



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO MESTRADO CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA, *CAMPUS* DE SOBRAL**

MILENA FONTENELE DE OLIVEIRA

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO 1,8-CINEOL EM
MODELOS DE ANSIEDADE COM CAMUNDONGOS**

SOBRAL-CE

2024

MILENA FONTENELE DE OLIVEIRA

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO 1,8-CINEOL EM
MODELOS DE ANSIEDADE COM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.
Co-orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

SOBRAL-CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32e de Oliveira, Milena Fontenele.
EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DO 1,8-CINEOL EM MODELOS DE
ANSIEDADE COM CAMUNDONGOS / Milena Fontenele de Oliveira. – 2024.
65 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.
1. Ansiedade. 2. 1,8-cineol. 3. testes comportamentais. 4. desequilíbrio redox. 5. camundongos. I.
Título.

CDD 610

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir viver esse momento e por ter me concedido força e sabedoria para contornar obstáculos inevitáveis na trajetória de uma jovem e inexperiente pesquisadora. Desde o momento da seleção para ingresso no programa de Mestrado senti o seu cuidado, expressado por meio de pessoas que foram verdadeiros anjos na minha vida. Cogitei desistir da vaga ao observar a concorrência, entretanto, me mantive firme e aqui estou eu: concluindo aquilo que um dia me pareceu impossível. Agradeço à Ele por abrir caminhos e me fortalecer até aqui, na realização de um sonho imenso.

Também sou grata pelo apoio da minha família, em especial, meus pais **Francisco Mário de Oliveira** e **Francisca Maria Machado Fontenele**, nunca cansarei de externalizar a minha gratidão por perceber a sorte de ter vocês como referências no trato com as responsabilidades e sonhos. Obrigada por serem meu porto seguro. Agradeço meus irmãos **Mirela Fontenele de Oliveira** e **João Victor Fontenele de Oliveira** pela parceria e cumplicidade.

Agradeço também imensamente ao meu noivo **Pedro Fellipe de Azevedo Rangel** por todo amor, apoio, injeções de ânimo e por ser meu colo nos momentos difíceis. Você representa o verdadeiro significado de família. Obrigada por toda a cumplicidade, meu amor. Esse sonho foi sonhado junto, o que o torna bem mais especial.

Gostaria de estender meus agradecimentos ao meu professor orientador **Francisco Walber Ferreira da Silva**. Muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado e pela disponibilidade em me ajudar com as minhas dificuldades. Agradeço também a sua flexibilidade, a qual me permitiu desenvolver um trabalho em parceria com o laboratório de Fisiologia e Neurofarmacologia. Me sinto verdadeiramente feliz e satisfeita por ter sido sua orientanda; tenha plena certeza de que você me ensinou lições valiosas que internalizei para a vida toda, profissional e pessoalmente falando.

Agradeço também a minha professora co-orientadora **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar**. Obrigada por ter sido tão acolhedora comigo desde a primeira orientação, pela paciência, por ser tão solícita e empolgada com a pesquisa comportamental. Levo comigo o seu brilho nos olhos ao descrever a nossa metodologia, além da sua assertividade e flexibilidade. A admiração que sinto por você é enorme, agradeço a sua participação e presença.

Gostaria de agradecer os professores **Rodrigo Maia da Silva** e **Inez Liberato Evangelista** por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa. Obrigada por

compartilharem o tempo de vocês conosco, além do conhecimento e experiência fenomenais que vocês possuem. Me sinto honrada em saber que receberei as vossas contribuições preciosas, a fim de aprimorar o trabalho da melhor maneira.

Um agradecimento muito especial ao meu amigo e colega de profissão **Antonio Renan Santana**, pois ele foi a minha dupla do começo ao fim do Mestrado. Ele que possui muitas qualidades, dentre elas o senso de responsabilidade, compromisso e companheirismo. Obrigada por dedicar seu tempo à realização dos experimentos, por oferecer soluções para algumas questões e, especialmente, pelo seu comprometimento.

Agradeço a Médica Veterinária **Alana Godinho** por todo o auxílio e suporte quando necessário. Obrigada por ter sido tão atenciosa conosco, especialmente no período de treinamento, mas não só. Obrigada pela disponibilidade e generosidade, você me ensinou muito e deixou registrada em mim a admiração pelo seu trabalho tão essencial e sério.

Agradeço também alunos de iniciação científica **Jeremias** pela ajuda no início dos experimentos e ao técnico do laboratório **Francisco** pela ajuda sempre que solicitada. Agradeço também os IC's **Daniele, D'Lucas, Mário, Gabriel, Raul e Yanna** pela contribuição essencial na fase das análises neuroquímicas. Obrigada pelo compromisso e pela vontade genuína de aprender. Que vocês possam continuar trilhando o caminho da pesquisa neurocientífica.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

E aos animais que doaram as suas vidas em prol do avanço neurocientífico.

Dedico esse trabalho à minha família e a todas as pessoas que brilham os olhos aos estudar neurociências.

*“Todo ato de percepção é, algum grau, um ato de criação.
E todo ato de memória é, [algum grau], de imaginação.”*

- Oliver Sacks

RESUMO

Os transtornos de ansiedade agrupam um conjunto de transtornos psicológicos que são caracterizados por sinais e sintomas em comum. Na esfera emocional, observa-se o medo, ansiedade e estresse desproporcionais ao contexto. Os âmbitos familiar, laboral e de relacionamentos têm se mostrado como os principais prejudicados em um quadro ansioso, comprometendo, pois, a qualidade de vida dos pacientes. Quanto aos psicofármacos tradicionais, apesar de desempenharem um papel ímpar no controle dos sintomas, podem gerar efeitos adversos nos pacientes, os quais diminuem as chances de adesão terapêutica. Dessa forma, torna-se necessária a busca por substâncias alternativas que apresentam eficácia no tratamento de pacientes com transtornos de ansiedade, cujos efeitos colaterais sejam menos danosos. No presente estudo, investigamos os efeitos do 1,8-cineol (CIN) em modelos preditivos de ansiedade, como o Teste do Labirinto em Cruz Elevado e Teste Caixa Claro/escuro. Para isso, camundongos swiss machos foram tratados por 14 dias com CIN nas doses de 5,0, 10 e 25 mg/kg, Diazepam 1 mg/kg ou salina. A avaliação comportamental mostrou que o CIN na dosagem de 5,0 mg/kg apresentou efeito do tipo ansiolítico nos testes Labirinto em Cruz Elevado e Caixa Claro/escuro e melhorou a capacidade exploratória dos animais, evidenciada pelos testes Placa Perfurada e Campo Aberto. Na análise neuroquímica, reduziu os níveis de malondialdeído e níveis de nitrito/nitrato, especialmente na dosagem de 5,0 mg/kg, mostrando atividade antioxidante e moduladora do sistema antioxidante endógeno. Além disso, evidenciou-se que o CIN atua via receptor GABAA, dado apresentado através do uso da droga flumazenil, antagonista de tal receptor gabaérgico. Conclui-se que o presente trabalho concedeu evidências pré-clínicas do CIN como uma nova abordagem terapêutica para ser utilizado no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos como os transtornos de ansiedade.

PALAVRAS-CHAVE: ansiedade; 1,8-cineol; testes comportamentais; desequilíbrio redox; camundongos.

ABSTRACT

Anxiety disorders group a set of psychological disorders that are characterized by common signs and symptoms. In the emotional sphere, there is fear, anxiety and stress that are disproportionate to the context. The family, work and relationship spheres have been shown to be the main harms in an anxious situation, thus compromising the quality of life of patients. As for traditional psychotropic drugs, despite playing a unique role in controlling symptoms, they can generate adverse effects on patients, which reduce the chances of therapeutic adherence. Therefore, it is necessary to search for alternative substances that are effective in treating patients with anxiety disorders, whose side effects are less harmful. In the present study, we investigated the effects of 1,8-cineole (CIN) in predictive models of anxiety, such as the Elevated Plus Maze Test and the Light/Dark Box Test. For this, male Swiss mice were treated for 14 days with CIN at doses of 5, 10 and 25 mg/kg, Diazepam 1 mg/kg or saline. The behavioral evaluation showed that CIN at a dosage of 5 mg/kg had an anxiolytic-like effect in the Elevated Cross Maze and Light/Dark Box tests and improved the animals' exploratory capacity, evidenced by the Perforated Plate and Open Field tests. In neurochemical analysis, it reduced malondialdehyde levels and nitrite/nitrate levels, especially at a dosage of 5 mg/kg, showing antioxidant and modulating activity of the endogenous antioxidant system. Furthermore, it was shown that CIN acts via the GABAA receptor, data presented through the use of the drug flumazenil, an antagonist of this GABAergic receptor. It is concluded that the present work provided preclinical evidence of CIN as a new therapeutic approach to be used in the treatment of neuropsychiatric disorders such as anxiety disorders.

KEYWORDS: Anxiety; 1,8-cineole; behavioral tests; redox imbalance; mice;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da molécula do 1,8-cineol	26
Figura 2: Três visualizações diferentes da estrutura molecular otimizada do CIN	26
Figura 3: Delineamento experimental	30
Figura 4: Teste Campo Aberto	31
Figura 5: Teste Labirinto Elevado em Cruz	32
Figura 6: Teste Caixa Claro/Escuro	34
Figura 7: Teste Placa Perfurada	35
Figura 8: Análise de atividade ansiolítica - Teste Labirinto Elevado em Cruz	44
Figura 9: Análise de atividade ansiolítica - Teste Caixa Claro/Escuro	46
Figura 10: Análise de atividade exploratória - Teste Campo Aberto – T0	47
Figura 11: Análise de atividade exploratória - Teste Campo Aberto – T14	48
Figura 12: Análise de atividade exploratória - Teste Placa Perfurada	49
Figura 13: Níveis de Peroxidação Lipídica nas áreas cerebrais	51
Figura 14: Níveis de Nitrito/Nitrato nas áreas cerebrais	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Transtornos de ansiedade: definição e classificações.....	15
2.1.2 Epidemiologia.....	18
2.1.3 Neurobiologia da ansiedade.....	19
2.2 Modelos preditivos de efeitos ansiolíticos.....	22
2.3 Tratamento clínico.....	23
2.4 Eucaliptol ou 1,8-cineol (CIN).....	25
2.4.1 Toxicidade do CIN.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo Geral.....	28
5.2 Objetivos Específicos.....	28
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
6.1 Animais.....	29
6.2 Drogas e Soluções.....	29
6.3 Modelo Experimental.....	29
6.4 Testes comportamentais.....	30
6.4.1 Teste do Campo Aberto (TCA).....	30
6.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE).....	32
2.4.3 Caixa Teste Claro/Escuro (CTCE).....	33
2.4.4 Teste da Placa Perfurada (TPF).....	33
2.5 Eutanásia e dissecação das áreas cerebrais.....	34
2.6 Análises Neuroquímicas.....	34
2.6.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS).....	34
2.6.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	34
2.7 Análises Estatísticas.....	35
ARTIGO CIENTÍFICO	
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40

Drogas e Soluções.....	40
Grupos e testes comportamentais.....	40
<i>Teste do Campo Aberto (TCA).....</i>	<i>41</i>
<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE).....</i>	<i>41</i>
<i>Caixa Teste Claro/Escuro (CTCE).....</i>	<i>41</i>
<i>Teste da Placa Perfurada (TPF).....</i>	<i>42</i>
Eutanásia e dissecação das áreas cerebrais.....	42
Determinação da peroxidação lipídica (TBARS) e concentração de nitrito/nitrato.....	42
Análises Estatísticas.....	43
RESULTADOS.....	43
Testes comportamentais.....	43
Avaliação da atividade ansiolítica.....	43
Avaliação da atividade exploratória.....	46
Análises Neuroquímicas.....	49
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	58
CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES.....	58
AGRADECIMENTOS.....	58
CONFLITOS DE INTERESSE.....	59
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade agrupam um conjunto de transtornos psicológicos que são caracterizados por sinais e sintomas em comum, possuindo frequência e intensidade altas, além de comprometimento funcional importante. Interferem negativamente na qualidade de vida das pessoas acometidas, com potencial de lhes causar prejuízos significativos em diversos âmbitos da vida, como o social, o familiar e o laboral (D'ávila *et al.*, 2020).

Quanto às categorias nosológicas, atualmente o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) os classifica como Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, Fobia Específica, Transtorno de Ansiedade Social (fobia social), Agorafobia, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Pânico, Transtorno de Ansiedade induzido por substância/medicamento e Transtorno de Ansiedade devido a outra Condição Médica (DSM-V-TR, 2023).

As variações entre os transtornos de ansiedade residem nos tipos específicos de objetos ou situações que provocam medo, ansiedade ou comportamentos de esquiva, assim como na natureza dos pensamentos associados. Embora haja uma considerável comorbidade entre esses transtornos, sua distinção pode ser estabelecida através da análise minuciosa dos tipos de situações temidas e evitadas, bem como através do conteúdo dos pensamentos e da identificação das crenças envolvidas (Bhattacharya *et al.*, 2023).

Quanto à sintomatologia, de modo geral, observa-se o medo, ansiedade e estresse desproporcionais ao contexto. No que diz respeito ao cognitivo, observa-se a hipervigilância, hipotenacidade, pensamentos catastróficos, com antecipação de ameaça no futuro. Quanto às alterações comportamentais, as ações seguem um padrão de fuga/esquiva, podendo haver procrastinação, isolamento social, rituais repetitivos e compulsões. Como repercussões físicas, observa-se a tensão muscular, hiperventilação e taquicardia (DSM-V-TR; Beck, 2022).

Todos os transtornos psicológicos, sem exceção, possuem etiologia multifatorial. Isso significa dizer que não há um fator patognomônico que distingue, biologicamente, um transtorno de outro, tal qual observamos no campo das ciências biomédicas, por exemplo. Genética, história de vida, ambiente e personalidade são alguns dos aspectos que estão relacionados em maior ou menor grau ao desencadeamento de um transtorno (Dalgallorondo, 2019).

Os transtornos de ansiedade têm sido apontados como um dos transtornos mentais mais frequentes, possuindo uma prevalência em torno de até 11 a 18% no mundo (Somers *et al.*,

2006; Remes *et al.*, 2016). No Brasil, estudos epidemiológicos nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro revelaram pelo menos algum transtorno de ansiedade em 18,8 a 20,8% da população, sendo a agorafobia um dos transtornos mais comuns (Ribeiro *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2019).

Esses dados sofreram um aumento após a pandemia da Covid-19, tendo em vista as condições de isolamento social, medo, estresse intenso e imprevisibilidade. A soma desses fatores contribuiu para o agravamento na saúde mental (Guilland *et al.* 2022). Nesse sentido, foi realizada uma pesquisa no Brasil no ano de 2020 a qual objetivou investigar as consequências psicológicas em decorrência do período pandêmico. Dos 45.161 respondentes, 40,4% relataram que se sentiam frequentemente deprimidos, 52,6% ansiosos, 43,5% relataram início de problemas de sono e 48% problemas de sono preexistentes e agravados. Esses sintomas mostraram-se mais prevalentes entre adultos jovens, mulheres e pessoas com antecedentes de transtornos mentais (Barros *et al.*, 2020).

Neurobiologicamente, os transtornos de ansiedade estão interligados às ações combinadas de circuitos neurais, os quais emergem da amígdala, do núcleo da estria terminal do hipocampo ventral e do córtex pré-frontal. Apesar de haverem regiões cerebrais preponderantes nessa cascata de eventos neuroquímicos, ressalta-se que o cérebro sofre modificações estruturais e funcionais de modo integrativo. Essas alterações fisiológicas podem desencadear sensações físicas desagradáveis, como a taquicardia, sudorese, formigamento nas extremidades e cefaleias (Pennix *et al.*, 2021; Prevedello, 2019).

Estudos pré-clínicos realizados com animais têm sido importantes na elucidação dos mecanismos neurobiológicos de diversos transtornos, além de investigarem novas alternativas terapêuticas. Os modelos de ansiedade, em específico, buscam simular um ambiente que possa desencadear diferentes formas de aversão ou desconforto. Os comportamentos e reações fisiológicas desencadeados pela exposição a esses sinais de possível perigo são empregados como indicadores de ansiedade e frequentemente se correlacionam com as medidas de ansiedade observadas em humanos (Wegener; Neigh, 2021).

