Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2012;33(2):211-215
ISSN 1808-4532

Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris

Ciro Gonçalves Sá[1]; Katrícia Maria Feitosa Cardoso[1]; Rivelilson Mendes Freitas[1]; Chistiane Mendes Feitosa[1,2,*]

[1]Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental,Universidade Federal do Piauí, Teresina - Piauí, Brasil.
[2]Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Campus Petrônio Portela, Ininga, Teresina- Piauí, Brasil.

RESUMO

A Doença de Alzheimer está relacionada a prejuízos na aquisição e retenção da memória, processos que podem ser estudados no laboratório por meio de modelos animais, entre eles o labirinto aquático de Morris, que avalia a memória espacial em ratos. Estudos sobre as propriedades biológicas do gênero *Citrus* destacam atividades importantes como antioxidantes e anticolinesterásica. O objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos do tratamento agudo com o óleo essencial de folhas (OEF) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck no processo de aquisição da memória espacial em ratos Wistar, utilizando o paradigma do labirinto aquático de Morris. O óleo essencial de *Citrus sinensis* possui em sua composição principalmente compostos da classe dos monoterpenos, como o limoneno (20,14%), citronelol (30,42%) e o geranial (31,42%). Os animais foram tratados previamente com doses do óleo essencial (OE) de *C. sinensis* (L.) Osbeck de 50, 100 e 200 mg/kg e realizados testes de campo aberto e do labirinto aquático de Morris. A aquisição da memória espacial é avaliada pelo tempo que o animal leva para localizar a plataforma depois de ter sido treinado. Nos resultados do campo aberto foi demonstrado que os animais não apresentam estímulo motor quando tratados com o óleo essencial de *Citrus sinensis* e os resultados do labirinto aquático foram significativamente menores na latência para encontrarem a plataforma submersa do que o grupo controle negativo [p<0,01] indicando uma capacidade de memória maior nos animais tratados, mas que devem ser reforçados por outros testes de memória preconizado na literatura.

Palavras-chave: *C. sinensis*. Memória. Doença de Alzheimer. Labirinto Aquático de Morris.

Autor correspondente: Chistiane Mendes Feitosa - Universidade Federal do Piauí - Departamento de Química - Campus Petrônio Portela - Ininga CEP.64049-550 - Teresina - Piauí - Brasil - e-mail: chistiane@ufpi.edu.br

INTRODUÇÃO

As doenças relacionadas a déficits cognitivos como a Doença de Alzheimer (DA) e prejuízos relacionados à aquisição e retenção da memória acometem cada vez mais pessoas, interferindo assim na qualidade de vida desses indivíduos. (Oliveira & Bizarro, 2007). A DA é caracterizada por um déficit da neurotransmissão colinérgica e pode ser tratada com agentes que restaurem o nível de acetilcolina através da inibição de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) e também reduzindo a agregação de β-amilóide e a formação das fibrilas neurotóxicas na DA. Desta forma, recentemente, há um aumento no interesse de drogas capazes de inibir estes eventos. (Loizzo et. al., 2008)

Muitos aspectos da memória humana e de outros animais assemelham-se, assim, no laboratório, os estudos sobre memória e aprendizagem, os quais podem ter o número de variáveis reduzido, conhecido e melhor controlado (Oliveira & Bizarro, 2007). Para estudar os mecanismos envolvidos sobre a memória de roedores, diversos métodos têm sido propostos, dentre eles, a tarefa do labirinto aquático de Morris, que é um teste comportamental para a avaliação da memória espacial amplamente utilizado na literatura (Bavaresco, 2008). Alguns estudos feitos com ratos indicam que os tratamentos usados na melhora da memória facilitam aos animais encontrarem a plataforma submersa no labirinto aquático (Wang et al., 2006; Alaei et al., 2008).

