativa,
29 como a Doença de Alzheimer (HOPPE, 2009), Doença de Parkinson (BASSANI,
30 2013), cardioprotetor e hepatoprotetor (SANTOS, 2010). KONRATH e colaboradores
31 (2005), demonstraram que a MEL pode atuar no pré-operatório e no pós-operatório
32 devido às suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, e também no
33 tratamento da insônia (ZHDANOVA *et al.*, 2001).

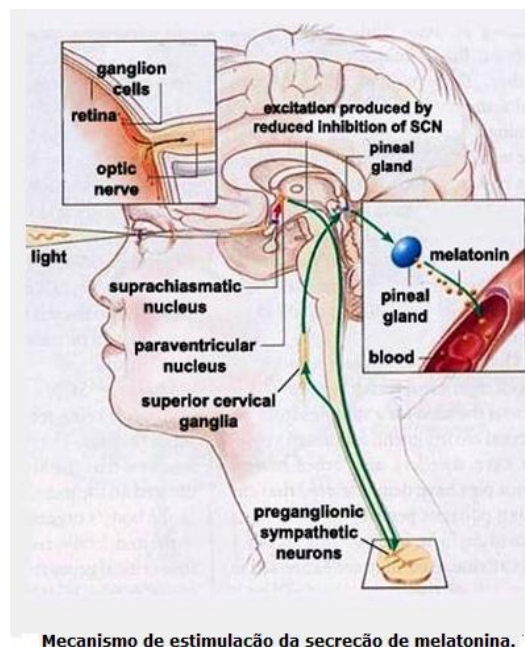
1 Em relação à toxicidade, a utilização de MEL exógena sugere efeitos
2 antioxidante, aterogênico, atóxico, não-mutagênico (ANISIMOV, 2003). Outro estudo
3 demonstra que o pré-tratamento com MEL impede a toxicidade induzida na
4 espermatogênese, o que poderia ser usado conjuntamente como suplemento para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

7 Na Figura 1 apresentamos a via neural, que transmite a informação da luz
8 exterior para a glândula pineal (a) e também a visualização da anatomia cerebral
9 com a localização da glândula pineal e a secreção da MEL no sangue (b).

(a)



(b)



Mecanismo de estimulação da secreção de melatonina.

Figura 1 - (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

Na Figura 2, 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.

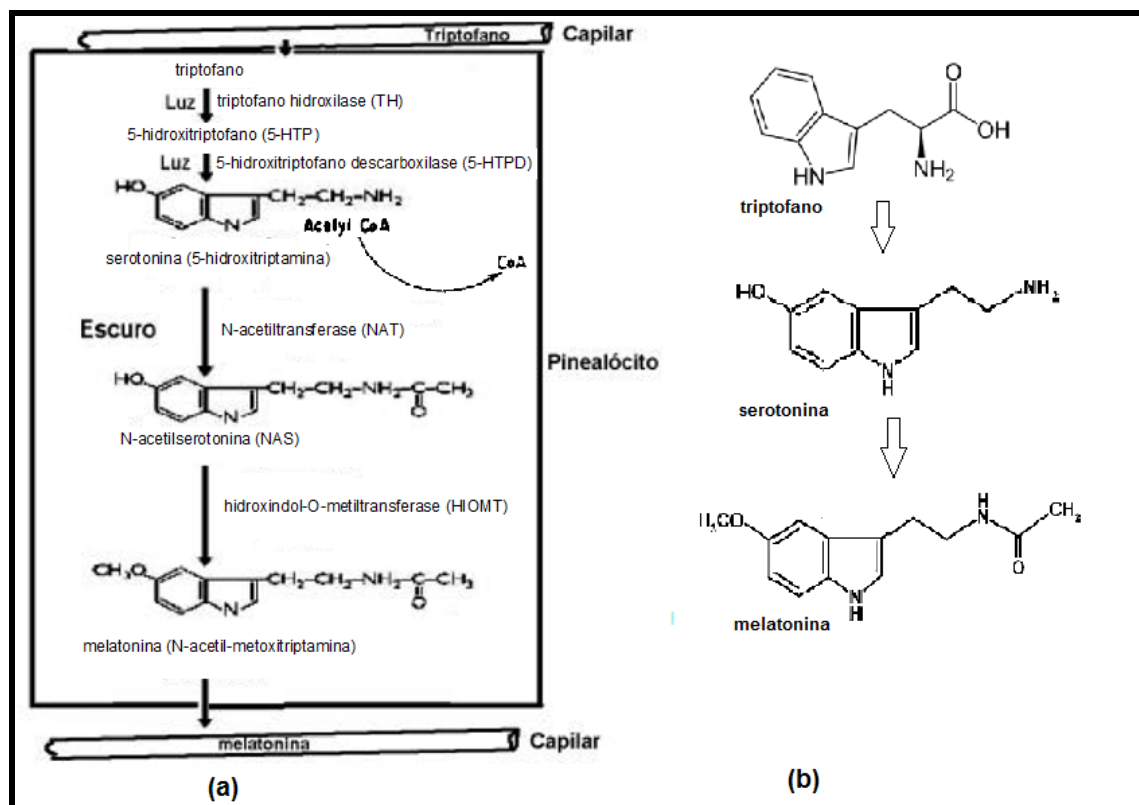


Figura 2 - (a) rota de biotransformação do triptofano, via serotonina, à MEL contendo as enzimas envolvidas; (b) rota simplificada (Adaptado de MAGANHIN *et al.*, 2008).

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 descarboxilase (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).

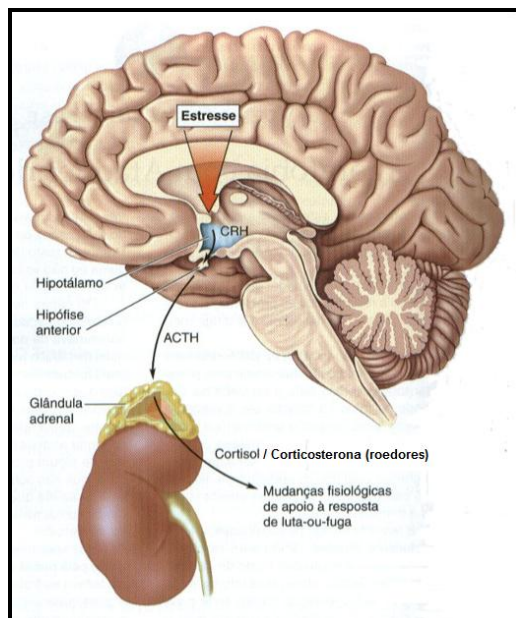
Nos humanos, a produção endógena de MEL atinge o seu valor plasmático máximo entre 02:00 h - 03:00 h (da madrugada), declinando ao longo do dia (MOCHEGIANI *et al.*, 1998; SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003; CORBALAN-TUTAU *et al.*, 2014).

1.2. O Estado Emocional de Estresse e o Hormônio Cortisol (COR)

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).

O estresse 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) pelo córtex da supra-renal (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; ALGHASHAM e RASHEED, 2014). Na Figura 3 apresentamos uma ilustração dos órgãos envolvidos na produção do COR, 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 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.*,

1 1993; KELLER, 2006; HELLHAMMER *et al.*, 2009; SCHER *et al.*, 2010) e em
2 animais após ensaios de estresse crônico ou agudo (SUTOH *et al.*, 2013;
3 BERGAMINI *et al.*, 2014).



4
5 Figura 3 - Ilustração dos órgãos envolvidos e o mecanismo simplificado da produção
6 do hormônio COR (Adaptado de NICOLAU, 2010).

7

8 Na Figura 4 apresentamos de forma esquemática a biotransformação do COR
9 e a Corticosterona (CORT) em humanos e em roedores e suas estruturas químicas.

10

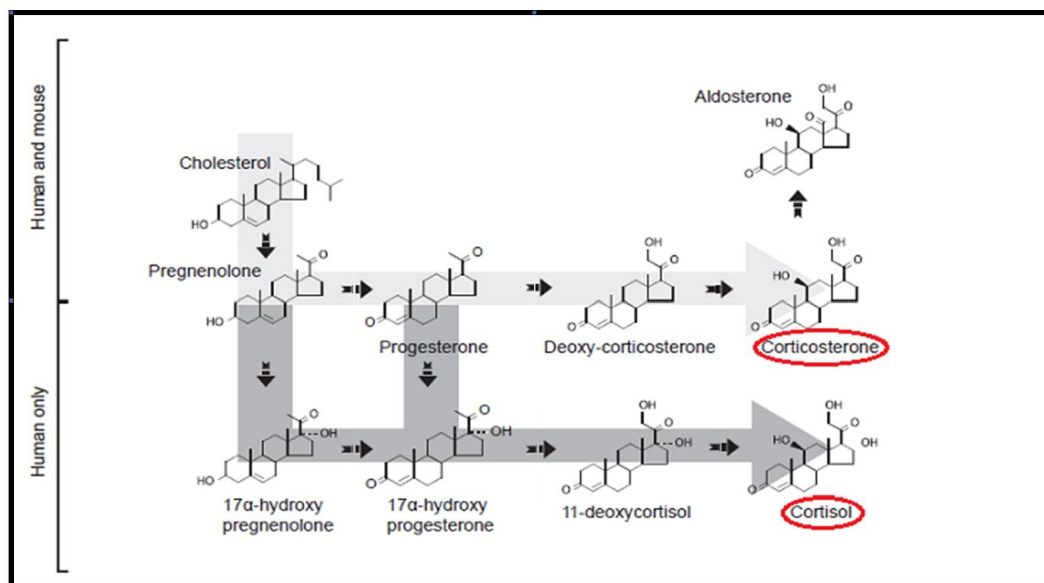


Figura 4 - Rota de síntese dos hormônios esteróides COR e CORT produzidos pelas glândulas adrenais em humanos e em roedores, respectivamente (Adaptado de KOSIR *et al.*, 2012).

O COR 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).

1.3. Inter-relações hormonais

Inúmeros são os estudos que procuram esclarecer a inter-relação entre os hormônios que possuem ligação com o ciclo circadiano, pois estes estão interligados de uma forma harmônica e estável, bem como as suas influências nos aspectos psiquiátricos e psicológicos no ser humano (DOBROW *et al.*, 2002; JURUENA *et al.*, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2009). Deste modo as suas alterações e variações afetam o organismo como um todo, incluindo o desequilíbrio que leva a obesidade. Alguns destes hormônios e transmissores são: melatonina, cortisol, cromogranina A (Cg A), testosterona, leptina, grelina, serotonina, prolactina, hormônio de crescimento (GH), adrenocorticotropina, (ACTH), neuropéptido K (NPK), fatores de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 2 (IL 2), interleucina 6 (IL 6), interleucina 10 (IL 10) (PURNELL *et al.*, 2004; ELLENBERG *et al.*, 2006; SCHMID *et al.*, 2006; ESQUIFINO *et al.*, 2007; CANO *et al.*, 2008; CANO *et al.*, 2009; ALLISON *et al.*,

2007; CANO *et al.*, 2010; LORDELO *et al.*, 2007; LUGO *et al.*, 2010; LUGO, 2011; GUPTA *et al.*, 2014).

Na Figura 5 apresentamos de uma forma esquemática a relação entre o "relógio biológico", ou ciclo circadiano, e os SNC e SNP (Sistema Nervoso Periférico).