O tratamento clínico dos transtornos de ansiedade é norteado, dentre outros critérios, pela gravidade. Para casos de intensidade leve, é indicada a psicoterapia, sendo a Terapia cognitivo-comportamental considerada padrão ouro. Para casos moderados a graves, recomenda-se a farmacoterapia combinada com psicoterapia (Bhattacharya, *et al.*, 2023). Quanto aos psicofármacos disponíveis, os principais grupos utilizados são os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS), Benzodiazepínicos, Antidepressivos Tricíclicos

(ATCs) e Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN) (Garakani, *et al.*, 2020).

Embora sejam importantes aliados na atenuação de sintomas ansiosos, esses medicamentos podem acarretar uma variedade de efeitos adversos nos pacientes. Dentre eles, estão déficit de memória e de atenção, tonturas, vertigens, visão turva, náuseas ou vômitos, fadiga e sonolência (Seppala *et al.*, 2018). Além disso, junto aos possíveis efeitos colaterais, é comum que muitos pacientes não obtenham uma resposta satisfatória ao tratamento em um primeiro momento, exigindo a necessidade de aumentar a dose ou realizar associações medicamentosas. Esse conjunto de fatores pode acarretar o abandono do tratamento psicofarmacológico, fato este que retarda ou impossibilita a remissão dos sintomas (Boni *et al.*, 2021).

Mediante tais problemáticas, pesquisas em todo o mundo estão sendo intensamente desenvolvidas na última década, a fim de investigarem tratamentos farmacológicos alternativos que possuam alto nível de eficácia e que produzam baixos efeitos adversos no organismo. Nesse ínterim, destacam-se os derivados de plantas e bioativos, os quais possuem constituintes com propriedades farmacoterapêuticas promissoras para o tratamento clínico de transtornos psiquiátricos, como Depressão e Ansiedade e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Mursal *et al.*, 2024; Sytar; Smetanska, 2021).

Nesse contexto, insere-se o 1,8-CINEOL (CIN), também denominado eucaliptol. Trata-se de um monoterpene, constituinte de óleos essenciais de plantas, como o eucalipto, manjerição e hortelã; ele apresenta propriedades farmacológicas abrangentes, incluindo atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Cai *et al.*, 2021). A sua molécula é lipofílica e de tamanho reduzido, características que viabilizam a penetração na barreira hematoencefálica. Estudos indicam que esse composto aumenta consideravelmente a atividade locomotora em camundongos e reduz a imobilidade, sugerindo uma atividade ansiolítica e antidepressiva (Dougnon; Ito, 2023).

Utilizamos nesse estudo um modelo de ansiedade em roedores que mimetiza os efeitos de um ambiente ansiogênico, a partir de parâmetros estabelecidos e validados na literatura. Utilizamos o CIN nas doses de 5,0 mg/kg, 10mg/kg e 25 mg/kg para tratamento dos sintomas associados à ansiedade. A avaliação comportamental evidenciou que o CIN na dosagem de 5,0 mg/kg apresentou efeito do tipo ansiolítico nos testes Labirinto em Cruz Elevado e Caixa Claro/escuro e melhorou a capacidade exploratória dos animais, evidenciada pelos testes Placa Perfurada e Campo Aberto.

Na análise neuroquímica, o CIN reduziu os níveis de malondialdeído (MDA) e níveis de nitrito/nitrato, especialmente na dosagem de 5,0 mg/kg, mostrando atividade antioxidante e moduladora do sistema antioxidante endógeno. Além disso, evidenciou-se que o CIN atua via receptor GABAA, dado apresentado através do uso da droga flumazenil, antagonista de tal receptor gabaérgico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtornos de ansiedade: definição e classificações

A ansiedade é um tipo de emoção inata ao ser humano e possui a função de nos alertar para uma possível ameaça ou perigo. Em contextos mais extremos, ela nos auxilia a evitar situações que põe nossa vida em risco. Em circunstâncias menos extremas, ela pode ser útil no processo de preparação para algo importante, como a realização de uma prova da faculdade, por exemplo. A nível evolutivo, tanto a ansiedade quanto o medo foram essenciais para a sobrevivência da nossa espécie, pois nos ajudaram a identificar predadores e a evitar locais onde a probabilidade de encontrá-los era alta (Hofmann, 2022; Sapolsky, 2021).

A diferença entre essas duas emoções pode ser apontada a partir da presença real de um objeto ou situação ameaçadora, caracterizada pelo medo. Enquanto que no estado de ansiedade há a prevalência de pensamentos focados no futuro, sempre no sentido catastrófico com superestimação da probabilidade de algum evento trágico ocorrer (Penninx *et al.*, 2021).

Sabendo dessa linha tênue entre o normal e o patológico, o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM, *American Psychiatric Association*, 2023) vem estabelecendo, ao longo de suas versões, critérios clínicos para diagnóstico dos transtornos de ansiedade estando em sua versão V-TR (5ª edição). Segundo o manual, o que diferencia uma ansiedade adaptativa de um transtorno de ansiedade são os fatores de frequência, intensidade e comprometimento funcional. Estes persistem por um tempo além do que geralmente se espera em períodos de estresse pontual, podendo durar por seis meses ou mais (Szuhany; Simon, 2022).

Dado que os indivíduos com transtornos de ansiedade geralmente tendem a superestimar o perigo, ou seja, costumam catastrofizar o futuro, a avaliação primordial do excesso ou desproporção do medo ou ansiedade é realizada pelo profissional de saúde mental, resguardando as variáveis culturais pertinentes. Muitos transtornos de ansiedade se manifestam

durante a infância e tendem a persistir, caso não recebam o tratamento adequado. A maioria desses transtornos é mais prevalente em mulheres do que em homens (com uma proporção aproximada de 2:1). O diagnóstico de cada transtorno de ansiedade é estabelecido somente quando constatado que os sintomas não sejam decorrentes de causas orgânicas e também que não sejam explicados de forma mais satisfatória por outro transtorno mental (Mutz *et al.*, 2022; Penninx *et al.*, 2021; DSM-V-TR).

No que se refere aos sintomas, geralmente são observados níveis de medo, ansiedade e estresse que estão desproporcionais ao contexto. Em termos cognitivos, há uma tendência à hipervigilância, à hipersensibilidade e a pensamentos catastróficos, acompanhados da antecipação de ameaças futuras. Em relação às mudanças comportamentais, os indivíduos muitas vezes adotam padrões de fuga ou esquiva, podendo apresentar procrastinação, isolamento social, envolvimento em rituais repetitivos e compulsões. Quanto às manifestações físicas, é comum observar tensão muscular, hiperventilação e taquicardia (DSM-V-TR; Beck, 2022).

Os transtornos de ansiedade têm uma etiologia multifacetada, com uma interação complexa entre fatores genéticos, neurobiológicos, psicológicos e ambientais. Pesquisas científicas têm identificado uma série de fatores desencadeadores que contribuem para o desenvolvimento desses transtornos. Por exemplo, estudos sugerem que experiências traumáticas na infância, como abuso físico, emocional ou sexual, podem aumentar significativamente o risco de desenvolver transtornos de ansiedade mais tarde na vida. Além disso, a predisposição genética desempenha um papel importante, com evidências indicando estimativas de herdabilidade oscilando entre 30% e 40%. Estudos apontam, ainda, para o papel dos genes NOTCH1, BDNF e FKBP5 no desenvolvimento de ansiedade em pessoas expostas ao estresse precoce e a contribuição dos genes SLC6A4, OXTR e COMT nos danos da funcionalidade cerebral e risco de deflagração de um transtorno de ansiedade em ambientes psicossociais desfavoráveis (Costa; Alves, 2023; Narmandakh *et al.*, 2021;).

Além dos fatores biológicos, fatores ambientais e de estilo de vida também desempenham um papel crucial. Por exemplo, estresse crônico, história de vida adversa, pressões sociais, desafios interpessoais e condições socioeconômicas desfavoráveis podem desencadear, manter e/ou agravar os sintomas de ansiedade. Compreender esses diversos fatores desencadeadores e entender que se trata de um fenômeno biopsicossocial é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e intervenção eficazes no tratamento dos transtornos de ansiedade (Riachi; Holma; Laitila, 2022).

Um transtorno de ansiedade pode variar em intensidade, podendo ser classificado como leve, moderado ou grave, e sua duração pode persistir desde semanas até anos. A *American Psychiatric Association* (APA), por meio do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), estabelece algumas categorias nosológicas de transtornos de ansiedade, baseando-se no tipo de objetivo ou situação desencadeantes e também nos conteúdos cognitivos, as quais são descritas a seguir:

- *Transtorno de Ansiedade por Separação*: é caracterizado por um medo excessivo de se separar de figuras de apego, como pais ou cuidadores, resultando em angústia significativa ao indivíduo. Este transtorno é mais comumente observado em crianças, embora também possa afetar adultos. O TAS está associado a um desenvolvimento emocional e psicossocial prejudicado, podendo levar a dificuldades de adaptação em diferentes áreas da vida, como laboral, social e familiar (Fiúza, 2023; DSM-V-TR).
- *Mutismo Seletivo*: também conhecido como transtorno de recusa da fala, é marcado pela incapacidade persistente de falar em situações específicas, apesar de possuir habilidades de linguagem em outras circunstâncias. Geralmente, manifesta-se na infância, afetando mais comumente crianças em idade escolar. As crianças afetadas podem falar normalmente em casa ou em ambientes familiares, mas se recusam a falar em outras situações, gerando significativo desconforto e prejuízos em sua vida cotidiana. Essa condição é frequentemente marcada por intensa ansiedade social (Lucas; Costa, 2021).
- *Fobia Específica*: é um transtorno de ansiedade caracterizado por um medo intenso e irracional de um objeto ou situação específica, que leva a uma evitação persistente e acentuada desses estímulos temidos. Este transtorno pode abranger uma ampla gama de fobias, como medo de animais, situações sociais, espaços fechados, avião, sangue e tomar injeções (Lemos *et al.*, 2024; DSM-V-TR).
- *Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social)*: é tipificado por um medo intenso e persistente de situações sociais, como aniversários, encontros ou de desempenho como apresentação de trabalhos acadêmicos, acompanhado por preocupação excessiva em ser julgado negativamente por outras pessoas, realizando antecipações catastróficas de que tudo será um desastre e que a possibilidade de haver alguma crítica é insuportável e inconcebível (Vasconcelos *et al.*, 2022).
- *Transtorno do Pânico*: é uma condição marcada por episódios de pânico recorrentes e imprevisíveis, caracterizados por uma intensa sensação de medo ou terror, que

atinge seu auge em questão de minutos. Estes episódios frequentemente apresentam sintomas físicos intensos, como taquicardia, sudorese, tremores, dificuldade respiratória, sensação de sufocamento, dor no peito, tonturas, náuseas, calafrios ou ondas de calor (Pinheiro, 2022; DSM-V-TR).

- *Transtorno de Ansiedade Generalizada*: é caracterizada por uma preocupação crônica e desproporcional em relação a diversos eventos ou atividades da rotina diária, como trabalho, família e relacionamento. Essa preocupação é caracterizada por uma dificuldade persistente em ser controlada e está comumente acompanhada por manifestações físicas, tais como aumento da tensão muscular, fadiga, irritabilidade, comprometimento da capacidade de concentração, distúrbios do sono e sensação de inquietude (D'ávila *et al.*, 2020).

- *Agorafobia*: é definida pela manifestação de um medo ou ansiedade intensos relacionados a situações ou ambientes nos quais escapar pode ser difícil ou pode gerar constrangimento, como transporte público, supermercados e filas de bancos. Tais situações ou ambientes são frequentemente evitados ou enfrentados com uma sensação de medo ou ansiedade intensa (Wilhelm *et al.*, 2024; DSM-V-TR).

- *Transtorno de Ansiedade induzido por substância/medicamento*: trata-se de uma condição em que a ansiedade é originada diretamente pelos efeitos fisiológicos de uma substância psicoativa ou medicamento. Essa ansiedade pode se apresentar tanto na fase de intoxicação quanto na de abstinência, envolvendo desde sintomas leves até ataques de pânico severos (Goldfield; Zhang; George, 2024).

- *Ansiedade devido a outra Condição Médica*: é caracterizada por uma condição na qual os sintomas de ansiedade são diretamente desencadeados por uma condição médica subjacente. Essa condição médica pode abranger uma variedade de problemas de saúde física, tais como doenças cardíacas, distúrbios endócrinos, doenças neurológicas, distúrbios respiratórios, dor crônica, entre outros (Riordan; Singhal, 2018; DSM-V-TR).

2.1.2 Epidemiologia

Cerca de 4,5% da população global, equivalente a aproximadamente 300 milhões de indivíduos, são estimados como acometidos pelo transtorno de ansiedade. Este número representa um aumento de mais de 55% entre 1990 e 2019. A taxa de prevalência mundial para todos os tipos de transtornos de saúde mental é de 12.537 casos por 100.000 pessoas, enquanto a

taxa específica para transtornos de ansiedade é de 3.895 por 100.000 habitantes. Comparativamente a outros transtornos psiquiátricos, a prevalência dos transtornos de ansiedade é nitidamente superior (Javaid *et al.*, 2023).

Constatou-se que a distribuição etária dos novos casos revelou uma incidência a partir dos dez anos de idade. Observaram-se dois picos nas faixas etárias de 10 a 14 anos e de 35 a 39 anos. Após os 65 anos de idade, a incidência de novos casos diminui. Entretanto, a prevalência permanece alta entre os idosos. É válido ressaltar que a distribuição etária dos novos casos e a prevalência dos transtornos de ansiedade se mantiveram estáveis nas últimas três décadas (Javaid *et al.*, 2023).

Os dados mais recentes também revelam disparidades regionais na prevalência e no acesso aos serviços de saúde mental para transtornos de ansiedade. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2022), regiões com recursos limitados, a identificação e tratamento desses transtornos muitas vezes enfrentam desafios significativos. Essa discrepância sublinha a urgência de investimentos em programas de saúde mental, políticas de saúde pública e iniciativas de conscientização para garantir que todas as pessoas, independentemente de sua localização geográfica ou situação socioeconômica, tenham acesso a serviços de tratamento dos transtornos de ansiedade de qualidade.

Estudos epidemiológicos realizados em cidades como São Paulo e Rio de Janeiro, no Brasil, revelaram que entre 18,8% a 20,8% da população apresenta algum tipo de transtorno de ansiedade, com destaque para a agorafobia como um dos transtornos mais comuns (Ribeiro *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2019). Esses números demonstraram um aumento após o surgimento da pandemia da Covid-19, devido às condições de isolamento social, medo, estresse intenso e imprevisibilidade associadas à crise sanitária. A interseção desses fatores contribuiu para o agravamento da saúde mental (Guilland *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, uma pesquisa realizada no Brasil em 2020 teve como objetivo investigar as consequências psicológicas decorrentes do período pandêmico. Dos 45.161 participantes, 40,4% relataram sentir-se frequentemente deprimidos, 52,6% ansiosos, 43,5% apresentaram início de problemas de sono e 48% relataram problemas de sono pré-existent agravados. Esses sintomas foram mais prevalentes entre adultos jovens, mulheres e indivíduos com histórico de transtornos mentais (Barros *et al.*, 2020).

2.1.3 Neurobiologia da ansiedade

A ansiedade é desencadeada por uma percepção de perigo iminente que é processada pelo sistema nervoso central (SNC). O medo e a ansiedade são processados, em um primeiro momento, nas mesmas regiões cerebrais, do sistema límbico, incluindo a amígdala, corpo estriado ventral e o hipocampo. A amígdala é uma estrutura bilateral, situada dentro da metade anterior do giro parahipocampal e é responsável pela identificação de estímulos considerados perigosos (Suzigan, 2024).

É constituída por cerca de 12 núcleos agrupados em três divisões com funções diferentes: basolateral, corticomedial e central. A Amígdala basolateral desempenha um papel crucial no registro e aprendizado do medo e envia sinais para a amígdala central. Além disso, possui uma ligação direta com o córtex pré-frontal. O corpo estriado ventral é uma região associada ao sistema límbico e está intimamente relacionada ao controle motor diante das emoções. O hipocampo é uma região que desempenha um papel fundamental na aprendizagem e na consolidação da memória declarativa (Suzigan, 2024; Sapolsky, 2021).

Estudos de neuroimagem evidenciaram atividades anormais na região da amígdala em pessoas com transtorno de ansiedade, sugerindo que esta pode explicar a hipervigilância que é bastante observada e relatada nos pacientes. O sistema autônomo simpático é ativado em após a recepção destes sinais de alerta, onde a pessoa se prepara para uma situação de luta ou fuga, porém tão-somente em decorrência de pensamentos catastróficos. (Prevedello, 2019; Kamali *et al.*, 2023).