Estudos realizados com o gênero *Citrus*, apresentaram atividades anticolinesterásica e antioxidante *in vitro*, sendo, portanto, espécies promissoras para futuras formulações farmacêuticas para o tratamento de doenças que envolvem a memória, incluindo a doença de Alzheimer. (Tundis et al., 2012). Outros trabalhos com espécies do gênero *Citrus* demonstraram importantes atividades biológicas para a memória, a saber: antioxidantes (Campêlo et al., 2011) e anticolinesterásica (Conforti et al., 2007), sendo importante a realização de estudos dos compostos relatados deste gênero na avaliação da memória de ratos.

Neste trabalho avaliamos o efeito do tratamento com o OEF de *C. sinensis* (L.) Osbeck. sobre a memória

espacial em ratos Wistar utilizando o experimento do Labirinto Aquático de Morris.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

O projeto para realização deste trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFPI sob parecer de número (007/11).

Animais: Neste experimento foram utilizados ratos Wistar, machos, oriundos do biotério da Universidade Federal do Piauí, pesando entre 250 -300g. Os animais foram mantidos no laboratório do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, com água e ração à vontade, até o início dos testes. Foi controlado o ciclo de luz (12/12 h) e a temperatura climatizada (22 ± 1 °C).

Tratamento utilizado em cada grupo experimental.

Grupos experimentais: Foi realizado um experimento, utilizando-se 5 grupos com 7 animais nos grupos controles, 6 animais nos grupos OE 50 e OE 100 e 5 animais no grupo OE 200. Os grupos foram tratados da seguinte forma: controle negativo (solução de *Tween* 80 a 0,5%), controle positivo (neostigmina 0,5 mg/kg), OEF de *C. sinenesis* (L.) Osbeck (50 e 100 e 200 mg/kg), determinadas em estudos pilotos de toxicidade. Em todos os experimentos as doses foram agudas, dose única, aplicadas via oral (v.o.) às 8 horas da manhã, 24 horas antes dos treinos realizados no Labirinto aquático de Morris. Os volumes variaram de acordo com a dosagem e o peso dos animais, utilizando-se uma solução de concentração de 50 g/L.

Caracterização da área e coleta de material vegetal

As folhas obtidas de *C. sinensis* (L.) Osbeck para o referido estudo foram coletadas às 8 horas da manhã do mês de Fevereiro de 2010, de hortas medicinais existentes nas proximidades do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, no município de Picos, Piauí. As exsicatas da espécie (Número 27.143) foram identificadas e depositadas no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí.

Extração do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

O OE de *C. sinensis* (L.) Osbeck foi obtido partindo-se de 1.080 g de folhas frescas trituradas e utilizando-se o sistema de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger, durante o período de quatro horas. O óleo coletado foi subsequentemente seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e mantido sob refrigeração até a realização da análise. O rendimento foi de 0,17%, calculados pela razão entre os pesos do óleo obtido e do material vegetal fresco.

Análise do Óleo Volátil e Identificação dos Constituintes

A análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatrógrafo à gás da marca Shimadzu, modelo GC 17 A, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & Scientific não-polar DB-5, (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 µm de espessura do filme); as condições de operações foram: temperatura do injetor a 250 ºC interface de 270 ºC e a coluna programada para operar 50 ºC, com elevação da temperatura na taxa de 5° C min^{-1}, até 180 ºC e taxa de 10 ºC min^{-1} até a temperatura de 250 ºC, carreado por gás hélio; velocidade de fluxo 1 mL/min e modo de divisão. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30-450 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro Wiley e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção, bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (Adams, 1995)

Teste do Campo Aberto

Para este experimento, os ratos foram divididos em cinco grupos (n=8) e tratados com óleo essencial de *Citrus sinensis* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.), com diazepam (2 mg/kg, i.p., controle positivo) e veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%, v.o.). A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por (Archer, 1973). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, foram observados durante o tempo de 5 minutos.