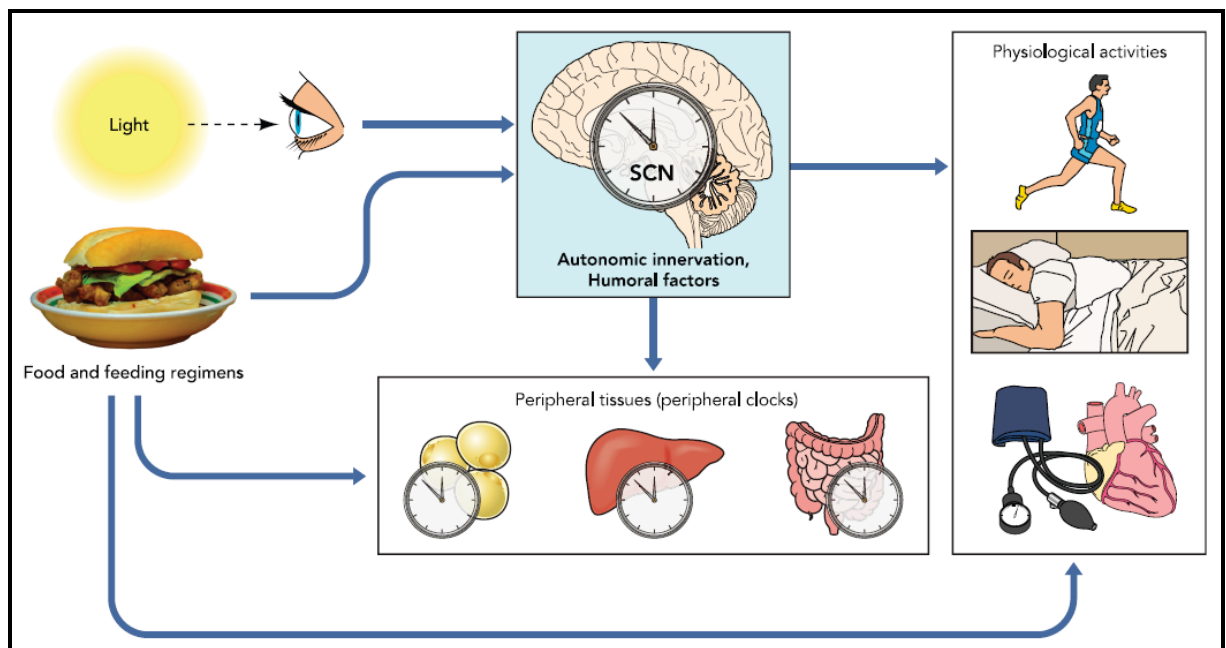


Figura 5 - Esquema do sinais de restabelecimento para o "relógio biológico" , relacionado com o SNC e o SNP (Sistema Nervoso Periférico) (FROY *et al.*, 2011).

Na Figura 6, apresentamos a relação entre os hormônios Melatonina e Cortisol em humanos, onde se observa uma alternância entre os picos plasmáticos da Melatonina e do Cortisol, ao longo do ciclo circadiano, ou seja, ao longo do dia.

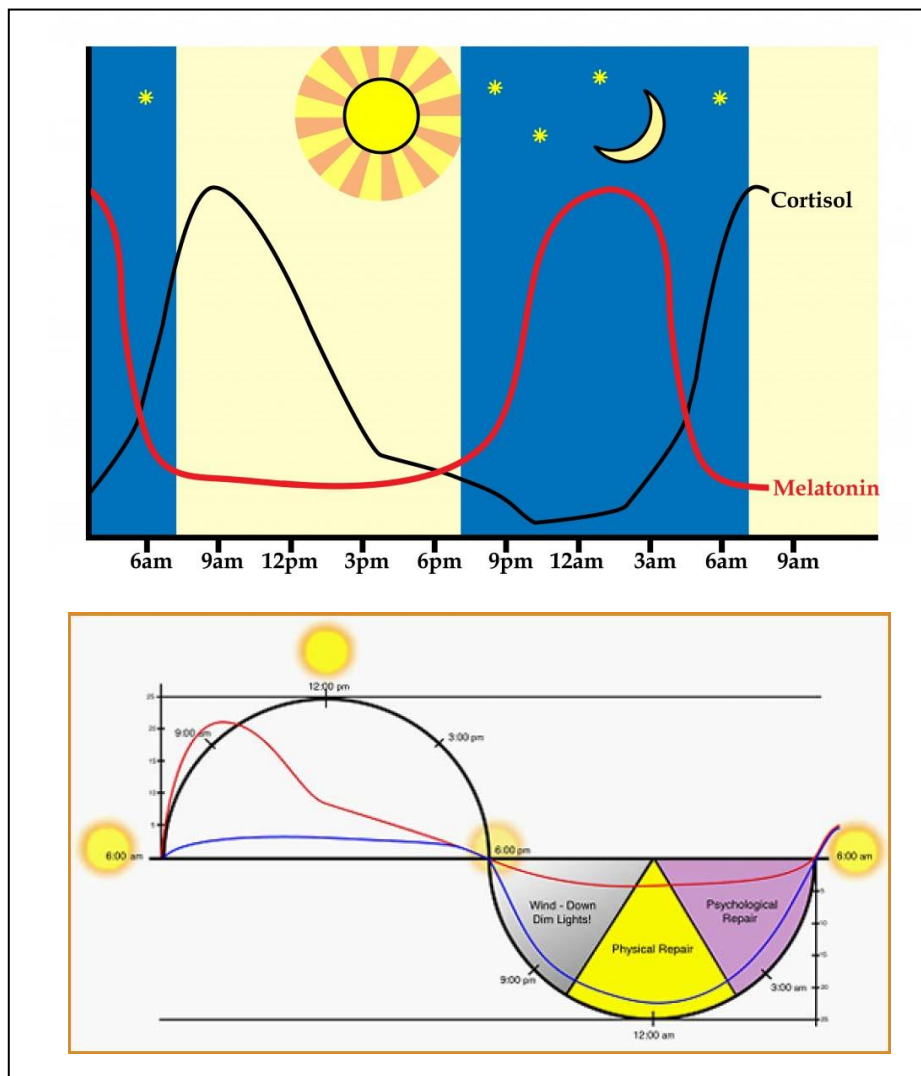


Figura 6 - Relação entre os hormônios Melatonina e Cortisol em humanos, com a alternância entre os picos plasmáticos da Melatonina e do Cortisol, ao longo do ciclo circadiano do dia.

Nas Tabelas 2 e 3 apresentamos uma breve revisão bibliográfica dos métodos analíticos utilizados para a medição dos hormônios MEL e COR, respectivamente.

1
2
3

4
5
6
7
8
9

10
11
12
13

Tabela 2 - Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de MEL em diversas matrizes de humanos

Método analítico	unidade e dados de detecção	população	matriz (anticoagulante, quando houver)	referência bibliográfica
CG/EM (derivatização com Pentafluorpropionico Anidro - PFPA)	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 - PFPA)	15 pg/mL (LD); 1 pg/mL (LD)	humanos (não especificado)	plasma (não especificado); fluido oral	SIMONIN <i>et al.</i> , 1999
CG/EM; CLAE-DF; CLAE-EM; RIA; ELISA	não especificado	humanos e animais	plasma, soro, urina, fluido oral	MIRICK e DAVIS, 2008

Tabela 3 - Revisão bibliográfica dos métodos analíticos para a análise de COR em diversas matrizes de humanos

Método analítico	unidade e dados de detecção	população	matriz (anticoagulante, quando houver)	referência bibliográfica
CG/EM	mg/g creatinina	crianças e adolescentes	urina	HOMMA <i>et al.</i> , 2007
HPLC (SPE-C18)	0,1 nmol/L (LD)	humanos	saliva	PALO <i>et al.</i> , 2009
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
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

1.4. Testes Psicológicos

A. Inventário de ansiedade de Beck (PROTOCOLO BAI: sintomas de ansiedade)

O Inventário de Ansiedade de Beck (BAI), criada por Aaron Beck, é um questionário de autorrelato com 21 questões de múltipla escolha, utilizada para medir a severidade da ansiedade de um indivíduo. As 21 questões expressam sintomas comuns de ansiedade (como sudorese e sentimentos de angústia) e indagam o quanto indivíduo tem sentido estes sintomas na última semana. Cada questão apresenta quatro possíveis respostas (nada, levemente, moderadamente, severamente). A BAI pode ter um resultado máximo de 63 e as categorias são: 0-7 (grau mínimo de ansiedade), 8-15 (ansiedade leve), 16-25 (ansiedade moderada), e 26-63 (ansiedade severa) (CUNHA, 2001).

B. Inventário de sintomas de stress para adultos de LIPP (ISSL) (sintomas de estresse)

O ISSL tem como objetivo detectar a presença de estresse e identificar a fase do estresse em que a pessoa se encontra, bem como a predominância de sintomas físicos e/ou psicológicos em cada fase. É constituído de três quadros: o primeiro diz respeito aos sintomas apresentados nas últimas 24 horas – fase de alerta (Q1); o segundo é relativo aos sintomas experimentados na última semana – fases de resistência e quase-exaustão (Q2); e o terceiro se refere aos sintomas apresentados no último mês – fase de exaustão (Q3). É composto por 53 itens, sendo 34 de natureza somática e 19 de natureza psicológica.

A avaliação clínica pode ser feita através das tabelas percentuais padronizadas do teste. Nesta perspectiva, se qualquer um dos escores brutos atingir os limites pré-determinados (maior que 6 em Q1, maior que 3 em Q2, maior que 8 em Q3) pode-se constatar a presença de estresse.

A fase de alerta é denominada como o primeiro momento em que o sujeito vivencia eventos estressores, onde a energia para o enfrentamento destas situações vem da produção de adrenalina. Nesta fase considera-se que o estresse ainda não traz malefícios físicos e psicológicos graves. Na fase de resistência entende-se que o estresse persistiu, exigindo que o sujeito continue

enfrentando os estressores, tentando estabelecer a homeostase interna. Caso a frequência ou a intensidade do estresse persista ainda mais, o sujeito passa para a fase de quase-exaustão, na qual o estresse pode preceder o adoecimento do sujeito. A exaustão, última fase do modelo quadrifásico de estresse, é considerada a mais nociva, pois compreende o momento em que há o aumento da probabilidade do aparecimento de doenças físicas e psíquicas (LIPP, 2000).

C. Inventário de ansiedade traço e estado – IDATE

Este inventário é composto por duas escalas, cada uma com 20 questões que medem separadamente ansiedade estado e ansiedade traço. Na ansiedade estado, as perguntas referem-se à como a pessoa se sente no momento em que a avaliação está sendo feita; as perguntas da ansiedade traço representam como a pessoa sente-se normalmente. As respostas indicam os níveis de ansiedade nestes dois contextos por meio de uma escala Likert de quatro pontos que varia de nenhum pouco a muito. Quanto maior o escore, maior o nível de ansiedade. A versão brasileira apresenta alfas de Cronbach de .89 para a escala de ansiedade estado e .88 para ansiedade traço (PASQUALI *et al.*, 1994). Recentemente foi validada uma versão reduzida do IDATE (FIORAVANTI-BASTOS *et al.*, 2011).

D. Escala de afeto positivo e afeto negativo – PANAS

Esta escala, adaptada ao Brasil, consiste em 20 descritores para cada categoria de afeto: positivo (p. ex. entusiasmado; $\alpha = .88$) e negativo (p.ex. medroso; $\alpha = .86$). Por meio de uma escala Likert de cinco pontos variando entre muito pouco ou nada até extremamente, os participantes devem avaliar o grau em que vivenciaram estes afetos ultimamente. Os escores para afeto positivo e afeto negativo são gerados separadamente, sendo que quanto maior o escore, maior é o relato do afeto (GIACOMONI e HUTZ, 1997).

E. Questionário de Saúde Geral de Goldberg (QSG)

Este instrumento é uma escala de 60 itens, que avalia a saúde mental de adultos não-clínicos através de uma escala de Likert de quatro pontos. A pontuação geral, que é a finalidade do presente estudo, pode ser usado como um indicador de bem-estar psicológico (SARRIERA *et al.*, 1996). Quanto maior a pontuação (máximo de 240), pior é a avaliação de sensação de bem-estar psicológico do indivíduo. O GHQ-60 foi originalmente desenvolvido por GOLDBERG e colaboradores (1976, *General health questionnaire* GHQ) e foi validado no Brasil por PASQUALI e colaboradores (1994a), o que mostra uma boa consistência interna com um alfa global coeficiente de 0,95.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da inalação do OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (elevado teor de limoneno) e do OE *Citrus aurantium* Lineu (elevado teor de linalol e acetato de linalila) no perfil psicofarmacológico e psicológico, nos sintomas relacionados a ansiedade e ao estresse, em voluntários humanos.

Este estudo procurará consolidar cientificamente, o que está fundamentado em evidências empíricas, que é a redução dos sintomas de ansiedade e de estresse, supondo atuação ansiolítica e anti-estresse dos OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e do OE *Citrus aurantium* Lineu, cujos componentes majoritários são o limoneno, mirceno, linalol e acetato de linalila, quando inalados.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o perfil psicológico de voluntários expostos por via inalatória ao OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (elevado teor de limoneno) e OE *Citrus aurantium* Lineu (elevado teor de linalol e acetato de linalila) através do PROTOCOLO BAI (sintomas de ansiedade) e INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE STRESS PARA ADULTOS DE LIPP (ISSL) (sintomas de estresse), INVENTÁRIO DE ANSIEDADE TRAÇO E ESTADO – IDATE (sintomas de ansiedade) , ESCALA DE AFETO POSITIVO E AFETO NEGATIVO – PANAS (sintomas de afeto) e Questionário de Saúde Geral de Goldberg (QSG) (sintomas de bem estar psicológico).