A formação reticular do tronco cerebral também está intimamente associada às respostas de ansiedade, uma vez que induz a despolarização do tálamo, resultando na excitação dos circuitos neuronais do córtex pré-frontal. Isso leva à formação das informações sensoriais, direcionando o foco do indivíduo para a situação de perigo. O córtex pré-frontal desempenha um papel fundamental na identificação, planejamento e tomada de decisões a partir de dados sensoriais captados interna e/ou externamente. Nos transtornos de ansiedade é observada uma intensa atividade nesta região (Golan *et al.*, 2018; Baumel *et al.*, 2022).

Até a década de 1980, prevalecia a concepção de que os transtornos de ansiedade estavam primariamente ligados aos circuitos neuronais gabaérgicos, onde o ácido gama-aminobutírico (GABA) desempenhava o papel principal como neurotransmissor inibitório do SNC. No entanto, estudos neurocientíficos recentes têm apontado para o envolvimento crucial das vias neurais que liberam serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) na neurobiologia dos transtornos de ansiedade. Nessa perspectiva, as vias gabaérgicas passaram a ser vistas como

moduladoras dessas vias, em um complexo sistema de regulação neuroquímica (Brunton; Chabner; Knollmann, 2019).

As monoaminas, como dopamina, 5-HT e NE, se localizam em pequenas populações de neurônios com corpos celulares distribuídos pelo tronco encefálico e pelo prosencéfalo basal. Estes neurônios se projetam de forma difusa para áreas corticais e outras regiões cerebrais. Além de desempenharem funções sinápticas locais de excitação ou inibição, os neurônios que contêm monoaminas estão intimamente associados às funções cognitivas, límbicas e comportamentais do indivíduo. As vias monoaminérgicas, particularmente as constituídas por neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, são protagonistas na neurobiologia dos transtornos de ansiedade (Suzigan, 2024).

Estudos apontam que os transtornos de ansiedade podem estar diretamente associados ao estresse crônico. Pessoas que estão constantemente expostas a situações adversas possuem um risco maior de desenvolver algum transtorno de ansiedade, especialmente se ocorrer em uma frequência e intensidade consideráveis nos primeiros anos de vida. Ainda assim, mesmo em sujeitos adultos esse risco também parece estar ligado ao estresse (Barbosa *et al.*, 2010; Sharifi-Rad, 2020).

Como consequência neurofisiológica da cronicidade do estresse, tem-se o estresse oxidativo, o qual consiste em um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes. A consequência dessa alteração é a produção excessiva de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons. A partir disso, o corpo detecta uma ameaça, fazendo com que seja ativado o sistema antioxidante em uma tentativa de retornar ao estado homeostático (Kamali *et al.*, 2023).

Essa dinâmica, em condições ideais, exerce um papel fundamental para a regulação bioquímica. Entretanto, quando excessiva, pode causar um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo, portanto, a produção acentuada de radicais livres. Tal condição desemboca na oxidação de biomoléculas, podendo resultar em perda de suas funções biológicas e instabilidade homeostática. Os principais radicais livres e espécies reativas de oxigênio são o Superóxido (O_2^\bullet), a hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Barbosa *et al.*, 2010).

Além disso, o sistema imunológico pode produzir espécies reativas de nitrogênio (RNS), os quais são caracterizados por compostos nitrogenados que têm alta reatividade, como o Óxido Nítrico (NO), Peróxido Nítrico (NO_2^-), Peroxinitrito ($ONOO^-$) e Radical Nitrose ($\cdot NO_2$). Quando produzidos em excesso, essas substâncias podem ser prejudiciais para as

células, podendo resultar em neuroinflamação, a qual está associada a diversos transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão e ansiedade (Won; Kim, 2020; Santos, 2019).

Dessa maneira, o sistema de defesa antioxidante entra em ação, objetivando barrar esses prejuízos. Tais mecanismos podem acontecer por meio de sistemas de prevenção, de varredura ou de reparo. Além disso, o sistema pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático possui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (Santos, 2019).

Existem alguns marcadores do estresse oxidativo, os quais são acionados quando a quantidade de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes. Dentre esses marcadores estão as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os quais consistem em um subproduto da peroxidação lipídica. A presença dessas substâncias indica danos celulares (Barbosa *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo é extremamente prejudicial ao organismo, pois causa danos e até mesmo a morte celular, afetando estruturas celulares cruciais, como o DNA e os lipídios. Esta última é denominada de peroxidação lipídica. Ademais, estudos vêm apontando a sua íntima relação com os transtornos de ansiedade (Bouayed; Soulimani, 2018). A depender da cronicidade de situações adversas e estressantes, os casos podem ser de maior ou menor gravidade. Fato é que toda essa alteração a nível celular, é fator de risco para várias doenças neuropsiquiátricas, incluindo os transtornos de humor e demências (Barbosa *et al.*, 2010; Sharifi-Rad, 2020; Bouayed; Soulimani, 2018).

2.2 Modelos preditivos de efeitos ansiolíticos

Na pesquisa básica, os experimentos ocorrem por meio de modelos, os quais objetivam representar um fenômeno complexo de uma maneira mais simples. Assim sendo, busca-se simular situações por meio de sistemas conhecidos, reconhecendo as limitações intrínsecas a essa metodologia, porém observando as contribuições relevantes que esta traz na elucidação de diversas patologias, incluindo os transtornos neuropsiquiátricos (Wegener; Neigh, 2021).

Os modelos preditivos de ansiedade com roedores visam representar um ambiente que possa desencadear diferentes formas de aversão ou desconforto. Os comportamentos e reações fisiológicas desencadeados pela exposição a esses sinais de possível perigo são empregados como indicadores de ansiedade e frequentemente se relacionam com as medidas de ansiedade observadas em humanos. Esses modelos são caracterizados pela percepção da aprendizagem

associativa de estímulos aversivos, a fim de investigar o potencial terapêutico de drogas ansiolíticas (Nunes; Hallak, 2014).

Existem alguns testes específicos que são balizadores dos referidos modelos, os quais buscam analisar comportamentos ansiosos, como o campo aberto, caixa claro/escuro, labirinto em cruz elevado e placa perfurada, além de outros voltados para a socialização, como interação social com outros roedores. Tais testes objetivam analisar o comportamento de fuga/esquiva natural dos roedores em situações que representam perigo e também a sua atividade exploratória, por meio da superação do conflito dessas duas características inatas (Acikgoz; Dayi, 2022).

2.3 Tratamento clínico

Atualmente, as linhas de tratamento para os transtornos de ansiedade envolvem psicotrópicos e psicoterapia. Quanto a esta última, a abordagem mais indicada é a Terapia Cognitivo-comportamental (TCC). A TCC é uma abordagem terapêutica baseada no modelo cognitivo desenvolvido por Aaron Beck, o qual compreende a identificação de situações, pensamentos, emoções e comportamento. O profissional que atende com essa abordagem, os pacientes a identificar e desafiar padrões de pensamentos desadaptativos e a aprender novas estratégias de enfrentamento, com a intenção de atenuar os sintomas (Beck, 2022; Carpenter, 2018).

A associação de medicamentos com a psicoterapia tem demonstrado importante contribuição na melhora dos quadros ansiosos, especialmente nos casos considerados moderados a graves. Para casos leves, a Terapia Cognitivo-comportamental demonstrou ser efetiva sem a necessidade de psicofármacos (Curtiss *et al.*, 2021). Quanto aos medicamentos, os principais grupos utilizados são os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS), Benzodiazepínicos, Antidepressivos Tricíclicos (ATCs) e Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN) (Garakani, *et al.*, 2020).

Os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) pertencem a uma classe de antidepressivos; seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da recaptação da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT). Dessa maneira, possibilitam o aumento da concentração desse neurotransmissor no corpo e no cérebro. Atualmente, são os que oferecem menores riscos na

administração e também possuem melhor custo benefício. Alguns deles são Fluoxetina, Sertralina, Paroxetina, Citalopram e Escitalopram (Matschinske *et al.*, 2022).

Os Benzodiazepínicos são medicamentos que, a depender da dosagem, podem ser utilizados como ansiolíticos, sedativos ou hipnóticos. Esses compostos dificultam a excitação e a transmissão de sinais em neurônios que expressam o receptor GABA-A, cuja ativação ocorre quando o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) se conecta. A hiperpolarização resultante reduz a probabilidade de ativação neuronal em diversas vias do sistema nervoso central, muitas das quais estão associadas à regulação da ansiedade e tensão. Os mais conhecidos são Diazepam, Alprazolam, Lorazepam e Clonazepam (Garakani, *et al.*, 2020)

Os Antidepressivos Tricíclicos recebem essa denominação devido à estrutura química que apresenta três anéis de carbono. Esses fármacos atuam predominantemente inibindo a recaptação pré-sináptica de monoaminas, incluindo, especialmente, a norepinefrina e serotonina, e em menor proporção, dopamina. Essa ação ocorre através do bloqueio dos sítios de transporte de norepinefrina e serotonina, resultando em um aumento das concentrações sinápticas desses neurotransmissores. Dentre, tem-se Amitriptilina, Imipramina, Nortriptilina, Clomipramina, Doxepina e Trimipramina (Vasconcelos *et al.*, 2024).

Os Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN), também denominados duais, pertencem a uma classe de antidepressivos que atuam inibindo a recaptação dos neurotransmissores serotonina (5-HT) e noradrenalina (também conhecida como norepinefrina) nos espaços sinápticos do sistema nervoso central. Seu mecanismo de ação envolve bloquear os transportadores de serotonina e noradrenalina localizados nas membranas pré-sinápticas dos neurônios. Possuem uma maior seletividade, em comparação com os antidepressivos tricíclicos, o que diminui significativamente a ocorrência de efeitos colaterais como boca seca, tonturas e constipação (Vasconcelos *et al.*, 2024).

Embora desempenhem um papel crucial na redução dos sintomas de ansiedade, esses medicamentos podem provocar uma variedade de efeitos adversos nos pacientes. Estes incluem comprometimento da memória e da atenção, tonturas, vertigens, visão turva, náuseas ou vômitos, fadiga e sonolência (Seppala *et al.*, 2018). Além disso, juntamente com os possíveis efeitos colaterais, é frequente que muitos pacientes não apresentem uma resposta satisfatória ao tratamento inicial, necessitando de ajustes na dose ou combinação com outros medicamentos. Esse conjunto de circunstâncias pode levar à interrupção do tratamento farmacológico, o que por sua vez pode retardar ou impedir a remissão dos sintomas (Boni *et al.*, 2021).

Pesquisas neurocientíficas vêm sendo desenvolvidas, tendo como alvo o estudo de drogas de origem vegetal que possam apresentar eficácia no tratamento de doenças neurológicas, incluindo a ansiedade, a fim de averiguar a possibilidade de diminuir os efeitos colaterais e aumentar a adesão ao tratamento. Historicamente, óleos essenciais de diferentes fontes têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia e, além disso, devido ao seu odor agradável e às vezes um sabor distinto são utilizados nas indústrias de aromas e perfumes (CALDAS *et al.*, 2016).

2.4 Eucaliptol ou 1,8-cineol (CIN)

Trata-se de um monoterpreno saturado e é principalmente extraído de óleos essenciais de plantas, incluindo eucalipto, *Salvia lavandulifolia* Vahl. e *Melaleuca quinquenervia*. O óleo essencial de eucalipto é conhecido por conter o maior teor de 1,8-cineol. Devido ao seu aroma e sabor agradáveis, o CIN é frequentemente utilizado para fabricar uma variedade de produtos aromatizados, a exemplo de cosméticos, perfumados, enxaguantes bucais e repelentes (Cai *et al.*, 2021). Seu nome químico é 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclico (2.2.2)-octano, sua fórmula química é $C_{10}H_{18}O$ e tem peso molecular igual a 154,24. A sua molécula está representada na figura 1.

Um estudo desenvolvido por Cai *et al.*, (2021) demonstrou que esse composto natural exibe uma ampla gama de propriedades farmacológicas, que incluem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras. Ademais, sua molécula é lipofílica e de tamanho reduzido, características que facilitam a penetração na barreira hematoencefálica.

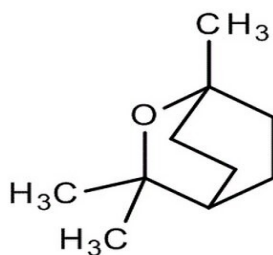


Figura 1: Representação da molécula do 1,8-cineol.

Fonte: Sigma-Aldrich

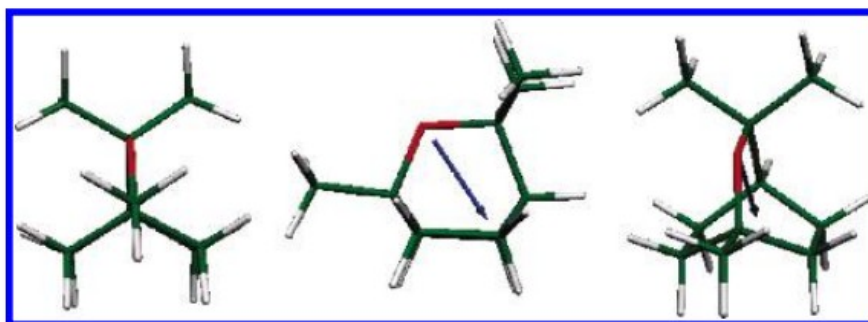


Figura 2: Três visualizações diferentes da estrutura molecular otimizada do CIN.

Fonte: Aparicio *et al.*, 2007.

Com relação ao sistema nervoso, o CIN apresenta efeitos antinociceptivo (Santos; Rao, 2000) e de bloqueador da excitabilidade nervosa. Estudos demonstraram que esse terpeno foi efetivo em bloquear o potencial de ação composto do nervo isquiático de ratos na faixa de concentração de 1,0 a 8,0mM e reduzir a excitabilidade nervosa pelo aumento da cronaxia e reobase, dois parâmetros relacionados à excitabilidade (Lima-Accioly *et al.*, 2006). Outro estudo realizado pelo grupo de pesquisa vinculado ao Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará demonstrou os efeitos do 1,8-cineol sobre os canais iônicos do gânglio cervical superior (Ferreira-da-Silva *et al.*, 2009).

Um estudo de 2019 evidenciou que esse monoterpene possui importantes efeitos hipnóticosedativos e antipsicóticos, que parecem estar relacionados ao monoterpene 1,8-cineol, possivelmente através da modulação de sistemas gabaérgicos, dopaminérgicos e sistemas glutamatérgicos. Estudos indicam, ainda, que este composto aumenta significativamente a atividade locomotora em camundongos e reduz a imobilidade, sugerindo uma atividade ansiolítica e antidepressiva (Doughon; Ito, 2023).

Outros estudos com animais têm investigado os efeitos do eucaliptol em pacientes com epilepsia (Nikbakht; Anarkooli; Abdanipour, 2022), em transtornos de humor, como a depressão, e também nos transtornos de ansiedade (Doughon; Ito, 2023; Bahrami; Yaghmaei; Yousofvand, 2022), e em edemas cerebrais (Santos *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos investigam possíveis efeitos neuroprotetores desse monoterpene (Nikbakht; Anarkooli; Abdanipour, 2022).

2.4.1 Toxicidade do CIN

O estudo de Caldas e colaboradores (2016) objetivou avaliar a toxicidade pré-clínica do 1,8-cineol para doses agudas e repetidas e a toxicidade reprodutiva em roedores. Os pesquisadores observaram que a administração oral de CIN (2000 mg/kg) produziu, de início, sinais de sedação, tremores e diarreia, intensificando-se ao longo do tempo. Após 180 min de observação, foram observadas dificuldades progressivas de respiração e convulsões, levando à morte de todos os animais em um período inferior a 24 h. Em vista destes efeitos, a dose oral de CIN foi reduzida para 1750 mg/kg, mas, mesmo com esta dose menor, os efeitos foram semelhantes aos obtidos com a dose maior, culminando em morte também em menos de 24h.

Em outro momento, a dose de CIN foi reduzida para 1500 mg/kg. Desta vez, foram observados alguns efeitos como tremores e sedação, porém não houveram novas mortes nas 24h posteriores ou nos 14 dias de observação. O estudo concluiu que não houveram sinais de toxicidade para as doses de 100,500 ou 1000 mg/kg no tratamento oral de roedores durante 50 dias consecutivos. Entretanto, alguns apresentaram diarreia nas doses de 500 e 1000 mg/kg na primeira semana de tratamento (Caldas *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado por Xu *et. al* (2014) investigou a toxicidade aguda e subaguda do CIN em modelos animais. Eles chegaram à conclusão de que as mortalidades estavam positivamente correlacionadas com a dose de 1,8-cineol nos valores de 3849 mg/kg, o que sugere que a toxicidade do CIN pertence à classe 4 ou baixa toxicidade de acordo com o padrão da Escala de Toxicidade de Hodge e Sterner. No nosso estudo, utilizamos a dose máxima de 25 mg/kg, portanto, não ofereceu riscos de toxicidade para os sujeitos experimentais.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do 1,8-cineol em modelos de ansiedade com camundongos.