Teste do Labirinto aquático de Morris (Morris Water Maze)

Este teste avalia a capacidade do animal para a aquisição de memória espacial, ao se mensurar a latência para que o animal localize uma plataforma submersa em um tanque com água opaca (Morris *et al*., 1982). Foi utilizado um tanque circular de fibra de vidro, com 134,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura, com uma plataforma quadrada de aço inoxidável, com dimensões de 15,0 x 15,0 cm de largura e 28,5 cm de altura, localizado no centro de uma sala de 12 m^2, com uma janela superior no ponto sul, sendo os treinos e os testes realizados a partir das 8 horas da manhã. Para a realização do teste, foi adicionado no tanque água até que o nível desta ultrapassasse 2,0 cm a altura da plataforma. Em seguida, a água foi deixada opaca com acréscimo de amido de milho. O teste consistiu de 2 dias de treinamento e uma sessão de testes realizada 48 horas após o último treino.

Na fase de treinamento, os ratos tinham 6 ensaios diários, com um tempo máximo de 54 segundos para cada ensaio e intervalos de 30 segundos para encontrar a plataforma localizada no quadrante noroeste. Para cada teste o animal foi solto de frente para a parede do tanque,

saindo de pontos pseudo-aleatório, que não seja daquele onde estava a plataforma. A aquisição da memória espacial foi avaliada após o término dos treinos no teste feito no quarto dia do experimento.

Análise estatística

Análise dos resultados: Os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica serão analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de *Student Newman Keuls* como *post hoc* teste através do programa GraphPad Prism versão 3.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software. O mesmo programa (GraphPad Prism©) será utilizado para confecção dos gráficos dos resultados obtidos neste trabalho. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas a partir de $p<0,05$.

RESULTADOS

A análise do OE das folhas de *C. sinensis* (L.) Osbeck revelou a presença de uma mistura de compostos: limoneno (20,14%), mirceno (0,64%), trans-beta-ocimeno (0,73%), linalol (2,58%), citronelal (1,23%), citronelol (30,42%), neral (1,71%), geranial (31,42%) e beta-cariofileno (2,04%) (Tabela 1) (Adams, 2001).

Tabela 1 - Rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de C. sinensis (L.) Osbeck.

Constituintes	Área (%)	* IK Calc.	*IK Literatura
Mirceno	0,64	989,3	991
Limoneno	20,14	1030,3	1031
Trans-beta-ocimeno	0,73	1046,0	1050
Linalol	2,58	1113,8	1104
Citronelal	1,23	1151,3	1153
Citronelol	30,42	1242,9	1233
Neral	1,71	1245,9	1240
Geranial	31,42	1277,8	1270
Beta-cariofileno	2,04	1413,3	1418
Total	90,91	-	

* IK= Indice de Kovat

Os resultados do teste de campo aberto indicam uma diminuição significativa em relação ao número de quadrantes percorridos pelo animal, quando se compara o grupo controle negativo, tratados apenas com o veículo, com os demais grupos, o controle positivo que foi tratado com diazepam (2 mg/kg), um ansiolítico, e os grupos tratados com o óleo essencial de *Citrus sinensis*, nas doses 50, 100 e 200 mg/kg (Figura 1) ($F(4,45) = 24,46$; $p < 0,0001$) e em relação ao movimento de *rearing*, apenas os grupos tratados com o óleo essência de *Citrus sinensis* apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo controle negativo (Figura 2) ($F(4, 35) = 2,954$; $p < 0,0334$). Os dados relacionados ao *grooming* não possuem diferença significativa. (Figura 3) ($F(4, 35) = 1,504$; $p < 0,2221$)

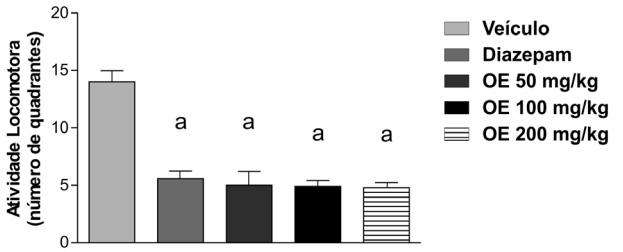

Figura 1- Efeito do tratamento com óleo essencial de Citrus sinensis (L.) Osbeck.