Quantificar hormônios ligados ao ciclo circadiano (relógio biológico) e às variáveis psicológicas e comportamentais, no fluido oral de voluntários expostos por via inalatória ao OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (elevado teor de limoneno) e OE *Citrus aurantium* Lineu (elevado teor de linalol e acetato de linalila), através de metodologia de imunoensaio Luminex® . Os hormônios são os listados no Quadro 1.

1 Quadro 1 - Hormônios que terão a metodologia de análise simultânea validada

1. melatonina	9. hormônio de crescimento (GH)
2. cortisol	10. adrenocorticotropina (ACTH)
3. cromogranina A (Cg A)	11. neuropeptídeo K (NPK)
4. testosterona	12. fatores de necrose tumoral alfa (TNF α)
5. leptina	13. interleucina 2 (IL 2)
6. grelina	14. interleucina 6 (IL 6)
7. serotonina	15. interleucina 10 (IL 10)
8. prolactina	

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

3. METODOLOGIA

A metodologia será baseada em voluntários, inalando substâncias vaporizadas em sala climatizada durante 60 minutos, uma vez por semana, durante 8 semanas consecutivas, nas quatro estações climática de um ano - verão, outono, inverno e primavera -, durante um ano. Tal fato levará em consideração a luminosidade e as características de cada estação climática do ano, o que relaciona-se com o funcionamento da glândula pineal e com a produção de hormônios, como por exemplo a melatonina.

Espera-se que ocorra o benefício da redução dos sintomas e a alteração dos hormônios ligados à ansiedade e ao estresse, pela inalação dos OE no Grupo Teste, e que não ocorra nenhum benefício destas alterações com a inalação do placebo Acetato de Octila no Grupo Placebo, nem na inalação da solução salina no Grupo Controle.

A dinâmica da metodologia é apresentada no Quadro 2 e na Figura 7.

Quadro 2 - Desenho experimental

Estação climatológica		Grupo teste	Grupo placebo	Grupo controle
INVERNO	1	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	2	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®
	3	inalação do OE durante 60 min/ 1 x por semana (8 semanas consecutivas)	inalação do placebo durante 60 min (8 semanas consecutivas)	inalação de ar atmosférico durante 60 min (8 semanas consecutivas)
	4	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®
	5	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	6	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas
PRIMAVERA	7	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	8	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®
	9	inalação do OE durante 60 min/ 1 x por semana (8 semanas consecutivas)	inalação do placebo durante 60 min (8 semanas consecutivas)	inalação de ar atmosférico durante 60 min (8 semanas consecutivas)
	10	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®	coleta do fluido oral em <i>Salivette</i> ®
	11	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	12	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas

Quadro 2 - continuação

Estação climatológica		Grupo teste	Grupo placebo	Grupo controle
VERÃO	13	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	14	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>
	15	inalação do OE durante 60 min/ 1 x por semana (8 semanas consecutivas)	inalação do placebo durante 60 min (8 semanas consecutivas)	inalação de ar atmosférico durante 60 min (8 semanas consecutivas)
	16	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>
	17	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	18	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas	intervalo de 4 semanas
OUTONO	19	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
	20	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>
	21	inalação do OE durante 60 min/ 1 x por semana (8 semanas consecutivas)	inalação do placebo durante 60 min (8 semanas consecutivas)	inalação de ar atmosférico durante 60 min (8 semanas consecutivas)
	22	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>	coleta do fluido oral em <i>Salivette®</i>
	23	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos	aplicação dos testes psicológicos
24 AVALIAÇÃO DOS TESTES PSICOLÓGICOS				
25 QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS NO FLUIDO ORAL NO EQUIPAMENTO DE IMUNOENSAIO LUMINEX® (UCM / MADRID)				

A cada estação climática - verão, outono, inverno, primavera - o experimento segue a dinâmica do fluxograma da Figura 7.

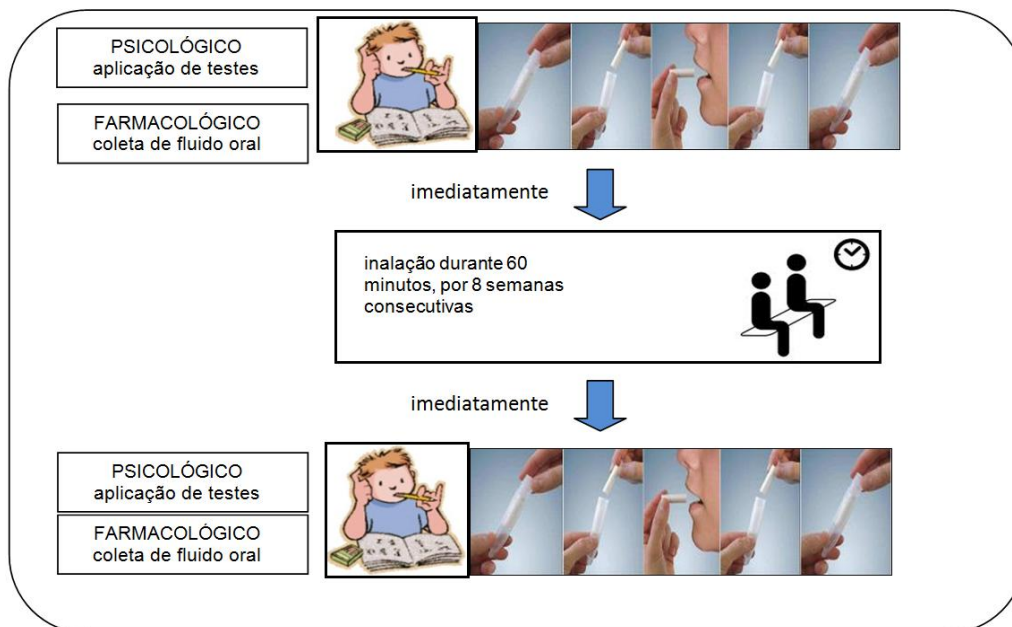


Figura 7 - Esquema fluxograma da parte experimental

Após o término da parte experimental os dados dos testes psicológicos serão analisados no InTCC e as amostras de fluido oral serão analisadas por técnica analítica de imunoensaio no equipamento Luminex® na UCM (Universidade Complutense de Madri/Espanha), como representados nas Figuras 8 e 9.

ANÁLISE DOS DADOS DOS TESTES PSICOLÓGICOS

ANÁLISE DO FLUIDO ORAL

Equipamento Lumine®x
em Madrid

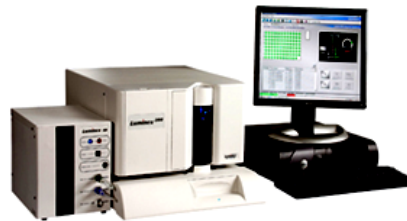


Figura 8 - Análise dos dados

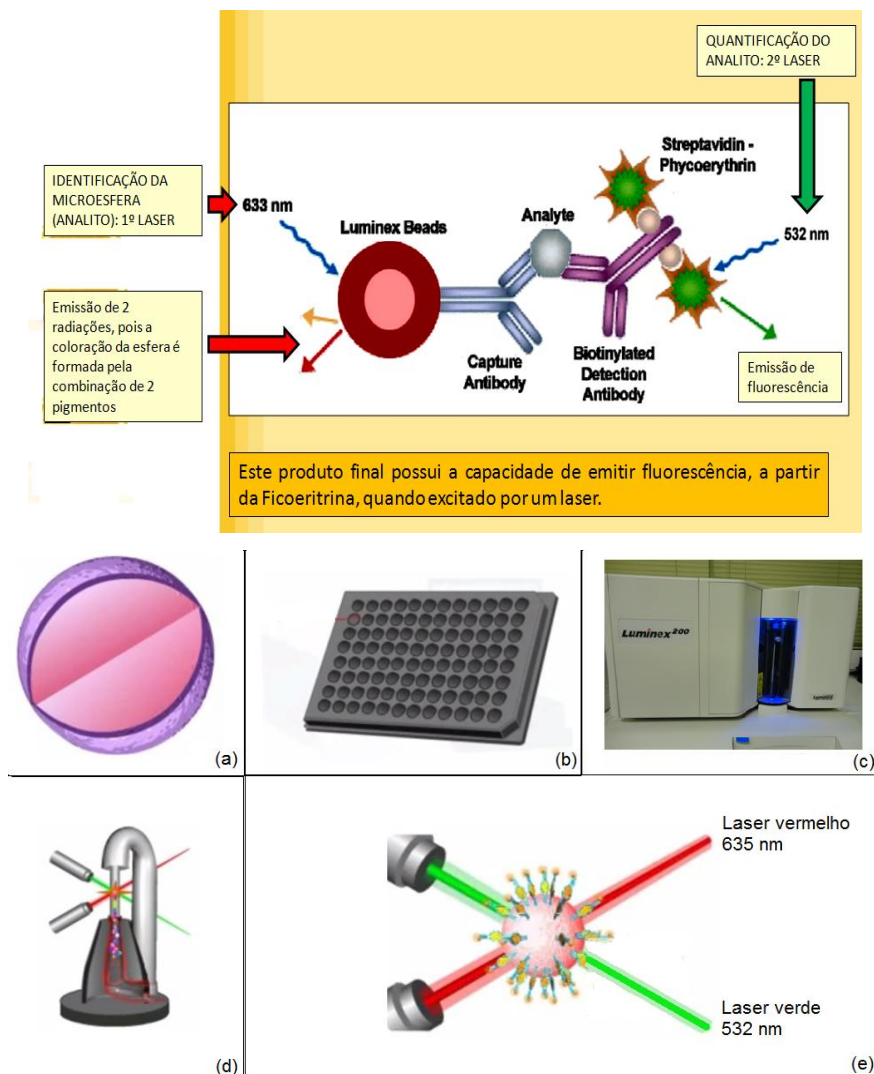


Figura 9 - Equipamento de imunoensaio Luminex® da UCM (Universidade Complutense de Madrid/ Facultad de Medicina, na Espanha). (a) imagem ampliada da microesfera contendo duas cores distintas, uma na parte exterior e outra no interior; (b) placa com 96 poços, cada poço para uma amostra, standard ou controle; (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).

3.1. Local de Realização dos Ensaios

O local dos ensaios será realizado nas instalações do Instituto de Terapias Cognitivo-Comportamentais (InTCC), localizado na Avenida Plínio Brasil Milano, 232, T - Higienópolis - Porto Alegre, RS. O INTCC é uma instituição privada de ensino, pesquisa, atendimento e consultoria na área da saúde mental. Possui instalações adequadas para esta pesquisa. O Instituto de Terapias Cognitivo-Comportamentais (InTCC) é coordenado por uma equipe onde a Psicóloga Dra Adriana Selene Zanonato é a responsável pelo acompanhamento e assessoria deste projeto. Dra Adriana é Psicóloga , Terapeuta de Casais e de Famílias - Co-cordenadora , professora e Supervisora do Instituto da Família de Porto Alegre. Membro do Conselho Deliberativo e Científico da Associação Gaúcha de Terapia Familiar. É Co-coordenadora do Curso de Formação em Terapias Cognitivo-Comportamentais do Instituto da Família de Porto Alegre e . Co- cordenadora do Ambulatório de TCC na Infância do mesmo Instituto Co-autora dos livros: Trabalhando com crianças e suas famílias: casos clínicos ilustrados e Trabalhando com crianças e suas famílias: histórias terapêuticas (<http://lattes.cnpq.br/9394781099139022>).