5.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial ansiolítico do 1,8-cineol por meio dos testes, Labirinto em Cruz Elevado e Caixa Claro/Escuro.
- b) Avaliar os efeitos sobre a atividade exploratória, através dos testes do Campo Aberto e Placa Perfurada.
- c) Analisar o efeito do tratamento com 1,8-cineol sobre o estresse oxidativo perante as concentrações de nitrito e nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado.
- d) Analisar o efeito do tratamento com 1,8-cineol sobre a peroxidação lipídica através dos níveis do ácido tiobarbitúrico (TBARS), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de cada animal.
- e) Verificar a possível ação do CIN através dos receptores GABA-A, por meio do mecanismo de ação da droga Flumazenil.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados 66 (sessenta e seis) camundongos machos Swiss, pesando entre 20-25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno em ambiente com temperatura e umidade controladas, cerca de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de claro/escuro alternado de 12 horas, com livre acesso à ração adequada e água e com higiene e limpeza adequadas.

Os experimentos foram realizados de acordo com as leis vigentes do Instituto Nacional de Saúde, através do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, sob o consentimento e a vigilância do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará de protocolo nº 04/23. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados nas experiências.

6.2 Drogas e Soluções

O composto bioativo investigado foi o 1,8-cineol(CIN) nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg. O CIN foi diluído em Tween 80 e em solução salina (NaCL 0,9%). Nos animais do grupo controle negativo foi administrado solução salina (NaCL 0,9%) em concentração equimolar. No grupo para controle positivo, foi utilizado o psicofármaco diazepam (1 mg/Kg; i.p.). A administração foi realizada por via intraperitoneal (i.p.).

Para investigação do envolvimento do sistema GABAérgico, mais precisamente do neurotransmissor GABAA, no mecanismo de ação do CIN, os animais foram pré-tratados com flumazenil (3,0 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com CIN. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e à Placa perfurada para avaliação dos parâmetros. Todos os fármacos e reagentes serão de pureza analítica.

6.3 Modelo Experimental

Os grupos de animais receberam por via i.p. o 1,8-cineol (5, 10 e 25 mg/kg) por 14 dias consecutivos, uma vez ao dia e veículo salinos. O diazepam (1 mg/kg) foi administrado no 14º dia, antes dos testes comportamentais (realizados neste dia). Também foi administrada a droga flumazenil, com objetivo de observar um possível bloqueio no neurotransmissor GABA,

através do receptor GABAA, também no 14º dia, antes dos testes de Labirinto em Cruz Elevado e Placa perfurada.

Todos os ensaios comportamentais foram realizados entre 09:00h e 15:00h, período de maior atividade dos roedores. A figura 4 apresenta o desenho metodológico, constando o curso temporal, drogas administradas e drogas com as quais os animais foram tratados. No primeiro dia de tratamento, 30 minutos após a administração da droga, todos os animais foram submetidos ao teste comportamental de campo aberto (TCA), a fim de verificar a funcionalidade motora dos animais. A continuação da realização dos testes comportamentais se sucederá somente no 14º dia, com a repetição do Campo Aberto, além do Teste labirinto em Cruz Elevado, Teste da Placa Perfurada e Caixa Teste claro/escuro.

No 15º dia foi realizada a eutanásia de todos os grupos para dissecação, a fim de obter as áreas cerebrais do hipocampo, corpos estriados e córtex pré-frontal, para a realização dos testes neuroquímicos. A respeito da administração de Flumazenil, como este foi utilizado somente para observar o mecanismo de ação envolvido, não foi necessário utilizar as dosagens neuroquímicas, apenas as comportamentais. Sendo assim, foram necessários apenas seis animais neste último grupo. Totalizando, assim, a utilização de 66 animais. Essa distribuição está melhor representada no quadro 1.

6.4 Testes comportamentais

6.4.1 Teste do Campo Aberto (TCA)

Este teste é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973), e permite uma avaliação da atividade locomotora do animal. É usado também para avaliar a atividade estimulante, depressora ou ansiolítica de um dado composto. Os animais serão divididos aleatoriamente, onde receberão tratamento: veículo (solução salina 0,9% v.o.) ou droga teste. Após 1 hora, os animais, um por vez, serão colocados no centro da arena em um campo-aberto confeccionado em acrílico com 60 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura, dividido em 12 arenas.

Estes animais permanecem no campo-aberto durante 5 minutos. Os parâmetros analisados foram o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), o tempo de autolimpeza (*grooming*), número de levantamentos (*rearing*) e tempo de imobilidade, registrados durante um período de 5 minutos.

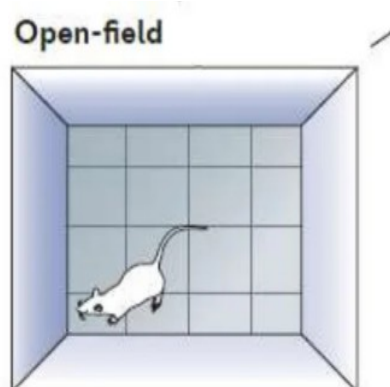


Figura 3: Teste Campo Aberto

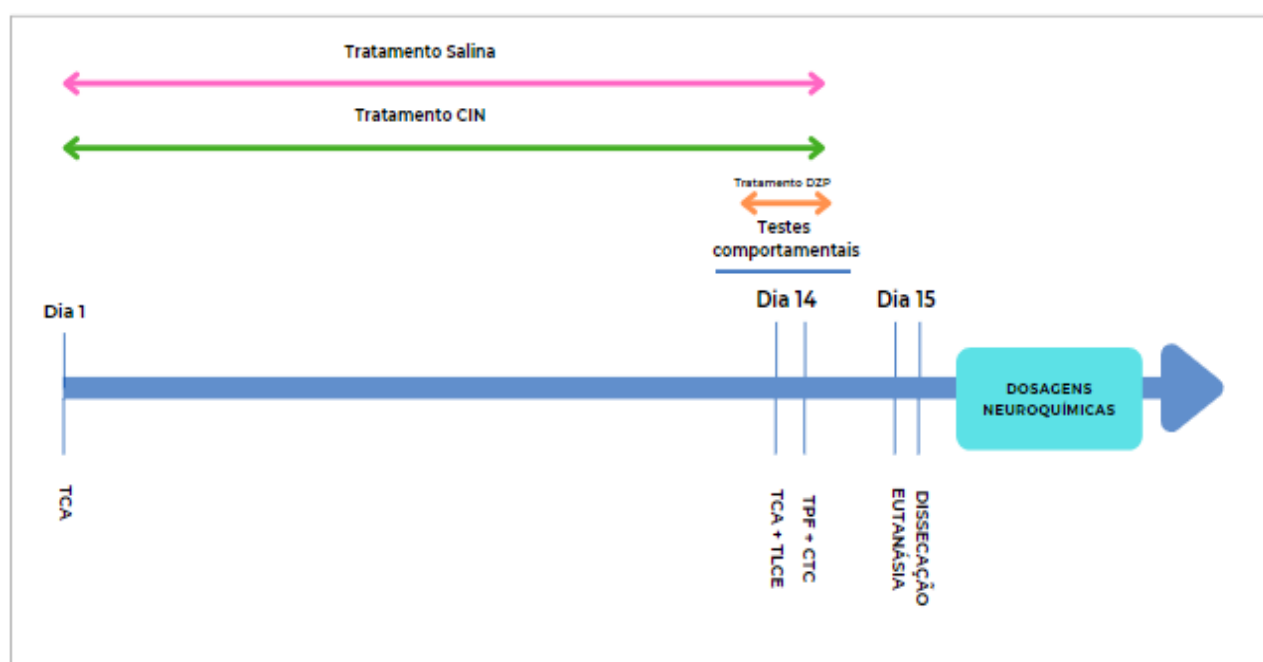


Figura 4: Delineamento experimental

Fonte: elaborada pela autora (2024). CIN= 1,8-cineol. DZP= Diazepam. TCA= Teste de campo aberto. TLCE= Teste labirinto em Cruz Elevado. TPF= Teste da placa perfurada. CTCE= Caixa Teste claro/escuro.

Este teste foi desenvolvido em um ambiente tranquilo e desprovido de barulho, sendo aplicado ao local das arenas uma iluminação vermelha e com ausência da iluminação principal da sala. Após o tempo estipulado, o animal testado foi retirado e o campo-aberto foi limpo, para evitar qualquer odor do animal anterior.

6.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)

Os animais irão ser colocados em um aparato composto por 3 braços que se ligam formando um Y, foi anotado a sequência de entrada do animal em todos os braços e também o tempo de permanência, isso será feito por um período de 5 minutos logo após um minuto de adaptação (Maurice *et al.*, 1994). O labirinto em cruz é um aparelho bem estabelecido para medir a ansiedade em roedores, ou seja, os animais que exibem um aumento do tempo relativo gasto nos braços fechados versus os braços abertos são considerados ansiosos (Acikgoz; Dalkiran; Dayi, 2022; Bouayed e Soulimani, 2018).



Figura 5: Teste Labirinto em Cruz Elevado

Quadro 1: Número de animais por grupo de testes comportamentais e dosagens neuroquímicas

	Testes comportamentais	Dosagens neuroquímicas	Nº de animais
Controle (CONT) – solução salina	Campo aberto (TCA)	TBARs +	6
	Placa perfurada (TPF)	Nitrito/nitrato	6
Controle + Diazepam 1mg (CONT + DZP)	Labirinto em Cruz (TLC)		
	Caixa claro/escuro (CTCE)		
1,8 CINEOL (5 mg/kg) – CIN 5	Campo aberto (TCA)	TBARs +	6
	Placa perfurada (TPF)	Nitrito/nitrato	6
1,8 CINEOL (10 mg/kg) – CIN 10	Labirinto em Cruz (TLC)		
	Caixa claro/escuro (CTCE)		
1,8 CINEOL (25 mg/kg) – CIN 25	Campo aberto (TCA)	TBARs +	6
	Placa perfurada (TPF)	Nitrito/nitrato	6
1,8 cineol (dose mais efetiva) + Flumazenil - CIN + FLU	Labirinto em Cruz (TLC)		
	Caixa claro/escuro (CTCE)		
TOTAL DE ANIMAIS			66

Fonte: elaborada pela autora (2024).

2.4.3 Caixa Teste Claro/Escuro (CTCE)

Esse teste consiste em uma caixa com dois compartimentos (claro e escuro, proporção de superfície 3:2), dividido em 15 quadrados: 9 x 9 cm no total. A caixa escura (PVC preta, 27 x 18 x 29 cm) é iluminada por uma luz vermelha e foi dividida em seis quadrados. A caixa iluminada (PVC branco 27 x 27 x 29 cm) é iluminada por uma luz branca localizada a 1,50 m acima do dispositivo e foi dividida em 9 quadrados. Os dois compartimentos se separam comunicados por meio de uma pequena porta (7 x 7 cm). O teste também visa observar comportamentos exploratórios do roedor, por meio dos parâmetros de cruzamentos (crossings), atividade exploratória vertical (*rearings*), permanência no lado claro e escuro em um período de 10 minutos (Richetto; Polesel; Weberstadlbauer, 2019; Bouayed; Soulimani, 2018; Acikgoz, Dalkiran; Dayi, 2022).



Figura 6: Teste Caixa Claro/Escuro

2.4.4 Teste da Placa Perfurada (TPF)

O teste Hole-board é utilizado principalmente para avaliar comportamentos exploratórios em roedores. O animal é colocado em uma arena com furos regularmente dispostos no chão. Tanto a frequência quanto a duração do comportamento espontâneo de headdips (afundamento de cabeça) nos buracos são então medidas durante um período de 5 minutos (Bouayed; Souliamani, 2018; Acikgoz; Dakiran; Dayi, 2022).



Figura 7: Teste Placa Perfurada

2.5 Eutanásia e dissecação das áreas cerebrais

Após a conclusão de todos os experimentos comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia através do deslocamento cervical. Em seguida, os cérebros foram prontamente removidos e as regiões do hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado foram separadas das áreas adjacentes por dissecação. Após a conclusão da separação dos tecidos, cada região foi acondicionada em papéis alumínio sobre uma placa de Petri com gelo, mantida sob gelo, pesada e armazenada a -80 °C para futuras análises neuroquímicas.

Após a coleta das referidas áreas cerebrais, as carcaças dos animais foram mantidas em sacos plásticos e acondicionados em freezer para posterior descarte, realizados pelo Biotério da Universidade Federal do Ceará.

2.6 Análises Neuroquímicas

2.6.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado dos animais foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas ao ácido 29 tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Resumidamente, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após, um volume de 0,25 mL foi mantido em um banho-maria a 37° C por 1 hora e precipitado com 400 µL de ácido perclórico (35%) seguido do processo de centrifugação (14.000 g/15 minutos/4°C).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido e a ele adicionado 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (1,2%) e levado ao banho-maria (95- 100°C/30 minutos). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

2.6.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Os homogenatos das amostras de tecido do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram preparados a 10% (p/v) em solução de fosfato de sódio 150 mmol/L, pH 7,4. Posteriormente foi realizado a centrifugação (11.000 g/15 minutos/4°C). Os sobrenadantes

foram coletados para a determinação da produção de óxido nítrico (NO) através da reação de Griess 18. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi incubada com 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 1%/N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%/H₃PO₄ 1%/diluído em água [1:1:1:1]) em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂.

2.7 Análises Estatísticas

Os dados estão mostrados como média ± Erro Padrão da Média, onde n representa o número de experimentos comportamentais ou dosagens neuroquímicas. Para análise dos dados, foram utilizados os programas estatísticos SigmaPlot (versão 10.0) e Excel (versão 2016). As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey ou Holm-Sidak ou Bonferroni, quando apropriado. O nível de significância de 95% (p<0,5) foi aplicado para todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

O 1,8-cineol promove efeito ansiolítico devido a ação sobre o sistema Gabaérgico e reduzindo o desequilíbrio redox em áreas corticais de roedores.

Milena Fontenele de Oliveira¹, Antonio Renan Santana¹, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar¹, Francisco Walber Ferreira-da-Silva^{2*}.

¹Physiology Laboratory, Federal University of Ceará, Medicine Campus, Sobral, Ceará, Brazil.

²Exact Science Center, State Univeresity of Ceará, Cidao Campus, Sobral, Ceará, Brazil

*Corresponding author: PhD Francisco Walber Ferreira-da-Silva, walber_ferreira@uvanet.br

RESUMO

Os transtornos de ansiedade agrupam um conjunto de transtornos psicológicos que são caracterizados por sinais e sintomas em comum. Na esfera emocional, observa-se o medo, ansiedade e estresse desproporcionais ao contexto. Os âmbitos familiar, laboral e de relacionamentos têm se mostrado como os principais prejudicados em um quadro ansioso, comprometendo, pois, a qualidade de vida dos pacientes. Quanto aos psicofármacos tradicionais, apesar de desempenharem um papel ímpar no controle dos sintomas, podem gerar efeitos adversos nos pacientes, os quais diminuem as chances de adesão terapêutica. Dessa forma, torna-se necessária a busca por substâncias alternativas que apresentam eficácia no tratamento de pacientes com transtornos de ansiedade, cujos efeitos colaterais sejam menos danosos. No presente estudo, investigamos os efeitos do 1,8-cineol (CIN) em modelos preditivos de ansiedade, como o Teste do Labirinto em Cruz Elevado e Teste Caixa Claro/escuro. Para isso, camundongos swiss machos foram tratados por 14 dias com CIN nas doses de 5,0, 10 e 25 mg/kg, Diazepam 1mg/kg ou salina. A avaliação comportamental mostrou que o CIN na dosagem de 5,0 mg/kg apresentou efeito do tipo ansiolítico nos testes Labirinto em Cruz Elevado e Caixa Claro/escuro e melhorou a capacidade exploratória dos animais, evidenciada pelos testes Placa Perfurada e Campo Aberto. Na análise neuroquímica, reduziu os níveis de malondialdeído e níveis de nitrito/nitrato, especialmente na dosagem de 5,0 mg/kg, mostrando atividade antioxidante e moduladora do sistema antioxidante endógeno. Além disso, evidenciou-se que o CIN atua via receptor GABAA, dado apresentado através do uso da droga flumazenil, antagonista de tal receptor gabaérgico. Conclui-se que o presente trabalho concedeu evidências pré-clínicas do CIN como uma nova abordagem terapêutica para ser utilizado no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos como os transtornos de ansiedade.