Doses de (50, 100 e 200 mg/kg) de C. sinensis sobre o desempenho (número de cruzamentos) na tarefa de campo aberto. Os resultados são a média ± EMP determinados por análise de variância. a - ($P < 0,0001$ em comparação ao grupo controle Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

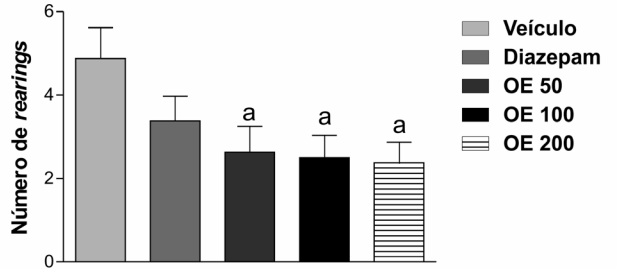

Figura 2 – Efeito do tratamento com óleo essencial de Citrus sinensis (L.) Osbeck

Doses (50, 100 e 200 mg/kg) de C. sinensis sobre o desempenho (número de rearing) na tarefa de campo aberto. Os resultados são a média ± EMP determinados por análise de variância. a - ($P < 0,05$ em comparação ao grupo controle Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

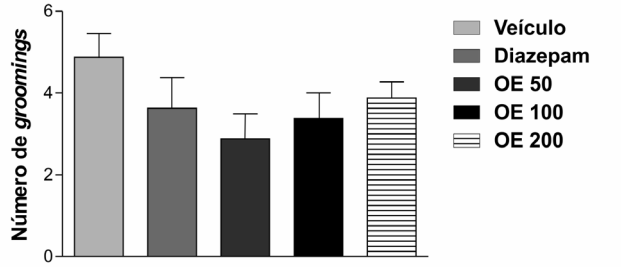

Figura 3 – Efeito do tratamento com óleo essencial de Citrus sinensis (L.) Osbeck

Doses de (50, 100 e 200 mg/kg) de C. sinensis sobre o desempenho (número de grooming) na tarefa de campo aberto. Os resultados são a média ± EMP determinados por análise de variância.

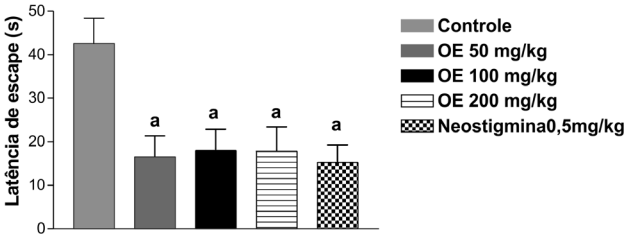

Figura 4 – Efeitos do tratamento com o óleo essencial de C. sinensis (L.) Osbeck

Doses de (50, 100 e 200 mg/kg) de C. sinensis e de neostigmina (0,5 mg/kg) sobre a latência de escape no teste do labirinto aquático de Morris em ratos a - quando comparado ao grupo controle tratado com veículo ($p<0.01$).

O tratamento com o OEF de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck reduziu significativamente o tempo que o animal leva para encontrar a plataforma submersa no teste do labirinto aquático de Morris quando se compara o grupo tratado apenas com veículo, com uma média de 42,6 s e os grupos tratados com o OEF de *C. sinensis* (L.) Osbeck nas

doses de 50, 100 e 200 mg/kg, com as respectivas médias de 16,5 s, 18 s e 17,8 s, tendo assim reduções percentuais de 61,2%, 57,6% e 58,2%, respectivamente, ($p<0,01$) e uma redução de 64% quando comparado à média do grupo controle que foi tratado apenas com o veículo e a média do grupo tratado com neostigmina 0,5 mg/kg, que foi de 15,3 s (Figura 4). ($F (4, 26) = 5,643$; $p = 0,0021$)