A aplicação e avaliação dos protocolos da área da psicologia serão realizados pelos psicólogos Adriana Selene Zanonato, Laura Nunes Wolffenbüttel (<http://lattes.cnpq.br/6038953107906179>) e pela Dr Carolina Baptista Menezes. Dra Carolina Possui graduação em Psicologia pela Pontifícia Universidade Católica do

Rio Grande do Sul. Foi bolsista de iniciação científica nas áreas de Epidemiologia/Saúde Coletiva e Psicologia Social. Fez mestrado com bolsa CNPq em Psicologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo investigado a associação entre o tempo e a frequência de prática de meditação sentada e silenciosa e o bem-estar psicológico e personalidade. Fez doutorado com bolsa CNPq na mesma instituição, no Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento. O foco de investigação foi o efeito de um ensaio controlado com meditação sentada e silenciosa na regulação emocional e controle cognitivo. É professora do curso de Psicologia da Universidade Federal de Pelotas. Os temas de interesse são os processos psicológicos básicos, a psicologia cognitiva experimental, o estudo da meditação dentro destas áreas de conhecimento, e estudos de intervenção e aplicação clínica da meditação/mindfulness. (<http://lattes.cnpq.br/1227895913030815>)

O InTCC disponibilizará salas e auditório para a realização deste estudo: sala 02 (40m²), sala 04 (40m²), sala 07 (50m²), auditório (60m²). Os voluntários permanecerão nestes ambientes (salas e auditório) aromatizados com OE durante 60 minutos, 1 vez por semana, durante 8 semanas consecutivas, sempre no mesmo horário, visando não haver variação devido ao ciclo circadiano dos hormônios pesquisados (melatonina, cortisol, cromogranina A (CgA), testosterona, leptina, grelina, serotonina, prolactina, hormônio de crescimento (GH), adeno corticotropina (ACTH), neuropeptídeo K (NPK), fatores de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 2 (IL 2), interleucina 6 (IL 6), interleucina 10 (IL 10).

3.2. Aplicação dos Testes Psicológicos

Os psicólogos Adriana Selene Zanonato, Laura Nunes Wolffenbüttel e Dr Carolina Baptista Menezes aplicarão e avaliarão os resultados dos protocolos PROTOCOLO BAI (níveis de ansiedade ou bem estar), INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE STRESS PARA ADULTOS DE LIPP (ISSL) (níveis de estresse ou não), INVENTÁRIO DE ANSIEDADE TRAÇO E ESTADO (IDATE), ESCALA DE AFETO POSITIVO E AFETO NEGATIVO (PANAS) e QUESTIONÁRIO DE SAÚDE GERAL DE GOLDBERG (QSG), nos voluntários submetidos a este estudo. Os

testes serão aplicados nos momentos que antecedem e precedem os períodos de inalação de cada estação climática.

A aplicação dos protocolos de avaliações psicológicas serão realizadas nas instalações do INTCC, Instituto de Terapias Cognitivo-Comportamentais (INTCC), localizado na Avenida Plínio Brasil Milano, 232, T - Higienópolis - Porto Alegre, RS.

3.3. Ambiente de Inalação (salas no InTCC)

Sala com dimensões definidas, limpa, organizada, sem poeira ou mofo, climatizada a 22°C. A sala será preparada anteriormente com a aromatização prévia por 15 minutos, de modo que o ambiente esteja pronto para o início do teste. A aromatização será realizada mediante o uso de aromatizadores cerâmicos elétricos de modo a ambientar toda a sala. Cada aromatizador cerâmico tem a capacidade de aromatizar em média 30m² com 10mL de produto durante 60 minutos. Os voluntários permanecerão na sala aromatizada por 60 minutos, com periodicidade de 1 vez por semana, totalizando 8 semanas consecutivas em cada estação climática do ano (verão, outono, inverno, primavera).

3.4. Cadastramento dos Voluntários Humanos

Os voluntários serão cadastrados e selecionados pelo InTCC juntamente com a autora deste projeto. A população será de homens e mulheres em idade de 20 a 40 anos, não diabéticos, sem patologia crônica degenerativa, sem o uso de medicação psicotrópica, sem uso de medicação Melatonina. Estes dados serão obtidos através de questionário sigiloso sociodemográfico aplicado no InTCC. Todo voluntário que sofrer trauma psicológico intenso durante este estudo terá seus dados desconsiderados.

O número total de voluntários (n) para este estudo será de 102 indivíduos, divididos em 3 grupos (grupo teste, grupo placebo e grupo controle).

3.5. Critérios de Exclusão dos Voluntários

Os critérios de exclusão dos voluntários a este projeto de pesquisa são indivíduos com idade fora da faixa de 20 a 40 anos, diabéticos, com patologia crônica degenerativa, em uso de medicação psicotrópica e/ou em uso de medicação Melatonina.

3.6. Critérios para Estabelecimento do Tamanho Amostral por Grupo

Segundo a Tabela 4 que apresenta a estimativa de amostra para comparação de grupos usando teste *t*, o tamanho amostral de 34 indivíduos por grupo, garante uma magnitude de 0,80 (razoável), com um alfa de 0,05 e um beta (poder) de 90% (ou seja, B=0,10) (HULLEY *et al.*, 2013).

Tabela 4 - Tamanho amostral por grupo usando o teste *t* (HULLEY *et al.*, 2013).

One-sided $\alpha =$ Two-sided $\alpha =$	0.005 0.01			0.025 0.05			0.05 0.10			
	$E/S^* \beta =$	0.05	0.10	0.20	0.05	0.10	0.20	0.05	0.10	0.20
0.10		3,565	2,978	2,338	2,600	2,103	1,571	2,166	1,714	1,238
0.15		1,586	1,325	1,040	1,157	935	699	963	762	551
0.20		893	746	586	651	527	394	542	429	310
0.25		572	478	376	417	338	253	347	275	199
0.30		398	333	262	290	235	176	242	191	139
0.40		225	188	148	164	133	100	136	108	78
0.50		145	121	96	105	86	64	88	70	51
0.60		101	85	67	74	60	45	61	49	36
0.70		75	63	50	55	44	34	45	36	26
0.80		58	49	39	42	34	26	35	28	21
0.90		46	39	21	34	27	21	28	22	16
1.00		38	32	26	27	23	17	23	18	14

Desta forma, este projeto utilizará o número total de voluntários n=102, garantindo que os dados obtidos com o estudo representem corretamente os fatos, possibilitando que as conclusões sejam as mais precisas e exatas possíveis.

3.7. Maneira de Exposição dos Voluntários nos Grupos

Os voluntários serão expostos pela via inalatória, à substância volatilizada com aromatizador elétrico, durante 60 min, em sala ampla de 60 m², permanecendo

1 sentados em ambiente com luminosidade e espaçoso, juntos em um número de até
2 34 voluntários **por grupo**.

3 A- Grupo teste, sala aromatizada com aroma natural:

4 O produto aromatizado será uma mistura pura de OE *Citrus sinensis* (L.)
5 Osbeck (laranja doce) e de OE *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga).

6
7 B- Grupo placebo, sala aromatizada com aroma sintético: O produto
8 aromatizado será o Acetato de Octila, 10% v/v (volume/volume) diluído em
9 solução salina (0,9% NaCl, Cloreto de Sódio).

10
11 C- Grupo controle, sala aromatizada com solução salina: O produto
12 aromatizado será solução salina (0,9% NaCl, Cloreto de Sódio).

13 14 **3.8. Riscos da Pesquisa e Segurança Toxicológica**

15 16 **3.8.1. Testes Psicológicos**

17 Esta pesquisa não acarreta danos e riscos aos voluntários, mediante a
18 aplicação dos protocolos de psicologia PROTOCOLO BAI (sintomas de ansiedade),
19 INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE STRESS PARA ADULTOS DE LIPP (ISSL)
20 (sintomas de estresse), INVENTÁRIO DE ANSIEDADE TRAÇO E ESTADO – IDATE
21 (sintomas de ansiedade), ESCALA DE AFETO POSITIVO E AFETO NEGATIVO –
22 PANAS (sintomas de afeto) e QUESTIONÁRIO DE SAÚDE GERAL DE GOLDBERG
23 (QSG), (sintomas de bem estar psicológico).

24 25 **3.8.2. Substâncias inaladas**

26 Esta pesquisa não acarreta danos ou riscos aos voluntários pela inalação
27 contínua e prolongada do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja
28 doce), do óleo essencial de *Citrus aurantium* Lineu (laranja amarga), do placebo
29 Acetato de Octila e do controle Solução Salina.

3.8.2.1. Grupo Teste, Óleos Essenciais

Os OE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e OE *Citrus aurantium* Lineu foram obtidos mediante doação da empresa Laszlo Aromaterapia Ltda.

Ambos os OE deste projeto serão utilizados de forma integral, sem isolamento de frações, partes ou moléculas e tiveram sua composição química conhecida e analisada, comprovando tratar-se das plantas alimentícias de laranja-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e laranja amarga (*Citrus aurantium* Lineu), com composição química sem toxicidade e em grau alimentício, cujos componentes majoritários são o limoneno, mircenolol, linalol e acetato de linalila, não apresentando perigo toxicológico aos voluntários (WOLFFENBÜTTEL *et al.*, 2015).

A administração por inalação dos OE de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja-doce) e de *Citrus aurantium* Lineu (laranja-amarga), de acordo com a metodologia apresentada neste projeto, de forma contínua e prolongada, não apresenta riscos de toxicidade aos voluntários, pois ambos os OE são regulamentados pela U.S. Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health (FDA, 2014), sendo seu uso reconhecido como seguro em humanos (GRAS, Generally Recognized as Safe), inclusive como aditivo alimentar, sendo também regulamentado pela International Fragrance Association (IFRA) padroniza o uso destes OE para uso em produtos de fragrâncias e perfumaria (MASTEN, 2004; MONTESINOS-HERRERO e PALOU, 2010).

Espera-se que ocorra o benefício da redução dos sintomas e a alteração dos hormônios ligados à ansiedade e ao estresse, com a inalação dos OE nos voluntários do Grupo Teste.

3.8.2.2. Grupo Placebo, Acetato de Octila

A administração por inalação do Acetato de Octila, de acordo com a metodologia apresentada neste projeto, não apresenta riscos de toxicidade aos voluntários.

O acetato de octila (CAS number 112-14-1) possui aroma característico de laranja e é um produto seguro toxicologicamente (DAUGHTREY *et al.*, 1989; DAUGHTREY *et al.*, 1989a). Possui número FEMA 2806 (*Flavour Extracts Manufactures*), sendo considerado um ingrediente natural, uma vez que está presente em alguns OE de *citrus* em ínfima quantidade que varia de 0,01 a 0,3%

(WOLFFENBÜTTEL *et al.*, 2015). O acetato de octila possui regulamentação de uso seguro como aditivo flavorizante em alimentos para humanos pela U.S. Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health (FDA, 2014).

Espera-se que não ocorra nenhum benefício ou nenhuma alteração fisiológica ou sintomática em relação a ansiedade e ao estresse, com a inalação do placebo Acetato de Octila nos voluntários do Grupo Placebo.

3.8.2.3. Grupo Controle, Solução Salina

A substância inalada pelo grupo controle é a solução salina ou soro fisiológico, cuja composição química é 0,9% NaCl (cloreto de sódio), a qual não apresenta toxicidade para os voluntários, na metodologia apresentada neste projeto.

Espera-se que não ocorra nenhum benefício ou alteração fisiológica ou sintomática em relação a ansiedade e ao estresse, com a inalação do controle Solução Salina nos voluntários do Grupo Controle.

3.9. Coleta de Amostra Fluido Oral

Através de *Salivette*® serão coletadas amostras de fluido oral de todos os participantes voluntários deste experimento nos momentos que antecedem e após os períodos de inalação de cada estação climática.

Imediatamente após a coleta, todas as amostras serão transportadas até a Universidade (UFRGS) em caixa refrigerada e então armazenadas em freezer de temperatura -80°C até o momento do traslado das amostras.

Em período de 30 minutos anterior a coleta da saliva, os voluntários não devem ter ingerido nenhuma alimentação sólida ou líquida.

3.10. Integralidade das Amostras de Fluido Oral

As amostras de fluido oral serão retiradas do freezer -80°C da UFRGS (Brasil) e serão imediatamente acondicionadas em recipiente caixa-isolante-térmico contendo gelo seco, capaz de manter as amostras de modo ideal por 72 horas, sendo possível deste modo, o seu traslado por aeronave em um voo comercial transcontinental até Madri. Chegando a Madri (Espanha), as amostras serão

1 imediatamente levadas a universidade UCM, e armazenadas em freezer -80°C. Este
2 procedimento não acarretará prejuízo às análises dos hormônios, conforme estudo
3 prévio (WOLFFENBÜTTEL, 2014).