PALAVRAS-CHAVE: Ansiedade; 1,8-cineol; testes comportamentais; desequilíbrio redox; camundongos;

INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade agrupam um conjunto de transtornos psicológicos que são caracterizados por sinais e sintomas em comum, possuindo frequência e intensidade altas, além de comprometimento funcional. Estes transtornos interferem na qualidade de vida das pessoas acometidas, com potencial de lhes causar prejuízos significativos em diversos âmbitos da vida como o social, o familiar e o laboral (D'ávila *et al.*, 2020).

Os transtornos de ansiedade têm sido apontados como um dos transtornos mentais mais frequentes, possuindo uma prevalência em torno de 11 a 18 % no mundo (Somers *et al.*, 2006; Remes *et al.*, 2016) e no Brasil, estudos epidemiológicos nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro revelaram pelo menos algum transtorno de ansiedade em 18,8 a 20,8% da população, sendo a agorafobia um dos transtornos mais comuns (Ribeiro *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2019).

O tratamento clínico dos transtornos de ansiedade depende de sua gravidade e para casos de intensidade leve, é indicada a psicoterapia. Para casos moderados a graves, recomenda-se a farmacoterapia combinada com psicoterapia (Bhattacharya, *et al.*, 2023). Quanto aos psicofármacos disponíveis, os principais são os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS), os Benzodiazepínicos, os Antidepressivos Tricíclicos (ATCs) e os Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN) (Garakani, *et al.*, 2020). Embora sejam importantes aliados na atenuação de sintomas ansiosos, eles podem acarretar efeitos adversos, como déficit de memória e de atenção, tonturas, vertigens, visão turva, náuseas ou vômitos, fadiga e sonolência (Seppala *et al.*, 2018).

Dessa forma, pesquisas envolvendo o uso de óleos essenciais e seus constituintes apresentam-se relevantes, já que alguns desses derivados de plantas e bioativos são propriedades farmacoterapêuticas promissoras para o tratamento clínico de transtornos psiquiátricos, como Depressão e Ansiedade e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Mursal *et al.*, 2024). Nesse contexto, insere-se o 1,8-cineol (CIN), também denominado eucaliptol. Ele é um monoterpene, constituinte de óleos essenciais do eucalipto, manjerição e hortelã (Sytar; Smetanska, 2021) e apresenta propriedades biológicas e farmacológicas como anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Cai *et al.*, 2022). Estudos indicam que esse composto aumenta consideravelmente a atividade locomotora em camundongos e reduz a imobilidade, sugerindo uma atividade ansiolítica e antidepressiva (Doughnon; Ito, 2023).

Devido ao grande prejuízo à saúde de pessoas acometidas pelos transtornos de ansiedade, a sua alta prevalência mundial e aos efeitos adversos dos psicofármacos utilizados no tratamento e/ou prevenção dos transtornos, este trabalho tem como objetivo estudar os efeitos ansiolíticos do 1,8-cineol em um modelo de ansiedade em roedores e investigar o possível mecanismo de ação ansiolítica promovida pelo 1,8-cineol.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 66 (sessenta e seis) camundongos machos Swiss, pesando entre 20-25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno em ambiente com temperatura e umidade controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, ~55 % umidade relativa), ciclo de claro/escuro alternado de 12 horas, com livre acesso à ração e água e com higiene e limpeza adequadas. Os experimentos foram realizados de acordo com as leis vigentes do Instituto Nacional de Saúde, através do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, sob o consentimento e a vigilância do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, número de protocolo 04/23. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados nas experiências.

2.2 Drogas e Soluções

1,8-cineol (CIN) foi diluído em Tween 80 e, posteriormente, em solução salina (NaCL 0,9%). As doses de CIN utilizadas foram 5, 10 e 25 mg/kg de peso dos animais e foram administradas por via intraperitoneal (i.p.). Nos animais do grupo controle negativo foi administrado solução salina (NaCL 0,9%) em concentração equimolar. No grupo controle positivo, foi utilizado o diazepam (1 mg/kg; via i.p.). Para investigação do efeito do CIN sobre o sistema GABAérgico, os animais foram pré-tratados com flumazenil (3,0 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com CIN. Após 30 minutos da administração do CIN, os animais foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e à Placa perfurada. Todos os fármacos e reagentes utilizados foram de pureza analítica e obtidos da Merck, Sigma-Aldrich ou Reagen.

2.3 Grupos e testes comportamentais

Nesse estudo, separamos os animais nos grupos: controle negativo, que recebeu apenas salina; controle positivo, que recebeu o flumazenil; diazepam, que recebeu diazepam uma única vez; cineol 5, cineol 10 e cineol 25, que receberam, respectivamente 5, 10 e 25 mg/kg de CIN. Os grupos tratados receberam as drogas uma vez ao dia via i.p por 14 dias consecutivos. O diazepam e o flumazenil foram administrados no 14º dia, antes dos testes comportamentais e todos os testes comportamentais foram realizados entre 09:00h e 15:00 h e são descritos a seguir.

2.3.1 Teste do Campo Aberto (TCA)

O Teste do Campo Aberto (TCA) é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973) e permite uma avaliação da atividade locomotora do animal e também a atividade estimulante, depressora ou ansiolítica de drogas. Nesse teste, os animais foram colocados no centro da arena em um campo-aberto confeccionado em acrílico com 60 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura, dividido em 12 arenas. Após 1 h de acondicionamento, foram analisados o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), o tempo de autolimpeza (*grooming*), número de levantamentos (*rearing*) e tempo de imobilidade por um período de 5 minutos.

2.3.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)

O teste do labirinto em Cruz Elevado (TLCE) é usado para medir a ansiedade em roedores a partir da quantificação do tempo relativo gasto nos braços fechados versus os braços abertos (Acikgoz; Dalkiran; Dayi, 2022; Bouayed; Soulimani, 2018). Nesse teste, os animais foram colocados em um aparato composto por 3 braços que se ligam formando um Y e foi analisado a sequência de entrada do animal em todos os braços e o tempo de permanência em cada local em período de 5 min, logo após 1 minuto de adaptação (Maurice *et al.*, 1994).

2.3.3 Caixa Teste Claro/Escuro (CTCE)

O teste Caixa Claro/Escuro (CTCE) visa observar comportamentos exploratórios do roedor por meio dos cruzamentos (*crossings*) entre as áreas claro e escuro, atividade exploratória vertical (*rearings*) e permanência no lado claro e escuro (Richetto; Polesel;

Weberstadlbauer, 2019; Bouayed; Soulimani, 2018). Os animais foram colocados na caixa e os parâmetros foram analisados em um período de 10 minutos (Acikgoz; Dalkiran; Dayi, 2022)

2.3.4 Teste da Placa Perfurada (TPF)

O teste Hole-board é utilizado principalmente para avaliar comportamentos exploratórios em roedores e nesse teste, os animais foram colocados em uma arena com furos regularmente dispostos na parte inferior da placa. Tanto a frequência quanto a duração do comportamento espontâneo de *headdips* (afundamento de cabeça) nos buracos foram então medidas durante um período de 5 min de observação (Bouayed; Souliamani, 2018; Acikgoz; Dakiran; Dayi, 2022).

2.5 Eutanásia e dissecação das áreas cerebrais

Após a conclusão de todos os experimentos comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia através do deslocamento cervical. Em seguida, os cérebros foram prontamente removidos e as regiões do hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado foram dissecadas e isoladas de suas áreas adjacentes. Cada região cortical foi acondicionada em placas de Petri mantida sob gelo e foram posteriormente pesadas e armazenadas em freezer a -80 °C para as análises neuroquímicas.

2.6 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS) e concentração de nitrito/nitrato

O grau de lipoperoxidação nos tecidos cerebrais foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Resumidamente, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10 % (peso/volume) em solução de KCl 1,15 %. Após, 250 µL do homogenato foi mantido em um banho-maria a 37° C por 1 h e precipitado com 400 µL de ácido perclórico (35%), seguido do processo de centrifugação (14.000 g/15 minutos a 4°C).

O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico (1,2%) e levado ao banho-maria (95- 100°C/30 minutos). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm e os resultados foram expressos em µmol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína. Para a determinação da concentração de

nitrito/nitrato, homogenatos das amostras dos tecidos foram preparados a 10% (peso/volume) em solução de fosfato de sódio 150 mmol/L, pH 7,40. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados (11.000 g/15 minutos a 4°C) e o sobrenadante coletado para a determinação da produção de óxido nítrico (NO) através da reação de Griess. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550 nm e a concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

2.7 Análises Estatísticas

Os dados estão mostrados como média \pm E.P.M., onde n representa o número de experimentos comportamentais ou dosagens neuroquímicas. Para análise dos dados, foram utilizados os programas estatísticos SigmaPlot (versão 10.0) e Excel (versão 2016). As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey ou Holm-Sidak, Bonferroni, quando apropriado. O nível de significância de 95% ($p < 0,05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

Testes comportamentais

Avaliação da atividade ansiolítica

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Objetivando analisar a atividade ansiolítica, os animais foram submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado, no qual foram avaliados os parâmetros da quantidade de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados.

Diante disso, observou-se que o grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg apresentou um aumento significativo na quantidade de entradas nos braços abertos ($P < 0,025$) quando comparado com o grupo controle (salina). Os efeitos observados nessa dosagem foram semelhantes aos observados no grupo Diazepam 1 mg/kg ($P < 0,006$) também em comparação ao grupo controle salina. Além disso, observou-se uma diferença significativa entre o grupo CIN 5,0 mg/kg e FLU + CIN 5,0 mg/kg ($P < 0,025$). Houve uma diminuição significativa na quantidade de entradas nos braços fechados no grupo CIN 5,0 mg/kg em comparação ao controle salina ($P < 0,001$), assemelhando-se novamente ao grupo diazepam ($P < 0,001$).

Quanto ao parâmetro de tempo de permanência, os dados demonstraram que o grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg apresentou um tempo de permanência significativo nos braços abertos ($P<0,006$) quando comparado com o grupo controle (salina). Esse efeito foi parecido com o constatado no grupo diazepam ($P<0,003$). Ademais, observou-se uma diferença significativa entre o grupo CIN 5,0 mg/kg e FLU + CIN 5,0 mg/kg ($P=0,006$).

Nos braços fechados, os resultados mostraram uma redução significativa no tempo de permanência do grupo CIN 5,0 mg/kg ($P<0,001$) em comparação ao grupo controle salina. Dado semelhante no grupo diazepam ($P<0,001$).

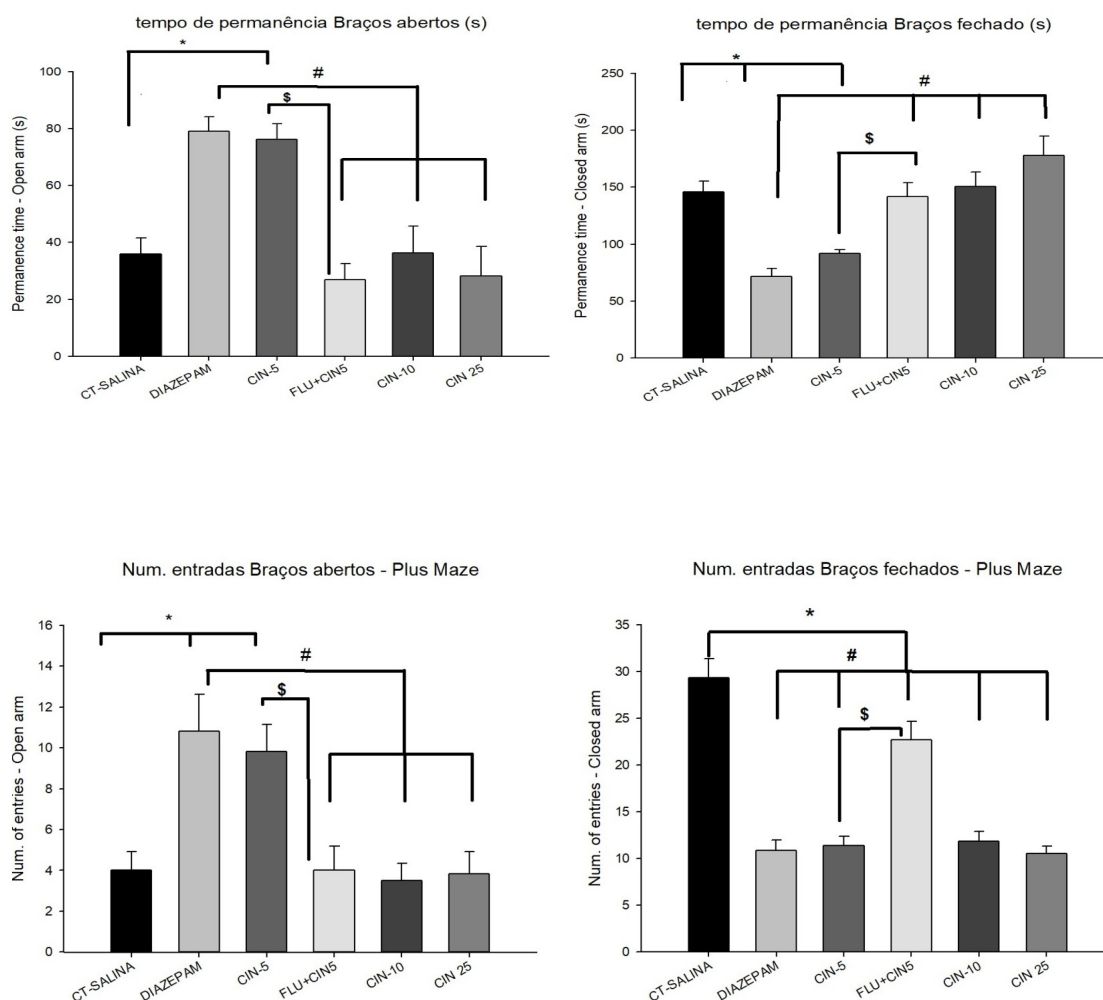


Figura 8: Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Fonte: Autora. Legenda:.. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1mg/kg. \$ evidencia diferença significativa em relação ao grupo CIN 5,0 mg/kg.

Teste Caixa Claro/escuro

Neste teste, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de cruzamentos (*crossings*), quantidade de exploração vertical (*rearings*) e tempo de permanência no lado claro e lado escuro da caixa. Notou-se que o CIN na dosagem de 5,0 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente os cruzamentos dos animais em relação ao grupo controle salina ($P<0,001$), demonstrando efeito similar da droga diazepam ($P<0,001$).

Com relação à quantidade de exploração vertical (*rearings*), os grupos CIN 5,0 mg/kg e diazepam apresentaram aumento significativo deste parâmetro em comparação ao grupo salina, sendo ($P<0,011$) e ($P<0,001$) respectivamente. Além disso, observou-se que o grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg aumentou significativamente o tempo de permanência no lado claro da caixa, quando comparado ao grupo controle salina ($P<0,001$), aproximando-se do grupo diazepam nesse sentido ($P<0,001$).