DISCUSSÃO

No resultado da identificação do óleo essencial de *Citrus sinensis* foram encontrados em maior quantidade compostos da classe dos monoterpenos. Estudos realizados com outros óleos essenciais de plantas inibidoras da AChE que também apresentaram em sua composição compostos da classe de terpenos, como com a *Salvia lavundulaefolia* e *Melissa officinalis* (Perry et al, 2002; Ferreira et al., 2006), foram seguidos de estudos cognitivos em adultos portadores da DA, sendo eles a Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer (ADAS) e a Escala de Avaliação Clínica da demência (CDR). Os resultados mostram uma melhora após 16 semanas nos dois testes realizados para os pacientes que utilizaram o extrato das duas plantas em comparação aos pacientes tratados com placebo, indicando que essas plantas podem futuramente ser utilizadas no tratamento da doença de Alzheimer (Akhondzadeh et al., 2003a; Akhondzadeh et al., 2003b), assim como outras plantas que apresentem atividades semelhantes.

Os testes de campo aberto foram realizados para detectar deficiências motoras que poderiam possivelmente afetar o desempenho dos animais tratados com o óleo essencial de *Citrus sinensis* e mostram que a locomoção dos animais não é comprometida pela ação do óleo, e que os animais tratados apenas com o veículo apresentaram maior movimentação no experimento (Freitas, 2010), além de ter uma significativa diminuição no número de *rearing*, indicando haver uma ação ansiolítica.

A escolha de um modelo experimental para avaliação do aprendizado e a memória de um roedor, deve levar em consideração a capacidade do animal de aprender a tarefa e sua capacidade de executá-la. Na avaliação da cognição em ratos, o procedimento experimental do labirinto aquático de Morris é adequada, uma vez que estes animais se mostram bons nadadores e apresentam uma boa capacidade de localização espacial requerida neste teste pelo fato da água ser um meio aversivo, a tendência desta espécie é procurar escapar desse meio (Pettenuzzo, 2001).

Nos estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa e apresentados na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, analisando a atividade *in vitro* da enzima acetilcolinesterase com o óleo OEF de *C. sinensis*, foram relatados valores de inibição do OE sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* no valor correspondente de $CI_{50} = 63$ µg/mL em comparação a um inibidor reversível da AChE, que foi utilizado como padrão (neostigmina) com o valor de $CI_{50} = 1,87$ µg/mL.

Em experimentos com labirinto aquático e ratos Wistar jovens, Segal *et al* (1988), foram um dos primeiros pesquisadores a estudar a correlação entre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro de ratos e o desempenho em uma tarefa espacial. Nesse estudo os autores avaliaram a atividade da enzima AChE em 43 regiões cerebrais diferentes de ratos. A aprendizagem individual e os índices de retenção foram encontrados e correlacionados significativamente com o nível da AChE em regiões específicas, como o corpo estriado e hipocampo. Nesse estudo foi verificado que os altos níveis da AChE nessas regiões cerebrais previu um desempenho ruim dos ratos no labirinto aquático. Assim, a atividade colinérgica em regiões selecionadas do cérebro dos ratos deve estar envolvida na execução de tarefas como a memória espacial.

Os inibidores da AChE utilizados como tratamento da Doença de Alzheimer (tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina, como a enzima AChE, aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (Grossberg et al., 2003). Portanto, analisando nossos resultados podemos sugerir que os efeitos do OE. de *C. sinensis*, por ser um inibidor da AChE, melhorou o desempenho dos animais tratados com o OE, quando comparado com o grupo tratado apenas com o *Tween* 80 a 0,5% e um resultado estatísticamente igual, quando comparado ao grupo tratado com um inibidor reversível da AChE, a neostigmina.

Pesquisas indicam que as frutas cítricas têm um grande potencial antioxidante devido, provavelmente, à concentração de fenóis totais e flavonóides (Peter, 2011), sendo uma importante atividade para a preservação da memória, a ação do OEF de *C. sinensis* nessa avaliação preliminar da memória de ratos (Figura 1) apresentou um resultado promissor para futuros testes que são necessários para a comprovação dessa atividade. No entanto, com esses resultados, podemos sugerir que novos testes complementares sobre o processo de memória em ratos precisam ser feitos para justificar o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento FAPEPI e CNPq.