5 **3.11. Dosagens dos Hormônios no Fluido Oral**

6 A obtenção dos níveis de melatonina, cortisol, cromogranina A (Cg A),
7 testosterona, leptina, grelina, serotonina, prolactina, hormônio de crescimento
8 (GH), adrenocorticotropina, (ACTH), neuropéptido K (NPK), fatores de necrose
9 tumoral alfa (TNF α), interleucina 2 (IL 2), interleucina 6 (IL 6), interleucina 10 (IL
10 10) serão através de ensaios com kits para Imunoensaio no equipamento Luminex®
11 em parceria com o Laboratório do Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
12 III, da Facultad de Medicina, da Universidad Complutense de Madrid na Espanha,
13 sob coordenação e orientação da Catedrática Prof^a Dr. Ana Isabel Esquifino.

15 **4. DESCARTE DE MATERIAIS**

16 Todos os procedimentos serão realizados de acordo com legislação vigente
17 no Brasil. Quanto aos procedimentos relacionados à execução das técnicas
18 comportamentais propostas no projeto, serão obedecidos os cuidados pertinentes à
19 adequada manipulação do material utilizado.

21 **5. ESTATÍSTICA**

22 Os resultados serão analisados por estatísticas descritivas e análise de
23 variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste post hoc de Student-Newman-
24 Keuls. Será utilizado o programa SPSS 20.0 para a análise estatística. O n de 34
25 em cada grupo (grupo teste, grupo placebo e grupo controle), visa a estimativa de
26 amostra para comparação de grupos usando teste *t*, com uma magnitude de 0,80
27 (razoável), com um alfa de 0,05 e um beta (poder) de 90% (ou seja, B=0,10).

6. RESULTADOS FINAIS

Os resultados obtidos serão publicados em revistas técnicas acadêmicas e científicas, bem como serão divulgados na mídia de saúde, sempre vinculando os nomes dos patrocinadores e colaboradores deste estudo.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES - 2015/2017

Este cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP.

ATIVIDADES/ DURAÇÃO	4 semanas (no mês posterior a aprovação do projeto pelo CEP)	1ª estação climática (3 meses) após a aprovação do projeto pelo CEP	2ª estação climática (3 meses) após a aprovação do projeto pelo CEP	3ª estação climática (3 meses) após a aprovação do projeto pelo CEP	4ª estação climática (3 meses) após a aprovação do projeto pelo CEP	6 meses (após a finalização da última coleta na 4ª estação climática)	6 meses (após a finalização da última coleta na 4ª estação climática)
Cadastramento e seleção dos voluntários humanos	X						
coleta de fluido oral (antes e após os períodos de inalação)		X	X	X	X		
Aplicação dos testes psicológicos nos voluntário (antes e após os períodos de inalação)		X	X	X	X		
Dosagem dos hormônios no fluido oral por imunoensaio LUMINEX® (em Madrid na Espanha)						X	X
Análise dos resultados						X	X
Redação de trabalhos científicos							X
Participação em encontros e congressos científicos							X
Relatório final							X

1 8. TERMOS DE CONCORDÂNCIA DE CO-PARTICIPAÇÃO
2
3

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid
Phone 34913947189 (1678)
Fax 34913941691
E-mail pelayos@med.ucm.es

Dra. Renata Pereira Limberger
Programa Postdoctoral
Facultad de Ciencias Farmacéuticas
Universidade Federal de Rio Grande do Sul
(Brasil)
<http://www.ufrgs.br/farmacia/>

Madrid 26 de Junio de 2015

Por la presente te informo de que mi grupo de investigación, situado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Universidad Complutense de Madrid y que yo dirijo, es de acuerdo a co-participar en el proyecto de investigación titulado "Estudio psicobiológico aceite esencial especies de *Citrus* (Rutaceae) ", con el investigador Dr. Renata Pereira Limberger (Farmacia, Facultad de Farmacia / UFRGS / Brasil).

A la espera de tus noticias te saluda atentamente



Ana I. Esquifino Parras
Catedrática

Termo de Concordância de co-participação

Eu, Carolina Baptista Menezes, doutora em Psicologia, concordo em co-participar no projeto de pesquisa sob o título "Estudo psicobiológico de óleo essencial de espécies de *Citrus* (Rutaceae)", tendo como pesquisadora Profª Dr Renata Pereira Limberger (Faculdade de Farmácia/UFRGS).

Sendo o que tinha,

Pelotas/RS, 26 de junho de 2015.



Carolina Baptista Menezes
email: menezescarolina@hotmail.com
tel: 5399014803

Termo de Concordância de co-participação

Eu, Adriana Selene Zanonato, Psicóloga, coordenadora do Instituto de Terapias Cognitivo-Comportamentais (InTCC), concordo em co-participar no projeto de pesquisa sob o título "Estudo psicobiológico de óleo essencial de espécies de *Citrus* (Rutaceae)", tendo como pesquisadora Dr Renata Pereira Limberger (Farmacêutica, Faculdade de Farmácia/ UFRGS).

Sendo o que tinha,

Porto Alegre/RS, 26 de junho de 2015.



Adriana Selene Zanonato
email: adrianazonato@psicoclin.net
tel: 5130223006

Termo de Concordância de co-participação

Eu, Laura Nunes Wolffenbüttel, Psicóloga, concordo em co-participar no projeto de pesquisa sob o título "Estudo psicobiológico de óleo essencial de espécies de *Citrus* (Rutaceae)", tendo como pesquisadora Dr Renata Pereira Limberger (Farmacêutica, Faculdade de Farmácia/ UFRGS).

Sendo o que tinha,

Porto Alegre/RS, 26 de junho de 2015.

Laura N. Wolffenbüttel

Laura Nunes Wolffenbüttel
email: lauranunesw@gmail.com
tel: 5199335092

1 **9. TERMO DE DOAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

CARTA DE DOAÇÃO

A Laszlo Aromatologia Ltda ME, inscrita sob o CNPJ 07.997.093/0001-10, Inscrição estadual 001006573.00-97, com funcionamento à Rua Itaúna, nº 66, CEP 31.110-070, Município de Belo Horizonte, Bairro Colégio Batista, telefone (31) 3486-2765, doa para Profa. Dr. Renata Pereira Limberger os seguintes produtos:

DISCRIMINAÇÃO	VOLUME	MARCA
OE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck (laranja doce)	1L	Laszlo
OE <i>Citrus aurantium</i> Lineu (laranja amarga)	1L	Laszlo

Belo Horizonte, 02 de Julho de 2015.



Laszlo Aromatologia Ltda ME

CNPJ 07.997.093/0001-10

Fabian Laszlo Soares Flegner

043.632906-92

2
3
4

10. REFERÊNCIAS

- AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. *Neuroanatomia Funcional: Texto e Atlas*. Roca, São Paulo, 2ª ed, 2008, 526 p.
- 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.
- 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.
- ALLISON, K.C.; AHIMA, R.S.; O'REARDON, J.P.; DINGES, D.F.; SHARMA, V.; CUMMINGS, D.E.; HEO, M.; MARTINO, N.S.; STUNKARD, A.J. Neuroendocrine Profiles Associated with Energy Intake, Sleep, and Stress in the Night Eating Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 90, p. 6214–6217, 2005.
- ANISIMOV, V.N. Effects of Exogenous Melatonin, A Review. *Toxicologic Pathology*, v. 31, p. 589–603, 2003.
- ARENDT, J.; SKENE, D. J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, v.9, p.25-39, 2005.
- 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.
- BARROS, D. M., ELISABETSKY, E. *Atividade anticonvulsivante do Linalol em convulsões induzidas por picrotoxina e estriknina*. In: Annals of the XIV Simpósio de Plantas Medicinais 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 Ciencias 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.

- 1 BEDROSIAN, T.A.; HERRING, K.L.; WALTON, J.C.; FONKEN, L.K.; WEIL, Z.M.;
2 NELSON, R.J. Evidence for feedback control of pineal melatonin secretion.
3 *Neuroscience letters*, v. 542, p.123-125, 2013.
- 4 BERGAMINI, M.R.; BERNARDI, M.M.; SUFREDINI, I.B.; CIARAMICOLI, M.T.;
5 KODAMA, R.M.; KABADAYAN, F.; SARACENI, C.H.C. Dentin hypersensitivity
6 induces anxiety and increases corticosterone serum levels in rats. *Life Sciences*, v.
7 98, p. 96–102, 2014.
- 8 BORRULL, N.C. El perfume del vino como poema químico. *Enoviticultura*, nº 15, p.
9 62-65, 2012.
- 10 BOUTIN, J.A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to
11 study melatonin pathways and actions. *TRENDS in Pharmacology Sciences*, v. 26, p.
12 412-419, 2005.
- 13 BRADLEY, B. F.; STARKEY, N. J.; BROWN, S. L.; LEA, R.W. Anxiolytic effects of
14 *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *Journal of*
15 *Ethnopharmacology*, v. 111, p. 517-525, 2007.
- 16 BRANDÃO, M.L. *As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência*,
17 Editora Pedagógica e Universitária, São Paulo, 4ªed, 2004, 223 p.
- 18 BUFFET-JERROTT, S. E.; STEWART, S. H.; BIRD, S.; TEEHAN, M.D. An
19 examination of differences in the time course of oxazepam's effects on implicit vs
20 explicit memory. *Journal of Psychopharmacology*, v.12, p.338-347, 1998.
- 21 BURNETT, K.M.; SOLTERBECK, L.A.; STRAPP, C.M. Scent and mood state
22 following an anxiety-provoking task. *Psychological reports*, v. 95, p. 702–722, 2004.
- 23 BURNS, E.E.; BLAMEY, C.; ERSSER, S.J. An investigation into the use of
24 aromatherapy on intrapartum midwifery practice. *Journal of Alternative and*
25 *Complementary Medicine*, v. 6, p. 141–147, 2000.
- 26 CANO, P.; CARDINALI, D.P.; JIMÉNEZ-ORTEGA, V.; RÍOS-LUGO, M.J.; SCACCHI,
27 P.A.; ESQUIFINO, A.I. Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern in expression of
28 prolactin and redox pathway enzymes in the rat adenohypophysis. *Open Obesity*
29 *Journal*, v. 2, p. 1-9, 2010.
- 30 CANO, P.; CARDINALI, D.P.; LUGO, M.J.R.; MATEOS, M.P.F.; TOSO, C.F.R.;
31 ESQUIFINO, A.I. Effect of a High-fat Diet on 24-Hour Pattern of Circulating
32 Adipocytokines in Rats. *Obesity*, v. 17, p. 1866–1871, 2009.
- 33 CANO, P.; JIMÉNEZ-ORTEGA, V.; LARRAD, A.; TOSO, C.F.R.; CARDINALI, D.P.;
34 ESQUIFINO, A.I. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of
35 prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating
36 hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrinology*, v. 33, p.
37 118–125, 2008.
- 38 CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D.. Neuroendocrine pharmacology of stress.
39 *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 235-272, 2003.

- 1 CARRASCO, J.L.; ALVAREZ, E.; OLIVARES, J.M.; REJAS, J. Análisis comparativo
2 de costes del inicio de terapia con pregabalina o ISRS/ISRN en pacientes resistentes
3 a las benzodiazepinas con trastorno de ansiedad generalizada en España. *Actas*
4 *Españolas de Psiquiatría*, v. 41, p. 164-74, 2013. Disponível em:
5 <<http://actaspsiquiatria.es/repositorio/15/83/ESP/15-83-ESP-164-174-677858.pdf>>.
6 Acessado em 09/02/2014.
- 7 CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA, M. Anxiolytic and sedative effects of
8 extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biological and Pharmaceutical*
9 *Bulletin*, v. 25, p.1629-1633, 2002.
- 10 CASES, J.; IBARRA, A.; FEUILLERE, N.; ROLLER, M.; SUKKAR, S.G. Pilot trial of
11 *Melissa officinalis* L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-
12 moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Mediterranean Journal of*
13 *Nutrition and Metabolism*, v. 4, p. 211–218, 2011.
- 14 CASTRO, R.J.A.; LEAL, P.C.; SAKATA, R.K. Tratamento da dor em queimados.
15 *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 63, p. 149-158, 2013.
- 16 CHABRA, A.; SHOKRZADEH, M.; NAGHSHVAR, F.; SALEHI, F.; AHMADI, A.
17 Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by
18 cyclophosphamide in male mice. *Human and Experimental Toxicology*, v. 33, p.
19 185–195, 2014.
- 20 CHEN, Y-J; CHENG, F.; SHIH, Y.; CHANG, T-M; WANG, M-F; LAN, S-S. Inhalation
21 of Neroli Essential Oil and Its Anxiolytic Effects. *Journal of Complementary and*
22 *Integrative Medicine*, v. 5, article 13, p. 1-10, 2008.
- 23 CHIOCA, L.R.; ANTUNES, V.D.C.; FERRO, M.M.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R.
24 Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation
25 in mice. *Life Sciences*, v. 92, p. 971–975, 2013a.
- 26 CHIOCA, L.R.; FERRO, M.M.; BARETTA, I.P.; OLIVEIRA, S.M.; SILVA, C.R.;
27 FERREIRA, J.; LOSSO, E.M.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect to lavender
28 essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not
29 GABA_A/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, p.
30 412–418, 2013b.
- 31 COHEN, S.; KESSLER, R.C.; GORDON, L.U. *Measuring stress, a guide for health*
32 *and social scientists*. New York, Oxford University Press, 1997, 237 p.
- 33 CORBALAN-TUTAU, D.; MADRIR, J.A.; NICOLÁS, F.; GARAULET, M. Daily profile
34 in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic
35 syndrome components. *Physiology and Behavior*, v. 123, p. 231-235, 2014.
- 36 COVACI, A.; DONEANU, C.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; SCHEPENS, P. Determination of
37 melatonin in pharmaceutical formulations and human plasma by gas chromatography-
38 electron impact mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 13, p. 431-436,
39 1999.