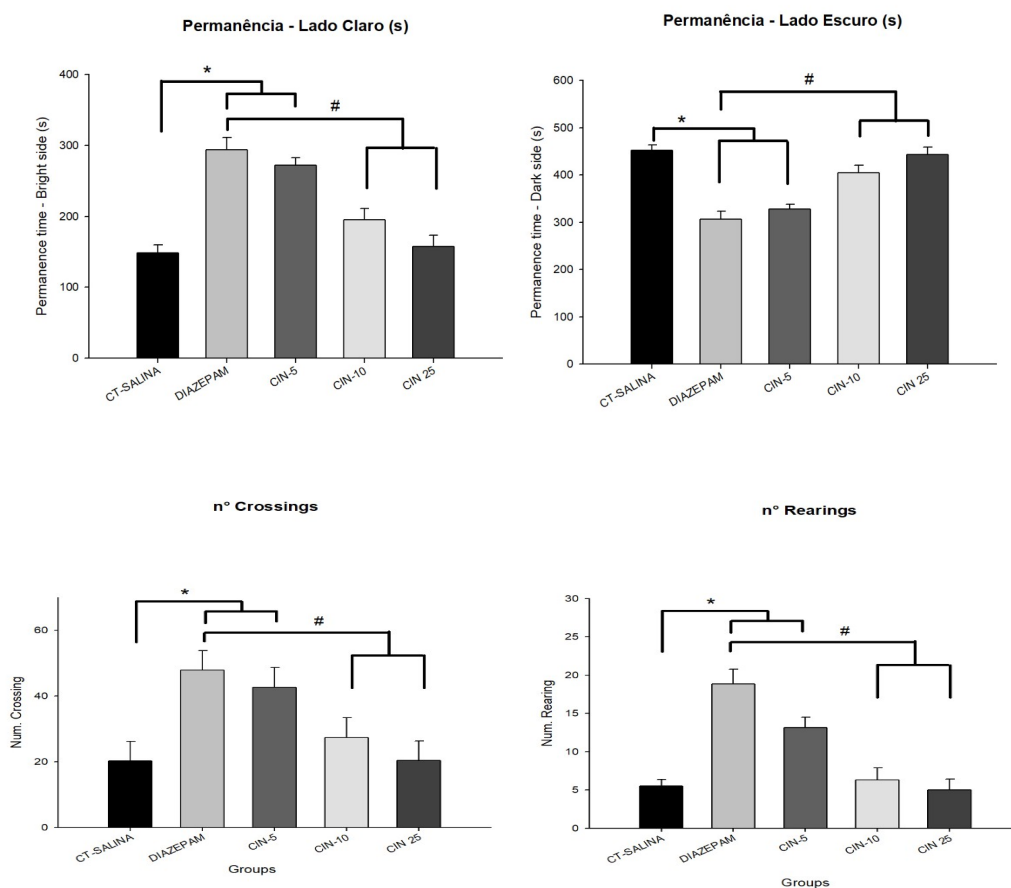


Figura 9: Caixa Teste Claro/Escuro. Fonte: Autora. Legenda: Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1mg/kg.

Avaliação da atividade exploratória

Teste do Campo Aberto - T0

Objetivando analisar a atividade exploratória espontânea, os animais foram submetidos ao Teste do Campo Aberto (TCA), no qual foram avaliados os parâmetros da quantidade de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados. Para avaliação das funções motoras, todos os animais foram submetidos ao TCA antes de iniciarem os seus respectivos tratamentos.

Conforme a mostra a Figura 10, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados nos parâmetros de cruzamentos (*crossings*), atividade exploratória vertical (*rearing*), comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e imobilidade no período antes dos tratamentos (T0).

Teste do Campo Aberto - T14

A fim de verificar-se a atividade exploratória espontânea em decorrências dos tratamentos realizados, os animais foram submetidos novamente ao TCA no dia 14 do protocolo experimental. Os parâmetros analisados foram os mesmos do T0, a saber: número de cruzamentos com as quatro patas (*crossings*), atividade exploratória vertical (*rearings*), comportamentos de autolimpeza (*groomings*) e tempo de imobilidade.

Notou-se que houve um aumento significativo na quantidade de cruzamentos no grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg ($P<0,009$) e Diazepam 1mg/kg ($P<0,001$) quando comparados ao grupo controle. O grupo CIN 5,0 mg/kg ainda demonstrou diferença significativa em relação às demais dosagens de CIN, sendo a de 10 mg/kg ($P<0,032$) e a de 25 mg/kg ($P<0,001$). O grupo diazepam também demonstrou aumento significativo quando comparados a estes grupos, sendo CIN 10 mg/kg ($P<0,003$) e 25 mg/kg ($P<0,001$).

Além disso, observou-se uma elevação na quantidade de atividade exploratória (*rearings*) nos grupos CIN 5,0 mg/kg ($P<0,021$) e Diazepam 1 mg/kg ($P<0,003$), em comparação ao grupo controle salina. O grupo CIN 5,0 mg/kg também apresentou um aumento significativo em comparação às demais dosagens de CIN, sendo a de 10 mg/kg ($P<0,032$) e a de 25 mg/kg ($P<0,001$). O grupo diazepam também apresentou aumento significativo quando comparados a estes grupos, sendo CIN 10 mg/kg ($P<0,004$) e 25 mg/kg ($P<0,001$).

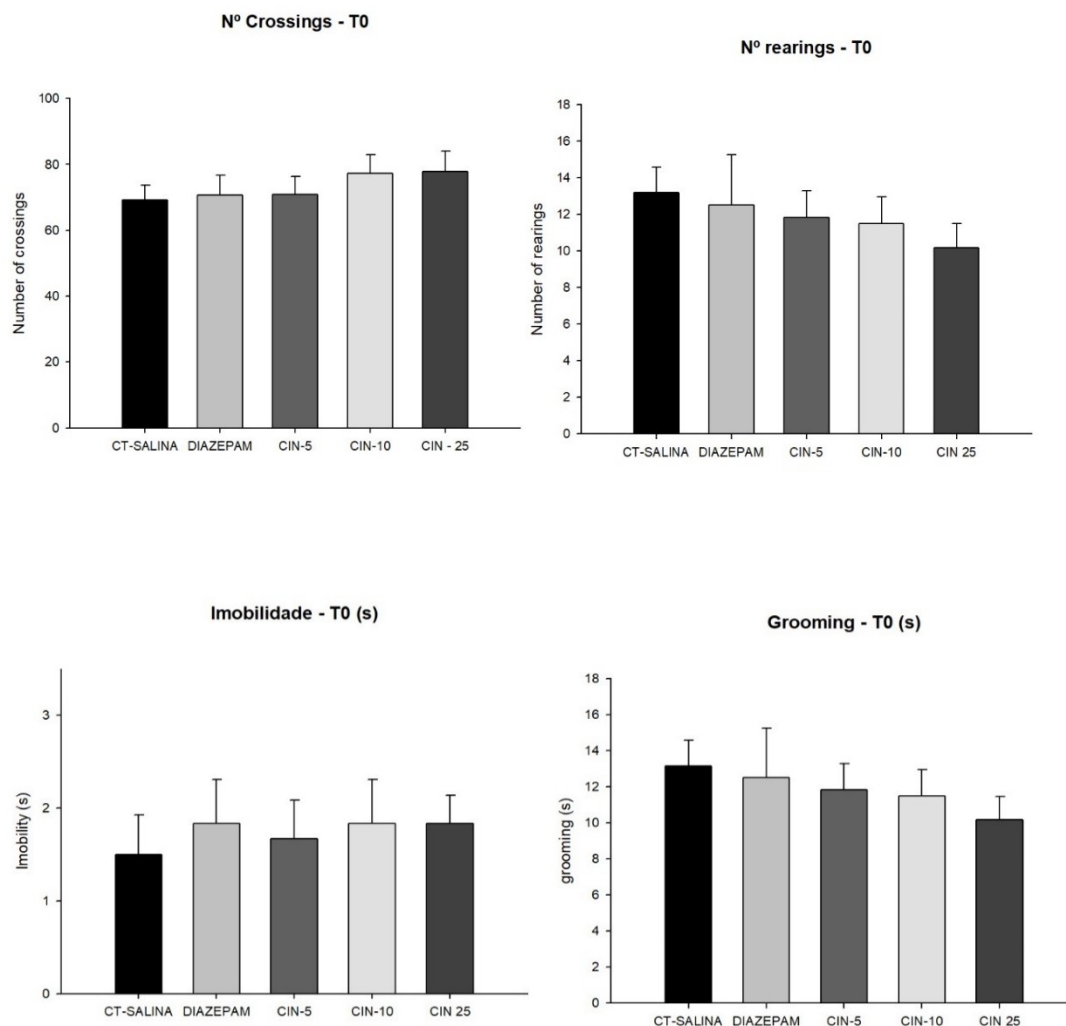


Figura 10: Teste do Campo Aberto – T0. Fonte: Autora. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste *One-way* ANOVA.

Houve uma redução significativa no tempo de imobilidade no grupo CIN 5,0 mg/kg ($P < 0,006$) e Diazepam 1 mg/kg ($P < 0,003$) em comparação ao grupo controle salina. Além disso, notou-se que o grupo CIN 5,0 mg/kg também apresentou uma redução significativa no tempo de imobilidade quando comparado às demais dosagens de CIN, sendo a de 10 mg/kg ($P < 0,025$) e a de 25 mg/kg ($P < 0,001$). O grupo diazepam também apresentou diminuição significativa quando comparado a estes grupos, sendo CIN 10 mg/kg ($P < 0,025$) e 25 mg/kg ($P < 0,001$).

Quanto aos comportamentos de autolimpeza (*groomings*), observou-se uma redução significativa do tempo de *groomings*, dos grupos CIN 5,0 mg/kg ($P < 0,002$) e Diazepam 1mg/kg

($P<0,001$), quando comparados ao grupo controle salina. O grupo CIN 5,0 mg/kg também apresentou diminuição significativa em comparação às demais dosagens de CIN, sendo a de 10 mg/kg ($P<0,009$) e a de 25 mg/kg ($P<0,001$). O grupo diazepam também apresentou redução significativa quando comparado a estes grupos, sendo CIN 10 mg/kg ($P<0,001$) e 25 mg/kg ($P<0,001$).

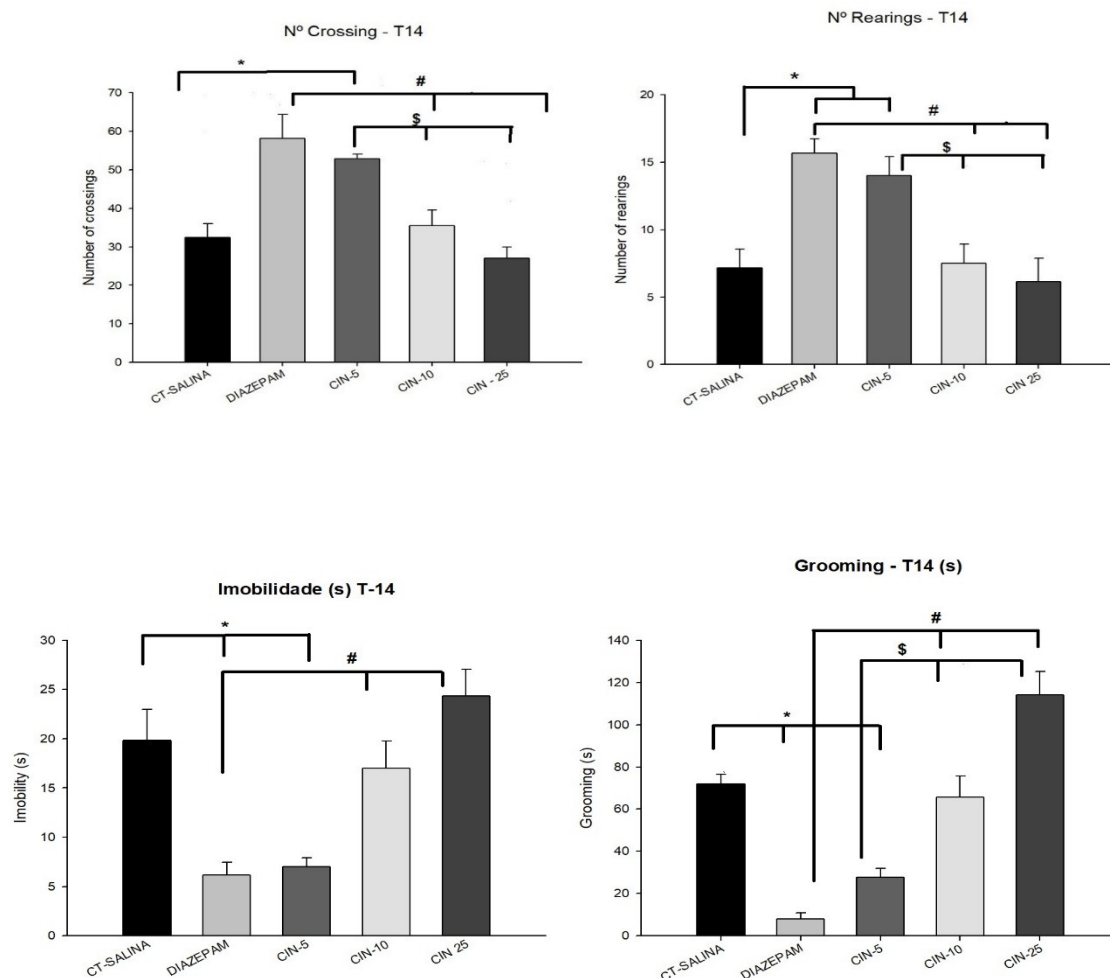


Figura 11: Teste do Campo Aberto – T14. Fonte: Autora. Legenda:. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1mg/kg. \$ evidencia diferença significativa em relação ao grupo CIN 5,0 mg/kg.

Teste da Placa Perfurada

Neste teste, foram avaliados os parâmetros de *Headdips* (afundamentos de cabeça) nos orifícios da placa, sendo necessária a entrada das duas orelhas, e do tempo de permanência. Com

relação os *headdips*, observou-se que os animais do grupo tratado CIN 5,0 mg/kg apresentaram aumentos significativos em comparação ao grupo salina ($P<0,001$), enquanto que o grupo tratado com diazepam apresentou $P<0,001$; demonstrando similaridade entre os referidos grupos. Além disso, observou-se uma diferença significativa entre o grupo CIN 5,0 mg/kg e FLU + CIN 5,0 mg/kg ($P<0,001$).

Quanto ao tempo de permanência, os resultados demonstraram aumento significativo no grupo CIN 5,0 mg/kg em comparação ao controle salina ($p<0,003$), assemelhando-se novamente ao grupo diazepam ($P<0,001$). Também foi possível constatar uma diferença significativa entre o grupo CIN 5,0 mg/kg e FLU + CIN 5,0 mg/kg ($P<0,001$).

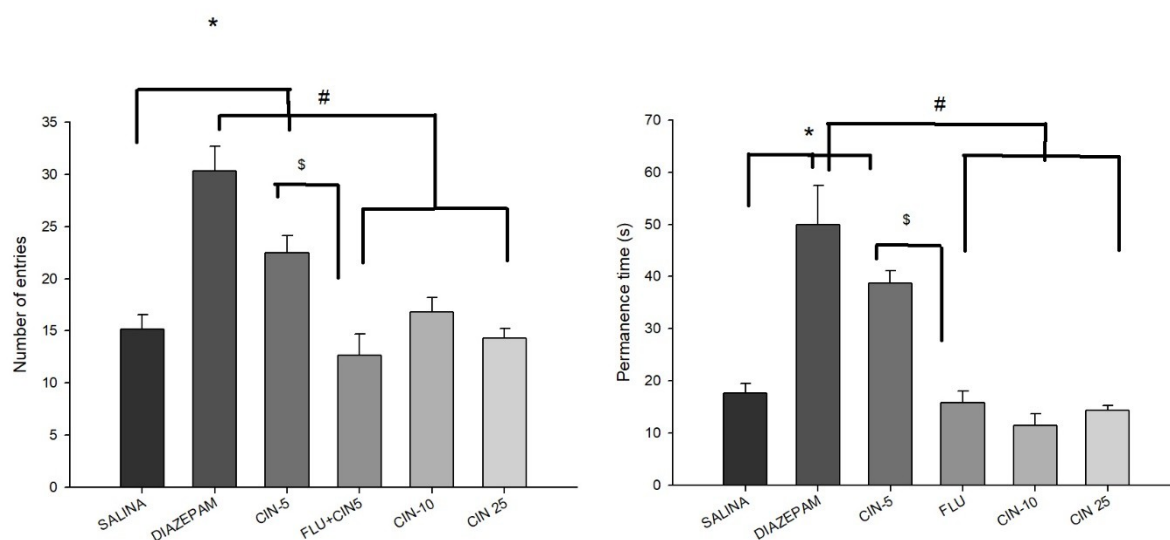


Figura 12: Teste da Placa Perfurada. Fonte: Autora. Legenda: Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1 mg/kg. \$ evidencia diferença significativa em relação ao grupo CIN 5,0 mg/kg.

Análises Neuroquímicas

Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

Ao analisar os níveis de peroxidação lipídica no hipocampo dos animais, o 1,8-cineol na dose de 5,0 mg/kg ($p<0,0002$) reduziu significativamente os níveis de MDA ao serem comparados com o grupo controle, tratado com salina (Figura 13). Esse resultado se assemelha ao grupo diazepam ($P<0,001$). Na área do corpo estriado observou-se uma redução significativa

nos níveis de MDA nos grupos CIN 5,0 mg/kg ($P<0,001$) e diazepam ($P>0,001$) em comparação ao grupo controle salina.

Com relação ao córtex pré-frontal, constatou-se que a dosagem de 5,0 mg/kg do CIN foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de MDA ($P<0,001$) em comparação ao grupo controle e às dosagens de CIN 10 mg/kg ($P<0,012$) e CIN 25 mg/kg ($P<0,001$). Esse efeito se assemelha ao observado no grupo diazepam ($P<0,001$), também comparado ao grupo controle salina.