ABSTRACT

Effect of oral treatment with essential oil of Citrus sinensis (L) Osbeck in the retention of spatial memory in rats evaluated in the Morris water maze

Alzheimer's disease is related to damage in memory acquisition and retention that can be studied in the laboratory through animal studies, including the Morris water maze, which assesses the spatial memory in rats. The *Citrus* has many studies on biological activities that are important for memory function as antioxidants and anticholinesterase. The objective of this study is to evaluate the effects of acute treatment with the essential oil of leaves (EOL) from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck in the acquisition of spatial memory in rats, using the paradigm of the Morris water maze. The essential oil of *Citrus sinensis* has in composition mainly composed of the class of monoterpenes such as limonene (24.14%), citronellol (30.42%) and geranial (31,42%). The animals

were previously untreated with doses of essential oil (EO) of *Citrus* sinensis 50, 100 e 200 mg/kg and the open field test conducted and the Morris water maze task. The acquisition of memory space is evaluated by time the animal takes to locate the platform after having been trained. The results of the open field was demonstrated that animals do not exhibit motor stimulus when treated with the essential oil of *Citrus sinensis* and the results of water maze were significantly lower in to find the submerged platform than the negative control group [p<0.01] indicating an increased memory capacity in the treated animals, but must be reinforced by other memory tests recommended by the literature.
Keywords: *Citrus sinensis*. Memory, Alzheimer's disease. Morris water maze.

REFERÊNCIAS

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass epectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing; 2001. 456p.

Alaei H, Moloudi R, Sarkaki AR. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. J Bodyw Mov Ther. 2008;12(1):72-5.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. Anim Behav. 1973;21(2):205-35.

Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003a;74(7):863–6

Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. J Clin Pharm Ther. 2003b;28(1):53–9.

Bavaresco CS. Alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos à administração intra-estriatal de hipoxantina [Tese]. Porto Alegre: Departamento de Bioquimica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008

Campêlo LML, Almeida AC, Freitas RLM, Cerqueira GS, Sousa GF, Saldanha GB, Feitosa CM, Freitas RM. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. J Biomed Biotechnol. 2011:Article ID 678673:8p. DOI:10.1155/2011/678673

Conforti F, Statti GA, Tundis R, Loizzo MR, Menichini F. *In vitro* Activities of *Citrus medica* L. vc. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. Phytother Res. 2007;21 (5):427-433.

Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araujo MEM. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J Ethnopharm. 2006;108(1):31–37.

Freitas, RM. Lipoic Acid Increases Hippocampal Choline Acetyltransferase and Acetylcholinesterase Activities and Improvement Memory in Epileptic Rats. Neurochem Res. 2010; 35(1):162–170.

Grossberg GT.Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. Curr The Res. 2003;64(4):216-235.

Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Menichini F, Products and their Derivatives as Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Disorders: An Update. Curr Med Chem. 2008;15(12):1209-1228.

Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature. 1982;297:681-683.

Oliveira A, Bizarro L. A pesquisa sobre memória através de modelos experimentais. In: Oliveira A. Memória: cognição e comportamento. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2007. p.65-83.

Perry NS, Houghton PJ, Jenner P, Keith A, Perry EK. Salvia lavandulaefolia essential oil inhibits cholinesterase in vivo. Phytomedicine. 2002;9(1):48-51.

Pettenuzzo LF. Efeito da administração crônica pós-natal dos ácidos propiônicos e metilmalônico sobre o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Water Maze) e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em hipocampo. [Dissertação]. Porto Alegre:Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

Peter AR. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. Sci Hortic. 2011;129(2):253-258.

Segal M, Greenberger V, Israeli M, Biegon A. A correlation between regional acetylcholinesterase activity in rat brain and performance in a spatial task. Behav Brain Res. 1988;30(2):215-219.

Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Colica C, Menichini F, Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *Citrus aurantium* L., *Citrus bergamia* and Risso and Poit. Peel Essential Oils. J Food Sci. 2012;71(1):H40-H46.

Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial lerning and memory in aged rats. Br J Pharmacol. 2006;148(2):147-153.

Recebido em 9 de janeiro de 2012.

Aceito em 9 de maio de 2012.