- 1 CUESTA, M.; CERMAKIAN, N.; BOIVIN, D.B. Circadian clock genes and
2 psychiatric. In: SHAW, P.; TAFTI, M.; THORPY, M.J. (ed.). *The Genetic Basis of*
3 *Sleep and Sleep Disorders*. Cambridge University Press, 2013, p. 351.
- 4 CUNHA, J.A. *Manual da versão em português das Escalas Beck*. São Paulo, SP:
5 Casa do Psicólogo, 2001.
- 6 DAUGHTREY, W.C.; EUTERMOSER, M.; THOMPSON, S.W.; BILES, R.W. A
7 subchronic toxicity study of octyl acetate in rats. *Fundamental And Applied*
8 *Toxicology*, v. 12, p. 313-320, 1989.
- 9 DAUGHTREY, W.C.; WIER, P.J.; TRAUL, K.A.; BILES, R.W.; EGAN, G.F. Evaluation
10 of the teratogenic potential of octyl acetate in rats. *Fundamental And Applied*
11 *Toxicology*, v. 13, p. 303-309, 1989a.
- 12 DETANICO, B.C.; PIATO, A.L.; FREITAS, J.J.; LHULLIER, F.L.; HIDALGO, M.P.;
13 CAUMO, W.; ELISABETSKY, E. Antidepressant-like effects of melatonin in the
14 mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology*, v. 607, p. 121-
15 125, 2009.
- 16 DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts
17 of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 165–170,
18 2001.
- 19 DOBROW, ILYSE J., CLAUDIA KAMENETZ, AND MICHAEL J. DEVLIN. "Aspectos
20 Psiquiátricos Da Obesidade Psychiatric Aspects Of Obesity." *Revista Brasileira de*
21 *Psiquiatria*, v. 24, supl III, p. 63-67, 2002.
- 22 DUPONT, R. L.; RICE, D. P.; MILLER, L. S. Economic costs of anxiety disorders.
23 *Anxiety*, v. 2, p.167-172, 1996.
- 24 EDRIS, A.E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their
25 Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 308–
26 323, 2007.
- 27 ELISABETSKY, E., SILVA BRUM, L.F., SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of
28 Linalol in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, v. 6, p. 107-113, 1999.
- 29 ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.P.C.; SANTOS, M. A. C.; SIQUEIRA, I. R.; AMADOR,
30 T. A.; NUNES, D. S. Sedative properties of Linalol. *Fitoterapia*, v. 15, p. 407-414,
31 1995.
- 32 ELLENBERG, C.; VERDI, B.; AYALA, L.; FERRI, C.; MARCANO, Y.; VEGA, J.V.
33 Síndrome de comedor nocturno: un nuevo trastorno de la conducta alimentaria.
34 *Anales venezolanos de nutrición*, v.19, p. 32-37, 2006.
- 35 ERNST, E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical
36 trials. *Phytomedicine*, v. 13, p. 205-208, 2006.
- 37 ESQUIFINO, A.I.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNANDEZ-MATEOS, P.;
38 CARDINALI, D.P. Neuroendocrine-immune correlates of circadian physiology:

- 1 studies in experimental models of arthritis, ethanol feeding, aging, social isolation,
2 and calorie restriction. *Endocrinology*, v. 32, p. 1–19, 2007.
- 3 ETAIN, B.; MILHIET, V.; BELLIVIER, F.; LEBOYER, M. Genetics of circadian
4 rhythms and mood spectrum disorders. *European Neuropsychopharmacology*, v. 21,
5 p. S676–S682, 2011.
- 6 FATURI, C.B.; LEITE, J.R.; ALVES, P.B.; CANTON, A.C.; TEIXEIRA-SILVA, F.
7 Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Progress in Neuro-*
8 *Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 34, p. 605-609, 2010.
- 9 FDA, U.S. Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health,
10 21CFR172.515 - Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 3, Chapter I,
11 Subchapter B, Part 172, Subpart F, Sec 172.515, 2014. Disponível em
12 <[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.51](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.515)
13 5>. Acessado em 19/05/2015.
- 14 FIORAVANTI-BASTOS, A.C.M.; CHENIAUX, E.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.
15 Development and validation of a short-form version of the Brazilian state-trait anxiety
16 inventory. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 24, p. 485-494, 2011. Disponível em
17 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-79722011000300009&lng=en&nrm=iso)
18 79722011000300009&lng=en&nrm=iso>. [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-79722011000300009)
19 79722011000300009. Acessado em 14/05/2015.
- 20 FONSECA, I.C.L.; PORTO, M.M. Relações entre Luz e Produção Hormonal no
21 Homem. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Arquitetura e
22 Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Arquitetura, *Cadernos do Proarq*, v. 8,
23 p. 1-2013, 2004.
- 24 FROCHOSO, S.S. *Estudio perfumístico*. Dissertação de Mestrado (Master Thesis).
25 Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 2004, 168p. Disponível em:
26 <<http://hdl.handle.net/2099.1/5205>>. Acessado em 04/02/2014.
- 27 FROY, O. Circadian Rhythms, Aging, and Life Span in Mammals. *Physiology*, v. 26,
28 p. 225-235, 2011. doi:10.1152/physiol.00012.2011
- 29 GARGANO, A.C. *Estudo da atividade ansiolítica e sedativa do OE das cascas de*
30 *frutos de espécies do gênero Citrus*. Dissertação de Mestrado – Universidade
31 Estadual Paulista, 2007, 54p.
- 32 GIACOMONI, C.H.; HUTZ, C.S. A mensuração do bem-estar subjetivo: escala de
33 afeto positivo e negativo e escala de satisfação de vida [Resumos]. *Sociedade*
34 *Interamericana de Psicologia* (Org.), Anais XXVI Congresso Interamericano de
35 Psicologia, 1997.
- 36 GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; ALVES, P.B.; TEIXEIRA-SILVA, F. Effect of Sweet
37 Orange Aroma on Experimental Anxiety in Humans. *Journal of Alternative and*
38 *Complementary Medicine*, v. 18, p. 798-804, 2012.
- 39 GOLDBERG, D.P.; RICKELS, K.; DOWNING, R.; HESBACHER, P. A comparison of
40 two psychiatric screening tests. *The British Journal of Psychiatry*, v. 129, p. 61-67,
41 1976.

- 1 GRAHAM, P.H.; BROWNE, L.; COX, H.; GRAHAM, J. Inhalation Aromatherapy
2 During Radiotherapy: Results of a Placebo-Controlled Double-Blind Randomized
3 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, p. 2372-2376, 2003.
- 4 GUÉNOLÉ, F.; GODBOUT, R.; NICOLASC, A.; FRANCO, P.; CLAUSTRAT, B.;
5 BALEYTE, J-M. Melatonin for disordered sleep in individuals with autism spectrum
6 disorders: Systematic review and discussion. *Sleep Medicine Reviews*, v. 15, p. 379-
7 387, 2011.
- 8 GUPTA, D.; MORLEY, J.E. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis and
9 Aging. *Comprehensive Physiology*, v. 4, p. 1495-1510, 2014.
- 10 HANSEN, V.H.; ANDERSEN, L.T.; MADSEN, M.T.; HAGEMAN, I.; RASMUSSEN,
11 L.S.; BOKMAND, S.; ROSENBERG, J.; GÖGENUR, I. Effect of melatonin on
12 depressive symptoms and anxiety in patients undergoing breast cancer surgery: a
13 randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Research and*
14 *Treatment*, v. 145, p. 683–695, 2014.
- 15 HELLHAMMER, D. H.; WÜST, S.; KUDIELKA, B. M. Salivary cortisol as a biomarker
16 in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, p. 163-171, 2009.
- 17 HERZ, R.S. Aromatherapy Facts and Fictions: A Scientific Analysis of Olfactory
18 Effects on Mood, Physiology and Behavior. *International Journal of Neuroscience*, v.
19 119, p. 263-290, 2009.
- 20 HEUBERGER, E.; HONGRATANAWORAKIT, T.; BÖHM, C.; WEBER, R.;
21 BUCHBAUER, G. Effects of Chiral Fragrances on Human Autonomic Nervous
22 System Parameters and Self-evaluation. *Chemical Senses*, v. 26, p. 281-292, 2001.
- 23 HEUBERGER, E.; NUNES, D. S.; LINCK, V. M.; SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ,
24 M.; ELISABETSKY, E. Effects of Essential Oils in the Central Nervous System. In:
25 BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (Org.). *Handbook of Essential Oils: Science,*
26 *Technology, and Applications*. London: CRC Press, 2010. p. 281-314.
- 27 HÖFERL, M.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Chirality influences the effects of linalool
28 on physiological parameters of stress. *Planta Medica*, v. 72, p.1188-1192, 2006.
- 29 HOMMA, K.; SATO, A.; WATANABE, H.; HASEGAWA, T. The Circadian Variation of
30 Cortisol Secretion in Patients with Anorexia Nervosa in Childhood and Adolescence
31 after Recovery of Body Weight by Treatment Using Gas Chromatography/Mass
32 Spectrometry in Selected Ion Monitoring. *Clinical Pediatric Endocrinology*, v. 16, p.
33 17-22, 2007.
- 34 HOPPE, J.B. *Investigação do efeito neuroprotetor da melatonina em modelo in vitro*
35 *de toxicidade do peptídeo β -amilóide*. Dissertação de Mestrado, Universidade
36 Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2009, 102p.
- 37 HORII, Y.; NAGAI, K.; NAKASHIMA, T. Order of exposure to pleasant and
38 unpleasant odors affects autonomic nervous system response. *Behavioral Brain*
39 *Research*, v. 243, p.109-117, 2013.

- 1 HOWARD, S.; HUGHES, B.M. Expectancies, not aroma, explain impact of lavender
2 aromatherapy on psychophysiological indices of relaxation in young healthy women.
3 *British Journal of Health Psychology*, v. 13, p. 603–617, 2008.
- 4 HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRADY, D.G.; NEWMAN, T.B.
5 *Designing Clinical Research*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2013, 378 p.
6
- 7
- 8 IBARRA, A.; FEUILLERE, N.; ROLLER, M.; LESBURGERE, E.; BERACOCHEA, D.
9 Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like
10 reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*, v. 17, p.
11 397-403, 2010.
- 12 IMURA, M.; MISAO, H.; USHIJIMA, H. The psychological effects of aromatherapy-
13 massage in healthy postpartum mothers. *Journal Midwifery Womens Health*, v. 51,
14 p. 21–26, 2006.
- 15 JAFARZADEH, M.; ARMAN, S.; FARAHBAKHS, F. Effect of aromatherapy with
16 orange essential oil on salivary cortisol and pulse rate in children during dental
17 treatment: A randomized controlled clinical trial. *Advanced Biomedical Research*, v.
18 6, p. 2-10, 2013.
- 19 JAMES, A.C.; JAMES, G.; COWDREY, F.A.; SOLER, A.; CHOKE, A. *Cognitive*
20 *behavioural therapy for anxiety disorders in children and adolescents (Review)*.
21 Cochrane Database of Systematic Reviews, John Wiley and Sons Ltd., 2013, 104p.
22 Disponível em:
23 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD004690.pub3/pdf>>.
24 Acessado em 20/02/2014.
- 25 JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J. Overlap between atypical depression, seasonal
26 affective disorder and chronic fatigue syndrome. *Revista Brasileira de Psiquiatria*,
27 v. 29, p. s19-s26, 2007.
- 28 KASPER, S. An orally administered lavandula oil preparation (Silexan) for anxiety
29 disorder and related conditions: an evidence based review. *International Journal of*
30 *Psychiatry in Clinical Practice*, v. 17, p. 15-22, 2013.
- 31 KELLEHER, F.C.; RAO, A.; MAGUIRE, A. Circadian molecular clocks and cancer.
32 *Cancer Letters*, v. 342, p. 9–18, 2014.
- 33 KELLER, B. *Estudo comparativo dos níveis de cortisol salivar e estresse em atletas*
34 *de luta olímpica de alto rendimento*. Dissertação de Mestrado em Ciências
35 Biológicas – Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas,
36 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006, 68p.
- 37 KIM, M.; HWANGBO, H.H. Randomized Trial Evaluating the Aroma Inhalation on
38 Physiological and Subjective Anxiety Indicators of the Nursing Students Experiencing
39 the First Intravenous Injection. *International Journal of Bio-Science and Bio-*
40 *Technology*, v. 2, p. 29-37, 2010.