Determinação da Concentração de Nitrito (NO_2) / Nitrato (NO_3)

Na área cerebral do hipocampo foram observadas diferenças significativas nos níveis de nitrito/nitrato nos grupos CIN 5,0 mg/kg ($P<0,002$) e diazepam 1 mg/kg ($P<0,001$) em relação ao controle salina. O grupo diazepam também demonstrou uma redução significativa em relação às dosagens do CIN de 10 mg/kg e 25 mg/kg, mas não em relação ao CIN 5,0 mg/kg.

Os dados do corpo estriado evidenciaram uma redução significativa nos níveis de nitrito/nitrato nos grupos tratados com CIN nas dosagens de 5,0 mg/kg ($P<0,033$) 10mg/kg (0,001) e 25 mg/kg ($P<0,036$) e diazepam 1 mg/kg ($P<0,05$) em comparação ao controle salina. Não houveram diferenças estatísticas entre o grupo diazepam e os demais grupos.

Quanto ao córtex pré-frontal, também notou-se uma diminuição significativa nos níveis de nitrito/nitrato nos animais tratados com CIN nas dosagens de 5,0 mg/kg ($P<0,001$) 10mg/kg (0,05) e 25 mg/kg ($P<0,002$) e diazepam 1 mg/kg ($P<0,001$) em comparação ao controle salina. Além disso, observou-se uma diferença significativa no grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg em comparação às dosagens de 10 mg/kg (0,033) e 25 mg/kg (0,048) do CIN. Não houveram diferenças estatísticas entre o grupo diazepam e os demais grupos.

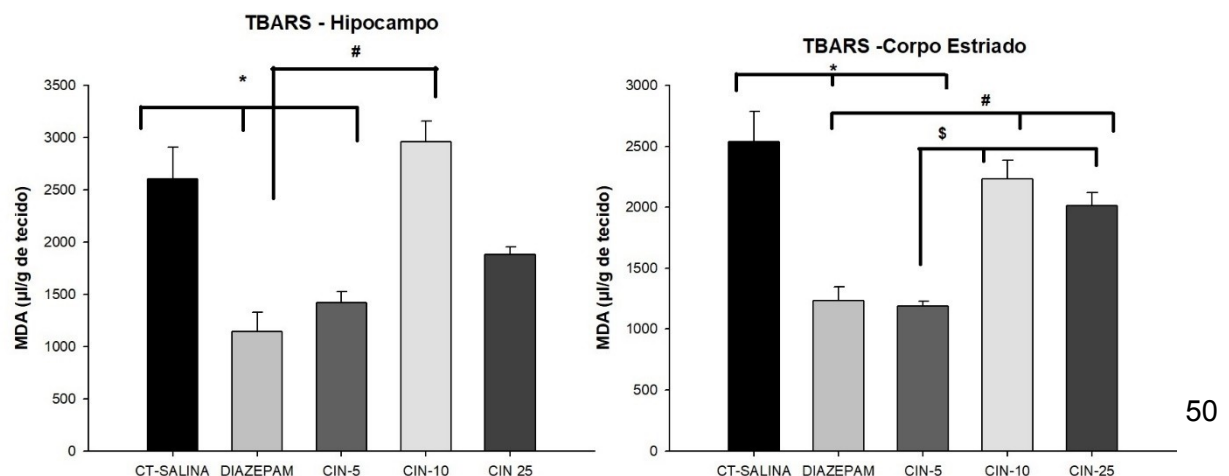
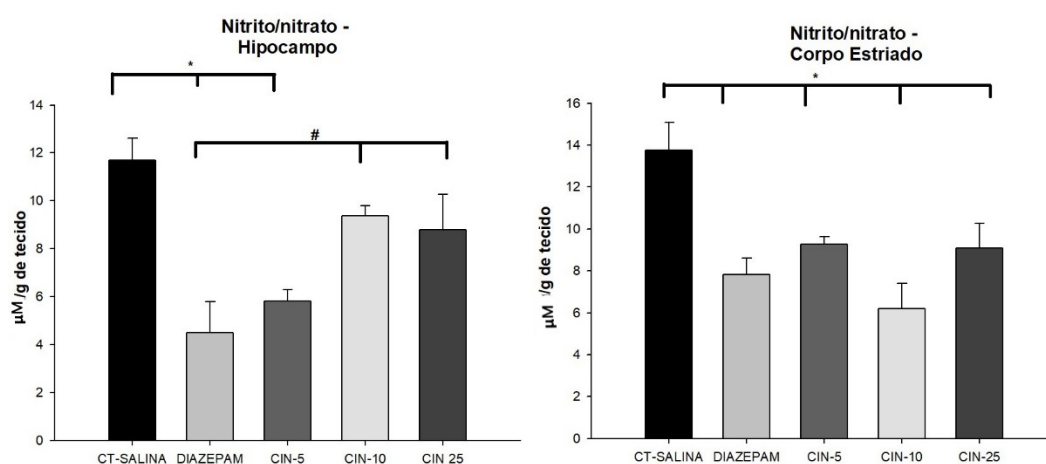


Figura 13: Análise neuroquímica dos níveis de peroxidação lipídica. Fonte: Autora. Legenda: Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1 mg/kg. \$ evidencia diferença significativa em relação ao grupo CIN 5,0 mg/kg.



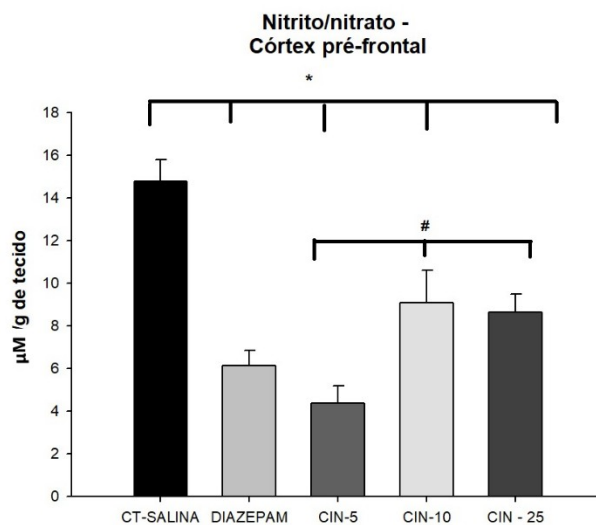


Figura 14: Análise neuroquímica dos níveis de nitrito/nitrato. Fonte: Autora. Legenda: Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle Salina. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Diazepam 1 mg/kg.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que o 1,8-cineol atuou como uma substância ansiolítica e que seu efeito pode ser parcialmente explicado pela ativação dos receptores GABA-A, além de redução no estresse oxidativo de áreas corticais associadas a comportamento de ansiedade, como o corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.

Com o objetivo de investigar a possível ação ansiolítica do 1,8-cineol, os animais foram submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Este possui a finalidade de indicar medidas comportamentais de ansiedade e comportamento exploratório. O teste TLCE é reconhecido como um dos testes mais validados para avaliar potenciais farmacológicos ansiolíticos do tipo benzodiazepínico (Bouayed; Souliamani, 2018).

Entende-se que os animais tendem a evitar áreas abertas devido ao medo de predadores, refletindo assim a ansiedade. Além disso, existe o fato dos braços abertos estarem a uma altura considerável do solo, despertando também o medo da morte. Portanto, animais que passam mais tempo nos braços fechados do labirinto são frequentemente tidos como mais ansiosos, enquanto

aqueles que passam mais tempo nos braços abertos são considerados menos ansiosos e mais exploratórios (Belovicova *et al.*, 2017).

A fim de haver um controle positivo, um grupo foi tratado com Diazepam (1 mg/kg), classificado como benzodiazepínico, é um psicofármaco de primeira linha utilizado no tratamento dos transtornos de ansiedade. Esses compostos dificultam a excitação e a transmissão de sinais em neurônios que expressam o receptor GABA-A, cuja ativação ocorre quando o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) se conecta, produzindo, dessa maneira, a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (Dougnon; Ito, 2023).

Nossos resultados evidenciaram efeitos do tipo ansiolítico do CIN na dosagem de 5,0 mg/kg em todos os parâmetros do TLCE, a saber: no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. Esses dados também foram registrados no grupo tratado com diazepam em uma dose reconhecida como ansiolítica (1 mg/kg), indicando que o efeito do 1,8-cineol se assemelhou ao da droga padrão. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes *et al.* (2010), no qual o tratamento por via oral com um éter monoterpênico produziu aumento significativo nos parâmetros analisados no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.

Entretanto, as dosagens de 10mg/kg e 25mg/kg do CIN demonstraram uma redução significativa nos parâmetros analisados no TLCE, sendo este último grupo menor em relação ao primeiro. Estes dados levantaram a hipótese de que o efeito ansiolítico do 1,8-cineol seria dependente de dosagem e, além disso, que também poderia estar interligado a um possível efeito sedativo nas doses mais altas, assim como observado nos psicofármacos da classe dos benzodiazepínicos. Nossos dados corroboram com os achados do estudo realizado por Khumpirapang *et al.* (2018) e Cai *et al.* (2021).

A fim de investigarmos o mecanismo de ação do CIN no sistema nervoso central, foi administrado Flumazenil (antagonista do GABAA) no 14º dia, 15 minutos antes do tratamento com CIN 5,0 mg/kg. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao Teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os dados evidenciaram a interrupção aguda dos efeitos ansiolíticos demonstrados previamente pelo CIN na dose de 5,0 mg/kg.

Os animais tratados com Flumazenil sofreram uma diminuição significativa na quantidade de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, com redução de 40,7% e 35,24%, respectivamente. Esses resultados demonstraram que o mecanismo de ação do CIN atua através da regulação dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) tipo A (GABAA), via sítio benzodiazepínico. Esse mecanismo de ação evidenciado em nosso estudo está em consonância com o estudo realizado por Dougnon; Ito (2020).

Ainda com o intuito de investigarmos os mecanismos subjacentes aos comportamentos ansiosos, os camundongos também foram submetidos ao Teste Caixa Claro/Escuro. Os resultados apresentados demonstraram um aumento significativo nos parâmetros de cruzamentos e rearing o grupo tratado com CIN 5,0 mg/kg, novamente de modo similar ao grupo diazepam. O aumento nesses parâmetros representa uma maior atividade exploratória dos animais e está associado a um possível efeito ansiolítico, por meio da superação de conflito inato, conforme também demonstra o estudo de Campos-Cardoso et al. (2023).

Além disso, também se observou um aumento no tempo de permanência no lado claro da caixa nos animais tratados com CIN 5,0 mg/kg e diazepam, em comparação ao grupo controle salina. O efeito da menor dosagem de CIN foi quase idêntico ao da droga padrão, sugerindo um potencial ansiolítico. O mesmo efeito sobre esse parâmetro foi evidenciado por Dougnon; Ito (2020), onde os autores observaram um aumento do parâmetro de permanência no lado claro nos animais sob efeito de inalação do 1,8-cineol. Nas demais dosagens de CIN não houve a constatação do mesmo efeito, ao contrário, houve uma diminuição neste parâmetro avaliado, demonstrando baixa atividade ansiolítica e possível atividade sedativa. Destaca-se que mais testes são necessários para avaliar melhor esse possível efeito.

O Teste de Campo Aberto é utilizado para examinar a atividade exploratória dos animais, os quais têm uma inclinação natural por explorar ambientes novos, mesmo diante de estresses e conflitos impostos por esse modelo. Portanto, é viável analisar o impacto de drogas no sistema nervoso central por meio da avaliação da atividade locomotora dos roedores (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022). Dessa maneira, constatou-se que o TCA, conduzido no primeiro dia do protocolo experimental e antes dos tratamentos, não revelou diferenças significativas entre os grupos investigados. Esses achados sugerem a inexistência de modificações comportamentais relacionadas à ansiedade e à função motora antes do experimento.

O TCA é amplamente utilizado para investigar as atividades ansiolíticas nos modelos pré-clínicos. Animais que apresentam a capacidade exploratória reduzida são classificados como mais ansiosos, pois encontram-se em resposta comportamental do tipo fuga/esquiva (Shah *et al.*, 2022). Os dados do Teste de Campo Aberto realizado no 14º dia evidenciaram que os grupos de animais tratados com diazepam e com 1,8-cineol na dosagem de 5,0 mg/kg apresentaram um aumento significativo na atividade exploratória horizontal (cruzamentos com quatro patas) e atividade exploratória vertical (*rearing*), assemelhando-se novamente aos

efeitos observados no grupo tratado com diazepam 1 mg/kg. O grupo tratado apenas com salina, e exposto aos mesmos estressores, demonstrou uma redução significativa nesses parâmetros.

Em relação ao tempo de imobilidade dos roedores no campo aberto, percebe-se que a dosagem de 5,0 mg/kg do CIN foi a única capaz de reduzir esse parâmetro a níveis semelhantes ao ansiolítico padrão utilizado, o diazepam. Entretanto, as dosagens de 10mg/kg e 25mg/kg do CIN demonstraram aumento significativo no tempo de imobilidade, sendo este último grupo maior em relação ao primeiro. Em estudos comportamentais, a diminuição do tempo de imobilidade sugere uma maior atividade locomotora dos animais, evidenciando maior predileção pelo comportamento exploratório. Esses indicadores são observados em animais sob efeito ansiolítico (Gomes *et al.*, 2010).

Ainda no campo aberto, constatou-se que os animais tratados com CIN 5,0 mg/kg demonstraram uma redução significativa no tempo de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), semelhante aos animais tratados com diazepam. O grupo CIN 5,0mg/kg ainda apresentou redução significativa nesse parâmetro em comparação aos grupos tratados com CIN nas dosagens de 10 mg/kg e 25 mg/kg, sendo que esta última dosagem apresentou aumento mais acentuado de *groomings*.

Este, por sua vez, é um comportamento natural realizado por roedores, visando à autolimpeza e à manutenção de diversos aspectos fisiológicos. Por outro lado, devido à sua natureza repetitiva e padronizada, estudos vêm sendo desenvolvidos para evidenciar que esse comportamento, quando em excesso, pode estar associado a níveis acentuados de ansiedade (referência) e traços de Transtorno Obsessivo-compulsivo (Mohrle *et al.*, 2020) por se tratar de uma espécie de estereotipia.

De acordo com Nin *et al.* (2012), o *grooming* pode ser diminuído sob efeito de drogas ansiolíticas, de modo semelhante ao observado no tratamento com CIN 5,0 mg/kg e diazepam 1 mg/kg. Estes resultados indicam um potencial ansiolítico do 1,8-cineol em doses mais baixas, pois esse efeito não foi observado com o aumento da dose, sugerindo uma atividade similar à observada nos benzodiazepínicos.

Ainda com a finalidade de investigarmos a atividade exploratória dos roedores, foi-se aplicado o teste da placa perfurada. Notou-se através dos resultados que a dosagem de 5,0 mg/kg do CIN foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de *headdips* e de tempo de permanência nos orifícios, assim como o diazepam também demonstrou. Os mesmos efeitos não foram observados nas outras dosagens de CIN. Além disso, antes desse teste também foi administrado o Flumazenil no 14º dia. Os dados evidenciaram a interrupção aguda dos efeitos

ansiolíticos demonstrados previamente pelo CIN na dose de 5,0 mg/kg. Os animais tratados com Flumazenil sofreram uma diminuição significativa na quantidade de *headdips* e no tempo de permanência nos orifícios da placa perfurada, com redução de 56,3% e 40,94%, respectivamente.

O estresse oxidativo é extremamente prejudicial ao organismo, pois causa danos e até mesmo a morte celular, afetando estruturas celulares cruciais, como o DNA e os lipídios. Esta última é denominada de peroxidação lipídica. Ademais, estudos vêm apontando a sua íntima relação com os transtornos de ansiedade (Bouayed; Soulimani, 2018). A depender da cronicidade de situações adversas e estressantes, os casos podem ser de maior ou menor gravidade. Fato é que toda essa alteração a nível celular, é fator de risco para várias doenças neuropsiquiátricas, incluindo os transtornos de humor e demências (Barbosa *et al.*, 2010; Sharifi-Rad, 2020; Bouayed; Soulimani, 2018).