- 1 KIM, T.-K.; KLESZCZYNSKI, K.; JANJETOVIC, Z.; SWEATMAN, T.; LIN, Z.; LI, W.;
2 REITER, R.J.; FISCHER, T.W.; SLOMINSKI, A.T. Metabolism of melatonin and
3 biological activity of intermediates of melatoninergetic pathway in human skin cells.
4 *Faseb Journal*, v. 27, p. 2754-2755, 2013.
- 5 KIRSCHBAUM, C.; PIRKE, K.-M.; HELLHAMMER, D.H. The 'Trier Social Stress
6 Test' - a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory
7 setting. *Neuropsychobiology*, v. 28, p. 76-81, 1993.
- 8 KLERMAN, E. B. Clinical aspects of human circadian rhythms. *Journal of Biological*
9 *Rhythms*, v. 20, p. 375-86, 2005.
- 10 KOMIYA, M.; TAKEUCHI, T.; HARADA, E. Lemon oil vapor causes an anti-stress
11 effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*,
12 v.172, p. 240-249, 2006.
- 13 KONRATH, C.A.; SILVA, D.L.D.; MOREIRA JUNIOR, N.L.; MONTEIRO, C.A.;
14 AUZANI, J.A.S.; CAUMO, W.; HIDALGO, M.P L. Avaliação do impacto da melatonina
15 pré-operatória na dor e ansiedade pós-operatórias de pacientes submetidas a
16 histerectomia abdominal. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, v. 25, p.
17 59-60, 2005.
- 18 KOOP, C.; VOGEL, E.; RETTORI, M.C.; DELAGRANGE, P.; MISLIN, R.
19 Anxiolyticlike properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of MT1
20 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness.
21 *Neupharmacology*, v.39, p.1865-1871, 2000.
- 22 KOSIR, R.; ZMRZLJAK, U.P.; BELE, T.; ACIMOVIC, J.; PERSE, M.; MAJDIC, G.;
23 PREHN, C.; ADAMSKI, J.; ROZMAN, D. Circadian expression of steroidogenic
24 cytochromes P450 in the mouse adrenal gland – involvement of cAMP-responsive
25 element modulator in epigenetic regulation of Cyp17a1. *The Federation of European*
26 *Biochemical Societies Journal*, v. 279, p. 1584–1593, 2012.
- 27 KRITSIDIMA, M., NEWTON, T., ASIMAKOPOULOU, K. The effects of lavender scent
28 on dental patient anxiety levels: a cluster randomised-controlled trial. *Community*
29 *Dentistry and Oral Epidemiology*, v.38, p. 83–87, 2010.
- 30 KUTLU, A.K., YILMAZ, E., ÇEÇEN, D. Effects of aroma inhalation on examination
31 anxiety. *Teaching and Learning in Nursing*, v. 3, p. 125–130, 2008.
- 32 LEHRNER, J.; ECKERSBERGER, C.; WALLA, P.; POTSCH, G.; DEECKLE, L.
33 Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in
34 female patients. *Physiology and Behavior*, v.71, p.83-86, 2000.
- 35 LEHRNER, J.; MARWINSKI, G.; LEHR, S.; JOHREN, P.; DEECKE, L. Ambient
36 odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office.
37 *Physiology and Behavior*, v.86, p. 92-95, 2005.
- 38 LEITE, M.P.; FASSIN JR., J.; BAZILONI E. M. F., ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.;
39 LEITE, J. R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in
40 rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18 (Supl.), p. 661-666, 2008.

- 1 LEMON, K. An assessment of treating depression and anxiety with aromatherapy.
2 *The International Journal of Aromatherapy*, v. 14, p. 63–69, 2004.
- 3 LEWY, A. J.; CUTLER, N. L.; SACKER, R. L. The endogenous melatonin profile as a
4 marker for circadian phase position. *Journal of Biological Rhythms*, v.14, p.227-236,
5 1999.
- 6 LIMA, N. G. P. B.; SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C. F.; ALVES, M. F.; SOUZA, F. S.;
7 MACEDO, R. O.; CARDOSO, R. B.; MORAIS, L. C.; DINIZ, M. F. M.; ALMEIDA, R.
8 N. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a
9 natural compound found in foods and plants. *Pharmacology, Biochemistry and*
10 *Behavior*, v. 103, p. 450–454, 2013.
- 11 LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; PIATO, A.L.; HERRMANN, A.P.;
12 BIRCK, F.D.; CARAMÃO, E.B.; NUNES, D.S.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E.
13 Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*, v. 16, p. 303-307, 2009.
- 14 LINCK, V.M.; SILVA, A.L.; FIGUEIRO, M.; CAMARÃO, E.B.; MORENO, P.R.H.;
15 ELISABETSKY, E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and
16 aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, v. 17, p. 679–683, 2010.
- 17 LIPP, M.E.N. *Manual do inventário de sintomas de stress para adultos de Lipp*
18 *(ISSL)*. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2000.
- 19 LORDELO, R.A.; MANCINI, M.C.; CERCATO, C.; HALPERN, A. Eixos Hormonais na
20 Obesidade: Causa ou Efeito? *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*,
21 v. 51, p. 34-41, 2007.
- 22 LUGO, M.J.R.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNANDEZ-MATEOS, M.P.;
23 SCACCHI, P.A.; CARDINALI, D.P.; ESQUIFINO, A.I. Melatonin effect on plasma
24 adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high
25 fat–fed rats. *Journal of Pineal Research*, v. 49, p. 342–348, 2010.
- 26 LUGO, M.J.R.; *Possible papel de La melatonina em La inducción de obesidad por*
27 *dieta hipercalórica: efectos metabólicos em ratas macho*. Tese (Doutorado em
28 Bioquímica) – Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Biología
29 Molecular III, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2011, 179p.
- 30 LV, X.N.; LIU, Z.J.; ZHANG, H.J.; TZENG, C.M. Aromatherapy and the Central Nerve
31 System (CNS): Therapeutic Mechanism and its Associated Genes. *Current Drug*
32 *Targets*, v.14, p.872-879, 2013.
- 33 MAGANHIN, C.C.; CARBONEL, A.A.F.A.; HATTY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-
34 JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J.; SIMÕES, R.S.; BARACAT, E.C.; SOARES-JR, J.M.
35 Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da*
36 *Associação Médica Brasileira*, v. 54, p. 267-271, 2008.
- 37 MARTIN, G. N.; The effect of exposure to odor on the perception of pain.
38 *Psychosomatic Medicine*. v. 68, p. 613-616, 2006.
- 39 MASTEN, Scott A. Bitter Orange (*Citrus aurantium* var. *amara*) Extracts and
40 Constituents (±)-p-synephrine [CAS No. 94-07-5] and (±)-p-octopamine [CAS No.

- 1 104-14-3]: Review of Toxicological Literature. National Toxicology Program, National
2 Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, US
3 Department of Health and Human Services. Contract, n. 01, 2004.
- 4 MIRICK, D.K.; DAVIS, S.; Melatonin as a Biomarker of Circadian Dysregulation.
5 *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v. 17, p. 3306-3313, 2008.
- 6 MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P.L.; GANGEMI, S.
7 *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and
8 evaluation of clinical trials. *Journal of Ethnopharmacology*, v.150, p.791-804, 2013.
- 9 MOCCHIEGANI, E.; SANTARELLI, L.; TIBALDI, A.; MUZZIOLI, M.; BULIAN, D.;
10 CIPRIANO, K.; OLIVIERI, F.; FABRIS, N. Presence of links between zinc and
11 melatonin during the circadian cycle in old mice: effects on thymic endocrine activity
12 and on the survival. *Journal of Neuroimmunology*, v. 86, p. 111–122, 1998.
- 13 MONTESINOS-HERRERO, Clara; PALOU, Lluís. Combination of physical and low-
14 toxicity chemical postharvest treatments for integrated disease management of citrus
15 fruit: a review. *Stewart Postharvest Review*, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2010.
- 16 MUZZARELLI, L.; FORCE, M., SEBOLD, M. Aromatherapy and reducing
17 preprocedural anxiety: a controlled prospective study. *Gastroenterology Nursing*,
18 v.29, p. 466–471, 2006.
- 19 NAKAMURA, A.; FUJIWARA, S.; MATSUMOTO, I.; ABE, K. Stress Repression in
20 Restrained Rats by (R)-(-)-Linalool Inhalation and Gene Expression Profiling of Their
21 Whole Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 5480–5485,
22 2009.
- 23 NI, C.-H.; HOU, W.-H.; KAO, C.-C.; CHANG, M.-L.; YU, L.-F.; WU, C.-C.; CHEN, C.
24 The Anxiolytic Effect of Aromatherapy on Patients Awaiting Ambulatory Surgery: A
25 Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative*
26 *Medicine*, v. 3, ID 927419, p.1-5, 2013. Disponível em:
27 <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/927419>>. Acessado em 20/02/2014.
- 28 NICOLAU, P.F.M. *Psiquiatria Geral. Cérebro e Mente*, v.1, 2010. Disponível em:
29 <<http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/texto13.htm>>. Acessado em 20/02/2014.
- 30 NÖLDNER, M.; GERMER, S.; KOCH, E. Pharmacokinetics of linalool and linalyl
31 acetate, the two main constituents of silexan, an essential oil from *Lavandula*
32 *angustifolia* flowers, in rats. *Planta Medica*, v. 77, pm 44, 2011.
- 33 PACCHIEROTTI, C.; IAPICHINO, S.; BOSSINI, L.; PIERACCINI, F.;
34 CASTROGIOVANNI, P. Melatonin in Psychiatric Disorders, a review on the
35 melatonin involvement in psychiatry. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 22, p.18-32,
36 2001.
- 37 PADRAYUTTAWAT, A.; YOSHIZAWA, T.; TAMURA, H.; TOKUNAGA, T. Optical
38 Isomers and Odor Thresholds of Volatile Constituents in *Citrus sudachi*. *Food*
39 *Science and Technology International Tokyo*, v. 3, p. 402-408, 1997.

- 1 PALO, E.F.; ANTONELLI, G.; BENETAZZO, A.; PREARO, M.; GATTI, R. Human
2 Saliva cortisone and cortisol simultaneous analysis using reverse phase HPLC
3 technique. *Clinica Chimica Acta*, v. 405, p. 60-65, 2009.
- 4 PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. *Melatonin: from molecules to therapy*.
5 Ed.Nova Publishers, 2007. 906 p.
- 6 PANDI-PERUMAL, S.R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.M.; CARDINALI, D.P.;
7 POEGGELER, B.; HARDELAND, R. (2006), Melatonin, Nature's most versatile
8 biological signal?, *The FEBS Journal*, v. 273, p. 2813–2838, 2006.
- 9 PASQUALI, L.; GOUVEIA, V.V.; ANDRIOLA, W.B.; MIRANDA, F.J.; RAMOS, A.L.M.
10 (1994). Questionário de saúde geral de Goldberg (QSG): adaptação
11 brasileira. *Psicologia: teoria e pesquisa*, v. 10, p. 421-37, 1994a.
- 12 PASQUALI, L.; PINELLI JÚNIOR, B.; SOLHA, A.C. Contribuição à validação e
13 normalização da escala de ansiedade-traço do IDATE. *Psicologia: teoria e pesquisa*,
14 v. 10, p. 411-420, 1994.
- 15 PEREIRA, D.S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Revisão: Moléculas que marcam o
16 tempo: implicações para os fenótipos circadianos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*,
17 v. 31, p. 63-71, 2009.
- 18 PERRY, N.; PERRY, E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders.
19 *CNS Drugs*. v. 20, p. 257-280, 2006.
- 20 POYARES, D.; PINTO JR, L.R.; TAVARES, S.; BARROS-VIEIRA, S. Hipnoindutores
21 e insônia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27, p. 2-7, 2005.
- 22 PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus*
23 *aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, v.78, p.1720-
24 1725, 2006.
- 25 PURNELL, J.Q.; BRANDON, D.D.; ISABELLE, L.M.; LORIAUX, D.L.; SAMUELS,
26 M.H. Association of 24-hour cortisol production rates, cortisol-binding globulin, and
27 plasma-free cortisol levels with body composition, leptin levels, and aging in adult
28 men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 89, p.
29 281-287, 2004.
- 30 REITER, R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and*
31 *Cellular Endocrinology*, v. 79, p. C153-C158, 1991.
- 32 REITER, R.J.; BENITEZ-KING, G. Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal
33 deterioration: implications for Psychiatry. *Salud Ment*, v. 32, p. 3-11, 2009.
- 34 RHO, K.; HAN, S.; KIM, K.; LEE, M. Effects of aromatherapy massage on anxiety
35 and self-esteem in korean elderly women: a pilot study. *International Journal of*
36 *Neuroscience*, v.116, p.1447-1455, 2006.
- 37 SADOCK, B.J.; SADOCK, V.A.; KAPLAN, H.I. *Comprehensive Textbook of*
38 *Psychiatry*. NEW YORK: LIPPINCOT WILLIAMS and WILKINS, 2005, 4179 p.

- 1 SANGUINETTI, E. E. *Plantas que curam*. 2.ed. Porto Alegre: Rígel, 1989. p.140.
- 2 SANTOS, C.A.; TORRES, K. R.; LEONART, R. *Plantas medicinais*. 2 ed. São Paulo:
3 Ícone, 1988. p.115
- 4 SANTOS, G.B. *Melatonina reduz o estresse oxidativo e as alterações*
5 *cardiovasculares induzidas pelo estanozolol em ratos submetidos ao exercício de*
6 *natação*, 2010, 75 f. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- 7 SARACINO, M.A.; IACONO, C.; SOMAINI, L.; GERRA, G.; GHEDINI, N.; RAGGI,
8 M.A. Multi-matriz assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined
9 MEPS-HPLC procedure. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 88,
10 p. 643-648, 2014.
- 11 SARRIERA, J.C.; CÂMARA, S.G.; SCHWARCZ, C.; BEM, L.A.; GARANDILLA, M.A.
12 Bem-estar psicológico dos jovens porto-alegrenses. *Psico*, v. 27, p. 79-95, 1996.
- 13 SAYEED, M.S.B.; SHAMS, T.; HOSSAIN, S.F.; RAHMAN, M.R.; MOSTOFA, A.G.M.;
14 KADIR, M.F.; MAHMOOD, S.; ASADUZZAMAN, M. *Nigella sativa* L. seeds modulate
15 mood, anxiety and cognition in healthy adolescent males. *Journal of*
16 *Ethnopharmacology*, v. 152, p. 156–162, 2014.
- 17 SCHER, A.; HALL, W.A.; ZAIDMAN-ZAIT, A.; WEINBERG, J. Sleep Quality, Cortisol
18 levels, and Behavioral Regulation in Toddlers. *Developmental Psychobiology*, v. 52,
19 p. 44-53, 2010.
- 20 SCHMID, D.A.; WICHNIAK, A.; UHR, M.; ISING, M.; BRUNNER, H.; HELD, K.;
21 WEIKEL, J.C.; SONNTAG, A.; STEIGER, A. Changes of Sleep Architecture, Spectral
22 Composition of Sleep EEG, the Nocturnal Secretion of Cortisol, ACTH, GH, Prolactin,
23 Melatonin, Ghrelin, and Leptin, and the DEX-CRH Test in Depressed Patients during
24 Treatment with Mirtazapine, *Neuropsychopharmacology*, v. 31, p. 832–844, 2006.
- 25 SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In:
26 GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Atheneu,
27 p.265-283, 2004.
- 28 SCHUWALD, A.M.; NÖLDNER, M.; WILMES, T.; KLUGBAUER, N.; LEUNER, K.;
29 MÜLLER, W.E. Lavender Oil-Potent Anxiolytic Properties via Modulating Voltage
30 Dependent Calcium Channels. *PLoS ONE*, v. 8, p. e59998, 2013. Disponível em:
31 <doi:10.1371/journal.pone.0059998>. Acessado em 20/02/2014.
- 32 SHAW, D.; ANNETT, J.M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J.C. Anxiolytic effects of lavender
33 oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine*, v.14, p. 613-620, 2007.
- 34 SILENIEKS, L.B.; KOCH, E.; HIGGINS, G.A. Silexan, an essential oil from flowers of
35 *Lavandula angustifolia*, is not recognized as benzodiazepine-like in rats trained to
36 discriminate a diazepam cue. *Phytomedicine*, v.20, p.172-177, 2013.
- 37 SILEXAN®, register 2009: International Standard Randomised Controlled Trial
38 Number ISRCTN74386009. Disponível em: <[http://www.controlled-](http://www.controlled-trials.com/ISRCTN74386009)
39 [trials.com/ISRCTN74386009](http://www.controlled-trials.com/ISRCTN74386009)>. Acessado em 02/09/2013.

- 1 SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L.A. A proteção
2 patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o
3 desenvolvimento tecnológico e industrial. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*,
4 v.8, p.14-22, 2006.
- 5 SIMONIN, G.; BRU, L.; LELIÈVRE, E.; JEANNIOT, J-P.; BROMET, N.; WALTHER,
6 B.; BOURSIER-NEYRET, C. Determination of melatonin in biological fluids in the
7 presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological techniques
8 and GC-MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21,
9 p.591–601, 1999.
- 10 SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the Melatonin Endocrine Message
11 in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by
12 Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacological Reviews*,
13 v. 55, p. 325–395, 2003.
- 14 SIMONNET, G. Preemptive antihyperalgesia to improve preemptive analgesia.
15 *Anesthesiology*, v. 108, p. 352-354, 2008.
- 16 SMITH, S.W. Review, Chiral Toxicology: It's the Same Thing, Only Different.
17 *Toxicological Sciences*, v. 110, p. 4–30, 2009.
- 18 SOARES, A.J.A.; ALVES, M.G.P. Cortisol como variável em psicologia da saúde.
19 *Psicologia, Saúde e Doenças*, v. 7, p. 165-177, 2006.
- 20 SODEN, K.; VINCENT, K.; CRASKE, S.; LUCAS, C.; ASHLEY, S. A randomized
21 controlled trial of aromatherapy massage in a hospice setting. *Palliative Medicine*,
22 v.18, p. 87–92, 2004.
- 23 SOUSA NETO, J.A.; DE CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma
24 revisão da literatura. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 44, p. 5-11, 2008.
- 25 SUGIMOTO, K.; KANAI, A.; SHOJI, N. The effectiveness of the Uchida-Kraepelin test
26 for psychological stress: an analysis of plasma and salivary stress
27 substances. *BioPsychoSocial medicine*, v. 3, n. 5, 2009.
- 28 SUTOH, M.; ITO, S.; KASUYA, E.; YAYOU, K. Effects of exposure to plant-derived
29 odorants on behavior and the concentration of stress-related hormones in steers
30 isolated under a novel environment. *Animal Science Journal*, v. 84, p.159-164, 2013.
- 31 TAKEDA, H.; TSUJITA, J.; KAYA, M.; TAKEMURA, M.; OKU, Y. Differences
32 Between the Physiologic and Psychologic Effects of Aromatherapy Body Treatment.
33 *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 14, p. 1-7, 2008.
- 34 TAN, W.; ZHOU, W.; LUO, H.-S.; LIANG, C.-B.; XIA, H. The inhibitory effect of
35 melatonin on colonic motility disorders induced by water avoidance stress in rats.
36 *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.17, p. 3060-3067,
37 2013.
- 38 TODA, M.; MORIMOTO, K. Effect of lavender aroma on salivary endocrinological
39 stress markers. *Archives of Oral Biology*, v. 53, p. 964-968, 2008.

- 1 TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine
2 factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, v.53, p.865-871, 2002.
- 3 UEHLEKE, B.; SCHAPER, S.; DIENEL, A. SCHLAEFKE, S.; STANGE, R. Phase II
4 trial on the effects of Silexan in patients with neurasthenia, post-traumatic stress
5 disorder or somatization disorder. *Phytomedicine*, v. 19, p. 665-671, 2012.
- 6 UMEZU, T. Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacology*
7 *Biochemistry and Behavior*, v. 64, p. 35-40, 1999.
- 8 UMEZU, T.; ITO, H.; NAGANO, K; YAMAKOSHI, M.; OOUCHI, H.; SAKANIWA, M.;
9 MORITA, M. Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents.
10 *Life Sciences*, v. 72, p. 91-102, 2002.
- 11 UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; YAMAKOSHI, M.; SAKANIWA, M.;
12 MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active
13 constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, p. 713-721, 2006.
- 14 UMEZU, T. Evaluation of the Effects of Plant-derived Essential Oils on Central
15 Nervous System Function Using Discrete Shuttle-type Conditioned Avoidance
16 Response in Mice. *Phytotherapy Research*, v. 26, p. 884-891, 2012.
- 17 VÁSQUEZ, F.M.; SUAREZ, M.A.; PÉREZ, A. Medicinal plants used in the Barros
18 Área, Badajoz Province (Spain). *Journal of ethnopharmacology*, v.55, p.81-85, 1997.
- 19 WARRENBURG, S. Effects of fragrance on emotions: Moods and Physiology.
20 *Chemical Senses*, v. 30, p. i248-i249, 2005.
- 21 WEBER, S. T.; HEUBERGER, E. The Impact of Natural Odors on Affective States in
22 Humans. *Chemical Senses*, v.33, p.433-440, 2008.
- 23 WIEBE, E.E. A randomized trail of aromatherapy to reduce anxiety before abortion.
24 *Effective Clinical Practice*, v. 3, p. 166–169, 2000.
- 25 WOELK, H.; SCHLÄFKE, S. A multi-center, double-blind, randomised study of the
26 lavender oil preparation silexan in comparison to lorazepam for generalized anxiety
27 disorder. *Phytomedicine*, v. 17, p. 94–99, 2010.
- 28 WOLFFENBÜTTEL, A.N. *Perfil químico dos óleos essenciais de Citrus aurantium*
29 *Lineu e Citrus sinensis (L.) Osbeck e avaliação psicofarmacológica da ação*
30 *ansiolítica*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia,
31 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2014, 223p.
- 32 WOLFFENBUTTEL, A.N.; ZAMBONI, A.; KERPEL DOS SANTOS, M.; TASSI
33 BORILLE, B.; AMERICO AUGUSTIN, O.; DE CASSIA MARIOTTI, K.; LEAL, M.B.;
34 PEREIRA LIMBERGER, R. Chemical Components of *Citrus* Essential Oils from
35 Brazil. *The Natural Products Journal*, v. 5, p.14-27, 2015.
- 36 YAMADA, K.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y. Effects of inhaling the vapor of *Lavandula*
37 *burnatii* super-derived essential oil and linalol on plasma adrenocorticotrophic
38 hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental

1 menopausal female rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.28, p.378–379,
2 2005.

3 YAMAMOTO, N. FIJIWARA, S.; SAITO-JIZUMI, K.; KAMEI, A.; SHINOZAKI, F.;
4 WATANABE, Y.; ABE, K.; NAKAMURA, A. Effects of Inhaled (S)-Linalool on
5 Hypothalamic Gene Expression in Rats under Restraint Stress. *Bioscience*
6 *Biotechnology and Biochemistry*, v. 77, p. 2413-2418, 2013.

7 ZHDANOVA, I.V.; WURTMAN, R.J.; REGAN, M.M.; TAYLOR, J.A.; SHI, J.P.;
8 LECLAIR, O.U. Melatonin Treatment for Age-Related Insomnia. *The Journal of*
9 *Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 86, p. 4727–4730, 2001.

10

11