Essa dinâmica, em condições ideais, exerce um papel fundamental para a regulação bioquímica. Entretanto, quando excessiva, pode causar um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo, portanto, a produção acentuada de radicais livres. Tal condição desemboca na oxidação de biomoléculas, podendo resultar em perda de suas funções biológicas e instabilidade homeostática. Os principais radicais livres e espécies reativas de oxigênio são o Superóxido ($O_2\bullet$), a hidroxila ($OH\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Existem alguns marcadores do estresse oxidativo, os quais são acionados quando a quantidade de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes. Dentre esses marcadores estão as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os quais consistem em um subproduto da peroxidação lipídica. A presença dessas substâncias indica danos celulares (Barbosa *et al.*, 2010).

Dessa maneira, o presente trabalho analisou os níveis de peroxidação lipídica através do teste de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi-se demonstrado que o 1,8-cineol na dose de 5,0 mg/kg reduziu de modo significativo os níveis de malondialdeído (MDA) nas três áreas cerebrais estudadas, assim como a droga padrão em comparação ao controle salina. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Nikbakht; Anarkooli; Abdanipour (2022) e Bahrami; Yaghmaei; Yousofvand (2022).

O mesmo não foi observado na dosagem de CIN 10 mg/kg, pois observou-se uma crescente dos níveis de MDA. Entretanto, a dose de CIN 25 mg/kg demonstrou uma redução nos níveis de MDA em relação à dosagem de 10 mg/kg nas áreas do hipocampo e corpo estriado. O

mesmo não foi observado no córtex pré-frontal, visto que a dose de 25mg/kg superou os níveis de MDA da dosagem de 10 mg/kg.

Além disso, na presença do estresse crônico, o sistema imunológico costuma produzir espécies reativas de nitrogênio (RNS), os quais são caracterizados por compostos nitrogenados que têm alta reatividade, como o Óxido Nítrico (NO), Peróxido Nítrico (NO₂-), Peroxinitrito (ONOO-) e Radical Nitrose (\cdot NO₂). Quando produzidos em excesso, essas substâncias podem ser prejudiciais para as células, podendo resultar em neuroinflamação, a qual está associada a diversos transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão e ansiedade (Won; Kim, 2020; Santos, 2019).

Para fins de avaliarmos os níveis do estresse nitrosativo, foram medidas as concentrações de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais do hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal. Observou-se que o CIN na dose de 5,0 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrato/nitrato em relação ao grupo controle salina em todas as áreas cerebrais estudadas sendo similar ao diazepam. Esses efeitos se assemelham aos achados do estudo realizado por Cai *et al.*, 2022, o qual constatou a capacidade do 1,8-cineol em reduzir significativamente o nível de inflamação e o estresse oxidativo e nitrosativo, resultando em uma menor apoptose das células pulmonares. Em nosso estudo, as dosagens de 10 mg/kg e 25 mg/kg também foram capazes de reduzir os níveis de estresse nitrosativo nas áreas do corpo estriado e córtex pré-frontal, mas não no hipocampo.

Outros estudos com animais têm investigado os efeitos do eucaliptol em pacientes com epilepsia (Nikbakht; Anarkooli; Abdanipour, 2022), em transtornos de humor, como a depressão, e também nos transtornos de ansiedade (Dougnon; Ito, 2023; Bahrami; Yaghmaei; Yousofvand, 2022), e em edemas cerebrais (Santos *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos investigam possíveis efeitos neuroprotetores desse monoterpene (Nikbakht; Anarkooli; Abdanipour, 2022).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que o 1,8-cineol possui atividade ansiolítica na dose de 5 mg/kg em modelos preditivos de ansiedade. O bioativo apresentou efeito positivo sobre a atividade exploratória e locomotora dos roedores. Ademais, demonstrou capacidade de aumentar a atividade antioxidante dos animais, evidenciado pelos níveis reduzidos de MDA.

Revelou, ainda, ser capaz de atenuar o estresse nitrosativo, demonstrado pela redução nos níveis de nitrito/nitrato no tecido cerebral. Quanto às doses de 10 e 25 mg/kg, estas

indicaram um possível efeito sedativo sobre os animais, hipótese comprovada por meio da ação do flumazenil, o qual comprovou o mecanismo de ação do CIN via receptor GABAA. Dessa maneira, o 1,8-cineol apresenta potencial farmacológico para ser utilizado no tratamento clínico dos transtornos de ansiedade.

Ressaltamos que o estudo apresenta algumas limitações, como a ausência de testes mais específicos para avaliação dos possíveis efeitos sedativos apontados, sendo necessário mais pesquisas com o intuito de investigar esses parâmetros de maneira aprofundada.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores contribuíram desde o momento da produção do projeto de pesquisa, colaborando com a indicação de artigos científicos e conhecimentos acerca do modelo de ansiedade, composto bioativo utilizado e testes comportamentais e neuroquímicos. Além disso, foram essenciais na execução do delineamento experimental e construção do presente artigo científico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Laboratórios de Fisiologia e Neurofarmacologia, Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) e Faculdade de Medicina de Sobral (FAMED).

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não possuem conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ACIKGOZ, B.; DALKIRAN, B.; DAYI, A. An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice. **Behavioural processes**, v. 200, n. 104670, p. 104670, 2022.

APARICIO, S. et al. Properties of 1,8-cineole: **A thermophysical and theoretical study. The journal of physical chemistry. B**, v. 111, n. 12, p. 3167–3177, 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARROS, M. B. A. Relato de tristeza/depressão, nervosismo/ansiedade e problemas de sono na população adulta brasileira durante a pandemia de Covid-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.d.]. 2020.

BAHRAMI, T.; YAGHMAEI, P.; YOUSOFVAND, N. **The effects of Ibuprofen and 1, 8-cineol on anxiety and spatial memory in hyperammonemic rats**. *Metabolic brain disease*, v. 38, n. 2, p. 613–620, 2023.

BAUMEL, W. T. et al. **Neurocircuitry of treatment in anxiety disorders. Biomarkers in neuropsychiatry**, v. 6, n. 10052, p. 10052, 2022.

BECK, Judith S. **Terapia cognitivo-comportamental: teoria e prática**. 2 Porto Alegre: Artmed, 2013, 413 p.

BELOVICOVA, K. et al. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. **Interdisciplinary toxicology**, v. 10, n. 1, p. 40–43, 2017.

BONI, B. S. et al. O uso de psicofármacos e/ou psicotrópicos: Uma revisão integrativa. Em: **Investigação Qualitativa em Saúde: Avanços e Desafios** | Investigación Cualitativa en Salud: Avances y Desafios. [s.l.] Ludomedia, 2021. p. 880–889.

BHATTACHARYA, S. et al. Efficacy of cognitive behavioral therapy for anxiety-related disorders: A meta-analysis of recent literature. **Current psychiatry reports**, v. 25, n. 1, p. 19–30, 2023.

CAI, Z.-M. et al. 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. **Journal of Asian natural products research**, v. 23, n. 10, p. 938–954, 2021.

CAI, Z. et al. **Enhanced protective activity of 1,8-cineole on emphysema using hyaluronic acid-coated liposomes via quantitative pulmonary administration in mice**. *SSRN Electronic Journal*, 2022.

CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 97, p. 297–306, 2016.

CAMPOS-CARDOSO, R. et al. Exploring the light/dark box test: Protocols and implications for neuroscience research. **Journal of neuroscience methods**, v. 384, n. 109748, p. 109748, 2023.

CARPENTER, J. K. et al. Cognitive behavioral therapy for anxiety and related disorders: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Depression and anxiety**, v. 35, n. 6, p. 502–514, 2018.

COSTA, A. P. P.; ALVES, A. P. P. Análise das bases genéticas e neurobiológicas da Ansiedade e Depressão: um painel de genes candidatos. **Cadernos de pós-graduação em distúrbios do desenvolvimento**, v. 23, n. 1, 2023.

COSTA, C. O. DA et al. **Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. Jornal brasileiro de psiquiatria**, v. 68, n. 2, p. 92–100, 2019.

CURTISS, J. E. et al. **Cognitive-behavioral treatments for anxiety and stress-related disorders**. Focus (American Psychiatric Publishing), v. 19, n. 2, p. 184–189, 2021.

DALGALARRONDO, P. **Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. v. 440, 2019.

D'AVILA, L. I. et al. Processo Patológico do Transtorno de Ansiedade Segundo a Literatura Digital Disponível em Português – **Revisão Integrativa. Revista Psicologia e Saúde**, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20435/pssa.v0i0.922>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

DE OLIVEIRA SANTOS, P.; CARVALHO, J. **Tratamento Farmacológico No Transtorno De Ansiedade Generalizada**. Zenodo, , 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5281/ZENODO.8088627>>

DOUGNON, G.; ITO, M. Inhalation administration of the bicyclic ethers 1,8- and 1,4-cineole prevent anxiety and depressive-like behaviours in mice. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 8, p. 1884, 2020.

FERREIRA-DA-SILVA, F.W., R. Barbosa, L. Moreira-Júnior, T. dos Santos-Nascimento, M.D. de Oliveira-Martins, A.N. Coelho-de-Souza, F.S. Cavalcante, V.M. Ceccatto, T.L. de Lemos, P.J. Magalhães, S. Lahlou, J.H. Leal-Cardoso, **Effects of 1,8-cineole on electrophysiological parameters of neurons of the rat superior cervical ganglion**, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 36 (2009) 1068–1073.

GARAKANI, A. et al. **Pharmacotherapy of anxiety disorders: Current and emerging treatment options. Frontiers in psychiatry**, v. 11, 2020.

GHAFARIMOGHADAM, M.; MASHAYEKH, R.; GHOLAMI, M.; FERREYDANI, P.; SHELLEY-TREMBLAY, J.; KANDEZI, N.; SABOURI, E.; MOTAGHINEJAD, M. A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: 49Current techniques and links to human cognition. **Physiology & Behavior**. v. 244, p. 1-15, 2022.

GOLDFIELD, D.; ZHANG, M.; GEORGE, T. P. Substance use and anxiety disorders: A scoping review. **Current addiction reports**, v. 11, n. 2, p. 352–370, 2024.

GOMES, P. B. et al. **Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 96, n. 3, p. 287–293, 2010.

GUILLAND, R. et al. Prevalência de sintomas de depressão e ansiedade em trabalhadores durante a pandemia da Covid-19. **Trabalho Educação e Saúde**, v. 20, 2022.

HOFMANN, S. G., ASNAANI, A., Vonk, I. J., SAWYER, A. T., & Fang, A. (2012). The efficacy of cognitive behavioral therapy: A review of meta-analyses. **Cognitive therapy and research**, 36(5), 427-440.

HOFMANN, S. G. **Lidando com a ansiedade: estratégias de TCC e mindfulness para superar o medo e a preocupação**. [s.l.] Artmed Editora, 2022.

JANKE, W.; NETTER, P. **Anxiolytic effects of drugs: Approaches, methods and problems**. Neuropsychobiology, v. 9, n. 1, p. 33–40, 1983.

JAVAID, S. F. et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. **Middle East Current Psychiatry**, v. 30, n. 1, 2023.

FIÚZA, V. F. **O transtorno de ansiedade de separação na infância: uma revisão de literatura**. Brazilian Journal of Health Review, v. 6, n. 6, p. 26577–26586, 2023.

KAMALI, A. et al. The Cortico-limbo-thalamo-cortical circuits: An update to the original Papez circuit of the human limbic system. **Brain topography**, v. 36, n. 3, p. 371–389, 2023.

LEMOS VASCONCELLOS, S. J. et al. **A relação entre fobias específicas com ansiedade, impulsividade e depressão: Um estudo exploratório**. Psico, v. 54, n. 1, p. e37366, 2023.

LUCAS, A. V. L.; COSTA, N. M. L. DA. Mutismo seletivo: Considerações sobre o transtorno de recusa da fala. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e27510716316, 2021.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS: DSM-5-TR. Porto Alegre: Artmed, 2023.

MATSCHINSKE, L. B. et al. Psicofármacos: atuação no organismo e seu uso indiscriminado / Psychoactive drugs: action in the organism and their indiscriminate use. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 12210–12226, 2022.

MURSAL, M. et al. Role of natural bioactive compounds in the management of neurodegenerative disorders. **Intelligent Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 102–113, 2024.

MUTZ, J. et al. Anxiety disorders and age-related changes in physiology. The British journal of psychiatry: **the journal of mental science**, v. 221, n. 3, p. 528–537, 2022.

NARMANDAKH, A. et al. Psychosocial and biological risk factors of anxiety disorders in adolescents: a TRAILS report. **European child & adolescent psychiatry**, v. 30, n. 12, p. 1969–1982, 2021.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528–543, 2014.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). (2022). **Folha informativa: Ansiedade**. Brasília – DF, 2022. Acessado em 12 de março de 2024, disponível em <<https://www.paho.org/pt/noticias/2-3-2022-pandemia-covid-19-desencadeia-aumento-25-na-prevalencia-ansiedade-e-depressao-em>>.

PENNINX, B. W. et al. **Anxiety disorders**. *Lancet*, v. 397, n. 10277, p. 914–927, 2021.

PINHEIRO, J. D. Transtorno de Pânico e Ansiedade: Condições Multifatoriais. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. e49011730122, 2022.

REMES, O. *et al.*, A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. **Brain and Behavior**, v. 6, n. 7, p. e00497, 2016.

RIACHI, E.; HOLMA, J.; LAITILA, A. Psychotherapists' views on triggering factors for psychological disorders. **Discover Psychology**, v. 2, n. 1, 2022.

RIBEIRO, W. S. et al. **The impact of epidemic violence on the prevalence of psychiatric disorders in Sao Paulo and Rio de Janeiro, Brazil**. *PloS one*, v. 8, n. 5, p. e63545, 2013.

RIORDAN, D. M.; SINGHAL, D. **Anxiety-related disorders: An overview**. *Journal of paediatrics and child health*, v. 54, n. 10, p. 1104–1109, 2018.

SANTOS, E. C. DOS et al. **The monoterpene 1,8-cineole prevents cerebral edema in a murine model of severe malaria**. *PloS one*, v. 17, n. 5, p. e0268347, 2022.

SANTOS FA, RAO VSN. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils**. *Phytother. Res.* 2000; 14: 240–4.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1,8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. **European journal of pharmacology**, v. 331, n. 2–3, p. 253–258, 1997.

SAPOLSKY, R. M. **Comporte-se: A biologia humana em nosso melhor e pior**. [s.l.] Companhia Das Letras, 2021.

SEPPALA, L. J. et al. Fall-risk-increasing drugs: A systematic review and meta-analysis: II. Psychotropics. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 19, n. 4, p. 371.e11-371.e17, 2018.

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, 2020.

SOBREIRA DANTAS NÓBREGA DE FIGUÊIREDO, F. R. et al. **Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1,8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice**. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 133, n. 110802, p. 110802, 2019.

SOMERS, J. M. et al., **Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature**. *Can. J. Psychiatry*, v. 51, p. 100-113, 2006.

SUZIGAN, M. S. et al. Neurobiologia dos transtornos de ansiedade. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 6109–6130, 2024.

SZUHANY, K. L.; SIMON, N. M. Anxiety disorders: A review. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 328, n. 24, p. 2431, 2022.

SYTAR, O.; SMETANSKA, I. Special issue “bioactive compounds from natural sources (2020, 2021)”. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 6, p. 1929, 2022.

VASANOVA, Z. K. et al. **Biological activity of 1,8-cineole from levant wormwood. Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 37, p. 30–32, 2003.

VASCONCELLOS, S. J. L. et al. **Personalidade, Ansiedade Social e Adaptação às Medidas de Distanciamento Durante a Pandemia**. **Psico-USF**, v. 27, n. 4, p. 779–790, 2022.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Antidepressivos na Ansiedade: Uma Abordagem Abrangente da Eficácia e Mecanismos de Ação. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1716–1722, 2024.

WEGENER, A. J.; NEIGH, G. N. Animal models of anxiety and depression: Incorporating the underlying mechanisms of sex differences in macroglia biology. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 15, 2021.

WILHELM, M. et al. **Development of decision rules for an adaptive aftercare intervention based on individual symptom courses for agoraphobia patients**. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, 2024.

ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **"Efeitos comportamentais e neuroquímicos do 1,8 cineol sobre modelos de ansiedade-like em camundongos"**, registrado como **Protocolo CEUA UFC Sobral nº 04/23**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva**, envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino). O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado *ad referendum* pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Campus da UFC em Sobral, em cumprimento à deliberação registrada na segunda reunião ordinária de 07/03/2023.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2023 até 31/12/2024
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus / Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	66 (sessenta e seis)
Peso/idade	20-25 g / 2-3 meses
Sexo	Machos (♂)
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 23 de maio de 2023.

Igor Iuço Castro da Silva
Professor de Biologia Humana
Coordenador CEUA UFC Sobral

Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA