



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO

**INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANSIOLÍTICO,
ANTIDEPRESSIVO E ANTINOCICEPTIVO DO CARVACROL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E
PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

FORTALEZA

2014

FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO

**INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANSIOLÍTICO,
ANTIDEPRESSIVO E ANTINOCICEPTIVO DO CARVACROL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E
PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M485i Melo, Francisca Helvira Cavalcante.
Investigação de possíveis mecanismos de ação ansiolítico, antidepressivo e antinociceptivo do carvacrol em camundongos : estudos comportamentais, neuroquímicos e participação do estresse oxidativo / Francisca Helvira Cavalcante Melo. – 2014.
183 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Plantas Medicinais. 2. Depressão. 3. Ansiedade. 4. Nociceptividade. 5. Antioxidantes.
I. Título.

CDD 615.32

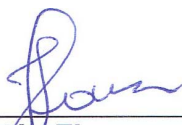
FRANCISCA HELVIRA CAVALCANTE MELO

**INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ANSIOLÍTICO,
ANTIDEPRESSIVO E ANTINOCICEPTIVO DO CARVACROL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E
PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em / /

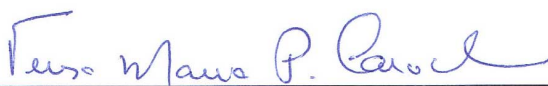
BANCA EXAMINADORA



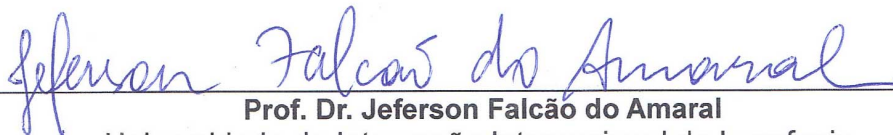
Profa. Dra. Francisca Clea Florenco de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará



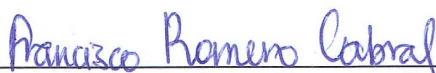
Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA



Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Jeferson Falcão do Amaral
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia
Afro-Brasileira – UNILAB



Prof. Dr. Francisco Romero Cabral
Hospital Israelita Albert Einstein – S.P.

*Agradeço a Deus, ao meu esposo e
ao nosso pequeno Benjamin,
nosso Filho da Felicidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para concluir esse projeto, mesmo diante de tantas dificuldades. Ao meu marido, **Alyson dos Santos Melo** e ao nosso anjinho, **Benjamin**, por terem sido a minha inspiração.

Aos meus pais, **Antonio Hugo Félix** e **Maria Hortulina Cavalcante Veras**, por terem me ensinado o valor do estudo. Graças a vocês, papai e mamãe, cheguei até aqui. Aos meus irmãos, **Henrique**, **Hélio**, **Hélder**, **Heron** e **Liana**, por me amarem da forma como sou. Ao meu avô, **Luiz Bezerra Veras** e minha avó, **Maria Cavalcante Melo**, pela paciência e carinho dispensados. À minha tia, **Estela**, pelas muitas risadas e momentos de descontração.

Aos meus sogros, **Macilio Gonçalves Melo** e **Maria do Socorro dos Santos Melo**, por terem me aceito como um novo membro da família.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a **Francisca Cléa Florenço de Sousa**, por ter me acompanhado, apoiado e por ter acreditado na minha capacidade.

Às Profas Dr^{as} **Carla Thiciane Vasconcelos de Melo**, **Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho** e aos Profs Dr^s **Jeferson Falcão do Amaral** e **Romero Cabral**, por terem gentilmente aceito participar da minha banca examinadora de doutorado.

À Prof^a Dr^a **Edna Maria Camelo Chaves** e ao Prof Dr **Jeferson Falcão do Amaral**, por terem gentilmente aceito participar da minha banca de qualificação.

À todas as demais professoras do Laboratório de Neurofarmacologia, **prof^a. Glauce Socorro de Barros Viana**, **prof^a. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**, **prof^a. Marta Maria de França Fonteles** e **prof^a. Danielle Silveira Macedo** por estarem sempre disponíveis a tirar dúvidas e ajudar na realização dos trabalhos.

Quero agradecer em especial às minhas amigas **Mariana Lima Fernandes**, **Maria do Carmo Oliveira Citó** e **Luciana Kelly Ximenes dos Santos** por terem me ajudado tantas vezes. Sem vocês eu não teria conseguido!

Aos amigos de graduação e mestrado, **Nayrton** e **Emiliano**, pelos momentos de descontração e também por estarem sempre dispostos a tirar minhas dúvidas.

Aos demais amigos de laboratório, igualmente importantes, **Edith**, **Charliane**, **Thici**, **Fernando**, **Mariana**, **Giuliana**, **Patrícia Freire**, **Aline Albuquerque**, **Izabel**, **Carol Porto**, **Alyne Mara**, **Leonardo** e **Isabel**.

Aos funcionários do laboratório **Vilani**, **Lena** e **Arnaldo**, pelas conversas descontraídas e disposição a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e farmacologia: **Célia**, **Alana**, **Fernando** e aos demais funcionários.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Em suma, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho,

Obrigada!!

“As futuras gerações algum dia vão rir da tolice dos filósofos materialistas modernos. Quanto mais estudo a natureza, mais fico maravilhado com os feitos do Criador. Oro enquanto estou trabalhando no laboratório.”

—Louis Pasteur

RESUMO

Carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico presente nos óleos essenciais de diversas plantas. É o principal constituinte dos óleos essenciais de orégano e thyme. Conhecendo previamente a ação antidepressiva e ansiolítica do carvacrol, este trabalho apresenta uma análise das concentrações de monoaminas e aminoácidos em corpo estriado de camundongos após o tratamento oral com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Os resultados mostraram um aumento dos níveis de dopamina em ambas as doses e de GABA, aspartato, taurina e glicina na dose de 25 mg/Kg. Sabendo do importante papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão, foi estudado o efeito do carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em animais previamente submetidos a injeções de pilocarpina. As áreas cerebrais do hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal foram retiradas para análise das concentrações de MDA, nitrito-nitrato, catalase, GSH e SOD. Os resultados mostraram que houve diminuição dos níveis de MDA em ambas as doses em todas as áreas cerebrais. Os níveis de nitrito-nitrato diminuíram em corpo estriado e hipocampo de animais tratados com a dose de 50 mg/Kg e nos animais tratados com a dose de 25 mg/Kg, houve diminuição dos níveis de nitrito-nitrato no hipocampo. A concentração de catalase diminuiu em ambas as doses na área cerebral do hipocampo e os níveis de GSH aumentaram na dose de 50 mg/Kg nas áreas do corpo estriado e hipocampo. Os níveis de SOD não foram alterados. Visto que muitas substâncias antidepressivas apresentam também ação analgésica, o presente trabalho apresentou um estudo das ações comportamentais do carvacrol em modelos animais de nocicepção, tais como teste da formalina, placa quente e contorções induzidas por ácido acético. Para estes testes, foram utilizadas doses de 50 e 100 mg/Kg. No teste das contorções induzidas por ácido acético, carvacrol em ambas as doses diminuiu o número de contorções. No teste da placa quente, carvacrol em ambas as doses apresentou um aumento no tempo de latência de dor no tempo de 60 min. No modelo de nocicepção induzida pela formalina, os animais tratados com carvacrol na dose de 50 mg/Kg apresentaram uma diminuição do tempo de lambadura da pata na primeira fase do teste. Já os animais tratados com carvacrol na dose de 100 mg/Kg apresentaram uma diminuição do tempo de lambadura tanto na primeira quanto na segunda fase do teste. O pré-tratamento dos animais com naloxona ou L-arginina não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do carvacrol na dose de 100 mg/Kg no teste das contorções induzidas por ácido acético. No modelo da nocicepção induzida pela formalina, o pré-tratamento dos camundongos com naloxona ou L-arginina também não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do carvacrol na dose de 100 mg/Kg na primeira e segunda fase do teste. O teste do campo aberto e rota rod não demonstrou alteração na dose de 100 mg/Kg, demonstrando que essa substância não alterou a atividade locomotora dos animais. Foi realizada uma avaliação toxicológica aguda em camundongos previamente tratados com carvacrol nas doses de 300 e 2000 mg/Kg. A análise histológica do fígado, rins e cérebro não mostrou nenhuma alteração desses órgãos após o tratamento com carvacrol

Palavras-chave: Plantas medicinais. Depressão. Ansiedade. Nocicepção. Antioxidantes.

ABSTRACT

Carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpenic phenol present in the essential oil of many plants. It is the major component of the essential oil fraction of oregano and thyme. Knowing the antidepressant and anxiolytic actions of carvacrol, this work presents an analysis of monoamines and amino acids concentrations in mice striatum after oral treatment with carvacrol at doses of 25 and 50 mg / Kg. The results showed increased expression of dopamine in both doses of carvacrol and increased levels of GABA, aspartate, glycine and taurine at the dose of 25 mg / kg. Knowing the important role of oxidative stress in the pathophysiology of depression, the present work studied the effects of carvacrol at doses of 25 and 50 mg/Kg in animals submitted to previous injection of pilocarpine. The brain areas of hippocampus, striatum and prefrontal cortex were removed for analysis of MDA, nitrite-nitrate, catalase, SOD and GSH concentrations. The results showed that there was a decrease in MDA levels in both doses in all the studied brain areas. Nitrite and nitrate levels decreased in the striatum and hippocampus of animals treated with the dose of 50 mg/Kg and the animals treated with 25 mg/Kg showed a decrease in nitrite and nitrate levels in the hippocampus. The concentration of catalase at both doses decreased in the hippocampus and the levels of GSH increased in the dose of 50 mg/Kg in mice striatum and hippocampus. The SOD levels did not change. Since many antidepressant substances also have analgesic action, this work presented a study of the behavioral actions of carvacrol in animal models of nociception such as the formalin test, hot plate and acetic acid-induced abdominal constriction test. For these tests we used carvacrol at doses of 50 and 100 mg/Kg. In acetic acid induced-abdominal constriction test, carvacrol at both doses reduced the number of writhes. In the hot plate test, carvacrol at both doses showed an increase in pain latency at the time of 60 min. In the formalin test, animals treated with carvacrol at a dose of 50 mg/Kg showed a decrease in paw licking time in the first phase of the test. The animals treated with carvacrol at a dose of 100 mg/Kg showed a reduction in paw licking time in both first and second phases of the test. Pretreatment with naloxone or L-arginine was unable to reverse the antinociceptive effect of carvacrol at a dose of 100 mg/Kg in acetic acid induced-abdominal constriction test. In the formalin test, pretreatment of mice with naloxone or L-arginine was also unable to reverse carvacrol antinociceptive effect at a dose of 100 mg/Kg in the first and second phases of the test. The open field and rota rod tests were performed at dose of 100 mg/Kg and showed no significant changes, demonstrating that the substance did not change locomotor activity in mice. Acute toxicological evaluation was performed in mice pretreated with carvacrol at doses of 300 and 2000 mg/Kg. Histological analysis of liver, kidney and brain showed no change in these organs after treatment with carvacrol.

Keywords: Medicinal plants. Depression. Anxiety. Nociception. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química do carvacrol	20
2	Estrutura química do timol	20
3	Receptor GABA _A	27
4	Vias dopaminérgicas no encéfalo	30
5	Vias da noradrenalina no encéfalo.	32
6	Vias da 5-hidroxitriptamina no encéfalo.	34
7	Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas por ácido acético.	67
8	Fluxo de tratamento no teste da formalina em camundongos.	69
9	Concentração de monoaminas em corpo estriado de camundongos tratados com carvacrol	75
10	Concentração de aminoácidos em corpo estriado de camundongos tratados com carvacrol	77
11	Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	79
12	Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	80
13	Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	81
14	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	83
15	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	84
16	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	85
17	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	87
18	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	88
19	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	89

20	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	91
21	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	92
22	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	93
23	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	95
24	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	96
25	Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.	97
26	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	99
27	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo da placa quente.	101
28	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste.	104
29	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste.	105
30	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos após o pré-tratamento com naloxona (1 mg//Kg) e L-arginina (150 mg/Kg).	107
31	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste após o pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg).	109
32	Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste após o pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg).	110

- 33 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos. 112
- 34 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o número de rearing no teste do campo aberto em camundongos. 113
- 35 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o número de grooming no teste do campo aberto em camundongos. 114
- 36 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 5 rpm, no teste do rota rod em camundongos. 116
- 37 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 15 rpm, no teste do rota rod em camundongos. 117
- 38 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 40 rpm, no teste do rota rod em camundongos. 118
- 39 Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: rim, cérebro e fígado em ratos na dose de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg no 14 ° dia após término da avaliação para toxicidade. 1A, 2A e 3A (controle), 1B, 2B e 3B (300 mg/Kg), 1C, 2C e 3C (2000 mg/Kg 2). 122

LISTA DE QUADROS

1 Distribuição dos subtipos de receptores adrenérgicos	31
2 Principais subtipos de receptores 5-HT	33
3 Subtipos de receptores opióides e suas funções (Katzung)	38
4 Drogas e Reagentes	50
5 Equipamentos	50
6 Teste do Campo Aberto em camundongos.	64
7 Teste do Rota Rod em camundongos.	65
8 Teste das contorções induzidas por ácido acético.	66
9 Teste da Formalina em camundongos.	68
10 Teste da Placa Quente em camundongos.	70

LISTA DE TABELAS

1 Ocorrência do carvacrol em óleos essenciais de plantas aromáticas	21
2 Alimentos flavorizados com óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (ppm)	21
3 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo da placa quente	102
4 Grupo controle, animais tratados com água e tween 80 no teste do Campo Aberto no 1º dia das administrações.	119
5 Grupo controle, animais tratados com água e tween 80 no teste do Campo Aberto no 14o dia das administrações.	120
6 Efeito do carvacrol na dose de 2000 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 1o dia das administrações de carvacrol.	120
7 Efeito do carvacrol na dose de 300 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 14º dia das administrações de carvacrol.	120
8 Efeito do carvacrol na dose de 300 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 1º dia das administrações de carvacrol.	121
9 Efeito do carvacrol na dose de 300 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 14o dia das administrações de carvacrol.	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1.	Carvacrol	19
1.2	Ansiedade	24
1.3	Depressão	27
1.4	Dor	35
1.5	A depressão e o processo inflamatório	39
1.6	Estresse oxidativo e depressão	40
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo Geral	47
3.2	Objetivos Específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Drogas e reagentes	50
4.2	Animais	51
4.3	Preparo das Drogas	52
4.4	Protocolo Experimental	52
4.4.1	Avaliação da Atividade Locomotora	52
4.4.1.1	Teste do Campo Aberto	63
4.4.2	Avaliação da atividade relaxante muscular	64
4.4.2.1	Teste do <i>Rota Rod</i>	64
4.5	Avaliação da Atividade Nociceptiva	65
4.5.1	Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	65
4.5.2	Teste da nocicepção induzida pela formalina.	67
4.5.3	Teste de nocicepção térmica na placa quente.	69
4.6	Testes Neuroquímicos	52

4.6.1	Dissecação das áreas cerebrais	53
4.6.2	Determinação de aminoácidos com HPLC.	54
4.6.3	Determinação de monoaminas e seus metabólitos com HPLC	55
4.7	Estresse oxidativo	56
4.7.1	Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).	56
4.7.2	Determinação da produção de nitrito.	57
4.7.3	Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)	58
4.7.4	Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	59
4.7.5	Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)	60
4.7.6	Dosagem de proteína	62
4.8	Avaliação da toxicologia	70
4.8.1	Procedimento experimental	70
4.8.2	Observação dos sinais de toxicidade	71
4.9	Análise Estatística	72
5	RESULTADOS	74
5.1	Estudos dos efeitos neuroquímicos do carvacrol	74
5.1.1	Determinação da concentração das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos usando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	74
5.1.2	Determinação das concentrações de aminoácidos em corpo estriado de camundongos usando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	76
5.2	Efeitos antioxidantes do tratamento agudo com carvacrol no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina.	78
5.2.1	Efeitos do tratamento com carvacrol sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.	78
5.2.2	Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.	82

5.2.3	Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina	86
5.2.4	Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a quantidade de SOD em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.	94
5.3	Atividade Antinociceptiva	98
5.3.1	Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.	98
5.3.2	Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção térmica na placa quente.	100
5.3.3	Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção induzida pela formalina.	103
5.3.4	Investigação do possível mecanismo nociceptivo do carvacrol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.	106
5.3.5	Investigação do possível mecanismo nociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção induzidas por formalina em camundongos.	108
5.3.6	Avaliação da Atividade Locomotora e Relaxante Muscular	111
5.3.6.1	Teste do Campo Aberto	111
5.3.6.2	Teste do <i>Rota Rod</i>	115
5.4	Avaliação da Toxicologia Aguda do carvacrol	119
5.4.1	Avaliação comportamental	119
5.4.2	Avaliação histológica	122
6	DISCUSSÃO	124
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
8	CONCLUSÃO	146
	REFERÊNCIAS	148

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. Carvacrol

Compostos que apresentam atividade biológica e são derivados de fontes naturais (plantas, animais e microorganismos) são definidos como produtos naturais (BAKER et al., 2007). Desde os tempos antigos, os produtos naturais tem sido uma importante fonte de agentes terapêuticos (CALIXTO, 2005). Mesmo nos dias atuais, continuam sendo uma fonte significativa de novos medicamentos, principalmente os antihipertensivos, antitumorais e anti-infecciosos (NEWMAN; CRAGG, 2007). O percentual de medicamentos derivados de produtos naturais era de 40% em 2000, 24% em 2001 e 26% em 2002 (BUTLER, 2004). Além de serem utilizados pela indústria farmacêutica, os produtos naturais também podem ser usados como terapias alternativas, como é o caso do uso de plantas medicinais (SOUSA et al., 2008).

Os óleos essenciais são produtos naturais derivados de plantas aromáticas que tem um largo uso na medicina como anti-sépticos, antimicrobianos e como flavorizantes e aromatizantes na indústria de alimentos e perfumes (MATOS et al., 1999; IPEK et al., 2005). São obtidos de partes da planta, tais como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, frutos e raízes (LIOLIOS et al., 2009). Quimicamente, os óleos essenciais são misturas variáveis de terpenóides que incluem monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}). Também estão incluídos uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, alcóois, aldeídos, ésteres acíclicos ou compostos que contém N e S, tais como cumarínicos e homólogos fenilpropanóides (CHAVES et al., 2008).

Carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol), um monoterpeno de peso molecular 150,21 g/mol (fig. 1) é o principal componente dos óleos essenciais de orégano e tomilho (tabela 1) (LAROUGI et al., 1993; ARREBOLA et al., 1994; MULINACCI et al., 1996; BIMCZOK et al., 2008). O gênero *Thymus* (tomilho), uma planta aromática e medicinal, inclui numerosas espécies com características botânicas diferentes e uma ampla heterogeneidade química. A denominação “orégano” é atribuída a um vasto número de espécies em mais de uma dúzia de gêneros em diferentes famílias (NHU-TRANG et al., 2006). Sendo também encontrado em plantas do gênero *Lamiaceae*, o

carvacrol está sempre acompanhado pelo seu isômero timol (fig. 2) (AESCHBACH et al., 1994). Considerado como um aditivo alimentar seguro, (tabela 2) é utilizado como flavorizante em doces, bebidas, gomas de mascar e outros alimentos (KNOWLES et al., 2005). Alguns conservantes já usados na indústria de alimentos apresentam óleos essenciais ou carvacrol em sua composição (BURT, 2004).

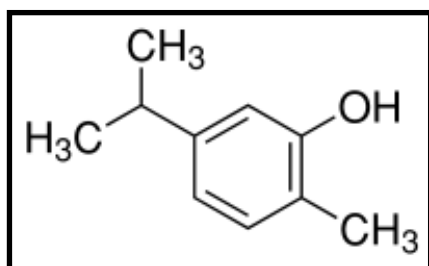


Figura 1 Estrutura química do carvacrol

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

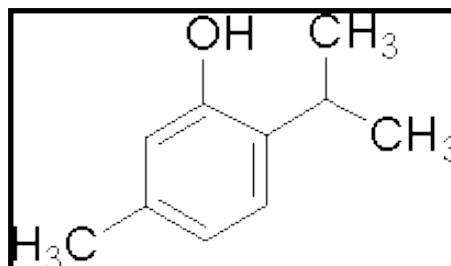


Figura 2 Estrutura química do timol

Já tem sido descrito que o tomilho apresenta vários benefícios medicinais, como propriedades antibacterianas e antifúngicas (DIDRY et al., 1994; MICHIELS et al., 2007; ARFA et al., 2007; UYANOGLU et al., 2008). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de tomilho estão relacionadas ao seu grande teor fenólico (BURT et al., 2007), sendo utilizado como um desinfetante oral em preparações farmacêuticas e agente flavorizante em produtos alimentícios (AHMED FARAG et al., 1995). Os principais constituintes de monoterpênos oxigenados são os compostos fenólicos timol e seu isômero, carvacrol. Timol tem um odor característico de fenóis aromáticos e sabor picante (GUILLEN et al., 2007). Carvacrol apresenta sabor e odor acre (KIMURA et al., 2006). As diferenças no sabor e odor dos óleos essenciais são decorrentes das diferentes proporções de isômeros fenólicos. Acredita-se que a produção de timol e carvacrol dependa de variações externas, como solo, condições climáticas, época de colheita e quantidade de água a que a planta é exposta. Aparentemente, estes fatores favorecem a formação de um isômero ou de outro (CHAMI et al., 2004). Também é estabelecido na literatura que não existe uma relação clara e direta dessa influência de condições ambientais e as percentagens de timol e carvacrol (ABU-LAFI et al., 2008). Timol e carvacrol são utilizados na fitoterapia como antisépticos, antiespasmódicos, tônico e contra gases intestinais. O uso na medicina popular e como conservantes

naturais tem se tornado limitado devido à sua insolubilidade em água, sublimação e decomposição na presença de luz (SHIMODA et al., 2006; VIÑAS et al., 2006).

Tabela 1 Ocorrência do carvacrol em óleos essenciais de plantas aromáticas

Planta	Carvacrol (%)
<i>Thymus capitatus</i>	12,7-74,4
<i>Thymus vulgaris</i>	9-60
<i>Satureja hortensis</i>	1,2-44
<i>Satureja montana</i>	30-40
<i>Origanum dictaminus</i>	58,8-82,3
<i>Origanum majorana</i>	48,7

Fonte: De Vincenzi et al. (2004)

Tabela 2 Alimentos flavorizados com óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (ppm)

Alimentos	T. capitatus	T. vulgaris	S. hortensis	S. montana	O. dictaminus	O. majorana
Derivados de carne	37,0	22,92	357,8	60,0	36,52	-
Condimentos e temperos	30,0	19,75	373,0	105,0	-	17,03
Gelatinas	2,0	10,04	-	-	-	3,4
Sopas	620,0	2,95	-	-	-	-
Bebidas não-alcólicas	0,50	4,97	-	-	-	4,65
Bebidas alcólicas	3,12	5,05	-	-	55,0	4,47

Fonte: De Vincenzi et al. (2004)

Estudos têm demonstrado que óleos essenciais de orégano e tomilho são efetivos contra estirpes de *E. Coli* (LACROIX et al., 2004; KISKÓ; ROLLER, 2005). Nostro et al. (2004) demonstraram um potencial antimicrobiano de carvacrol e timol contra *S. aureus* resistente à metilina. Outros estudos comprovaram a ação dessas substâncias contra estirpes de *Shigella* sp, *B cereus*, *B. circulans*, *S. entérica*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniaei*, *S. mutans* e *S. viridans* (ULTEE; SMID, 2001; KUNLE et al., 2003; BAGAMBOULA et al., 2004; RAJKOVIC et al., 2005; VALERO; FRANCÉS, 2006; KNOWLES et al., 2005; BURT et al., 2005; LIOLIOS et al., 2009).

O potencial antifúngico dos óleos essenciais já foram descritos em diversos estudos (PERIAGO; MOEZELAAR, 2001; MIAO He et al., 2007). Estudos comprovaram um significativo efeito antifúngico do carvacrol no tratamento de candidíase oral em ratos imunossuprimidos e na inibição do crescimento de *B. cinerea* e leveduras (CHAMI et al., 2004; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2007; ARORA; KAUR, 1999).

A ação antimicrobiana do carvacrol se deve a sua natureza hidrofóbica, ocasionando o seu acúmulo na membrana citoplasmática e fuga de íons potássio. Diferentes estudos demonstraram que o efluxo de íons potássio é a primeira indicação de dano à membrana, que teria como consequência uma diminuição do pH intracelular e inibição da síntese de ATP (POL et al., 2002).

A quantidade de óleo essencial necessária para exercer atividade antimicrobiana é, na maioria das vezes, maior do que a quantidade usada como flavorizante e está associada a efeitos adversos sensoriais. O forte aroma dos óleos essenciais pode ser resolvido com o uso de métodos desaromatizantes. É essencial encontrar um equilíbrio entre as propriedades antimicrobianas e a desaromatização (CHAIBI et al., 1997). Também é recomendado associar o uso de óleos essenciais ou seus compostos a outras técnicas de preservação e à redução de temperatura e pH ou usando uma combinação sinérgica dos óleos essenciais e seus compostos, como a associação de carvacrol e p-cymeno, o que permite uma diminuição da concentração usada e efeitos adversos sensoriais menos expressivos (BAGAMBOULA et al., 2004).

Aeschbach et al. (1994) sugeriram que timol e carvacrol apresentam propriedades antioxidantes que podem ser utilizadas como uma alternativa aos aditivos antioxidantes sintéticos usados na preservação de alimentos. Este estudo também demonstrou que o timol e carvacrol inibem a peroxidação de lipossomos fosfolipídeos de maneira dose-dependente. Aydin et al. (2003) analisaram os efeitos de timol e carvacrol contra o dano oxidativo ao DNA induzido por H₂O₂ em linfócitos humanos. O uso de timol e carvacrol em concentrações abaixo de 100 µM juntamente com 100 µM de H₂O₂ reduziu significativamente o dano ao DNA. Aparentemente, baixas concentrações de timol e carvacrol são capazes de prevenir o dano oxidativo induzido por H₂O₂. Outro estudo sugere uma ação protetora contra o H₂O₂ no fígado e células testiculares de ratos pré-tratados com carvacrol (SLAMENOVA et al., 2008).

Yanishlieva et al. (1999) também fizeram um estudo sobre o potencial antioxidante dessas substâncias e chegaram à conclusão de que o timol é um agente antioxidante mais eficaz que seu isômero carvacrol devido ao maior impedimento estérico do grupo fenólico no timol em comparação ao carvacrol.

Alguns autores sugerem que o carvacrol apresenta um potencial como droga antitumoral (ZEYTIÑOGLU et al., 2003). Estudos de células neoplásicas malignas de pulmões humanos demonstraram que o carvacrol apresenta propriedades antitumorais (KOPARAL et al., 2005). Outros estudos têm demonstrado que o carvacrol apresenta um forte efeito antimutagênico em linfócitos humanos através da inibição da troca de cromátides irmãs. Além disso, o carvacrol apresentou atividade *antitumorígenica in vitro* e *in vivo* (ZEYTIÑOGLU et al., 1998). O mecanismo da atividade antimutagênico parece ser devido ao seu potencial mutagênico, pelo menos no teste de Ames, visto que muitos agentes anticâncer tem ação mutagênica (BERTRAM, 2001). A atividade antimutagênica pode estar relacionada a sua habilidade de modificar as membranas lipídicas e a permeabilidade dos canais iônicos ou devido à sua natureza antioxidante (IPEK et al., 2005). Um estudo feito por Canbek et al. (2008) sugere que o carvacrol apresenta efeito hepatoprotetor em ratos submetidos a isquemia e reperfusão.

Foi feito um estudo onde aortas isoladas de ratos, pré-contráidas com KCL ou fenilefrina, foram tratadas com timol e carvacrol. Os resultados mostraram que o timol e carvacrol apresentaram um relaxamento independente do endotélio, provavelmente

envolvendo a via de transdução de liberação do cálcio no retículo sarcoplasmático (PEIXOTO-NEVES et al., 2009).

Guimarães e colaboradores (2010) fizeram um estudo que demonstrou uma possível ação antinociceptiva do carvacrol em camundongos tratados intraperitonealmente e uma possível ação antioxidante *in vitro* do carvacrol.

Nosso grupo realizou estudos com o carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg com o intuito de investigar possíveis ações centrais desta substância em modelos animais de depressão e ansiedade. Os resultados demonstraram que este monoterpene apresentou ações ansiolíticas (MELO et al., 2010) e antidepressivas (MELO et al., 2011), possivelmente através da ativação de vias gabaérgicas e dopaminérgicas, respectivamente.

1.2 Ansiedade

Os transtornos da ansiedade estão entre as formas mais comuns de psicopatologia em todo o mundo (HELLIÓN-IBARROLA et al., 2006; ROSEN et al., 2008), com uma prevalência estimada ao longo da vida de 28,8% e uma prevalência estimada em 12 meses de 18,1% na população geral (GARAKANI et al., 2006). A ansiedade não é necessariamente um problema contemporâneo, gerado em resposta ao estilo de vida frenético atual. Esse distúrbio foi descrito por Hipócrates 400 anos antes de Cristo (LEAMAN, 1999).

A ansiedade normal pode ser definida como um difuso e desagradável sentimento de apreensão, muitas vezes acompanhada por sintomas autonômicos, tais como dores de cabeça, palpitações, aperto no peito, agitação e desconforto gástrico leve, que podem ser uma resposta a uma situação ou estímulo ameaçador. Enquanto o medo é específico, a ansiedade é considerada difusa e desfocada. (KEELEY; STORCH, 2009). O Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, IV Revisão (DSM-IV), classifica como transtornos de ansiedade: transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico, agorafobia, fobia social (FS), transtorno obsessivo compulsivo

(TOC), fobias específicas e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (KINRYS; WYGANT, 2005).

Indivíduos que apresentam distúrbios de ansiedade muitas vezes têm dificuldades em manter relacionamentos interpessoais, estando esse transtorno associado a problemas familiares, dificuldade em manter amizades e a problemas conjugais, como separação e divórcio (CASSIDY et al, 2009).

Dos vários subtipos de transtornos de ansiedade, o TAG é o mais comum; seguidos de fobias específicas, agorafobia, FS, TEPT, TOC e transtorno do pânico. Farmacoterapia e psicoterapia combinados são tratamentos efetivos para vários tipos de transtornos de ansiedade (KONNOPKA et al., 2009).

Estes transtornos afetam negativamente o funcionamento das atividades diárias e aumentam o risco de desenvolvimento de outros tipos de desordens, além de apresentar conseqüências relevantes na economia da sociedade (REARDON et al., 2009; KONNOPKA et al., 2009). De acordo com estudos epidemiológicos, os transtornos da ansiedade são distúrbios comuns em crianças e adolescentes, não se restringindo aos adultos (KEELEY; STORCH, 2009). Estudos têm sugerido que as mulheres possuem uma probabilidade duas vezes maior de preencherem os critérios para transtorno do pânico, TAG e TEPT ao longo da vida e aproximadamente uma vez e meia maior de preencherem critérios para TOC e FS ao longo da vida. Mulheres com transtornos de ansiedade relatam maior gravidade dos sintomas e tendem a apresentar com mais freqüência uma ou mais comorbidades psiquiátricas em comparação aos homens. Evidências de vários estudos sugerem que os fatores genéticos e os hormônios sexuais femininos podem desempenhar papéis importantes na expressão dessas diferenças de gênero (KINRYS; WYGANT, 2005).

Os benzodiazepínicos (BDZ) são as drogas mais freqüentemente utilizadas para o tratamento da ansiedade. O uso dessas substâncias está associado a muitos efeitos adversos, incluindo sedação, relaxamento muscular e amnésia anterógrada. Além disso, uma interrupção súbita do uso desses medicamentos pode ocasionar sintomas de abstinência, tais como tremores, insônia e exacerbação da ansiedade (BORGES et al., 2008; RABBANI et al., 2008; DWYER et al., 2009).

Existe uma forte associação entre o GABA_A e a ansiedade, visto que um grande número de agentes ansiolíticos – álcool, barbitúricos, benzodiazepínicos - atuam como agonistas desse receptor (CHRISTMAS et al., 2008). A atividade do receptor GABA_A é mediada por um grande número de ligantes químicos, que atuam em diferentes sítios do receptor (GALOFRÉ et al., 2009). Os benzodiazepínicos se ligam a um sítio alostérico do receptor GABA_A, causando uma mudança conformacional no receptor e aumentando a afinidade entre o GABA e o seu sítio receptor na subunidade β . O resultado é a abertura do canal de cloreto, influxo de íons cloreto e conseqüente hiperpolarização da célula (SONAVANE et al., 2002; FEREN et al., 2006). O aumento da condutância dos íons de cloreto, induzido pela interação dos benzodiazepínicos com o GABA, assume a forma de um aumento na freqüência de eventos de abertura do canal (KATZUNG, 2014).

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), tendo sua ação mediada pelos receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C (SMITH; SIMPSON, 2003).

Os receptores GABA_A (fig. 3) são receptores ionotrópicos (ligados a canais iônicos), formados por múltiplas combinações de subunidades. Estudos moleculares revelaram que o receptor GABA_A é uma estrutura pentamérica com canal de cloreto, formada a partir de uma gama de diferentes classes de subunidades, atualmente 19 subunidades (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ) (ALLEN et al., 2009).

Diferentes subtipos de receptores GABA_A parecem mediar diferentes efeitos farmacológicos, com o subtipo α_1 associado a sedação, amnésia e propriedades anticonvulsivantes, enquanto as subunidades α_2 estão envolvidas com as ações ansiolíticas e miorrelaxantes. Este efeito tem levado à sugestão de que benzodiazepínicos seletivos podem produzir efeitos hipnóticos mais específicos que benzodiazepínicos não-seletivos (FEREN et al., 2006; KATZUNG, 2014).

O receptor metabotrópico GABA_B apresenta sete domínios transmembrana acoplados à proteína G do receptor (GPCR) com homologia ao receptor metabotrópico de glutamato e tem um alto peso molecular (YAMADA et al., 1999). O receptor GABA_B existe como uma combinação de duas subunidades, heterodímero GABA_{BR1} e GABA_{BR2} (ALLEN et al., 2009). Exerce efeitos de inibição pré e pós-sináptica através

da inibição dos canais de cálcio operados por voltagem e abertura dos canais de potássio. Este processo está relacionado com a inibição do AMPc (RANG et al., 2007). O baclofeno é um agonista dos receptores GABA_B utilizado no tratamento da espasticidade. Os antagonistas GABA_B ainda não têm aplicação clínica (RANG et al., 2012).

O receptor GABA_C é um receptor ionotrópico com canal de cloreto. Trata-se de um receptor homoligomérico, composto de múltiplas unidades ρ , ou seja, não se encontram as subunidades mais comuns dos receptores GABA: δ , γ e ϵ . Tem distribuição menos ampla que os subtipos A e B, sendo encontrado na retina, medula espinhal, colículo superior e hipófise (BRUNTON, 2006).

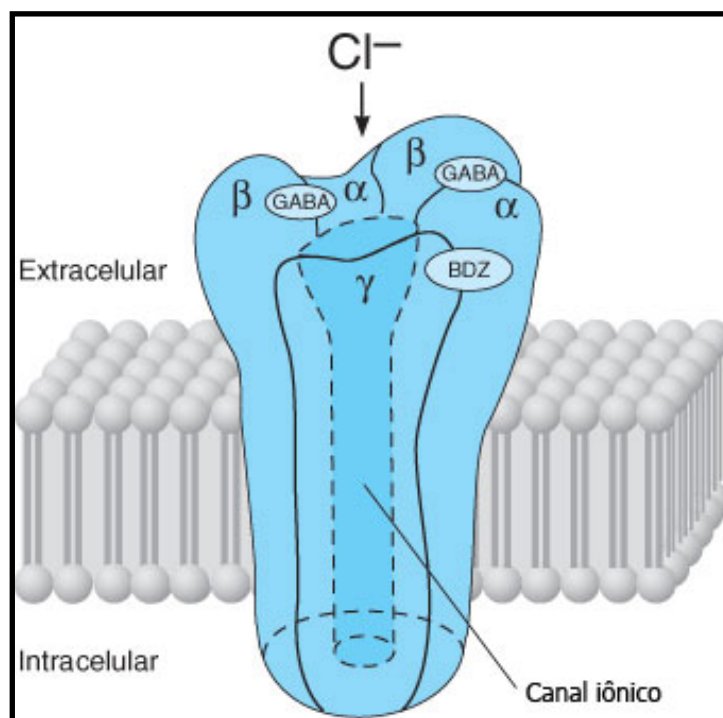


Figura 3 Receptor GABA_A
Fonte: Katzung (2014)

1.3 Depressão

A depressão é uma doença de curso episódico ou crônico, debilitante e que apresenta uma alta incidência, sendo uma grande preocupação na saúde pública.

(HELLIÓN-IBARROLA et al., 2006; GALDINO, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão atualmente representa a segunda causa de incapacidade nos países desenvolvidos. Nos últimos anos, muito esforço tem sido dedicado visando melhorar o diagnóstico e tratamento dessa doença (ANSSEAU et al., 2009).

Estima-se que em 2020 a depressão será a segunda maior causa de incapacidade no mundo (MARTIN et al., 2007; CONKLIN et al., 2009). Os indivíduos deprimidos apresentam anedonia (dificuldade em experimentar experiências prazerosas), irritabilidade, dificuldade de concentração, anormalidades do sono e do apetite. Além da mortalidade associada ao suicídio, pacientes depressivos são mais susceptíveis a desenvolver doenças coronárias e diabetes do tipo 2 (KRISHNAN; NESTLER, 2008). É freqüentemente associada com a ansiedade em um contexto clínico. A ansiedade pode predispor ou aumentar a vulnerabilidade dos indivíduos à depressão ou pode apresentar-se como uma comorbidade (BASSO et al., 2009; DEMPSEY et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que a depressão e ansiedade são mais prevalentes entre as mulheres. Pessoas com baixa escolaridade e economicamente desfavorecidas também possuem maior risco de apresentar depressão (ANDRADE et al., 2006; MARTIN et al., 2007). A idade de início dos transtornos depressivos situa-se entre 20 e 40 anos, embora seja possível a ocorrência de depressão na infância (LIMA, 1999).

Depressão pós-parto é uma complicação comum da gravidez, afetando entre 10% e 15% das mulheres durante o período pós-natal. Têm sido relatadas taxas de depressão pós-parto de 28% a 48% em mães adolescentes e taxas de até 38% em mulheres que vivem em condições de pobreza. Em mães com bebês na UTI neonatal, a taxa de depressão pós-parto varia de 28% para 70% (MOUNTS et al., 2009).

A depressão também é uma queixa comum entre os idosos. Muitas vezes, apresenta-se como o resultado final de uma combinação de fatores, incluindo debilitação da saúde, doença crônica, preocupações financeiras, mudanças ambientais, restrições de mobilidade, perda da vida social e comprometimento cognitivo (CHEN et al., 2009; GUMARÃES; CALDAS, 2006). Um estudo realizado na cidade de Pelotas

(RS), com 583 idosos mostrou que 43% apresentavam tristeza e sintomas depressivos (GAZALLE et al., 2004).

A principal teoria bioquímica da depressão é a “hipótese das monoaminas”, que postula que a depressão é provocada por uma diminuição funcional de monoaminas no cérebro. Esta hipótese foi originada a partir de observações clínicas, onde foi observado que a imipramina e a iproniazida, dois compostos não relacionados estruturalmente e que não tinham uso psiquiátrico, tinham potentes efeitos antidepressivos em humanos. Posteriormente, descobriu-se que essas substâncias aumentavam a transmissão central de serotonina, dopamina e noradrenalina. Outra evidência clínica foi o uso da reserpina, um antigo agente antihipertensivo que atua depletando os estoques de monoaminas e produz sintomas depressivos em humanos (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

As monoaminas incluem as catecolaminas (dopamina e noradrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) (KATZUNG, 2014).

O precursor metabólico da dopamina e da noradrenalina é a L-tirosina, um aminoácido aromático. A tirosina-hidroxilase é uma enzima citosólica que catalisa a conversão da L-tirosina em diidroxifenilalanina (dopa). A etapa seguinte consiste na conversão da dopa em dopamina, reação catalisada por uma enzima também citosólica, a L-dopa descarboxilase. Nas vesículas sinápticas das terminações nervosas adrenérgicas, ocorre a conversão de dopamina em noradrenalina, através de uma reação catalisada pela enzima dopamina- β -hidroxilase (RANG et al., 2012).

São conhecidas cinco vias dopaminérgicas importantes no cérebro (fig 4). A primeira via é a mesolímbico-mesocortical, e é a mais estreitamente relacionada ao comportamento. A segunda é a via nigroestriatal, que está envolvida na coordenação dos movimentos voluntários. A terceira é o sistema tuberoinfundibular, que está relacionada com a inibição fisiológica da secreção de prolactina. O quarto sistema dopaminérgico é a via medular-periventricular e o quinto é a via-incerto-hipotalâmica (KATZUNG, 2014).

Foram identificados cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅. Esses receptores são distribuídos em duas famílias distintas, os grupos dos receptores semelhantes a D₁ e semelhantes a D₂ (KATZUNG, 2014). O receptor D₁ ativa a adenilato ciclase e localiza-se principalmente no putame, no núcleo *accumbens* e no núcleo olfatório. O segundo membro dessa família é o receptor D₅, que também atua ativando a adenilato ciclase e é encontrado no hipocampo e hipotálamo. O receptor D₂ atua inibindo os canais de cálcio e abrindo os canais de potássio, sendo encontrado tanto pré quanto pós-sinápticamente em neurônios no caudado putame, núcleo *accumbens* e tubérculo olfatório. Um segundo membro dessa família é o receptor D₃, que atua inibindo a adenilato ciclase e localiza-se no córtex frontal, medula oblonga e mesencéfalo. O terceiro membro dessa família é o receptor D₄, que também atua inibindo a adenilato ciclase. Todos os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos (BRUNTON, 2006; KATZUNG, 2014).

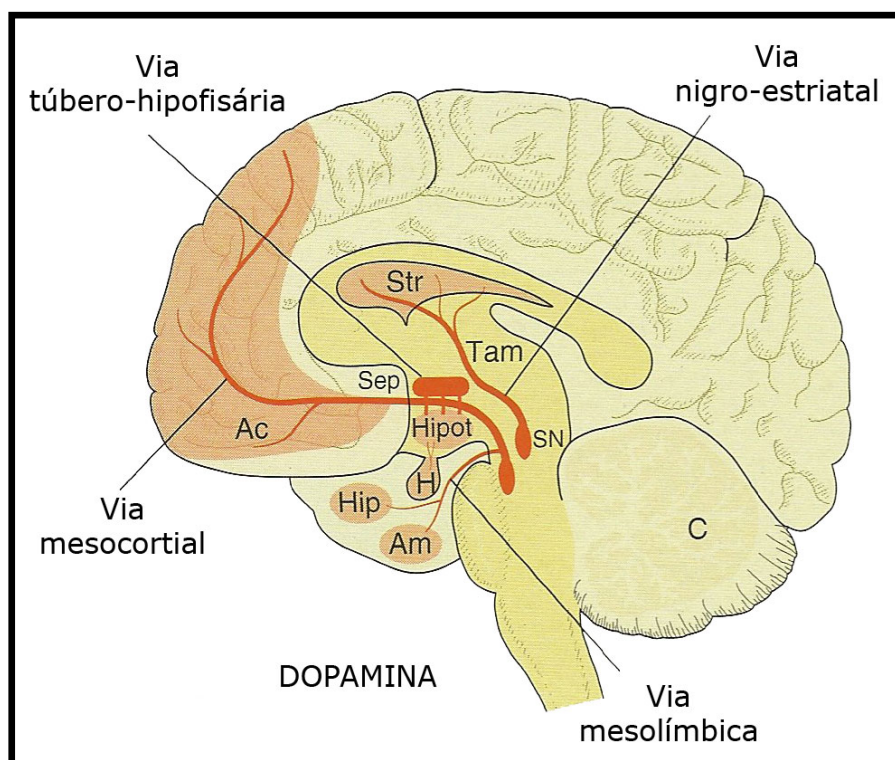


Figura 4 Vias dopaminérgicas no encéfalo

Fonte: Rang et al. (2012)

Nota: A localização dos principais grupos de corpos celulares e tratos de fibras é mostrado em laranja. Am, núcleo amigdalóide; C, cerebelo; Hip, hipocampo; H, hipófise; Hipot, hipotálamo; Tam, tálamo; SN, substância negra; Ac, núcleo *accumbens*; Sep, septo; Str, corpo estriado

Os neurônios noradrenérgicos localizam-se, em sua maioria, no *locus ceruleus* ou na área tegmentar lateral da formação reticular (fig. 5). Existem descritos cinco subtipos de receptores noradrenérgicos: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 (Quadro 1). Todos os subtipos de receptores noradrenérgicos são metabotrópicos. Os receptores α_1 atuam ativando a fosfolipase C, com conseqüente produção de trifosfato de inositol e diacilglicerol como segundos mensageiros, enquanto os receptores α_2 inibem a adenilato ciclase e diminuem a produção de AMPc. Todos os tipos de receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilato ciclase e a produção de AMPc (RANG et al., 2012; KATZUNG, 2014).

Quadro 1 Distribuição dos subtipos de receptores adrenérgicos

Receptor	Tecido	Ações
α_1	Músculo liso vascular; Músculo dilatador pupilar; Músculo liso pilomotor; Próstata; Coração	Contração; Contração; Ereção dos pêlos; Contração Efeito inotrópico +
α_2	SNC; Plaquetas; Terminações nervosas; Músculo liso vascular; Células adiposas	Múltiplas; Agregação; Inibe liberação de transmissores Contração; Inibição da lipólise
β_1	Coração	Efeitos inotrópicos e cronotrópicos +
β_2	Músculo liso respiratórios, uterino e vascular; Músculo esquelético; Fígado	Relaxamento; Captação de potássio; Ativa a glicogenólise
β_3	Células adiposas	Ativa a lipólise

Fonte: Katzung (2014)

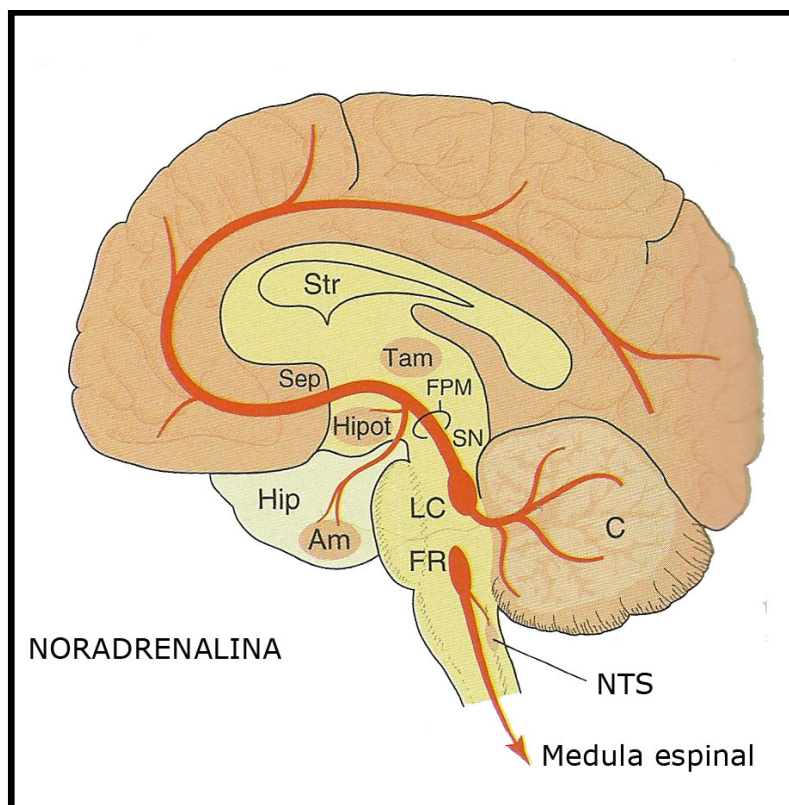


Figura 5 Vias da noradrenalina no encéfalo. Fr, formação reticular do tronco encefálico; FPM, feixe prosencefálico medial; NTS, núcleo do trato solitário (núcleo sensitivo do vago)

Fonte: Rang et al. (2012)

Nota: Outras abreviaturas, iguais às da Fig. 2

A 5-HT é sintetizada por uma via em duas etapas, a partir do aminoácido essencial, o triptofano. A triptofano-hidroxilase, constitui a enzima que limita a velocidade na via de síntese. Essa enzima converte o triptofano em L-5-hidroxitriptofano. A enzima que converte o L-5-hidroxitriptofano em 5-HT é a L-aminoácido aromático descarboxilase, enzima idêntica à L-dopa descarboxilase (BRUNTON, 2006).

As vias da 5-HT originam-se em sua maioria de neurônios na rafe ou nas regiões na linha mediana da ponte e parte superior do tronco encefálico (fig. 6). Existem 14 subtipos diferentes de receptores 5-HT nos mamíferos (Quadro 2). Com exceção do receptor 5-HT₃, todos esses receptores são metabotrópicos (BRUNTON, 2006; RANG et al., 2007).

Quadro 2 Principais subtipos de receptores 5-HT

Receptor	Localização	Principais efeitos	Segundo mensageiro
1 ^a	SNC	Inibição neuronal	↓AMPC
1B	SNC; músculo liso vascular	Inibição pré-sináptica	↓AMPC
1D	SNC; vasos sanguíneos	Vasoconstrição cerebral	↓AMPC
2A	SNC; SNP; músculo liso; plaquetas	Excitação neuronal	↑IP ₃ /DAG
2B	Fundo gástrico	Contração	↑IP ₃ /DAG
2C	SNC; plexo coróide	Secreção de LCR	↑IP ₃ /DAG
3	SNC; SNP	Excitação neuronal	Nenhum
4	SNC; SNP	Excitação neuronal	↑AMPC
5	SNC	Desconhecidos	Desconhecido
6	SNC	Desconhecidos	Desconhecido
7	SNC; trato GI; vasos sanguíneos	Desconhecidos	↑AMPC

Fonte: Rang et al. (2012)

Os transtornos depressivos são geralmente tratados com compostos que inibem a recaptação das monoaminas ou que inibem o seu metabolismo. O processo de recaptação das monoaminas é de suma importância para a finalização da ação do neurotransmissor na fenda sináptica, sendo mediado por um carreador e dependente de energia (AMARA; KUHAR, 1993).

O uso de antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase são associados com muitos efeitos adversos e tem segurança limitada na overdose. Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina são mais seguros em caso de superdosagem, mas estão associados com disfunção sexual e náuseas (ANDREASEN et al., 2009).

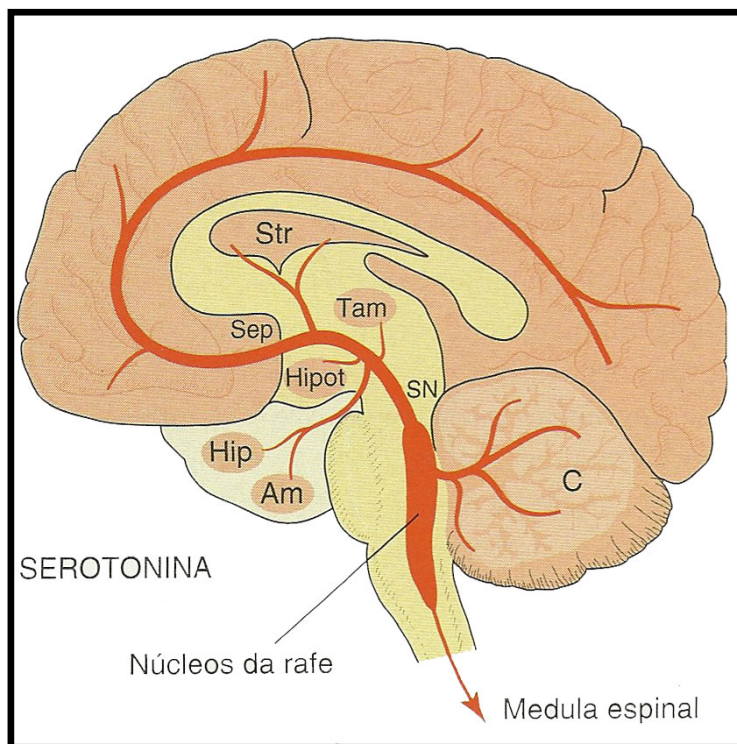


Figura 6 Vias da 5-hidroxitriptamina no encéfalo.

Fonte: Rang et al. (2012)

Nota: Abreviaturas iguais às da Fig. 2

Inibidores seletivos da recaptação de monoaminas e inibidores da monoamina oxidase aumentam a transmissão monoaminérgica de maneira imediata, embora seus efeitos antidepressivos demorem semanas para se desenvolver (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Isso ocorre devido a mudanças neuroplásticas secundárias produzidas em decorrência da recaptação das monoaminas. Uma dessas mudanças é a supra-regulação (aumento) no córtex cerebral do receptor 5-HT_{1B} durante o tratamento crônico com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Além disso, o aumento inicial observado nos neurotransmissores com o uso de alguns antidepressivos parece produzir uma infra-regulação (redução) na atividade de alguns receptores. Um aumento da transmissão serotoninérgica pode constituir um efeito a longo prazo comum dos antidepressivos (KATZUNG, 2008).

A resposta ao uso de antidepressivos é variável, podendo ser mais rápida ou mais demorada, dependendo do paciente. Essa resposta pode persistir ou diminuir e é necessário, muitas vezes, ajustes na dose ou uma mudança para outro medicamento (MULDER et al., 2009).

Os pacientes em uso de antidepressivos podem não tolerar ou não estar dispostos a aceitar os efeitos adversos associados com as doses ideais dos seus medicamentos. Os pacientes também podem subestimar a gravidade da depressão e não buscar tratamento adequado (ANSSEAU et al., 2009).

Um estudo acompanhou 175 pacientes diagnosticados com depressão e tratados com antidepressivos durante 18 meses e os resultados mostraram que, enquanto 84% desses pacientes pareceram recuperados (com pelo menos 8 semanas sem apresentar depressão), em algum momento durante os 18 meses houve uma recaída e apenas 37% dos pacientes se recuperaram e permaneceram bem (MULDER et al., 2009). Estes resultados foram consistentes com outros estudos (RAMANA et al., 1995; HOENCAMP et al., 2001; RUSH et al., 2006), o que demonstra que mesmo com o uso dos antidepressivos atuais, as taxas de recaídas ainda são altas. Alguns autores alegam que os antidepressivos convencionais fornecem uma remissão completa de apenas 50% dos pacientes deprimidos (MACHADO et al., 2009).

1.4 Dor e inflamação

A Associação Internacional Para o estudo da Dor (The International Association for the Study of Pain) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial” (MANJIANI et al, 2014). A dor pode influenciar significativamente o estado de saúde de um indivíduo e pode ter sérias consequências negativas, incluindo morbidade e mortalidade. A dor crônica e persistente de alta intensidade pode levar a uma má nutrição, diminuição do apetite, padrões anormais de sono, fadiga e comprometimento das atividades cotidianas.

A definição de dor acima citada exige um sujeito consciente capaz de experimentar a dor. Os mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos ligados aos processos dolorosos, sua amplificação e depressão são chamados nociceptivo, pró-nociceptivo e

antinociceptivo, respectivamente. A dor é um dos possíveis pontos finais da nocicepção, que pode apresentar outros eventos relacionados que não sejam a dor, como os reflexos de retirada e a vocalização (SANDKÜHLE, 2009).

A excitação de alto limiar de fibras nervosas aferentes primárias que são fracamente mielinizadas (fibras A δ) ou amielínicas (fibras C) provocam dor nociceptiva. Nem todas as fibras C e A δ são nociceptivas, algumas respondem a estímulos naturais de baixa intensidade. Já as fibras A β (bastante mielinizadas) são de baixo limiar, portanto, não costumam provocar nocicepção e dor (SANDKÜHLE, 2009).

Um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo animal a uma invasão de microorganismos patogênicos é o processo inflamatório. São conhecidos quatro sinais cardinais que caracterizam a inflamação aguda: rubor, calor, dor e edema. As reações de calor e rubor são provocadas por um aumento no fluxo de sangue local, como resultado da vasodilatação. O edema é provocado por um aumento da permeabilidade vascular devido à atividade dos leucócitos no endotélio vascular. Estes processos são desencadeados por injúria tecidual e invasão de substâncias exógenas. Medicamentos como a aspirina são usados como drogas de primeira escolha para o tratamento da inflamação aguda devido a sua alta capacidade de suprimir os sintomas inflamatórios clássicos. Uma vez que estas drogas exercem sua ação através da inibição das COXs e assim, inibem a biossíntese de PGs, acredita-se que PGs sintetizadas endogenamente estão envolvidas nas reações inflamatórias. De fato, as PGs estão relacionadas com a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, levando ao rubor e calor. Acredita-se que a histamina e a bradicinina são liberadas posteriormente, levando a formação de edema (KAWAHARA et al, 2014).

Prostanóides são um grupo de eicosanóides que consistem em quatro tipos de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs): PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ e TXA₂. Prostanóides são produzidos pelas ações sequenciais da COX e a respectiva síntese de ácido araquidônico (AA), que é liberado pela fosfolipase A₂ por membranas fosfolipídicas. A COX apresenta dois sítios de ação: o sítio cicloxigenase, onde o AA é convertido em PGG₂ e o sítio peroxidase, responsável pela redução de PGG₂ a PGH₂. São conhecidas duas enzimas COX: COX-1 e COX-2. As prostaglandinas são

moléculas com uma estrutura básica de ácido prostanóico, que consiste em um anel ciclopentano e duas cadeias de carbono, e são classificados de A a J, de acordo com a estrutura de seu anel de ciclopentano. Já os tromboxanos apresentam uma estrutura básica de ácido trombanóico, que consiste em dois oxigênios em anel (BARKIN et al, 2010).

A aspirina e outras drogas antiinflamatórias não esteroides (AINES) inibem a atividade da cicloxigenase (COX) ligando-se ao seu sítio ativo e inibindo a biossíntese de prostanóides, resultando em efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. Quando adicionado exogenamente, a PGE₂ provoca pirexia, dor e inflamação. Portanto, é provável que a ação dos AINES seja baseada principalmente na inibição da síntese PGE₂.

Atualmente, existem mais de 20 diferentes AINES, que pertencem a uma das classes: inibidores não seletivos das COXs ou inibidores seletivos da COX-2. Ambos os inibidores seletivos e os não seletivos apresentam efeitos antiinflamatórios, já que os dois inibem a COX-2. Entretanto, os efeitos adversos associados com cada subclasse variam. Especificamente, os inibidores da COX-1 (AINES não seletivos) aumentam o risco de sangramento gastrointestinal, diminuem a taxa de filtração glomerular e possuem efeitos antiplaquetários. Os inibidores da COX-2 (AINES seletivos) levam a um aumento no risco de edema, aumento no risco de falência cardíaca, hipertensão e eventos trombóticos, tais como infarto do miocárdio. Os AINES seletivos foram introduzidos para mitigar os efeitos gastrintestinais, já que eles não inibem a COX-1. Entretanto, AINES seletivos aumentam o risco de eventos cardiovasculares (FOWLER et al, 2014).

Os analgésicos opióides são drogas largamente usadas para o tratamento da dor moderada, severa e persistente e têm sido utilizados principalmente para o tratamento da dor associada ao câncer (ERSEK et al, 2004). Os agonistas opióides produzem analgesia ao se ligarem a respectivos receptores acoplados a proteína G localizados em regiões do cérebro e medula espinhal envolvidos na transmissão e modulação da dor. Alguns efeitos podem ser mediados por receptores opióides localizados em nervos periféricos sensoriais (BRUNTON et al, 2012).

Existem três tipos de receptores opióides clássicos: μ (mu), δ (delta) e κ (kappa). O receptor de N/OFQ é um receptor de descoberta mais recente (BRUNTON et al, 2012). A droga mais utilizada é a morfina, que atua no principal receptor opióide, o receptor μ .

Quadro 3 Subtipos de receptores opióides e suas funções (Katzung, 2014)

Receptor	Função
μ	Analgesia supra-espinhal e espinhal, sedação, inibição respiratória, diminuição do trânsito intestinal, modulação da liberação de hormônios e neurotransmissores
δ	Analgesia supra-espinhal e espinhal, modulação da liberação de hormônios e neurotransmissores
κ	Analgesia supra-espinhal e espinhal, efeitos psicomiméticos, diminuição do trânsito intestinal

Seus efeitos adversos mais comuns incluem tonturas, náuseas, boca seca, suores, constipação, sedação, depressão do sistema nervoso central (LEE et al, 1993). O uso dessa classe de medicamentos muitas vezes leva a dependência e tolerância, sendo uma condição que requer tratamento e cuidados a longo prazo (World Wealth Organization, WHO).

Dor, incluindo a dor neuropática, é uma queixa comum em diversas situações clínicas. Vários antidepressivos tem mostrado eficácia no tratamento da dor neuropática, incluindo os antidepressivos tricíclicos, venlafaxina, bupropiona e duloxetina. A dor neuropática é consequência direta de lesão ou doença afetando o sistema somatossensitivo periférico ou central (ex: neuropatia diabética periférica, dor pós-derrame, dor do membro fantasma, neuralgia pós-herpética, compressão de nervos provocados por hérnia de disco, em indivíduos com doença de Parkinson ou esclerose múltipla, entre outros) (SANSONE et al, 2008). O envolvimento do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da dor formou a base para o uso de antidepressivos

tricíclicos para o tratamento da dor neuropática (HACHE et al, 2014). Evidências tem sugerido que a dopamina (DA) está envolvida na regulação da dor e, mais particularmente, na analgesia (WOOD, 2008). O aumento da transmissão dopaminérgica induzida pela L-DOPA ou bupropiona produzem analgesia em diversos modelos de dor neuropática (PEDERSEN et al., 2005; COBACHO et al., 2010). A dopamina também está envolvida na regulação da atividade locomotora, cognição, recompense e emoção (MISSALE et al., 1998), que pode ter alguma correlação com a modulação da dor.

A falta de inibição, particularmente aquela mediada pelo ácido gama aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, é responsável por muitos estados de dor. Até recentemente, as drogas com ação gabaérgica eram prescritas principalmente para aliviar espasmos musculares, ansiedade e epilepsia, raramente para o tratamento da dor. Compostos analgésicos estão sendo desenvolvidos visando o transporte de GABA, assim como enzimas e receptores gabaérgicos. Alguns análogos do GABA agem inibindo os canais iônicos, uma propriedade que contribui para seus efeitos analgésicos (JASMIN et al, 2004). O uso de drogas gabaérgicas para o tratamento da dor é limitado principalmente por efeitos adversos indesejados, como sedação e amnésia.

1.5 A depressão e o processo inflamatório

Existem evidências que apontam a depressão como uma desordem inflamatória. Maes e colaboradores (1991) relatam que a depressão maior é caracterizada por uma resposta inflamatória, apresentando ativação de monócitos e aumento da produção de interleucinas-1 β (IL-1 β), interleucinas-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF α) e ativação do sistema immune, com ativação de células t-helper. A ativação da resposta inflamatória na depressão parece estar relacionado a uma hiperatividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, sugerindo que essa hiperatividade é induzida por citocinas pró-inflamatórias (MAES et al, 1994). Dowlati e colaboradores (2010) publicaram um estudo que mostra um aumento das citocinas IL-6 e TNF α na depressão.

O TNF α é uma citocina inflamatória com atividades pleiotrópicas em células endoteliais e imunes. O nível de TNF α em plasma de pacientes com depressão maior se mostrou ainda mais elevado que em pacientes com esclerose múltipla (MIKOVA et al, 2001). Kim e colaboradores (2007) relataram um aumento nos níveis de IL-12 em pacientes depressivos. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos, células dendríticas, fagócitos, células B (TRINCHIERI, 2003). A neoptertina, um marcador da atividade inflamatória, também apresentou níveis aumentados em pacientes depressivos em comparação a pessoas saudáveis (DUNBAR et al, 1992).

Existem evidências de que fármacos antidepressivos exercem efeitos específicos nas respostas inflamatórias e no sistema imune. Estudos mostraram que o tratamento com antidepressivos parece normalizar o aumento inicial de IL-6 em pacientes depressivos (KUBERA et al, 2000). Seidel e colaboradores (1995) relataram que um tratamento de 6 semanas com antidepressivos foi capaz de diminuir o aumento inicial das concentrações plasmáticas de proteína C reativa, haptoglobulina e alfa-2-macroglobulina. Segundo Kim e colaboradores (2007), um tratamento de 6 semanas com antidepressivos diminuiu significativamente o aumento nos níveis de IL-12. Essas evidências apontam a depressão como uma desordem inflamatória e demonstra que os antidepressivos também exibem efeitos antiinflamatórios.

1.6 Estresse oxidativo e depressão

Estudos recentes tem apontado o estresse como um fator importante na causa da depressão, relacionando o estresse crônico a uma desregulação do eixo adrenal-pituitário-hipotalâmico e à toxicidade em consequência da liberação excessiva de glicocorticóides (RÉUS et al, 2014).

Devido ao elevado nível de metabolismo oxidativo, o cérebro é bastante vulnerável ao estresse oxidativo e a produtos moleculares quimicamente reativos contendo oxigênio, tais como os íons oxigênio, os peróxidos e peroxinitritos, superóxidos e óxido nítrico (NO) que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Tanto ERO como ERN são

mediadores intracelulares que vão aumentando com o passar da idade, contribuindo para danos celulares e reagindo com vários alvos biológicos, como proteínas, lipídios, RNA e DNA. O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, através da geração de espécies reativas em excesso ou da diminuição da capacidade do corpo em produzir compostos antioxidantes (MELLO et al, 2014). O efeito do estresse oxidativo no DNA pode causar o encurtamento dos telômeros (SZE BENI et al, 2014).

Evidências indicam que a depressão maior está relacionada ao envelhecimento celular. Numerosos estudos reportaram um encurtamento dos telômeros em células mononucleares do sangue em pacientes com depressão maior. Telômeros são proteínas nucleares complexas que contém DNA rico em guanina localizadas nas extremidades dos cromossomos. Os telômeros não codificam nenhuma proteína, mas são essenciais para a estabilidade e proteção do cromossomo contra degradação ou recombinação. Quando o DNA telomérico atinge um encurtamento crítico devido às mitoses contínuas, a célula torna-se suscetível a sofrer apoptose. O encurtamento dos telômeros tem sido associado a uma variedade de fatores estressantes, como estresse psicológico, estresse na infância, inflamação, glicocorticóides. Muitos desses fatores estão presentes na depressão.

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo encurtamento dos telômeros na depressão permanecem desconhecidos, embora elevados níveis de estresse oxidativo como resultado da inflamação ou de hormônios estressantes parecem mediar de alguma forma esse processo.

Já se sabe que pessoas que sofrem de depressão unipolar ou bipolar apresentam uma desregulação do sistema de defesa antioxidante. Estudos clínicos e estudos com modelos animais tem demonstrado que a depressão está associada com um aumento de malonaldeído (MDA, um marcador da peroxidação lipídica) e 8-iso-prostaglandina F2 (marcador da peroxidação do ácido araquidônico) (MOYLAN et al, 2014).

Estudos feitos em pacientes depressivos mostraram um aumento no estresse oxidativo e nitrosativo. Esses efeitos resultam em menores níveis de concentrações de

ácidos graxos n-3, uma função reduzida dos sistemas antioxidantes onde foram encontrados menores concentrações no plasma de vitamina E e C, concentrações menores de albumina, concentrações menores de agentes antioxidantes como o zinco e coenzima Q10 (CoQ10) e menores índices de aminoácidos como o triptofano e a tirosina. A desregulação destes sistemas antioxidantes contribui para a fisiopatologia da depressão ao oferecer uma proteção reduzida contra os EROs e ERNs (MOYLAN et al, 2014).

Glutationa (GSH) é outro agente antioxidante que foi examinado em pacientes depressivos. A GSH é sintetizada no fígado por três aminoácidos: glicina, glutamina e cisteína. A GSH tem três funções: é um potente antioxidante que protege as células contra danos causados por radicais livres e recicla as vitaminas C e E, para que elas possam se tornar novamente ativas e serem usadas em processos antioxidantes; a GSH é empregada pelos leucócitos como fonte de energia usada para a linfoproliferação; a GSH é um purificador natural, portanto altas concentrações são encontradas no fígado. Já em 1934 foi documentado uma redução nas concentrações sanguíneas de GSH em desordens psiquiátricas (LOONEY & CHILDS, 1934). Foram encontrados níveis reduzidos de GSH em pacientes que sofrem de depressão (MAES et al, 2000).

A glutathione peroxidase (GpX) é uma enzima antioxidante envolvida na eliminação de radicais livres. A família da GpX compreende diferentes isoformas, duas encontram-se em grandes quantidades no sangue: a GpX1, expressa nas hemácias e a GpX3, encontrada (CHU et al, 1992). As GpXs catalisam a redução do peróxido de hidrogênio utilizando a glutathione, que é utilizada como doadora de elétrons para regenerar a forma reduzida da selenocisteína (CEBALLOS-PICOT et al, 1992).

Superóxido desmutase (SOD) é uma família de enzimas antioxidantes, que tem como co-fatores o cobre e o zinco, que catalisam a dismutação de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. São encontradas três formas em humanos: SOD1, um dímero localizado no citoplasma; SOD2, um tetrâmero presente nas mitocôndrias e SOD3, um tetrâmero extracelular. A SOD 2 é a primeira linha de defesa contra o superóxido produzido durante a fosforilação oxidativa (LI et al, 1995). Ratos deficientes de SOD2 expostos a agentes oxidantes morrem pouco depois do nascimento

(LI et al, 1995) e ratos deficientes de SOD1 tem dano oxidativo persistente e desenvolvem carcinoma hepatocelular (ELCHURI et al, 2005). Estes resultados mostram que a SOD é uma importante enzima antioxidante. Estudos tem revelado níveis de SOD e GpX menores em pacientes depressivos (MOYLAN et al, 2014).

O NO é um importante mediador em muitos processos neurais. Roedores submetidos a estresse crônico ou agudo de imobilização apresentaram níveis aumentados da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Embora a expressão de NO, iNOS e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) esteja aumentada na depressão, estudos recentes tem indicado que a NOS participa em mecanismos associados ao uso de antidepressivos. Isso sugere que o NO pode ter diferentes efeitos em diferentes locais ao longo do curso e do tratamento da depressão. O aumento dos níveis de NO e O_2^- pode levar à formação de peroxinitrito (ONOO $^-$) e subsequente oxidação, nitração ou nitrosilação de proteínas, contribuindo para o dano celular (MOYLAN et al, 2014).

A catalase é uma enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Os seres humanos com baixos níveis de catalase (acatalasemia) têm um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus (GÓTH et al, 2004). Poucos estudos examinaram a atividade da catalase na depressão. Galecki e colaboradores (2009) observou um aumento nos níveis de atividade da catalase durante episódios agudos de depressão em comparação com voluntários saudáveis. Szuster-Ciesielska e colaboradores (2008) também detectaram um aumento na atividade da catalase em pacientes com depressão maior.

Estudos tem associado a disfunção mitocondrial como um fator importante na patogênese de diversas doenças, como a depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia. Pesquisas em modelos animais mostraram uma inibição mitocondrial em cérebro de ratos após estresse crônico (REZIN et al, 2009). Em humanos, um estudo de Kimbrell e colaboradores (2002) mostrou que pacientes depressivos apresentam uma redução no metabolismo de glicose em algumas áreas cerebrais em comparação com pessoas saudáveis. Gardner e colaboradores (2003) demonstrou uma diminuição na produção de ATP mitocondrial em músculos de pacientes com depressão.

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais, predominantemente os produtos derivados de plantas, tem sido a base para o desenvolvimento de diversas substâncias farmacologicamente ativas.

O carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol), um monoterpene encontrado principalmente em óleos essenciais de plantas do gênero *Thymus* e *Lamiaceae*, tem demonstrado possuir diferentes ações farmacológicas.

Estudos prévios realizados por nosso grupo com o objetivo de investigar possíveis ações centrais do carvacrol em modelos animais demonstraram que este monoterpene apresentou ações ansiolíticas (MELO et al., 2010) e antidepressivas (MELO et al., 2011). O carvacrol também apresentou ações analgésicas em camundongos tratados por via intraperitoneal (GUIMARÃES et al., 2010) e apresentou efeitos antioxidantes *in vitro* (GUIMARÃES et al., 2010).

Conhecendo a importância que os antidepressivos tem ganhado ao longo do tempo como agentes alternativos para o tratamento da dor e sabendo que ainda não existem estudos sobre uma possível ação antioxidante central do carvacrol, o presente estudo foi realizado para investigar os efeitos do carvacrol em modelos neuroquímicos e comportamentais a fim de investigar os possíveis efeitos antidepressivos, analgésicos e antioxidantes. Com isso, buscamos nos produtos naturais o surgimento de novas drogas que apresentem menor incidência de reações adversas e facilite a adesão do paciente ao tratamento terapêutico.

Como não existem estudos que avaliem a toxicidade do carvacrol, foi feito uma análise da toxicidade oral aguda do carvacrol a fim de avaliar a viabilidade do carvacrol para um futuro uso clínico.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis mecanismos de ação ansiolítico, antidepressivo e analgésico do carvacrol em camundongos. Para isto, foram utilizados modelos experimentais e neuroquímicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis de monoaminas (dopamina, noradrenalina, serotonina e seus respectivos metabólitos) e as concentrações de aminoácidos GABA, Glutamato, Taurina, Histidina e Glicina em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinar alterações nos sistemas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais em estudo;
- Determinar o índice peroxidação lipídica, glutathiona reduzida (GSH), e a produção de nitrito e nitrato nas áreas cerebrais estudadas;
- Determinar a ação do carvacrol em camundongos nos modelos comportamentais de nocicepção utilizando os testes das contorções induzidas por ácido acético, placa quente e teste da formalina.
- Verificar as participações dos sistemas opióide e nitrérgico no mecanismo de ação antinociceptivo do carvacrol.
- Avaliar a atividade locomotora espontânea e atividade relaxante muscular utilizando os testes do campo aberto e rota rod, respectivamente.

- Avaliar a toxicidade oral aguda conforme o Guia OECD-423/2001.

•

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e reagentes

Quadro 4 Drogas e Reagentes

Drogas/Reagentes	Origem
Água Destilada	Deionizador
Álcool Etílico P.A.	Quimex, Brasil
Carvacrol	Sigma
Pilocarpina	Sigma
Formalina	Sigma
Diazepam	União Química Brasil
Indometacina	Sigma
Morfina	Sigma
Naloxona	Sigma
L-arginina	Sigma
Ácido acético	Sigma
Tween 80	Sigma

Quadro 5 Equipamentos

Equipamentos	Modelo/Origem
Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo aberto	Fabricado pelo laboratório
Rota Rod	Ugo Basile, Itália

Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil
Bomba para HPLC	LC-10AD Shimadzu Corp., Japão
Centrífuga refrigerada (ependorf)	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha
Pipetas automáticas	H.E., Dinamarca
Degaseificador	DGU-2A ShimadzuCorp., Japão
Detector eletroquímico	L-ECD-6^a, Shimadzu Corp., Japão
Equipamento de Millipore para filtração a vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA
Freezer a -70°C	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Ashville, N.C., USA
Integrador C-R6A Chromatopac	Shimadzu Corp., Japão
Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
Sonicador	Modelo PT 10-35, Brinkmann Instruments Inc. NY, USA
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Vidrarias	Pirex, Brasil
Estufa de secagem e esterilização	Modelo 315 SE FANEN, Brasil
Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil

4.2 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos camundongos albinos da espécie *Mus musculus* e da variedade *Swiss*, adultos, do sexo masculino, pesando entre 20-25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno em um biotério com a temperatura de

aproximadamente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 em 12h. Os animais se alimentaram com ração do tipo Purina e receberam água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta universidade, sendo 04/2012 o número do referido protocolo.

4.3 Preparo das Drogas

O carvacrol (CVC) foi emulsificado em Tween 80 a 2% e diluído em água destilada, obtendo a concentração final de 2,5 e 5 e 10 mg/mL, que correspondem as doses de 12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Os grupos controle receberam veículo (água destilada emulsificada a 2% com Tween 80. As demais drogas utilizadas nos experimentos tais como diazepam (2 mg/kg), pilocarpina (400 mg/Kg), formalina (1%), ácido acético (0,6%), indometacina (5 mg/Kg), morfina (7,5 mg/Kg), naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada. O volume total de solução administrada nos animais foi de 10 mL/kg.

4.4 Protocolo Experimental

Os experimentos foram realizados durante o período do dia e os animais foram observados em um ambiente fechado, silencioso e à temperatura constante de aproximadamente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos os testes comportamentais foram realizados com diferentes grupos de animais e em dias distintos. Em todos os testes, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 70% para a remoção de resíduos e odor do animal.

Testes Neuroquímicos

Para os testes neuroquímicos, grupos de animais foram tratados com veículo (2% Tween 80 em água destilada, v.o.) e carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg (v.o) e 1h depois foram sacrificados por deslocamento cervical para dissecação da área cerebral do corpo estriado para detecção dos níveis de aminoácidos e monoaminas no HPLC.

Outros grupos de animais foram tratados com veículo (2% Tween 80 em água destilada, v.o.) e carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg (v.o) e 1h depois receberam uma injeção intraperitoneal de pilocarpina 400 mg/Kg. Após a morte dos animais, o cérebro foi dissecado para retirada das áreas do corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal para análise do efeito do carvacrol sobre o estresse oxidativo

4.4.1 Dissecação das áreas cerebrais

Após o sacrifício por deslocamento cervical, os animais foram decapitados e tiveram as regiões de interesse rapidamente removidas e colocados em eppendorfs para posterior preparo dos homogenatos, para detecção tanto dos níveis de aminoácidos e monoaminas no HPLC quanto para a avaliação do estresse oxidativo.

Para a retirada do córtex pré-frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (MACHADO, 1985).

Após a retirada do córtex pré-frontal, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo, que foi descolado e retirado.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Após o término da dissecação, córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram colocados em eppendorfs devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior. As áreas foram estocadas durante um período de tempo de no máximo 2 meses, e foram considerados como tendo a mesma viabilidade daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24h após a dissecação (BURKE, GREENBAUN, 1987; FIELDER *et al.*, 1987).

4.4.2 Determinação de aminoácidos com HPLC.

Procedimento experimental

Para a determinação dos níveis de aminoácidos, foram retiradas as áreas cerebrais correspondentes ao corpo estriado. Para a preparação dos homogenatos, foi utilizado um volume de 10% da área em ácido perclórico 0,1M.

Método

As determinações dos níveis de aminoácidos foi realizada através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O aparelho consiste em uma pré-coluna de derivatização na presença de ortoftaraldeído (OPA) e foi programado com um detector fluorimétrico (330-450) nm acoplado a um integrador.

A coluna cromatográfica utilizada foi a C18, 250X 4,6mm, 5 μ que percorria a coluna com velocidade de 1,0mL/min. A fase móvel A consistiu em 50mM NaH₂PO₄ em 20% de metanol ajustada para PH de 5,5. A fase móvel B consistiu em 100% de metanol. As fases foram preparadas com água ultra purificada (Mili-Q system) e filtrada com o uso de filtros milipore de 0,22 μ m.

Soluções reagentes

- Ácido perclórico 0,1M

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e completo o volume para 300 mL.

- Padrões

Todos os aminoácidos foram preparados nas concentrações de 2,5 mmol/L ou 2,5mM. Glutamato, aspartato, glicina, taurina e GABA foram solubilizados em ácido perclórico 0,1M.

O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completado o volume para 300 mL com água mili-Q.

Preparo das amostras.

Para o preparo das amostras, foi utilizado homogenatos cerebrais a 10% em ácido perclórico 0,1M. Após o preparo, estes foram centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros milipore 0,22 μm .

Solução de derivatização.

Para o preparo da solução de derivatização, 13,5 mg de OPA foi dissolvido em 250 μl de etanol, juntamente com 10 μl de 2-mercaptoetanol, o volume da solução foi então completado para 2,25 mL com tampão borato, pH 9,3. A solução foi filtrada com o milipore 0,22 μm . A solução foi acondicionada em vidro âmbar no refrigerador por, no máximo, uma semana. Para as derivatizações, 20 μl da amostra foi diluída em 20 μl de OPA e injetada no HPLC após um minuto de agitação.

4.4.3 Determinação de monoaminas e seus metabólitos com HPLC

Procedimento experimental

Para a determinação dos níveis de monoaminas e seus derivados, foram retiradas as áreas cerebrais correspondentes ao corpo estriado. Para a preparação dos homogenatos, foi utilizado um volume de 10% da área em ácido perclórico 0,1M.

Método

Para a determinação das concentrações de catecolaminas, foi utilizado o equipamento HPLC. Uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu, Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD- 6^A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referencia de Ag-AgCl (HALLMAN; JONSSON, 1984).

Preparo das amostras.

Para o preparo das amostras, foi utilizado homogenatos cerebrais a 10% em ácido perclórico 0,1M. Após o preparo, estes foram centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros milipore 0,22 µm.

Soluções reagentes

- Fase móvel

Foram pesados 15,75g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mh (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 471,5mL com água Milli-Q. Em seguida, foi feita a filtração e degaseificação, e posterior adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba reagenti, MI, Itália) e 8,5 mL de tetrahydrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

- Ácido perclórico 0,1M

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e completo o volume para 300 mL.

- Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4ng/20µl de solução de NA, Da, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa *Microsoft Excel* e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

4.5 Estresse oxidativo

4.5.1 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Método

O grau de lipoperoxidação foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir:

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido a 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

Curva-padrão de malonildialdeído (MDA)

A partir da solução padrão de MDA (6 mols), foram preparadas as soluções a 0,627 μmol ; 1,247 μmol ; 2,463 μmol ; 4,8 μmol ; 9,16 μmol e 16,77 μmol . O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 532 nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

Soluções reagentes:

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

-Solução de cloreto de potássio

2,3 g de cloreto de potássio (Reagen, RJ, Brasil) foram diluídos para um volume final de 200 mL de água destilada.

-Tampão fosfato

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Reagen, RJ, Brasil) 50mM em água bidestilada, pH 7,4.

- Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)

TBA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mg em 50 mL de água bidestilada.

4.5.2 Determinação da produção de nitrito.

Método da preparação da curva-padrão

Foram pesados 7 mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10nM), foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do testes (GREEN et al., 1981).

Procedimento Experimental

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μl do sobrenadante foi incubada com 100 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H_3PO_4 1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ H_3PO_4 1%/ diluído em água (1:1:1:1)] a 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 NaNO_2 .

Solução reagente

A seguinte solução reagente foi empregada nessa técnica:

- Solução de NaNO_2 (10 mM)

NaNO_2 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 7 mg em 10 mL de água bidestilada. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

4.5.3 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT)

Método

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O à proporção que a H_2O_2 , utilizado como substrato, é hidrolisado, de acordo com Maehly e Chance (1954) e Chance e Maehly (1955).

A atividade da enzima é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu a sensibilidade. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorvância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína.

Procedimento Experimental

Foi preparado o meio da reação com H_2O_2 (18 mL) mais tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H_2O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 μL do meio de reação mais 20 μL do homogenato a 10%. A leitura é feita durante 6 min, a uma temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230 nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951).

Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8,0

12,11 g de Trisma Base (1M) e 0,19 g de EDTA (5 mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluídos em 100 mL de água Milli-Q. O pH foi acertado com Hcl 1M.

- H_2O_2 para meio de reação

10 μL de peridol 30% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluídos em 10 mL de água Milli-Q (qsp).

4.5.4 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Método

A atividade da SOD foi medida de acordo com Sun et al. (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente

gera O₂⁻ o qual reduz o NBT produzindo Formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença de SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

Procedimento Experimental

Os homogenatos das áreas cerebrais (10% em tampão fosfato) foram centrifugados (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio foi utilizado o sobrenadante.

Numa câmara escura foi misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50 mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8) 30 µL da amostra, 150 µL do NBT 75µM e 300 µL riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro 560nm. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Lowry (1951).

4.5.5 Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

Método

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1988).

Procedimento Experimental

Preparou-se o homogenato a 10% das áreas cerebrais a serem estudadas, em EDTA 0,02 M. Em seguida, foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%.

O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH

8,9 e mais 20 μL de DTNB 0,01 M e após 1 minuto da reação, foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através do espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

Curva-padrão de glutathiona (GSH)

A partir da solução padrão de GSH (1 mg/mL), foi preparado 4 mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado 4mL de tampão tris HCl 0,4M (pH 8,9). Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 minuto da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- Solução de ácido etilenodiaminotetracético

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1 mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2 M. Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

- Tampão Tris-HCl

14,352 gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 30 mL de EDTA 0,2 mM, mais 300 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 0,4 M. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, RJ, Brasil) para pH 8,9.

- Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato

DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 39,6 mg em 10 mL de metanol absoluto.

- Solução de ácido tricloroacético

TCA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mL mais 50 mL de água bidestilada.

- Solução de glutathiona

GSH (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mg em 50 mL de água bidestilada.

4.5.6 Dosagem de proteína

Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados às proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA.

Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- Reagente A

Na_2CO_3 (Reagen, RJ, Brasil) a 2% em NaOH (Reagen, RJ, Brasil) 0,1 N.

- Reagente B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, RJ, Brasil) a 1%.

- Reagente C

Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar).

-Reagente de Folin

Ciocalteau – Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada.

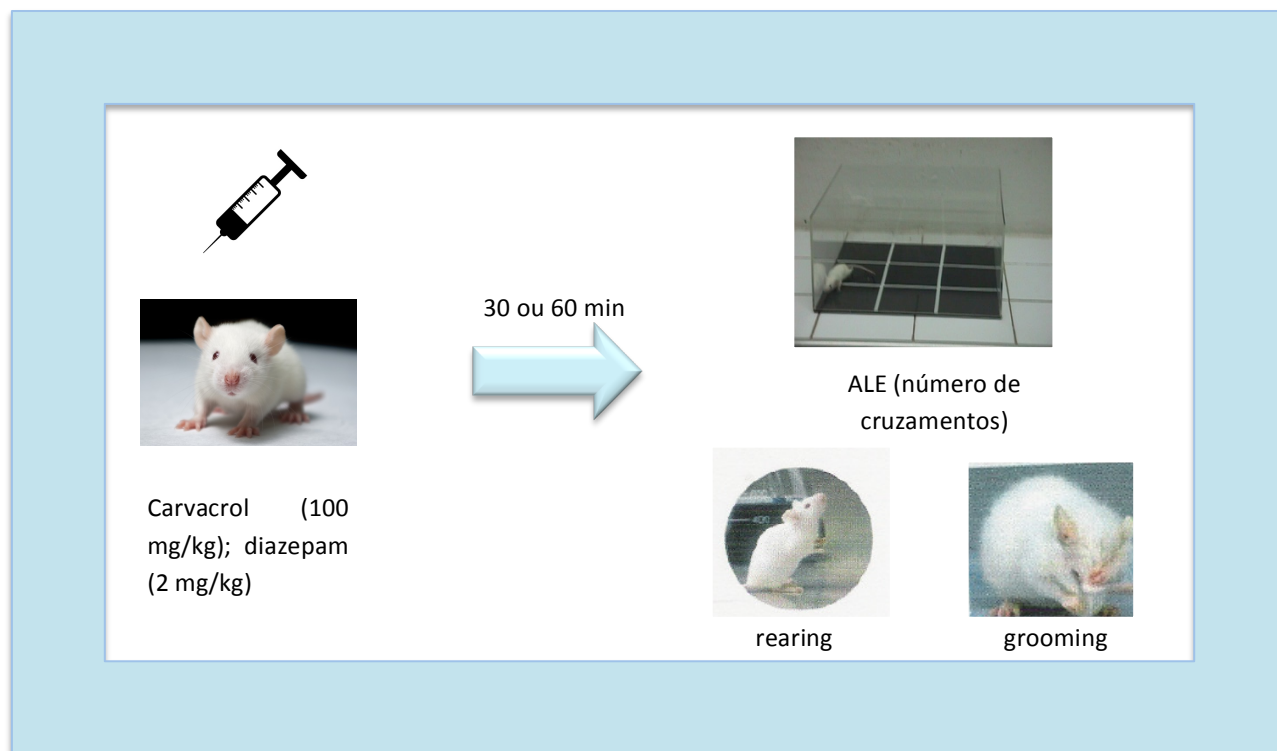
-Solução de albumina sérica bovina

Albumina sérica bovina (Sigma, St Louis, Mo, USA) 1 mg/mL em água bidestilada.

4.5.7 Avaliação da Atividade Locomotora**4.5.7.1 Teste do Campo Aberto**

Este teste é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). O aparato para camundongos é composto de paredes de acrílico transparente e o piso é dividido em nove quadrantes da cor preta e com a mesma dimensão, sendo as dimensões do aparato de 30 x 30 x 15 cm. Sessenta minutos após o tratamento por via oral com carvacrol (100 mg/Kg) e 30 minutos após o tratamento com diazepam (2 mg/kg, i.p. os animais, individualmente, foram colocados no centro do campo aberto. Foram registrados durante o período de 5 minutos o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem se encostar nas paredes.

Quadro 6 Teste do Campo Aberto em camundongos.

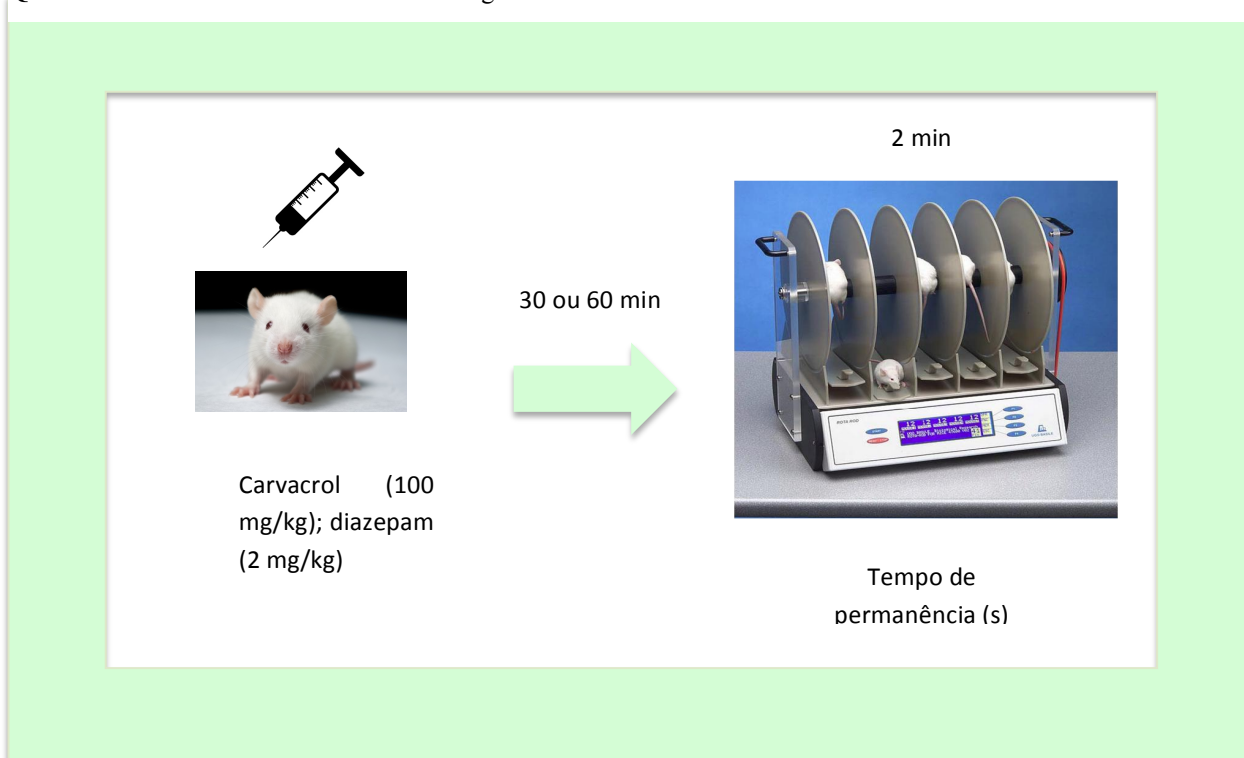


4.5.8 Avaliação da atividade relaxante muscular

4.5.8.1 Teste do *Rota Rod*

O teste do *rota rod* mede o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI & BURGOS, 1979). Sessenta minutos após o tratamento por via oral com carvacrol (100 mg/Kg) e 30 minutos após o tratamento com diazepam (2 mg/kg, i.p.), os camundongos foram colocados sobre as quatro patas em uma barra giratória de 2,5 centímetros de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em três rotações distintas (5, 15 e 40 rpm) e observados por um período de 2 minutos. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s) (DUNHAM; MIYA, 1957).

Quadro 7 Teste do Rota Rod em camundongos.



Avaliação da Atividade Nociceptiva

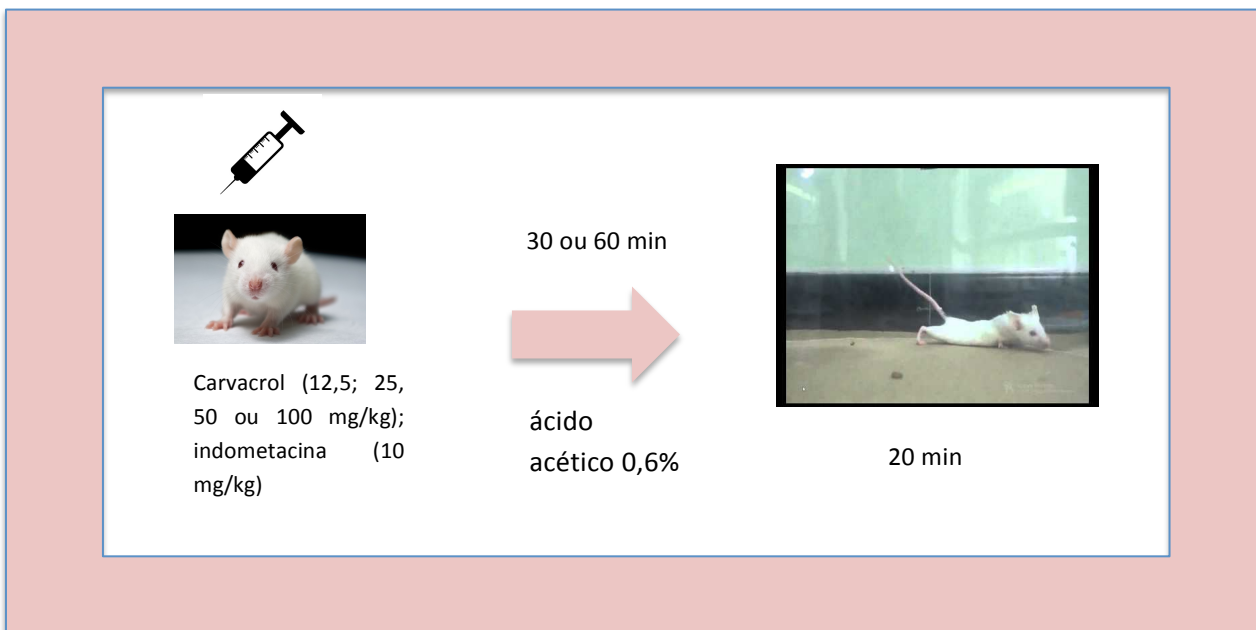
4.5.9 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

O teste baseia-se na quantificação das contorções abdominais induzidas pela aplicação intraperitoneal de ácido acético 0,6% (v/v). O animal exibe um comportamento sugestivo de dor – nociceptivo caracterizado pela contorção do abdômen seguido da extensão das patas traseiras. Os animais foram tratados com carvacrol nas doses de 12,5; 25, 50 ou 100 mg/Kg (v.o) e uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. A indometacina (indo), na dose de 10 mg/Kg (i.p.), um agente antiinflamatório não esteroide foi utilizado como padrão positivo nesse teste. O número de contorções foi o parâmetro utilizado para avaliar o potencial antinociceptivo dos tratamentos neste teste, sendo o número de contorções contado por 20 minutos logo após a aplicação intraperitoneal do ácido (COLLIER et al, 1968; KOSTER

et al, 1959). A aplicação do ácido acético ocorreu sempre 30 minutos após o tratamento intraperitoneal ou 60 minutos após o tratamento via oral.

Para investigar o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) e do sistema opióide no mecanismo de ação antinociceptivo do carvacrol no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, os animais foram tratados com veículo, carvacrol (100 mg/Kg) ou o tratamento associado de carvacrol e L-arginina (L-ARG; 150 mg/Kg) ou naloxona (NAL; 1 mg/Kg). Carvacrol foi administrado 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Quando associado, os animais receberam carvacrol (100 mg/Kg) 30 min após o tratamento com L-ARG (150 mg/Kg) ou NAL (1 mg/Kg). O número de contorções foi contado decorrido 10 min da administração de ácido acético, durante 20 min.

Quadro 8 Teste das contorções induzidas por ácido acético.



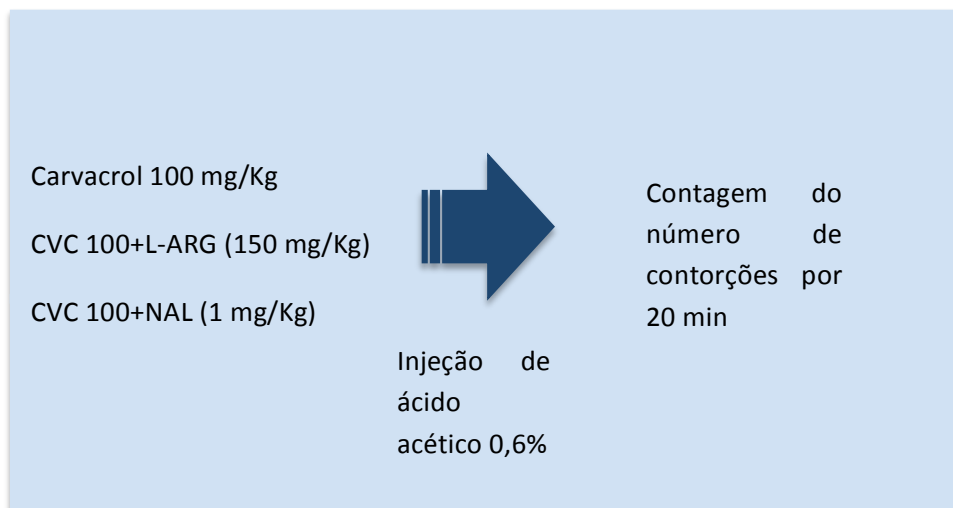
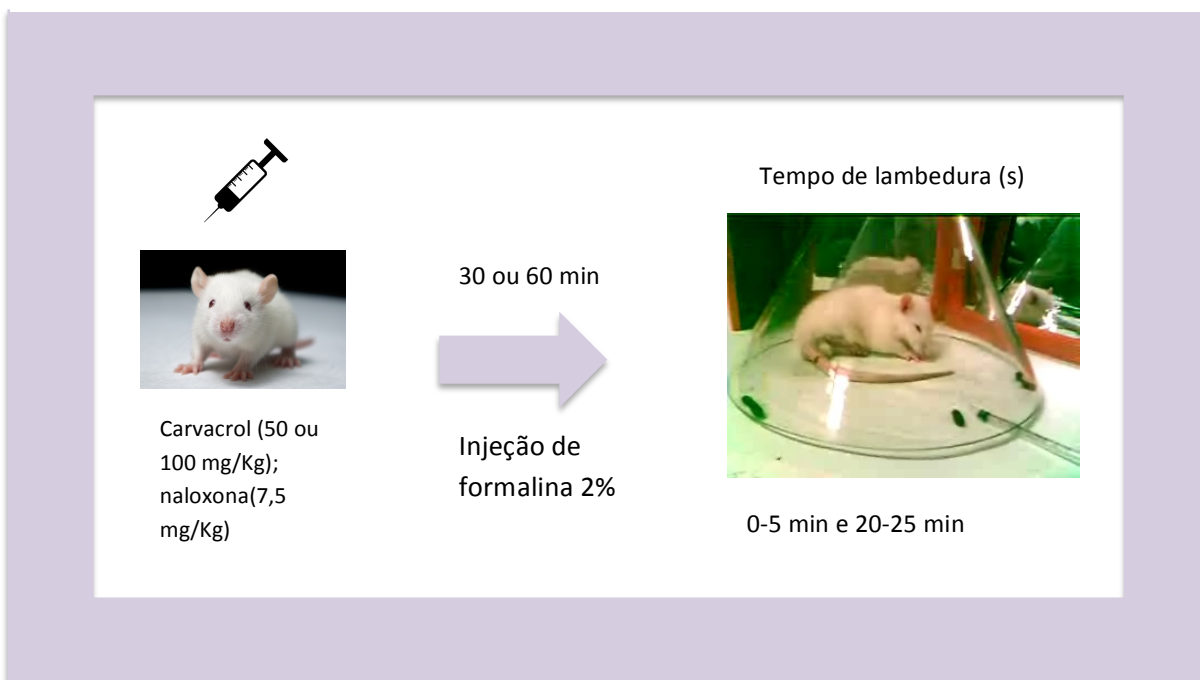


Figura 7 Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas por ácido acético.

4.5.10 Teste da nociceção induzida pela formalina.

A aplicação de solução de formalina a 2% na pata traseira direita de roedores leva a um comportamento sugestivo de dor, lambe e/ou morder a pata, bifásico, onde a primeira fase ocorre do momento da aplicação até o quinto minuto subsequente e a segunda fase ocorre entre o 20^o e 30^o minuto seguintes à aplicação intraplantar de formalina. Os animais foram tratados com carvacrol nas doses de 50 ou 100 mg/Kg por via oral. Um grupo de animais foi tratado com a indometacina 10 mg/Kg (i.p.), que é um conhecido agente antiinflamatório não esteroide, usado neste teste como padrão positivo. Uma hora após os tratamentos por via oral ou trinta minutos após os tratamentos via i.p., os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2% na pata traseira e foram observados por 5 minutos e contados o número de lambeduras da pata traseira. Quinze minutos após a primeira fase do teste, os animais foram observados por mais 5 minutos e o tempo de lambedura da pata foi contado novamente. O tempo de lambedura foi registrado em segundos e a redução desse tempo foi considerado como evidência de atividade antinociceptiva (HUNSKAARS & HOLE, 1985).

Quadro 9 Teste da Formalina em camundongos.



Para investigar o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) e do sistema opióide no mecanismo de ação antinociceptivo do carvacrol no teste da nocicepção induzida por formalina, os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 2% em água destilada, v.o.) 60 min antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Quando associado, os animais receberam carvacrol (100 mg/Kg) 30 min após o tratamento com L-ARG (150 mg/Kg) ou NAL (1 mg/Kg). O tempo de lambertura foi registrado nos intervalos de 0-5 min e 20-25 min após a aplicação de formalina.

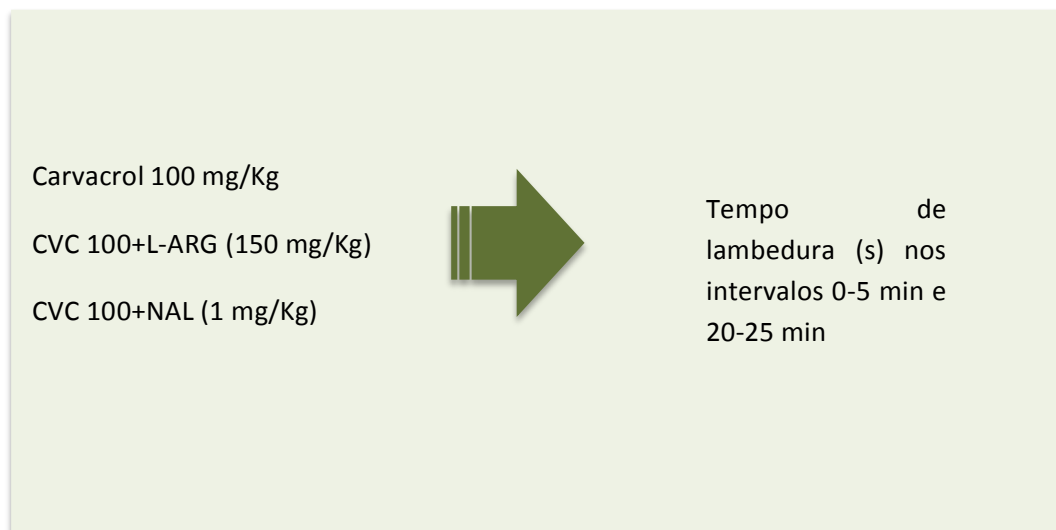
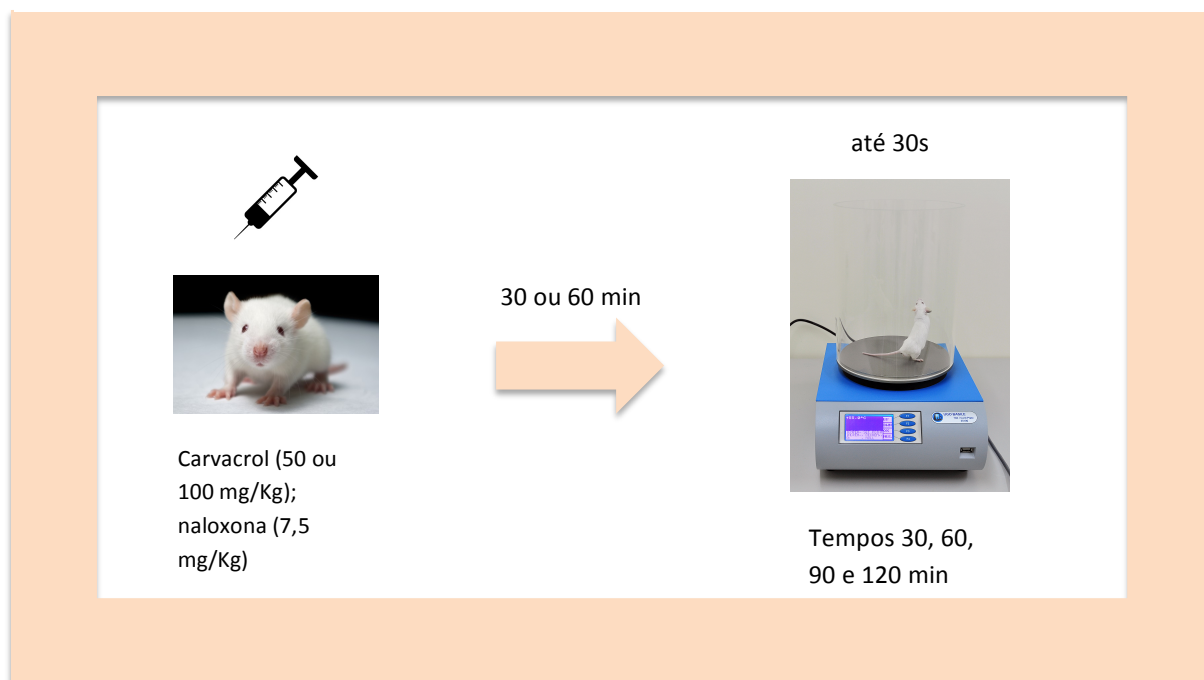


Figura 8 Fluxo de tratamento no teste da formalina em camundongos.

4.5.11 Teste de nociceção térmica na placa quente.

O teste de nociceção térmica na placa quente baseia-se no tempo de latência para a expressão de resposta ao calor, lambe a pata traseira ou pular. Este teste foi descrito por Eddy e Leimbach (1953). Neste ensaio, os animais são expostos ao calor na placa quente $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ antes e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após o tratamento. São admitidos apenas animais com tempo de resposta ao calor de até 30 segundos, portanto, para essa triagem, os animais foram submetidos à placa quente no dia anterior ao ensaio e apenas os animais que exibiram respostas até o tempo limite foram selecionados para o experimento. Os animais foram tratados com carvacrol 50 ou 100 mg/Kg (v.o.) morfina 7,5 mg/Kg (i.p) 60 e 30 minutos, respectivamente, antes de serem submetidos ao teste.

Quadro 10 Teste da Placa Quente em camundongos.**4.6 Avaliação da toxicologia****4.6.1 Procedimento experimental**

A toxicidade oral aguda foi realizada conforme o Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) e o número de animais por dose (três).

O experimento foi realizado com 09 (nove) camundongos machos, com peso entre 25 e 30 mg, sendo 03 do grupo controle e 06 dos grupos teste (que receberam carvacrol). Os animais foram alocados individualmente em caixas de poliuretano, em condições controladas de luminosidade (12h claro/ 12h escuro), temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e receberam água potável e ração comercial *ad libitum*.

Os animais ficaram em jejum por 8 h anteriormente à administração do carvacrol, com acesso livre apenas água. O peso corporal dos animais foi verificado no dia (dia 1) da administração do carvacrol, no sétimo (dia 7) e no décimo quarto dia (dia 14) pós-

administração. A administração do carvacrol (2000 mg/kg) foi realizada em dose única por via oral.

A dose inicial selecionada para o estudo foi de 2000 mg/kg, segundo o guia da OECD 423, na ausência de morbidade ou mortalidade a dose deve ser aumentada para 5000 mg/kg. Após esse período a categoria toxicológica é estimada, segundo as especificações do Guia.

4.6.2 Observação dos sinais de toxicidade

Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto a alterações comportamentais de acordo com “screening” hipocrático. Foram observados: a postura, frêmito vocal, irritabilidade, contorção, posição trem posterior, ataxia, convulsões/tremores, hipnose, anestesia, respiração, cianose, consistência e aspecto das fezes, micção, fechamento da pálpebra, lacrimejamento, piloereção, aspecto da pele e pêlos, salivação, hipotermia. As observações foram realizadas a intervalos variados no dia de administração do carvacrol (1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h) e a partir de então periodicamente até o 14º dia (MALONE, 1977; PUCCI, 2009). A intensidade dos eventos foi pontuada e classificada segundo Malone (1977) em: 0= ausente, 1= raro, 2= pouco, 3= moderado e 4= intenso.

No décimo quarto dia (dia 14), os animais foram sacrificados. Em seguida foi realizada a necropsia para a avaliação geral dos órgãos e foram retirados: cérebro, fígado e rins, para análise histopatológica.

4.8.3 Análise Histológica

Para a análise histológica os órgãos (fígado, cérebro e rim) foram retirados e colocados em solução de formol 10% tamponado por 24 horas. Após esse período, os órgãos foram retirados da solução de formol tamponado, em seguida foram seccionados e colocados em cassetes. Os cassetes foram colocados em recipientes contendo álcool a 70%, para posterior confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, os cassetes com os órgãos já seccionados foram mergulhados em solução de parafina para posterior corte e fixação dos tecidos nas lâminas para microscopia. Em seguida as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina/eosina e posteriormente analisadas por microscopia.

Solução de Formol tamponado 10%

Regentes (Para a preparação de 1 litro de formol tamponado)

Misturar:

- Solução de 35-40% de formaldeído (formalina) 100 ml
- Água destilada 900 ml
- Fosfato monobásico de sódio 4g
- Fosfato dibásico de sódio 6,5g

4.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EUA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software.

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*).

Em todas as análises estatísticas, os valores foram apresentados pela Média±Erro Padrão da Média (EPM) com o número de animais entre parênteses e foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância, assim como os demais símbolos a, b, c, d, e.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudos dos efeitos neuroquímicos do carvacrol

5.1.1 Determinação da concentração das monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos usando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A análise dos resultados obtidos em corpo estriado de camundongos mostram que o carvacrol (25 e 50 mg/kg) aumentou significativamente os níveis de DA em ambas as doses, comparado ao grupo controle; DA [Controle: $1.089 \pm 0.4135(8)$; CVC-25: $5.598 \pm 1.384(8)$; CVC-50: $5.954 \pm 10.8468(8)$]. (FIGURA 9).

Os resultados também demonstraram um aumento nos níveis de 5-HT e DOPAC, embora esse aumento não tenha sido significativo em comparação ao grupo controle; 5-HT [Controle: $2.148 \pm 0.5730(8)$; CVC-25: $4.810 \pm 1.017(8)$; CVC-50: $4.976 \pm 1.455(8)$]; DOPAC [Controle: $3.755 \pm 0.92(8)$; CVC-25: $5.470 \pm 0.6968(8)$; CVC-50: $4.897 \pm 1.088(8)$].

Não houve alterações significativas nos níveis de NE, HVA e HIAA.

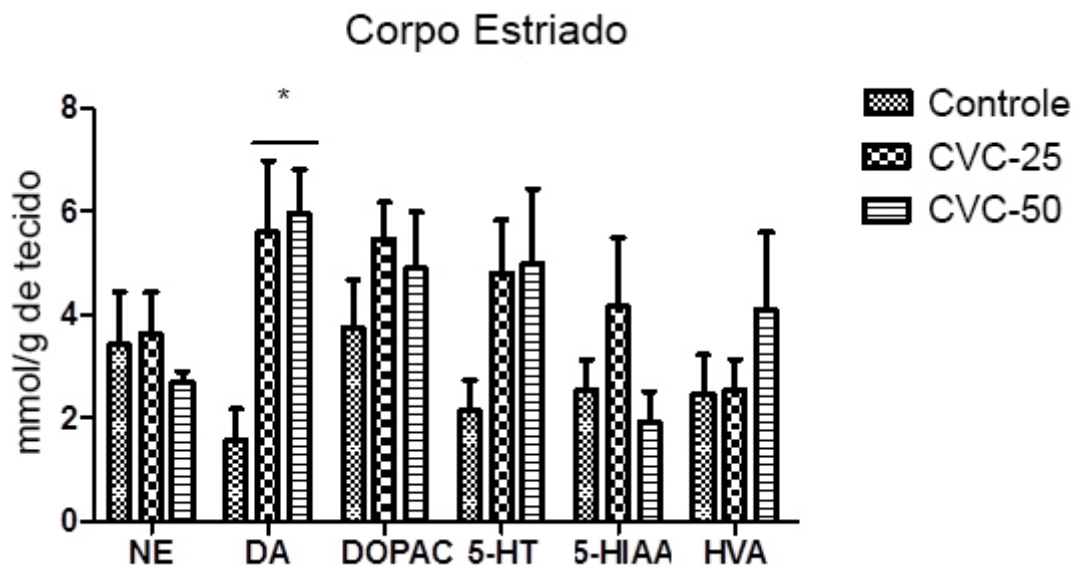


Figura 9 Níveis de monoaminas e seus metabólitos após pré-tratamento com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em corpo estriado de camundongos. CVC -25 (carvacrol 25 mg/Kg); CVC-50 (carvacrol 50 mg/Kg); DA (dopamina); NE (noradrenalina); DOPAC (ácido dihidroxifenil-acético) ; 5-HT (serotonina); 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindol-3-acético); HVA (ácido homovanílico). * $p < 0,05$ ANOVA seguido por Student Newman Keuls teste *post hoc*.

Determinação das concentrações de aminoácidos em corpo estriado de camundongos usando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os efeitos do carvacrol (25 e 50 mg/kg) nas concentrações de aminoácidos em corpo estriado de camundongos são mostrados na figura 8. Carvacrol na dose de 50 mg/kg aumentou significativamente os níveis de ASP, TAU, GABA e GLI comparado ao grupo controle: ASP [Controle: $1250 \pm 441,9(8)$; CVC-25: $213,7 \pm 29,84(8)$; CVC-50: $2610 \pm 559,3(8)$]; TAU [Controle: $25,12 \pm 18,12(8)$; CVC-25: $414,9 \pm 82,02(8)$; CVC-50: $1646 \pm 77,93(8)$]; GABA [Controle: $25,28 \pm 3,878(8)$; CVC-25: $165,6 \pm 27,75(8)$; CVC-50: $1135 \pm 24,90(8)$]; GLI [Controle: $389,5 \pm 121,0(8)$; CVC-25: $195,9 \pm 70,61(8)$; CVC-50: $1304 \pm 32,89(8)$].

Na dose de 25 mg/kg, carvacrol diminuiu os níveis de GLU comparados ao grupo controle: [Controle: $621,9 \pm 208,1(8)$; CVC-25: $36,01 \pm 12,348$; CVC-50: $409,2 \pm 21,28(8)$] (FIGURA 10).

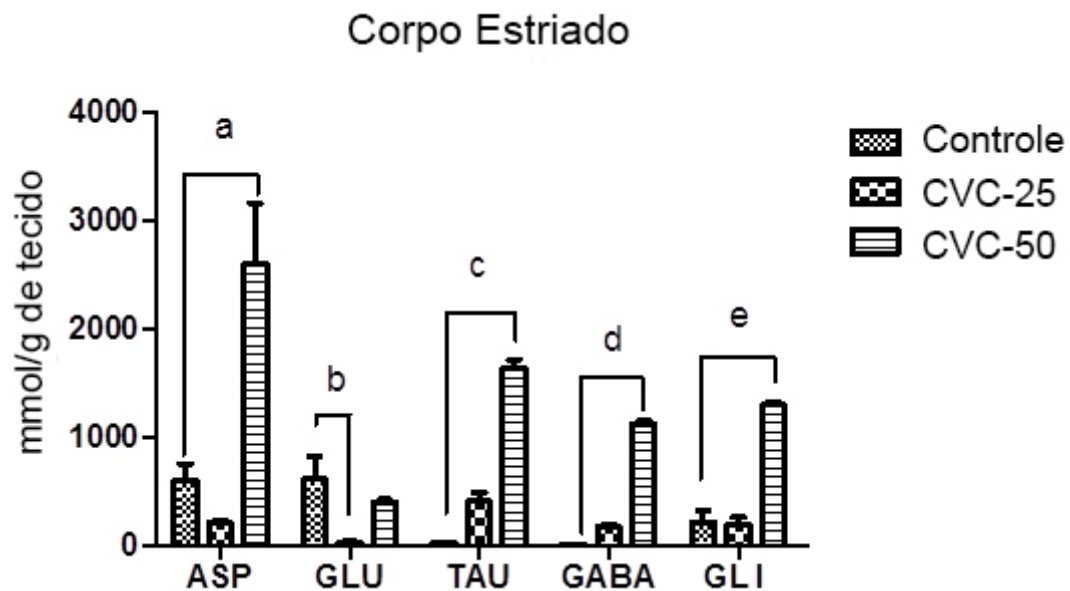


Figura 10 Níveis de aminoácidos e seus metabólitos após pré-tratamento com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em corpo estriado de camundongos. CVC -25 (carvacrol 25 mg/Kg); CVC-50 (carvacrol 50 mg/Kg; ASP (aspartato); GLU (glutamato); TAU (taurina); GABA (ácido gama-aminobutírico) e GLI (glicina). ^{a,c,d,e} $p < 0,05$ ANOVA, seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*.

5.2 Efeitos antioxidantes do tratamento agudo com carvacrol no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina.

As análises para investigação da atividade antioxidante das drogas em estudo foram realizadas em homogenatos pré-frontais, hipocampais e estriais dos grupos Controle (Tween 80, 3% em água destilada, v.o), Carvacrol 25 mg/Kg (v.o.), Carvacrol 50 mg/Kg (v.o.) e Carvacrol 100 mg/Kg (v.o.).

5.2.1 Efeitos do tratamento com carvacrol sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.

Os animais foram pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50mg/Kg ou com Tween 80, 3% em água destilada uma hora antes de serem submetidos ao teste de convulsões induzida por pilocarpina. Após a morte, o cérebro dos animais foi dissecado e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizados para análise. Os animais tratados com carvacrol na dose de 25 e 50 mg/Kg tiveram uma diminuição significativa nos níveis de MDA no córtex pré-frontal [Controle: $3487 \pm 259,6(8)$; CVC-25: $1086 \pm 234,7(8)$; CVC-50: $2207 \pm 75,31(8)$], hipocampo [Controle: $3115 \pm 573,5(8)$; CVC-25: $1009 \pm 81,84(8)$; CVC-50: $1620 \pm 168,7(8)$;] e corpo estriado [Controle: $3771 \pm 223,9(8)$; CVC-25: $952,2 \pm 45,57(8)$; CVC-50: $1631 \pm 224,1(8)$] comparando com o grupo controle (FIGURAS 11, 12 e 13).

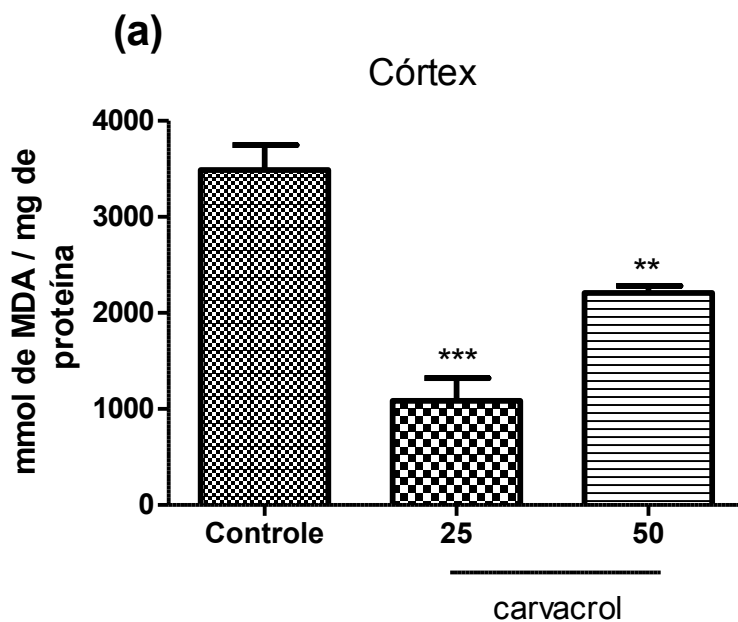


Figura 11 Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de MDA em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,1$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

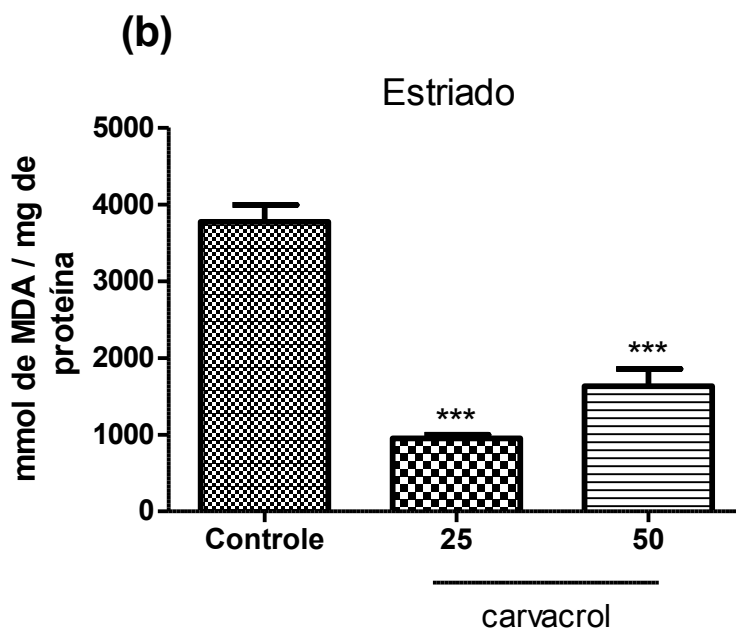


Figura 12 Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de MDA em corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. *** $p < 0,1$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

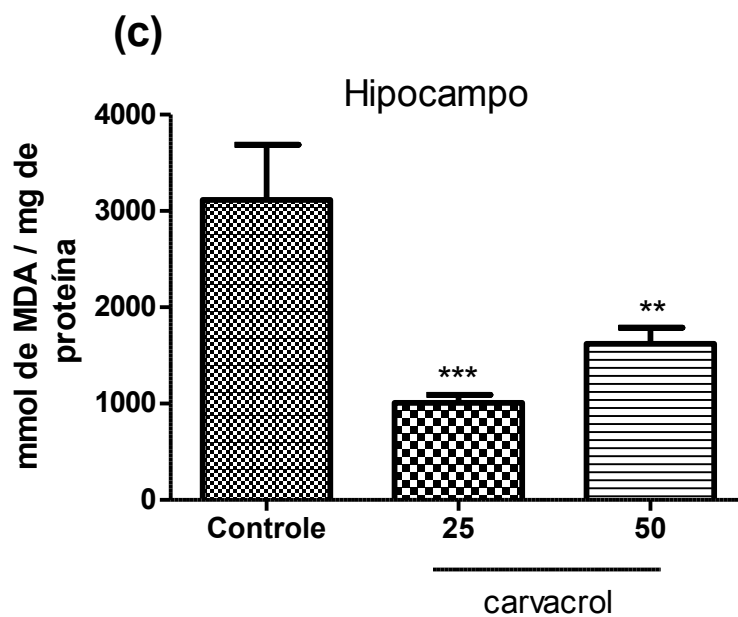


Figura 13 Efeito do carvacrol (CVC) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de MDA em hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,1$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.2.2 Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.

Os animais foram pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50mg/Kg ou com Tween 80, 3% em água destilada uma hora antes de serem submetidos ao teste de convulsões induzida por pilocarpina. Após a morte, o cérebro dos animais foi dissecado e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizados para análise. Os animais tratados com carvacrol na dose de 25 mg/Kg apresentaram alteração significativa na produção de nitrito/nitrato no corpo estriado [Controle: $176,7 \pm 25,72(8)$; CVC-25: $48,53 \pm 6,533(8)$] e hipocampo [Controle: $112 \pm 20,63(8)$; CVC-25: $38,95 \pm 10,16(8)$] comparando com o grupo controle. Os animais tratados com carvacrol na dose de 50 mg/Kg tiveram um aumento significativo na produção de nitrito/nitrato no hipocampo [Controle: $112 \pm 20,63(8)$; CVC-50: $43,22 \pm 10,36(8)$] comparando com o grupo controle (FIGURAS 14, 15 e 16).

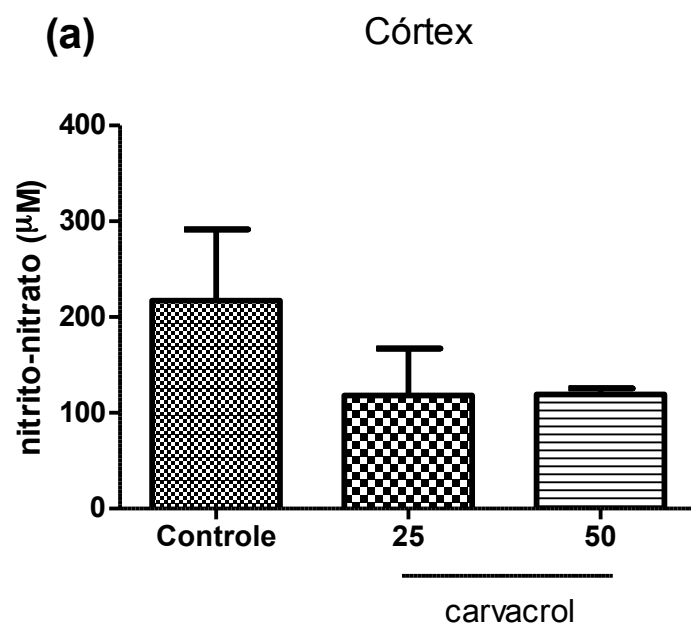


Figura 14 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

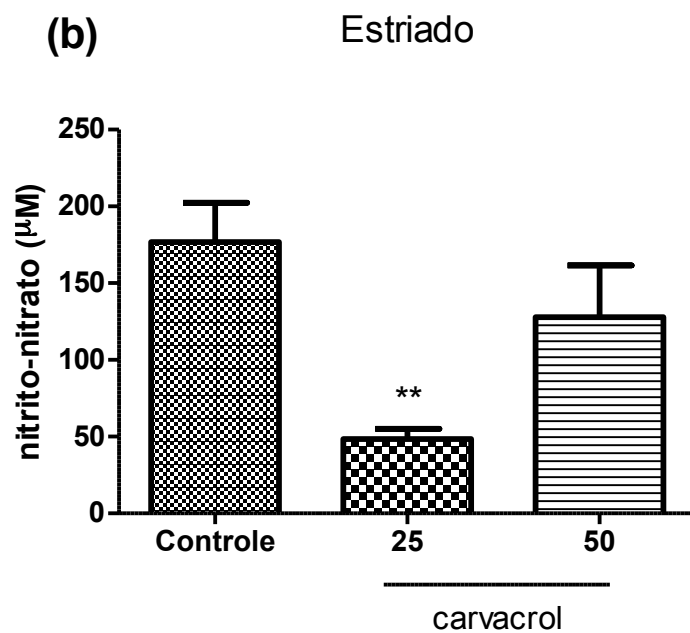


Figura 15 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de nitrito/nitrato em corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ** $p < 0,01$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

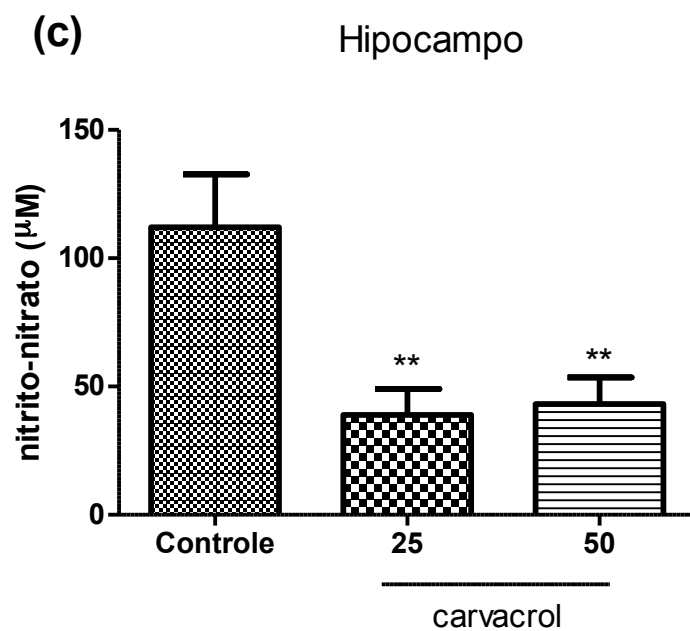


Figura 16 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de nitrito/nitrato em hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ** $p < 0,01$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.2.3 Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina

Os animais foram pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50mg/Kg ou com Tween 80, 3% em água destilada uma hora antes de serem submetidos ao teste de convulsões induzida por pilocarpina. Após a morte, o cérebro dos animais foi dissecado e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizados para análise. Os animais tratados com carvacrol na dose de 25 e 50 mg/Kg tiveram uma diminuição significativa na produção de catalase no hipocampo [Controle: $2145 \pm 152,6(8)$; CVC-25: $1276 \pm 271,7(8)$; CVC-50: $1530 \pm 38,97(8)$] comparando com o grupo controle (FIGURAS 17, 18 e 19).

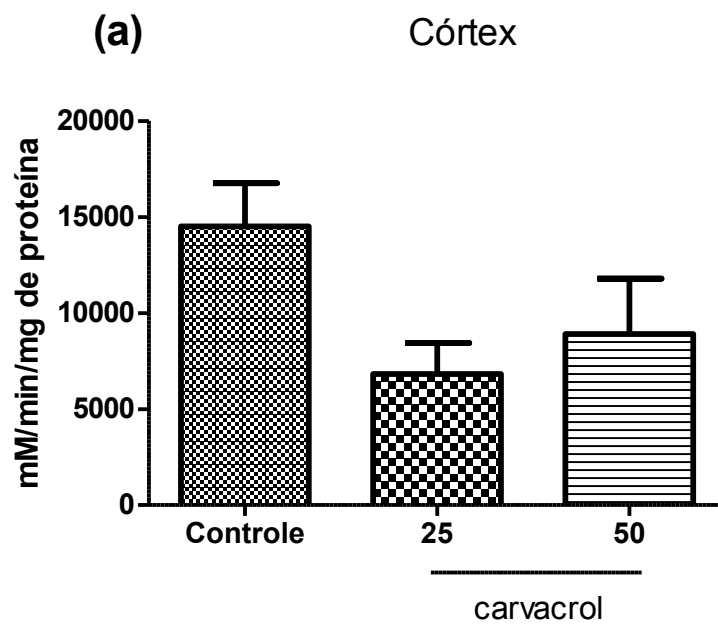


Figura 17 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de catalase em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

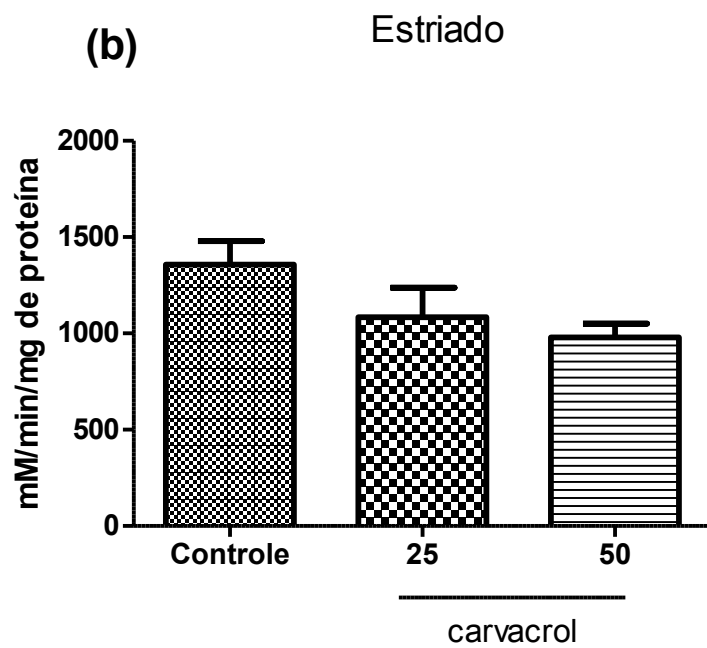


Figura 18 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de catalase em corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

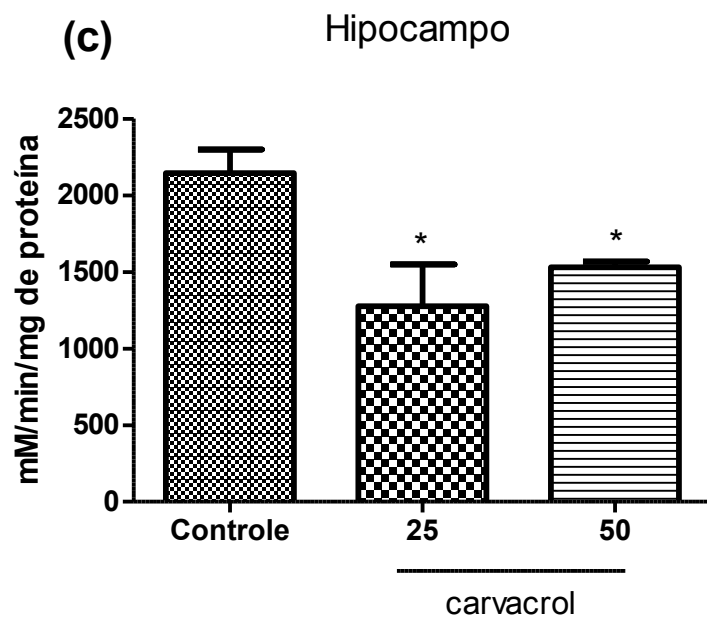


Figura 19 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a atividade da catalase em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina. O gráfico mostra os níveis de catalase em hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.2.4 Efeitos do tratamento com carvacrol sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.

As figuras 20, 21 e 22 mostram que o pré-tratamento com carvacrol na dose de 50 mg/Kg foi capaz de alterar a quantidade de GSH nos animais submetidos ao estresse tanto nas áreas do hipocampo [Controle: $1643 \pm 143,8(8)$; CVC-25: $972,8 \pm 84,37(8)$; CVC-50: $3355 \pm 517,8(8)$] quanto no corpo estriado [Controle: $1784 \pm 611,3(8)$; CVC-25: $877,7 \pm 63,67(8)$; CVC-50: $3078 \pm 360(8)$] em comparação ao grupo controle comparando. O córtex pré-frontal não mostrou alteração significativa em comparação ao grupo controle. Os animais foram pré-tratados com carvacrol nas duas doses ou com Tween 80, 3% em água destilada uma hora antes de serem submetidos ao teste de convulsões induzida por pilocarpina. Após a morte, o cérebro dos animais foi dissecado e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizados para análise.

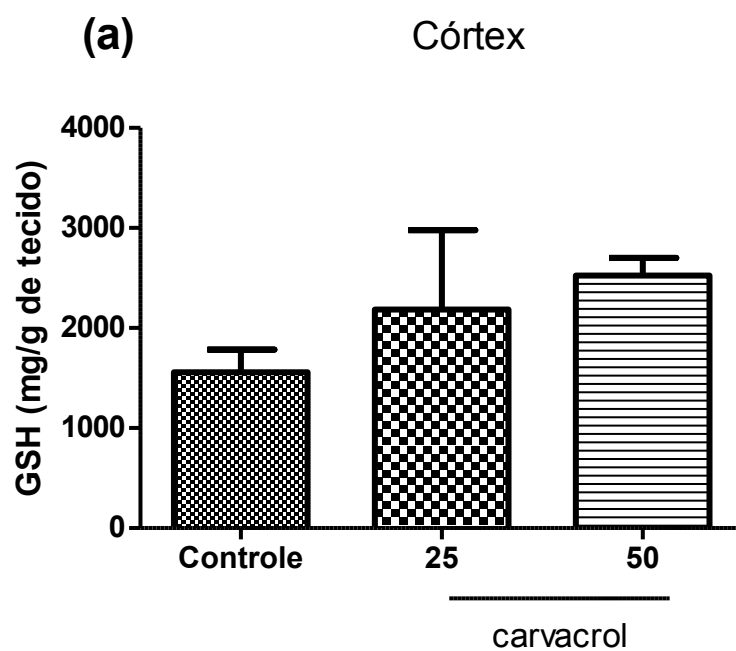


Figura 20 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de GSH em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

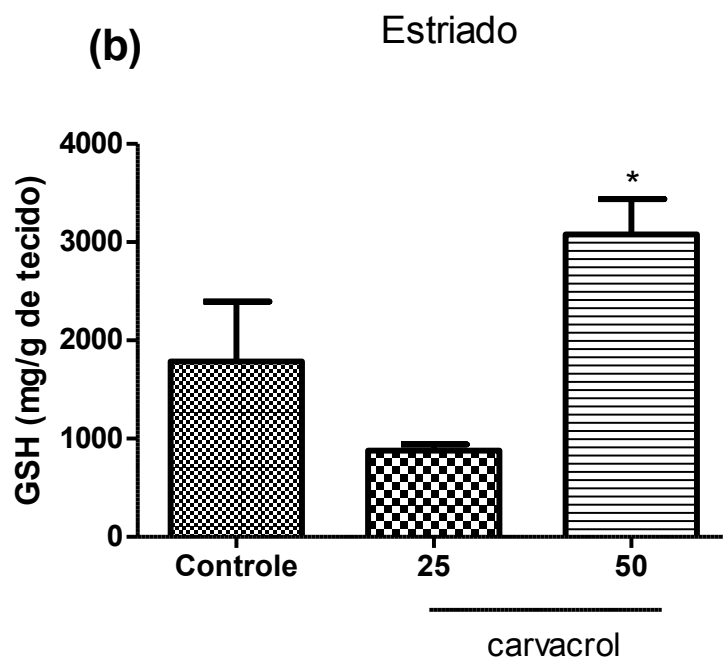


Figura 21 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de GSH em corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

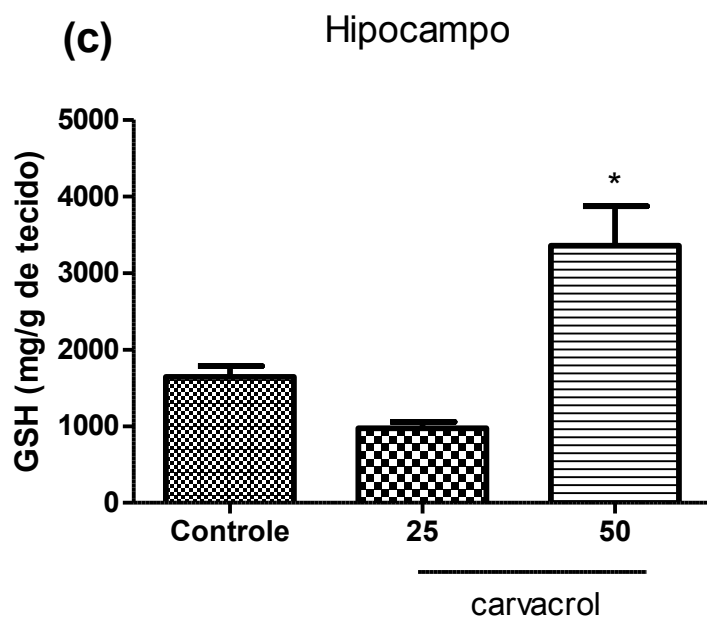


Figura 22 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de GSH em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de GSH em hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.2.4 Efeitos do tratamento com carvacrol sobre a quantidade de SOD em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo pelo teste da convulsão induzida por pilocarpina.

As figuras 23, 24 e 25 mostram que o pré-tratamento com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg não altera a quantidade de SOD nos animais submetidos ao estresse, comparando ao controle. Os animais foram pré-tratados com carvacrol nas duas doses ou com Tween 80, 3% em água destilada uma hora antes de serem submetidos ao teste de convulsões induzida por pilocarpina. Após a morte, o cérebro dos animais foi dissecado e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram utilizados para análise.

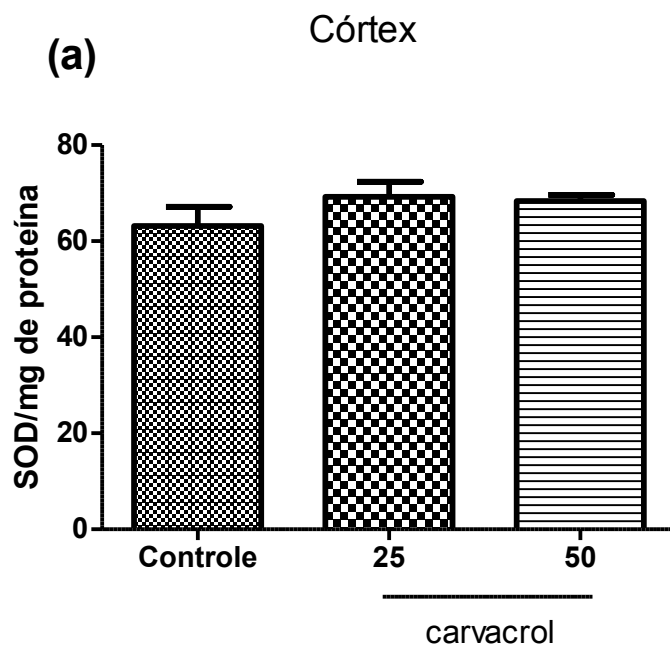


Figura 23 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em córtex pré-frontal de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de SOD em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

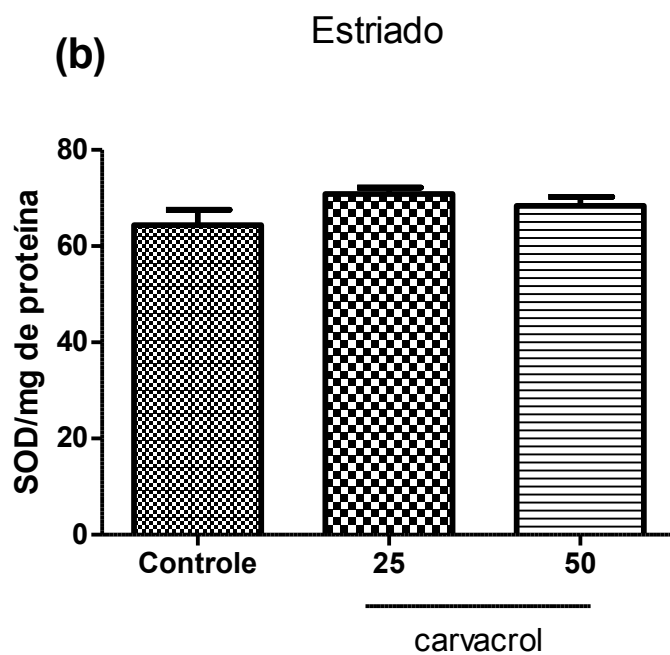


Figura 24 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em corpo estriado de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de SOD em corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

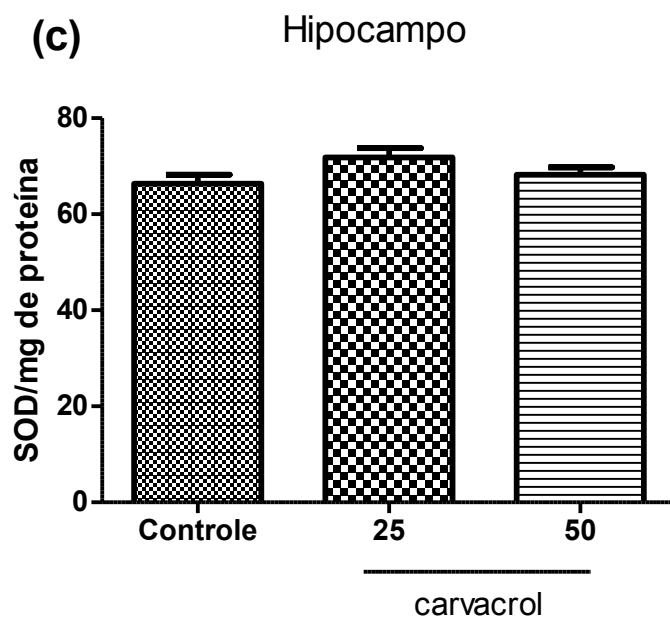


Figura 25 Efeito do carvacrol (CVC) sobre a quantidade de SOD em hipocampo de animais submetido a convulsão induzida por pilocarpina.

O gráfico mostra os níveis de SOD em hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina e pré-tratados com veículo ou carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3 Atividade Antinociceptiva

5.3.1 Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.

A administração intraperitoneal de ácido acético 0,6% nos animais tratados previamente com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) produziu um alto número de contorções abdominais [controle: $39,75 \pm 1,989$ (8)]. O grupo de animais que recebeu tratamento prévio com indometacina 10mg/Kg, v.o., droga antiinflamatória não-esteróide, usada como padrão positivo, demonstrou uma diminuição significativa do número de contorções abdominais [IND-10: $12,08 \pm 1,323$ (10)]. A administração oral de carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg diminuiu significativamente o número de contorções abdominais [CVC-50: $23 \pm 1,165$ (8); CVC-100: $18,50 \pm 2,318$ (7)], porém, o tratamento oral de carvacrol nas doses de 12,5 e 25 mg/ Kg não apresentou alteração no número de contorções abdominais em comparação com o grupo controle (FIGURA 26).

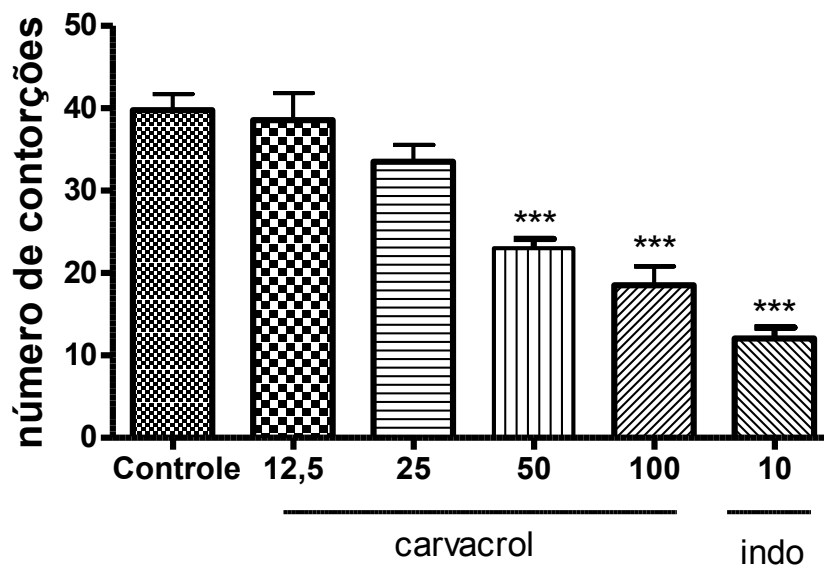


Figura 26 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. O gráfico mostra o número de contorções induzidas por ácido acético em grupos de camundongos tratados com veículo, carvacrol (12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg) e indometacina (10 mg/Kg) 60 min antes de receberem uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. O número de contorções foi contado decorrido 10 min da administração de ácido acético, durante 20 min. *** $p < 0.001$ ANOVA and Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.2 Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção térmica na placa quente.

Os grupos de animais tratados com veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) não tiveram diferenças entre si quanto ao tempo de latência para exibir comportamento nociceptivo nos tempos em que foram observados. O tratamento com carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg aumentou o tempo de latência para exibir comportamento nociceptivo no tempo de 60 min [controle: $6.278 \pm 1.315(9)$; CVC-50: $13.00 \pm 2.258(10)$; CVC-100: $12.06 \pm 1.278(9)$]. A morfina na dose de 7,5 mg/Kg, que foi utilizada como padrão positivo, aumentou significativamente o tempo de reação na placa quente em todos os tempos observados: [0 min: $20.30 \pm 1.169(10)$; 30min: $30.01 \pm 4.220(10)$; 60min: $19.40 \pm 2.267(10)$; 90min: $25.70 \pm 3.358(8)$; 120min: $28.01 \pm 2.545(10)$]. Os resultados podem ser vistos na **Figura 27** e **Tabela 1**.

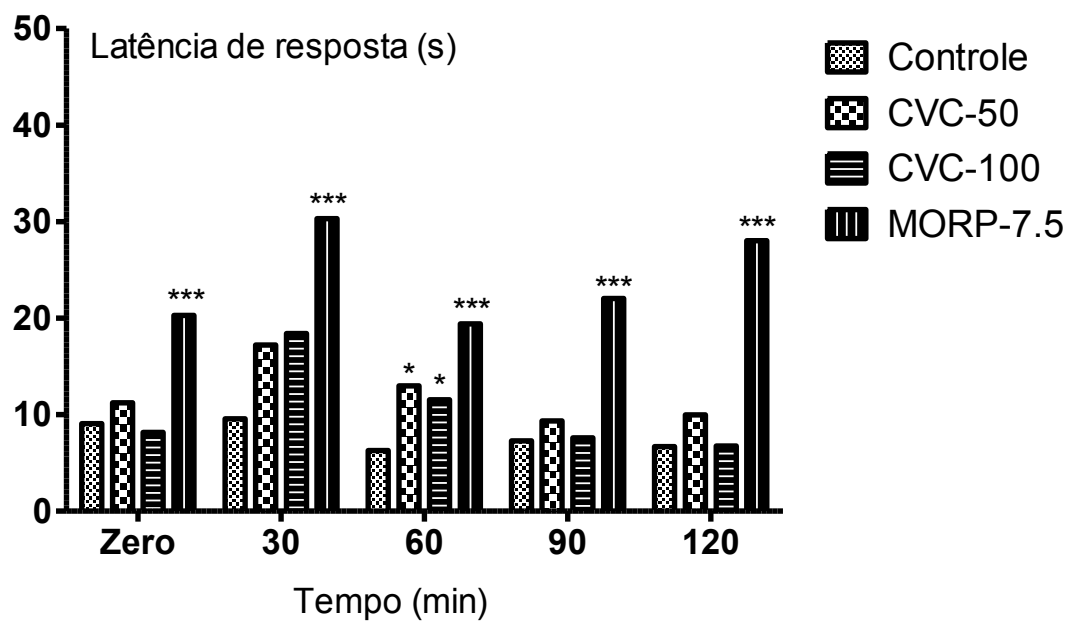


Figura 27 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo da placa quente.

Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo necessário para os animais exibirem respostas frente ao estímulo térmico, registrados antes (tempo 0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 min após os tratamentos com CVC, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o.) ou Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. A resposta consiste em saltar ou lambear a pata traseira após serem postos na placa aquecida ($51 \pm 0,5$ °C). * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ ANOVA and Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

Tabela 3 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo da placa quente

Tempo de Resposta ao Estímulo (s)					
Grupo	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	9,078±1,722 (9)	9,578±1,659(9)	6,278±1,315(9)	7,289±1,243(9)	6,700±1,097(9)
CVC-50	11,23±1,276 (10)	17,21±3,448(10)	13,00±2,258(10)*	9,340±1,274(10)	9,980±1,613(10)
CVC-100	8,170±1,412 (10)	18,40±3,727(10)	12,06±1,278(9)*	7,600±2,315(10)	6,760±0,7267(10)
MORP-7.5	20,30±1,169(10)***	30,01±4,220(10)**	19,40±2,267(10)***	25,70±3,358(8)***	28,01±2,545(10)***

Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo necessário para os animais exibirem respostas frente ao estímulo térmico, registrados antes (tempo 0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 min após os tratamentos com CVC, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., veículo (Tween 80, 3% em água destilada v.o.) ou Morfina 7,5 mg/Kg, i.p. A resposta consiste em saltar ou lambear a pata traseira após serem postos na placa aquecida (51 ± 0,5 °C). *p<0,5 ; ***p<0.001 ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.3 Avaliação do potencial antinociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção induzida pela formalina.

Grupos de animais pré-tratados com carvacrol na dose de 100 mg/Kg e morfina (7,5 mg/Kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de lambertura da pata na primeira fase do teste (0-5min) [controle: 53.53 ± 2.661 (10); CVC-100: 37.11 ± 3.307 (10); MORF-7.5 mg/kg: 2.000 ± 0.8660 (8)] em comparação ao grupo tratado com veículo (Tween 80, 3% em água destilada) (FIGURA 26). Um comportamento semelhante foi observado na segunda fase do teste (20-25 min), onde grupos tratados com carvacrol 100 mg/Kg e morfina (7,5 mg/Kg) também apresentaram uma redução significativa no tempo de lambertura em comparação ao grupo controle [controle: 21.88 ± 3.641 (10); CVC-100: 0.7207 ± 0.5415 (10); MORF-7.5 mg/kg: 2.000 ± 0.8660 (8)] (FIGURA 28).

Animais pré-tratados com carvacrol na dose de 50 mg/Kg diminuíram significativamente o tempo de lambertura da pata apenas na segunda fase do teste [CVC-50: 1.381 ± 0.8284 (10)] em comparação ao grupo controle (FIGURA 29).

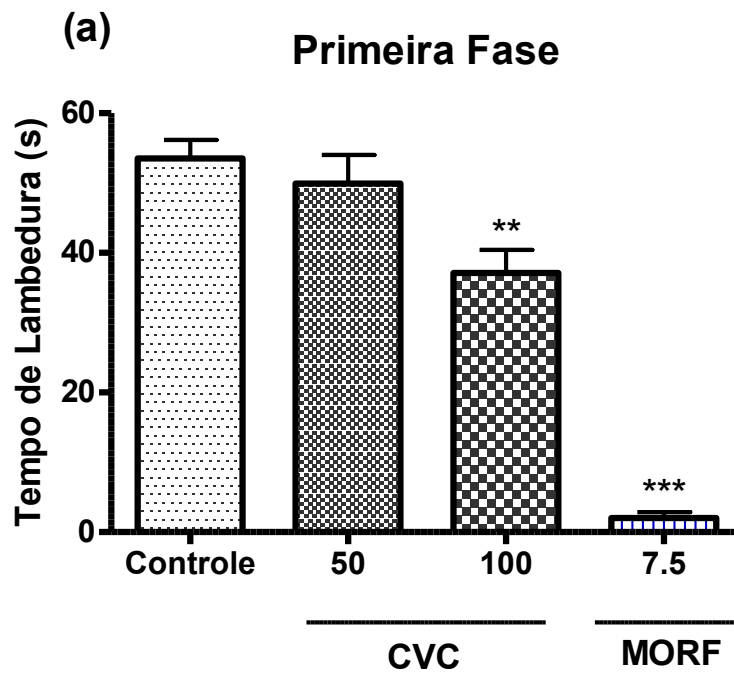


Figura 28 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste.

Os valores do gráfico representam a média \pm E.P.M do tempo de lambedura da pata traseira após aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com CVC nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Um grupo recebeu morfina 7,5 mg/Kg, i.p. 30 min antes da injeção de formalina 1%. O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 0-5 min após a aplicação de formalina. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

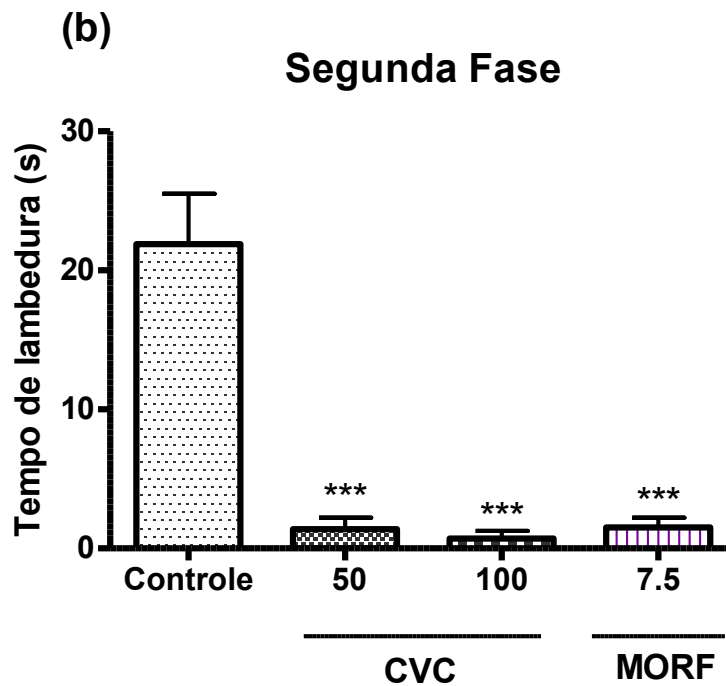


Figura 29 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste.

Os valores do gráfico representam a média ± E.P.M do tempo de lambedura da pata traseira após aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com CVC nas doses de 50 e 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Um grupo recebeu morfina 7,5 mg/Kg, i.p. 30 min antes da injeção de formalina 1%. O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 20-25 min após a aplicação de formalina. *** $p < 0.001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.4 Investigação do possível mecanismo nociceptivo do carvacrol no modelo de contorções induzidas por ácido acético.

Visto que a dose de 100 mg/Kg foi a dose que apresentou melhor potencial antinociceptivo, o experimento seguinte foi realizado utilizando esta dose.

Fig. 30 mostra que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo promovido pelo carvacrol na dose de 100 mg/Kg em comparação ao grupo controle [controle: 27.73 ± 2.566 (10); CVC-100: 15.32 ± 2.474 (10); CVC+L-ARG: 8.500 ± 2.847 (8); CVC+NAL: 14.13 ± 1.894 (8)].

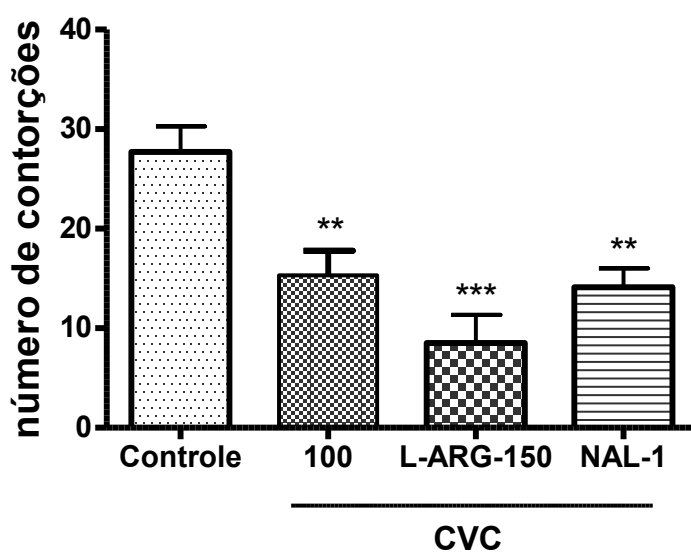


Figura 30 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos após o pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg).

O gráfico mostra o número de contorções induzidas por ácido acético em grupos de camundongos tratados com veículo, carvacrol (100 mg/Kg) ou o tratamento associado de carvacrol e L-arginina (L-ARG; 150 mg/Kg) ou naloxona (NAL; 1 mg/Kg). Carvacrol foi administrado 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Quando associado, os animais receberam carvacrol (100 mg/Kg) 30 min após o tratamento com L-ARG (150 mg/Kg) ou NAL (1 mg/Kg). O número de contorções foi contado decorrido 10 min da administração de ácido acético, durante 20 min. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ANOVA and Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.5 Investigação do possível mecanismo nociceptivo do carvacrol no modelo de nocicepção induzidas por formalina em camundongos.

Neste caso também foi utilizado carvacrol na dose de 100 mg/Kg pelo mesmo motivo já citado anteriormente.

Fig. 31 e 32 mostram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo promovido pelo carvacrol na dose de 100 mg/Kg, em comparação ao grupo controle, tanto na primeira fase [controle: $80,47 \pm 7,169$ (10) ; CVC-100: $42,61 \pm 4,418$ (10); CVC+L-ARG: $49,39 \pm 10,78$ (8); CVC+NAL: $35,49 \pm 4,914$ (8)] quanto na segunda fase do teste fase [controle: $15,70 \pm 2,317$ (10) ; CVC-100: $0,1931 \pm 0,1931$ (10); CVC+L-ARG: $0,2575 \pm 0,2575$ (8); CVC+NAL: $35,49 \pm 4,914$ (8)].

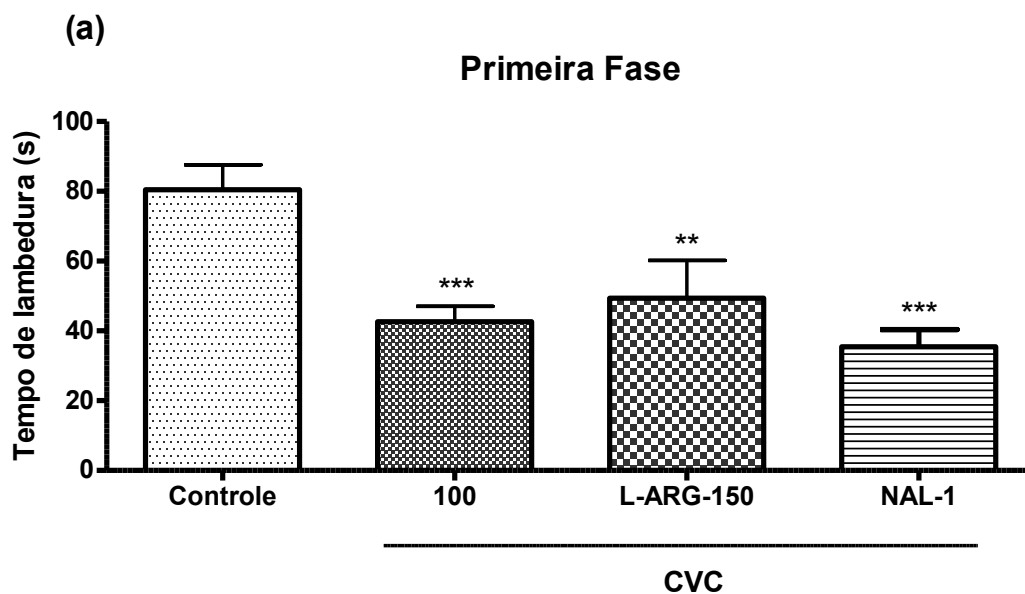


Figura 31 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pela formalina em camundongos, na primeira fase do teste após o pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg). Os valores do gráfico representam a média± E.P.M do tempo de lambedura da pata traseira após aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Quando associado, os animais receberam carvacrol (100 mg/Kg) 30 min após o tratamento com L-ARG (150 mg/Kg) ou NAL (1 mg/Kg). O tempo de lambedura foi registrado no intervalo de 0-5 min após a aplicação de formalina. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

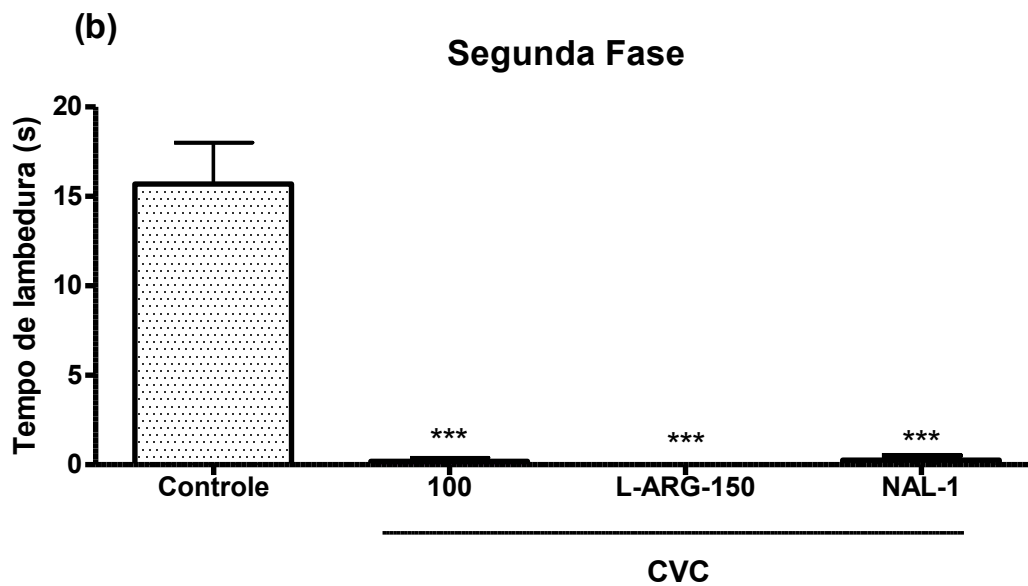


Figura 32 Efeito do carvacrol (CVC) sobre o tempo de lambertura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pela formalina em camundongos, na segunda fase do teste após o pré-tratamento com naloxona (1 mg/Kg) e L-arginina (150 mg/Kg). Os valores do gráfico representam a média± E.P.M do tempo de lambertura da pata traseira após aplicação de formalina 1%. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de receberem injeção intraplantar de formalina 1%. Quando associado, os animais receberam carvacrol (100 mg/Kg) 30 min após o tratamento com L-ARG (150 mg/Kg) ou NAL (1 mg/Kg). O tempo de lambertura foi registrado no intervalo de 20-25 min após a aplicação de formalina. *** $p < 0.001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.6 Avaliação da Atividade Locomotora e Relaxante Muscular

5.3.6.1 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* e *grooming* foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing* e de *grooming*. Carvacrol na dose de 100 mg/Kg administrado por via oral não alterou a atividade locomotora comparando com o controle, enquanto o diazepam 2 mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora em relação ao controle (FIGURA 33) [controle: $44,71 \pm 3,998$ (7); CVC-100: $37 \pm 5,487$ (8); DZP-2: $27,14 \pm 1,280$ (7)].

O tratamento com carvacrol 100 mg/Kg não alterou o número de *rearing* (FIGURA 34), comparado com o controle. O diazepam 2 mg/Kg, usado como droga padrão, reduziu o *rearing* em relação ao controle [controle: $4,375 \pm 0,6797$ (7); CVC-100: $4,875 \pm 0,8952$ (8); DZP-2: $2,125 \pm 0,5154$ (7)].

O *grooming* (FIGURA 35) teve uma diminuição significativa com o uso do carvacrol na dose de 100 mg/Kg em relação ao controle. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *grooming* em relação ao controle [controle: $2,250 \pm 0,25$ (7); CVC-100: $1,125 \pm 0,125$ (8); DZP-2: $0,9 \pm 0,2769$ (7)].

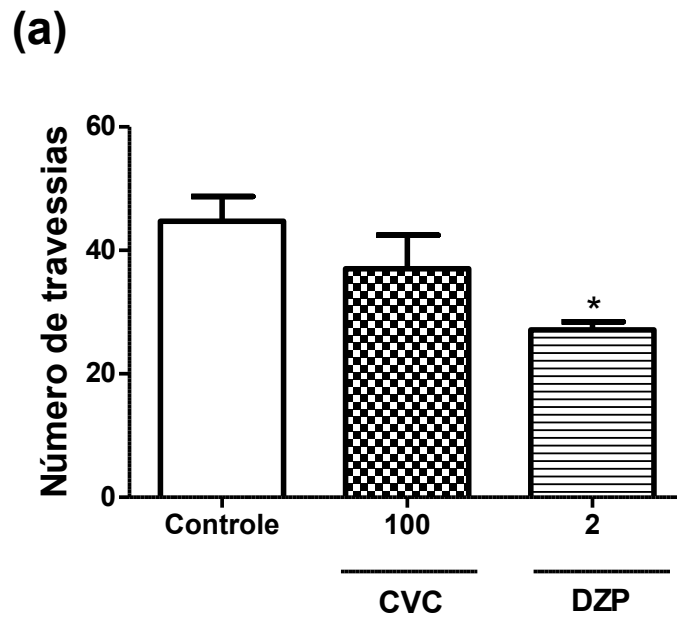


Figura 33 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto em camundongos. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 5 min no teste do campo aberto. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

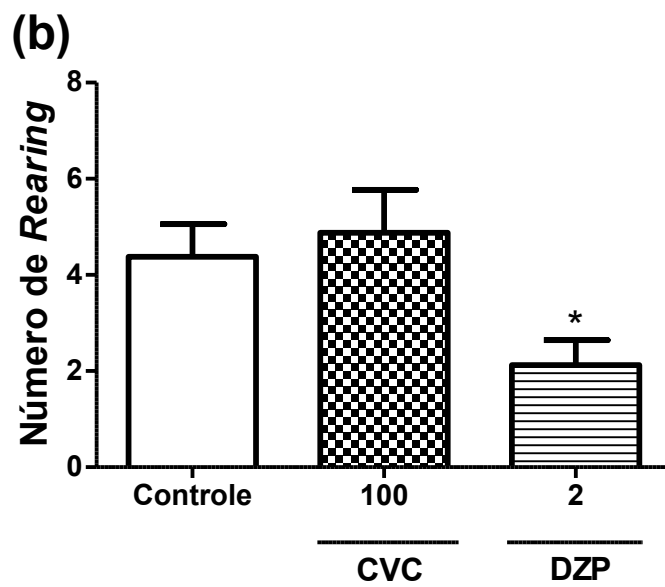


Figura 34 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o número de rearing no teste do campo aberto em camundongos. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 5 min no teste do campo aberto. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

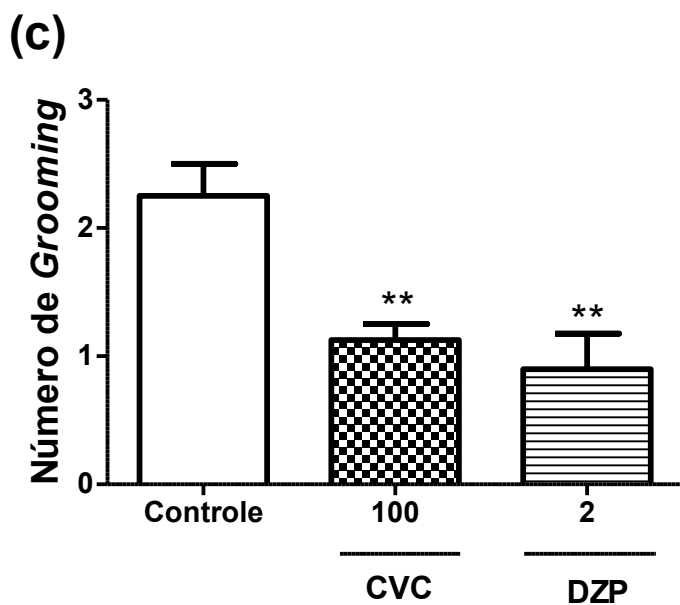


Figura 35 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o número de grooming no teste do campo aberto em camundongos. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg, v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 5 min no teste do campo aberto. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. ** $p < 0,01$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.3.6.2 Teste do *Rota Rod*

Neste teste, o parâmetro analisado é o tempo de permanência na barra durante o período de 2 min nas rotações de 5,15 e 40 rpm.

Carvacrol 100 mg/Kg, v.o. nas respectivas rotações não alterou o tempo de permanência na barra em comparação ao grupo controle. O diazepam 2 mg/Kg, i.p. foi usado como padrão positivo e diminuiu significativamente o tempo de permanência na barra nas três rotações estudadas em comparação ao grupo controle [5 rpm: controle: $119,2 \pm 0,3329$ (8); CVC-100: $119,3 \pm 0,5261$ (8); DZP-2: $97 \pm 5,041$ (8)]; [15 rpm: controle: $116,8 \pm 0,9086$ (8); CVC-100: $113,6 \pm 2,519$ (8); DZP-2: $93 \pm 4,166$ (8)]; [40 rpm: controle: $81,89 \pm 4,120$ (8); CVC-100: $72,3 \pm 4,637$ (8); DZP-2: $66 \pm 1,390$ (8)] (Figuras 36, 37 e 38).

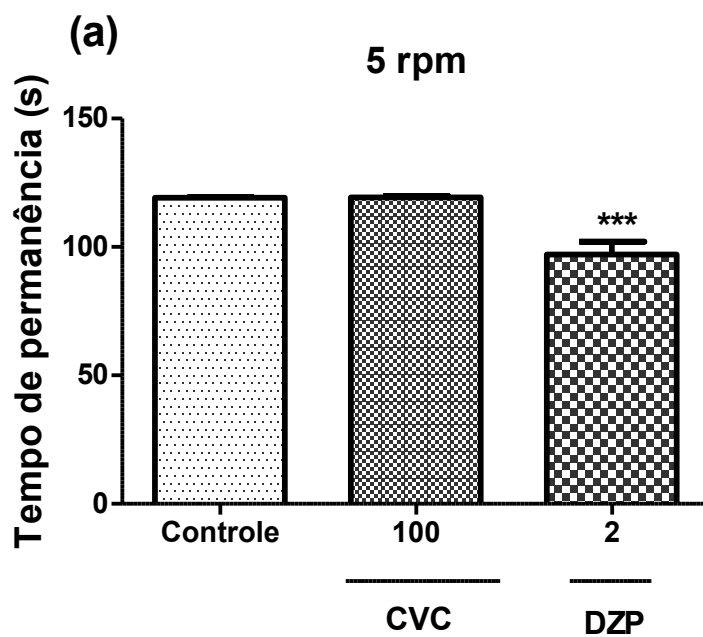


Figura 36 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 5 rpm, no teste do rota rod em camundongos.

Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 2 min no teste do *Rota Rod*. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. *** $p < 0,001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

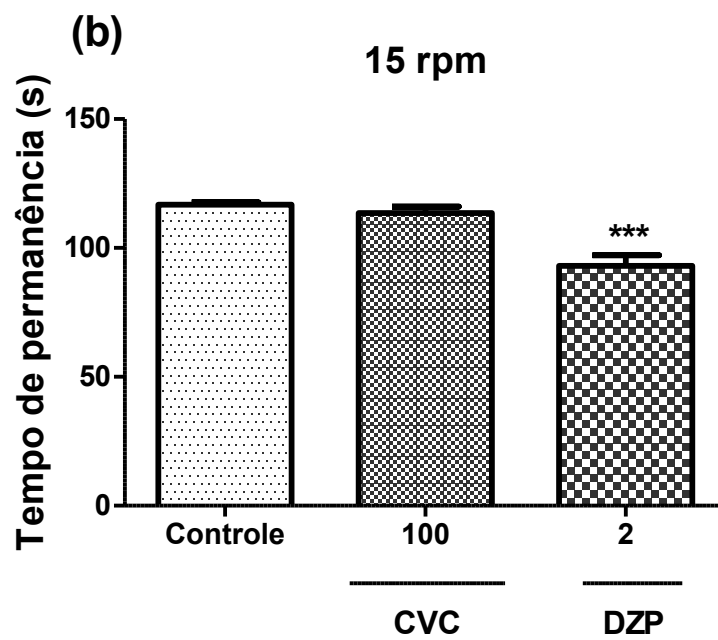


Figura 37 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 15 rpm, no teste do rota rod em camundongos.

Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 2 min no teste do *Rota Rod*. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. *** $p < 0,001$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

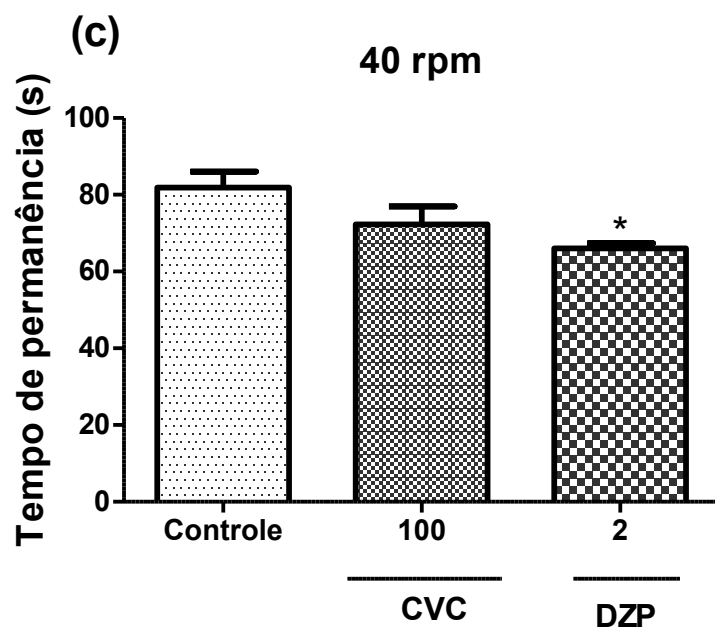


Figura 38 Efeito do carvacrol (CVC) e diazepam (DZP) sobre o tempo de permanência na barra giratória, na velocidade de 40 rpm, no teste do rota rod em camundongos. Os animais foram previamente tratados com CVC na dose de 100 mg/Kg , v.o. ou veículo (Tween 80, 3% em água destilada, v.o.) 60 min antes de serem observados por 2 min no teste do *Rota Rod*. O grupo padrão positivo foi tratado com diazepam 2 mg/Kg, i.p. e submetido ao experimento 30 min depois do tratamento. * $p < 0,05$ ANOVA e Student Newman Keuls como teste *post hoc*.

5.4 Avaliação da Toxicologia Aguda do carvacrol

5.4.1 Avaliação comportamental

De acordo com o protocolo OECD-423/2001, para a avaliação da toxicidade aguda do carvacrol um grupo de animais foi tratado com solução de água e tween 80 (grupo controle) e outro grupo foi tratado com a dose de 2000 mg/Kg. Cada grupo era composto por três animais (n=3).

Uma hora após a administração oral, os camundongos foram observados por 5 min na caixa acrílica do Campo Aberto. Depois, os animais foram observados por 6 horas seguidas. Foram observadas alterações como letargia, taquicardia e piloereção no grupo tratado com carvacrol na dose de 2000 mg/Kg. No segundo dia, o animal de número 3 veio a óbito. Nos demais dias, os animais 1 e 2 não apresentaram alterações, se mantendo em estado de alerta. Eles foram mantidos com livre oferta de água e comida e não apresentaram perda de peso nem alterações nas fezes.

Nos outros dias em que os camundongos foram observados, eles não apresentaram alterações comportamentais nem perda de peso ou alterações nas fezes. (TABELAS 4, 5, 6 e 7).

Tabela 4 Grupo controle, animais tratados com água e tween 80 no teste do Campo Aberto no 1º dia das administrações.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações
1 (32gr)	20	1	15	1	-
2(31gr)	08	2	7	1	-
3 (30gr)	25	1	8	2	-

Tabela 5 Grupo controle, animais tratados com água e tween 80 no teste do Campo Aberto no 14o dia das administrações.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações
1 (36gr)	28	1	10	-	-
2(32gr)	22	-	13	-	-
3(34gr)	32	2	10	3	-

Tabela 6 Efeito do carvacrol na dose de 2000 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 1º dia das administrações de carvacrol.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações após a 1º. hora
1 (35gr)	29	1	6	2	Letargia
2(32gr)	15	1	4	1	Letargia e taquicardia
3 (34gr)	11	3	-	1	Letargia, tremores e piloereção

Tabela 7 Efeito do carvacrol na dose de 2000 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 14º dia das administrações de carvacrol.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações
1 (36gr)	37	1	08	1	-
2 (34gr)	23	2	10	1	-

No 14º. dia, os animais foram sacrificados. Foram removido o cérebro, rim e fígado para análise histológica. A preparação foi da seguinte forma: os órgãos inteiros

foram mergulhados no formol por 24hs e, após retirados, foram lavados com soro fisiológico e mergulhados em álcool 70% por mais 24hs para então serem realizados os cortes, sendo os fragmentos colocados em recipientes independentes do tipo K7, identificados e armazenados em frascos mergulhados em álcool 70%. As lâminas foram confeccionadas em cortes em parafina pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Como ocorreu a morte de 1 animal com a dose de 2000 mg/Kg, o protocolo OECD (no. 423) recomenda repetir o experimento com a dose de 300mg/Kg. Os animais foram observados da mesma forma que os grupos anteriores, não apresentaram alterações, nem perda de peso e todos sobreviveram até o 14º dia (TABELAS 8 e 9).

No 14º. dia, foi realizado o mesmo procedimento para preparo dos órgãos do grupo de animais da dose anterior.

Tabela 8 Efeito do carvacrol na dose de 300 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 1º dia das administrações de carvacrol.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações Após a 1º. hora
1 (34gr)	54	1	19	-	agitação
2 (31gr)	34	1	5	-	
3 (31gr)	17	1	2	-	Piloereção

Tabela 9 Efeito do carvacrol na dose de 300 mg/Kg no teste do Campo Aberto no 14º dia das administrações de carvacrol.

Animal	ALE	Grooming	Rearing	Fezes	Observações
1 (38 gr)	45	1	18	3	Agitação
2 (34 gr)	19	1	4	4	
3 (33 gr)	17	5	11	-	

Avaliação histológica

Com o intuito de averiguar possíveis danos aos órgãos internos, foi realizada análise histológica nos órgãos dos animais. No último dia de estudo (14º dia) os animais foram sacrificados e seus órgãos (fígado, cérebro e rins) foram retirados para análise histológica.

Nas preparações das lâminas com os tecidos dos respectivos órgãos estudados (fígado, cérebro e rins) não houve alterações, nem sinais de processo inflamatório ou alterações na ultraestrutura dos órgãos analisados microscopicamente (Figura 39).

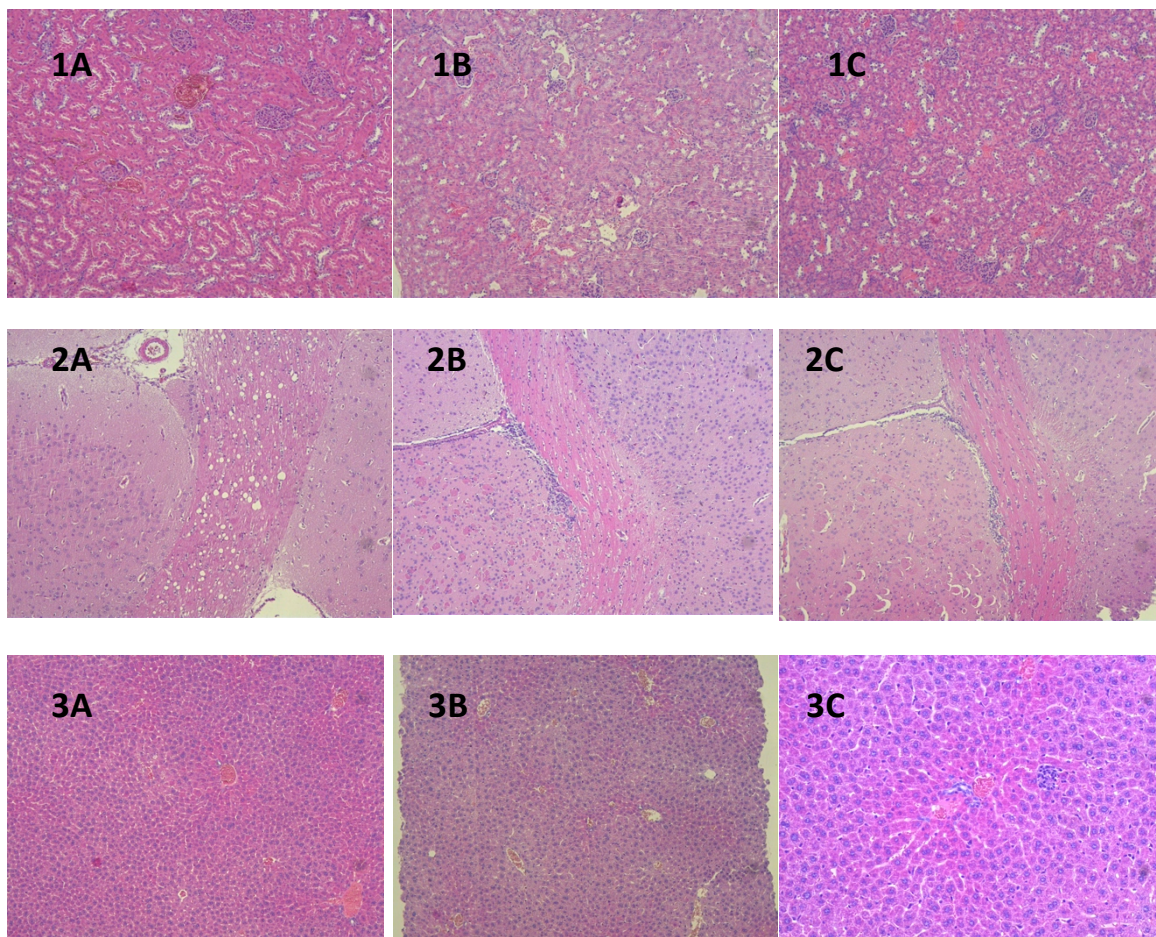


Figura 39 Análise histológica dos seguintes órgãos respectivamente: rim, cérebro e fígado em ratos na dose de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg no 14º dia após término da avaliação para toxicidade (aumento de 10X). 1A, 2A e 3A (controle), 1B, 2B e 3B (300 mg/Kg), 1C, 2C e 3C (2000 mg/Kg).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol) é um monoterpene fenólico presente nos óleos essenciais de diversas plantas, sendo o principal constituinte dos óleos essenciais de thyme e orégano (KOPARAL; ZEYTIÑOGLU, 2005). Estudos anteriores sugerem que alguns monoterpenos apresentam atividades no sistema nervoso central, tais como atividades ansiolíticas, antidepressivas e psicoestimulantes (UMEZU; MORITA 2003; MELO et al., 2006; SILVA et al., 2007; SOUSA et al., 2008).

O estresse é considerado como um fator importante no desenvolvimento de transtornos do sistema nervoso central, tais como depressão. Estudos têm demonstrado que experiências estressantes aumentam a vulnerabilidade a esta desordem. (KAROLEWICZ; PAUL, 2001; HENNINGSSEN et al., 2009).

Recentemente, foi publicado um trabalho analisando os efeitos antidepressivos após a administração oral de carvacrol, em modelos animais de depressão em camundongos (MELO et al, 2011). Os resultados mostraram que o carvacrol apresenta atividade antidepressiva e que essa atividade parece estar envolvida com o sistema dopaminérgico, possivelmente pela ativação dos receptores D₁ e D₂.

Já se sabe que a dopamina é um neurotransmissor importante para o movimento e cognição. A dopamina também atua na área estriatal que subjaz a atividade motora, motivação e tomada de decisões (OAK et al 2000, ZHANG; SULZER, 2012). A pesquisa teórica sobre o papel da dopamina na depressão é em grande parte ofuscada pela pesquisa do papel da noradrenalina e a serotonina na depressão. Descobertas recentes revelaram a importância da dopamina na fisiopatologia da depressão e existe uma idéia emergente de que a maioria dos pacientes deprimidos tratados com os inibidores da recaptação da serotonina e inibidores seletivos da recaptação de serotonina / noradrenalina não atingem remissão (DUNLOP; NEMEROFF, 2007).

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação do carvacrol na depressão, foi feita a análise dos níveis de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de

camundongos pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Como esperado, os níveis de dopamina aumentaram significativamente após o tratamento agudo de carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg em camundongos. Os níveis de DOPAC, um metabólito da dopamina, aumentaram em ambas as doses e HVA, um outro metabólito da dopamina, também apresentou um aumento, porém apenas na dose de 50 mg/Kg. Nenhum dos aumentos dos metabólitos foram significativos em comparação ao grupo controle.

O neurotransmissor serotonina atua através de múltiplos receptores e media uma grande variedade de funções em vertebrados (TIERNEY, 2001). A serotonina tem um importante papel na regulação de processos emotivos, ligados a mecanismos de recompensa e também relacionados ao processo de alimentação (HAYES; GREENSHAW, 2011). Os resultados do presente trabalho demonstraram um aumento nos níveis de serotonina em ambas as doses, mas esse aumento não foi significativo em comparação ao grupo controle.

Estes resultados corroboram com estudos prévios em modelos animais de depressão, onde o SCH23390 e sulpirida (antagonistas D_1 e D_2), mas não o PCPA (um inibidor da enzima triptofano-hidroxilase), ou a ioimbina e prazosina (antagonistas α -1 e α -2 adrenérgicos) foram capazes de reverter a atividade antidepressiva do carvacrol em modelo de nado forçado em camundongos (MELO et al, 2011).

Melo e colaboradores (2009) publicaram um trabalho em que camundongos receberam doses orais de carvacrol antes de serem submetidos a modelos de ansiedade tais como o plus maze elevado. Os resultados mostraram que o carvacrol apresenta um efeito ansiolítico que é revertido pelo pré-tratamento com flumazenil, um antagonista dos receptores $GABA_A$.

Com o intuito de esclarecer o mecanismo de ação central do carvacrol, foram dosados os níveis de aminoácidos após a administração oral de carvacrol em camundongos nas doses de 25 e 50 mg/Kg utilizando HPLC. Os resultados mostraram

um aumento significativo dos níveis de GABA após o tratamento agudo de carvacrol na dose de 50 mg/Kg.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos (PATEL et al, 2001). Alterações no sistema gabaérgico tem sido associadas com a fisiopatologia dos distúrbios de ansiedade. Já se sabe que pacientes com distúrbios de ansiedade apresentam uma redução na ligação de benzodiazepínicos em variadas regiões do cérebro (LYDIART, 2003). Portanto, esse resultado reforça a teoria de que o carvacrol é um agente ansiolítico que age via receptor GABA_A.

Glutamato (GLU) é um aminoácido excitatório que age como o principal mediador excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Este neurotransmissor é conhecido por exercer suas atividades via receptores específicos, incluindo subclasses ionotrópicas e metabotrópicas (NMDA, não-NMDA e mGluR, respectivamente) (SAMUEL et al, 1996). Os resultados apontaram para uma diminuição dos níveis de GLU em corpo estriado de camundongos apenas após a administração oral de carvacrol na dose de 25 mg/Kg.

Estudos anteriores demonstraram que em pedaços de tecido estriatal e em ratos em movimentação livre, DA e agonistas D₁, mas não os agonistas D₂, aumentam os níveis de NMDA, enquanto o antagonista D₁ SCH23390 inibe as respostas induzidas por NMDA (AGNOLI; CARLI, 2011). Alguns estudos *in vitro* mostraram que os agonistas glutamatérgicos aumentam a liberação de [³H] DA em sinaptossomos estriatais (SITGES et al, 2000).

Taurina (TAU) é um dos aminoácidos mais abundantes em mamíferos e tem mostrado estar envolvido em muitas funções fisiológicas importantes. Foi demonstrado que a taurina atua na manutenção da integridade estrutural da membrana, regulando a ligação e o transporte de cálcio, como um neuromodulador, um neurotransmissor, um antioxidante em situações de estresse e um neuroprotetor contra neurotoxicidade induzida por glutamato. Na presença de taurina, o aumento de [Ca²⁺]_i induzida pelo glutamato é acentuadamente reduzida (WU, 2010).

A taurina tem mostrado desempenhar um papel importante na manutenção da homeostase cerebral. Numa série de estudos, a TAU tem agido como ativador de receptores de glicina, a concentrações moderadas, e como um agonista fraco nos receptores GABA_A (PEREIRA et al, 2009).

Os nossos resultados mostraram que o carvacrol, na dose de 50 mg / Kg aumentou os níveis de taurina no corpo estriado de camundongos, em relação ao grupo controle.

A glicina (GLI) é um dos principais neurotransmissores inibitórios nas zonas posteriores do sistema nervoso central dos vertebrados (ARAGÓN; LOPEZ-CORCUERA, 2003). Como um neurotransmissor inibitório clássico, a glicina é única, pois pode atuar como um agonista de ambos os GliRs inibitórios e o receptor excitatório NMDA (NMDARs) (XU; GONG, 2010). Carvacrol, na dose de 50 mg / Kg aumentou os níveis de glicina no corpo estriado de camundongos, em relação ao grupo controle.

Aspartato (ASP) é um aminoácido excitatório liberado juntamente com o glutamato pelo Schaffer Collateral Pathway (SC) e giro dentado. Essa liberação é Ca²⁺ dependente e parece servir como um co-transmissor através de sua atividade seletiva em receptores NMDA (WANG; NADLER, 2007).

Aspartato e glutamato existem em atípicas altas concentrações em regiões cerebrais que são críticas para a mediação de atividades cognitivas, tais como o córtex cerebral, giro dentado, hipocampo e estriato (PARK et al, 2000). Além disso, preparações de hipocampo são conhecidas por liberar aspartato juntamente com os aminoácidos glutamato e GABA (WANG; NADLER, 2007).

Os nossos resultados mostraram que a dose mais elevada de carvacrol (50 mg / Kg) foi capaz de aumentar os níveis de ASP no corpo estriado de camundongos, em relação ao grupo controle.

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, os efeitos de carvacrol sobre as

monoaminas e os níveis de aminoácidos, no estriado. Em conclusão, nossos resultados sugerem que carvacrol, na dose de 50 mg / Kg estimula a liberação dos aminoácidos endógenos ASP, TAU, GABA e GLI. Além disso, os níveis de glutamato foram diminuídos com a dose de 25 mg / Kg. Em doses de 25 e 50 mg / Kg, o carvacrol estimula a liberação da monoamina dopamina.

Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a atividade antidepressiva e ansiolítica do carvacrol são dependentes de um aumento nos níveis de dopamina e de GABA no SNC, respectivamente.

A convulsão induzida por pilocarpina é um modelo experimental largamente utilizado para provocar epilepsia do lobo temporal, que é a mais comum forma de epilepsia encontrada clinicamente. Nesse modelo, largas doses de pilocarpina, um agente convulsivo colinomimético, são utilizadas para produzir crises espontâneas recorrentes em roedores, e é caracterizado por uma injúria neuronal semelhante à encontrada em humanos que apresentam epilepsia no lobo temporal. As convulsões induzidas por pilocarpina são particularmente resistentes a terapia com agentes antiepiléticos, de uma forma semelhante à epilepsia do lobo temporal.

Entre as regiões do cérebro, o hipocampo é especialmente susceptível a convulsões induzidas por pilocarpina. Observou-se uma forte correlação entre convulsões induzidas por pilocarpina e danos cerebrais decorrentes de estresse oxidativo.

Estudos prévios reportaram efeitos neuroprotetores de alguns compostos antioxidantes em animais submetidos à convulsão induzida por pilocarpina. Alguns desses compostos são ácido lipóico, alfa-tocoferol e ácido ascórbico (AHMED, 2014).

Foi proposta a hipótese de que anormalidades em certos compostos lipídicos podem desempenhar um papel significativo na depressão (HORROBIN, 1990). Alterações em fosfolipídios e colesterol, que são componentes estruturais da membrana celular cerebral, podem induzir mudanças nas microviscosidade das membranas e,

consequentemente, em vários sistemas neurotransmissores, aos quais estão relacionados à patologia da depressão (BILICI et al, 2001).

Níveis altos de peroxidação lipídica e simultâneo declínio de mecanismos antioxidantes podem levar ao dano celular e consequente estresse oxidativo. A peroxidação lipídica ocorre devido a interações entre radicais livres de diversas origens e ácidos graxos insaturados e lipídios. Este fenômeno envolve um amplo espectro de alterações e a consequente degeneração da membrana celular pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos de desordens no metabolismo lipoproteico. A peroxidação lipídica de estruturas celulares é, portanto, uma consequência da atividade de radicais livres (LEAL et al, 2005).

O malonaldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (MAFRA et al, 1999).

No presente estudo, os níveis de malonaldeído foram medidos em corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao teste da convulsão induzida por pilocarpina. Foram utilizados três grupos: grupo controle, tratado com água emulsificada com tween 80; o grupo tratado com carvacrol na dose de 25mg/Kg e o grupo tratado com carvacrol na dose de 50 mg/Kg. Uma hora após o tratamento oral com estas substâncias, os animais receberam uma injeção de pilocarpina. Os resultados mostraram que carvacrol nas duas doses foi capaz de diminuir significativamente os níveis de MDA em todas as áreas cerebrais analisadas. Estes resultados sugerem um efeito antioxidante do carvacrol, que foi capaz de reverter a peroxidação lipídica provocada pela convulsão induzida por pilocarpina.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa e altamente reativa devido à presença de elétrons desemparelhados. Quando diluído, o NO tem uma meia-vida de menos de 10 segundos, sendo rapidamente oxidado a nitrito e nitrato. O NO liga-se à

hemoglobina e outras proteínas que contém o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas, sendo uma molécula benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual. O NO é um potente vasodilatador e, no SNC, é considerado um neurotransmissor. Devido à sua alta capacidade de difusão, o NO tem sua ação sem a necessidade de receptores de membrana, levando a respostas rápidas e precisas. (SCHMIDT & WALTER, 1994).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Entre os receptores de glutamato, existem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que são encontrados preferencialmente no hipocampo. O NO tem um importante papel na ação dos receptores NMDA. Após o estímulo do neurônio, ocorre liberação do glutamato e posterior ligação aos receptores NMDA. O íon cálcio (Ca^{2+}) é então liberado, levando à produção de nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) e à síntese de NO. O NO pós-sináptico vai então estimular retrogradamente a pré-sinapse. Esse mecanismo é conhecido como LTP (Long-Term Potentiation) (BOHME et al, 1991).

Normalmente, existe um balanço entre a produção e a eliminação do NO e seus metabólitos. Estudos tem reportado que um aumento da peroxidação lipídica pode levar à estimulação de macrófagos e liberação de NO via síntese por iNOS (óxido nítrico sintase induzida). A interação do NO com radicais superóxido levam a formação do peroxinitrito, um potente inibidor da respiração mitocondrial (AHMED, 2014).

No presente trabalho, o pré-tratamento dos animais com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg antes da injeção de pilocarpina levou a uma diminuição dos níveis de nitrito e nitrato no hipocampo em ambas as doses estudadas (25 e 50 mg/Kg). Já no corpo estriado, apenas a dose de 25 mg/Kg teve uma diminuição significativa dos níveis de nitrito e nitrato. No córtex pré-frontal, ambas as doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram diminuição nos níveis de nitrito e nitrato, porém essa diminuição não foi significativa comparada ao grupo tratado apenas com pilocarpina. Esses resultados

também sugerem uma ação antioxidante do carvacrol, especialmente na área cerebral do hipocampo.

Outra importante enzima antioxidante encontrada no sistema nervoso central é a catalase, responsável por converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água. O peróxido de hidrogênio pode se difundir facilmente pelas membranas celulares e reagir com metais de transição, gerando o radical hidroxila (OH^*). O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo (BARREIROS et al, 2006).

A catalase é uma heme proteína citoplasmática encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação de GSH mediana pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Um aumento na atividade da catalase pode ser atribuído ao aumento do metabolismo observado durante as crises convulsivas. Foi relatado que convulsões induzidas por pilocarpina provocam um aumento da expressão e atividade da catalase, como resposta compensatória ao aumento de espécies reativas de oxigênio, de modo a proteger o organismo contra danos neuronais (WILHELM et al, 2011).

As concentrações da enzima catalase também foram mensuradas em grupos de camundongos tratados com água e tween 80 antes de receberem a injeção de pilocarpina, ou em grupos de animais pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg antes do tratamento com pilocarpina. Foram analisadas as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Os níveis de catalase encontrados no córtex pré-frontal e corpo estriado foram menores em animais pré-tratados com carvacrol em ambas as doses, porém essa diferença não foi significativa em comparação ao grupo controle. Já no hipocampo, houve uma diminuição significativa nos níveis de catalase em ambas as doses de carvacrol, comparados ao grupo controle. Esses resultados, assim como os anteriores, sugerem uma ação antioxidante do carvacrol, especialmente na região do hipocampo.

Já foi citado anteriormente que os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas, em particular o DNA e RNA. O nosso organismo apresenta proteções próprias para neutralizar a ação dos radicais livres. Um desses sistemas de proteção presentes no organismo é a glutatona reduzida (GSH) em conjunto com duas enzimas, GSH peroxidase (GPx) e GSH redutase (GR). A GSH está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Pode ser considerada como um dos agentes mais importantes de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões resultantes da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutatona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS et al, 2006).

A depleção do GSH no hipocampo é uma característica da convulsão induzida por pilocarpina e é uma consequência do estresse oxidativo e consequente formação de radicais livres. A depleção da glutatona cerebral pode levar a uma disfunção mitocondrial e a danos neuronais (AHMED, 2014).

No presente estudo, as concentrações de glutatona foram mensuradas em grupos de camundongos tratados com água e tween 80 antes da injeção de pilocarpina e em grupos de animais pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg antes de receberem as injeções de pilocarpina. Foram analisadas as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Houve um aumento significativo nos níveis de GSH encontrados em animais tratados com o carvacrol na dose de 50 mg/Kg nas áreas cerebrais do hipocampo e corpo estriado, em comparação ao grupo controle. Animais tratados com a dose de 25 mg/Kg não apresentaram alterações significativas nos níveis de GSH em comparação ao grupo controle. Esta elevação dos níveis de GSH é mais uma evidência de uma ação neuroprotetora do carvacrol.

A superóxido dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que a SOD-manganês está localizada principalmente nas mitocôndrias. A SOD tem papel antioxidante e catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

No presente estudo, os níveis de SOD foram analisados após o pré-tratamento dos animais com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Foram analisadas as áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Não houve alterações significativas nos níveis de SOD em comparação com o grupo controle em nenhuma das três áreas cerebrais analisadas após o tratamento agudo do carvacrol nas duas doses estudadas.

Os inibidores da recaptação de monoaminas são drogas que bloqueiam o transporte das monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina. Estas drogas tem um longo histórico de uso como antidepressivos e, mais recentemente, para o tratamento da dor (ROSENBERG et al, 2013; SINDRUP et al, 2005; MAIZELS et al, 2005).

Os antidepressivos tricíclicos, juntamente com anticonvulsivantes, são consideradas drogas de primeira linha para o tratamento de dor neuropática. Os antidepressivos podem ser usados como analgésicos em pacientes com dor crônica e não concomitante depressão, embora a dor seja um sintoma comum da depressão, que costuma ser freqüente em pacientes com dor crônica, apoiando a hipótese de que a dor e a depressão compartilham alguns mecanismos bioquímicos comuns (SAWYNOK; REID, 2000; LYNCH, 2000). A analgesia induzida por estas drogas parece ser centralmente mediada, mas evidências consistentes também indicam um mecanismo de ação periférico. Vários mecanismos farmacológicos são apontados como responsáveis por seu efeito antinociceptivo, mas a inibição dos transportadores de monoamina (e, conseqüentemente, a facilitação da inibição descendente dos sistemas de dor) está implicado na base mecanicista.

A bupropiona, um inibidor da recaptação de dopamina, que também inibe a recaptação de noradrenalina, tem mostrado eficácia em casos de tratamento de dor neuropática. Os antidepressivos tricíclicos ainda são os mais utilizados deste grupo para o tratamento de dor neuropática (SEMENCHUK et al, 2001; SANSONE et al, 2008). No modelo de dor neuropática de constrição crônica do nervo, a alodinia é significativamente atenuada por fluoxetina e, particularmente, pela bupropiona (PEDERSEN et al, 2005). Naderi e colaboradores (2014) aplicaram bupropiona nas doses de 30, 90, 120 e 200 mg/Kg três horas antes de submeter grupos de ratos ao teste da formalina. Os resultados mostraram que a bupropiona foi capaz de diminuir significativamente a lambertura da pata na segunda fase do teste da formalina, nas doses estudadas.

A maioria dos estudos de antidepressivos têm-se centrado na sua ação analgésica central (supra-espinal ou raquidiana). No entanto, um mecanismo de ação analgésica periférica também tem sido sugerido. Esta teoria é sustentada devido aos efeitos obtidos após o uso de alguns antidepressivos em vários modelos animais de inflamação e nocicepção, tais como o teste da formalina, carragenina, modelos de artrite crônica induzida por adjuvante de Freund e outros modelos, tais como dor visceral (MICÓ et al, 2006).

Estudos anteriores demonstraram que o inibidor seletivo da recaptação de dopamina (RTI-113 [3β-(4-cloro-fenil)tropano-2β-ácido carboxílico-fenil-ester-hidroclorido], bupropiona e o (RTI-112 [3β-(3-metil-4-cloro-fenil) tropano-2β-ácido carboxílico-metil-ester-hidroclorido]), um inibidor da recaptação tanto de dopamina, serotonina quanto de noradrenalina, foram capazes de bloquear as contorções induzidas por ácido acético em ratos (ROSENBERG et al, 2013).

Os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) não são utilizados para o tratamento da dor e existem poucos estudos experimentais apontando um possível efeito analgésico. Os IMAO são utilizados como último recurso para o tratamento da depressão devido aos seus numerosos e potencialmente graves efeitos secundários. Os inibidores da MAO que não têm efeitos satisfatórios em dor crônica, de acordo com dados clínicos, são: harmalina, iproclozida, iproniazida, isocarboxazida, moclobemida

nialamida, toloxatona e tranilcipromina (MIKA et al, 2013).

Sabendo dos extensos estudos existentes sobre o uso de antidepressivos para o tratamento da dor, inclusive de antidepressivos inibidores da recaptação de dopamina, foi feito um estudo do carvacrol em modelos animais clássicos de nocicepção, tais como contorções induzidas por ácido acético, placa quente e formalina.

O teste das contorções induzidas por ácido acético é um dos modelos mais bem descritos e utilizados para o estudo da atividade antinociceptiva (VOUGTAU et al, 2004; GENE et al, 1998; SALAWU et al, 2008). A contorção abdominal induzida por ácido acético é um teste utilizado para avaliar tanto a atividade central quanto periférica de analgésicos. Foi relatado anteriormente que a redução no número de constrições abdominais pode estar associado com várias drogas, agindo através de diferentes mecanismos, sendo considerado um teste antinociceptivo não específico (ROCHA et al, 2011). Em geral, o ácido acético provoca dor através da liberação de substâncias endógenas como a serotonina, a histamina, prostaglandinas (PGs), bradicininas e substância P (GENE et al, 1998; NGUELEFACK et al, 2006). O método tem sido associado com a produção e liberação de metabólitos do ácido araquidônico via biossíntese de cicloxigenase e prostaglandinas, aumentando os níveis de PGE₂, PGF_{2a} e PGI₂, em fluidos peritoneais, bem como derivados da lipoxigenase (ARAÚJO et al, 2009).

Os nossos resultados indicam que o carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg foi capaz de reduzir o número de contorções em camundongos, mostrando um efeito antinociceptivo. Doses abaixo de 50 mg/Kg não apresentaram atividade antinociceptiva. Para avaliar um possível mecanismo analgésico, foi examinado o efeito da naloxona (um antagonista opióide não-seletivo) no teste das contorções induzidas por ácido acético. A dose de naloxona utilizada (1 mg/Kg, i.p.) no experimento é suficiente para bloquear os receptores opióides, como demonstrado anteriormente em modelos animais (YAKSH, 1997).

No entanto, neste estudo, a naloxona não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva do carvacrol na dose de 100 mg/Kg, o que indica que o efeito analgésico do carvacrol não parece estar envolvido com ativação de receptores opióides.

Com o intuito de investigar um possível mecanismo periférico envolvido na ação antinociceptiva do carvacrol, foi analisado o envolvimento do óxido nítrico (NO). É bem conhecido que o NO e o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) tem um importante papel na nocicepção (PATIL et al, 2003).

O óxido nítrico é um ativador endógeno da guanilil ciclase e provoca um acúmulo de GMPc intracelular (PYNE et al, 1996). Já é bem conhecido o envolvimento do óxido nítrico nos três níveis da via da dor; o periférico, corno dorsal e córtex cerebral (PERIMAL et al, 2011). No entanto, pesquisadores tem relatado um papel tanto nociceptivo quanto antinociceptivo do NO na via de sinalização L-arginina/NO/GMPc em tecidos periféricos (CAMPOS et al, 2007; CHEN et al, 2009; MUCCILLO-BAISCH et al, 2010; NGUELEFACK et al, 2010).

Estudos anteriores realizados no nosso laboratório mostraram que a L-arginina tem uma ação nociceptiva na segunda fase do teste da formalina e é capaz de reverter o efeito antinociceptivo de drogas que agem via NO (ARAÚJO et al, 2009). Com isso, podemos sugerir um possível efeito pró-nociceptivo do NO neste teste. Os resultados demonstraram que o efeito antinociceptivo do carvacrol no teste da cortorção por ácido acético não foi revertido quando utilizado em combinação com a L-arginina (150 mg/Kg), um precursor da síntese de NO.

O modelo da nocicepção induzida pela formalina é um método bem descrito que discrimina a dor nos seus componentes centrais e/ou periféricos. Tem sido relatado que a indução de dor após injeção de formalina em patas de camundongos apresenta uma nocicepção bifásica (CHEN et al, 2009; LOPES et al, 2010). A primeira fase (0-5 minutos após a injeção de formalina) é caracterizada por uma intensa dor neurogênica, começa imediatamente após a injeção e é, provavelmente, um resultado direto da estimulação de nociceptores na pata e reflete uma dor mediada pelo sistema nervosa central. A segunda fase é de dor moderada (20-40 minutos) parece ser causada pela liberação de serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas e, pelo menos, em certa medida, pela

sensibilização dos neurônios nociceptivos centrais (ARAÚJO et al, 2009; MBIANTCHA et al, 2011; COUTO et al, 2011). Analgésicos centrais, tais como narcóticos, inibem ambas as fases, enquanto drogas como esteróides (hidrocortisona, dexametasona) e antiinflamatórios não esteróides (AINES) suprimem principalmente a segunda fase (TRONGSAKUL et al, 2003).

Carvacrol na dose de 100 mg/Kg reduziu significativamente a duração do tempo de lambertura da pata (em segundos) em ambas as fases do teste da formalina. Entretanto, na dose de 50 mg/Kg, carvacrol reduziu significativamente o tempo de lambertura da pata apenas na segunda fase do teste. Para a avaliação de um possível mecanismo nociceptivo no teste da formalina, os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/Kg) ou L-arginina (150 mg/Kg). Os resultados foram similares aos demonstrados no teste das contorções induzidas por ácido acético, tanto a naloxona quanto a L-arginina não foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo do carvacrol na dose de 100 mg/Kg.

O modelo de nocicepção térmica da placa quente é um teste usado para avaliar a atividade antinociceptiva central. Este teste produz, a uma temperatura constante, dois tipos de respostas comportamentais, que são a lambertura da pata e o pulo. Ambos comportamentos são considerados como integrados a uma resposta supraespinhal (CHAPMAN et al, 1985; ESMAEILI-MAHANI et al, 2010; ARSLAN et al, 2010). Grupos de animais foram tratados por via oral com carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg e submetidos ao teste da placa quente. Os animais foram analisados nos tempos 0, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados mostraram que carvacrol, nas duas doses, aumentou o tempo de reação aos 60 minutos. Estes resultados sugerem um possível envolvimento central no efeito antinociceptivo do carvacrol, apesar de que o receptor opióide e o NO não parecem estar relacionados a esse efeito.

Dados na literatura demonstraram que drogas relaxantes musculares, sedativas e psicomiméticas podem mostrar atividade no teste das contorções induzidas por ácido acético e teste da placa quente. Um estudo da ação do carvacrol na dose oral de 50 mg/Kg no teste do campo aberto e do rota rod já havia sido feito anteriormente, mostrando que o carvacrol não alterou a atividade locomotora espontânea no teste do

campo aberto e também não alterou o tempo de queda no teste do rota rod (MELO et al, 2009). Foi então realizado os mesmos testes para analisar um possível efeito do carvacrol nas dose oral de 100 mg/Kg. Os resultados encontrados foram semelhantes aos da dose de 50 mg/Kg.

Nossos resultados mostraram que o carvacrol nas doses estudadas não alterou o tempo de permanência na barra giratória, ao contrário do diazepam (2 mg/kg), que diminuiu o tempo de permanência na barra giratória nas três velocidades utilizadas (5, 15 e 40 rpm). Este resultado sugere que o carvacrol na dose de 100 mg/Kg não apresenta bloqueio neuromuscular periférico, diferenciando-se do diazepam, que na dose de 2 mg/kg apresenta um conhecido efeito relaxante muscular. No teste do campo aberto foram observados os parâmetros locomoção, *rearing* e *grooming*. O carvacrol nas três doses estudadas não alterou a atividade locomotora dos animais observados. Já o diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu a atividade locomotora, indicando um efeito sedativo comum aos benzodiazepínicos.

De acordo com alguns autores, um aumento no número de *grooming*, especialmente em roedores, pode estar relacionado a um aumento do estresse e da ansiedade (DRAGO et al., 1999; KALUEFF et al., 2004). Estudos tem demonstrado que a neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado e no núcleo accumbens parece representar um papel importante no comportamento de *grooming* (DRAGO et al., 1999; SERAFIM; FELICIO, 2001).

Chindo et al. (2003) sugerem que a atividade locomotora e o *rearing* são indicativos de excitabilidade do SNC e que uma diminuição destes parâmetros sugere uma atividade sedativa. O carvacrol não alterou o número de *rearing*, mas diminuiu o número de *grooming* nas doses de 100 mg/Kg. Já o diazepam, na dose estudada, reduziu tanto o número de *rearing* quanto o número de *grooming*. Tais resultados sugerem que o carvacrol não apresenta uma ação sedativa, pois não alterou a atividade locomotora ou o número de *rearing* e diminuiu o número de *grooming* na dose de 100 mg/Kg. Já o diazepam alterou todos os três parâmetros analisados, o que confirma a suas propriedades ansiolítica e sedativa.

Como já foi citado anteriormente, o carvacrol é usado em baixas concentrações como um flavorizante e conservante na indústria alimentícia (SUNTRES et al, 2015). Apesar de seu uso, pouco se sabe sobre potenciais efeitos tóxicos do carvacrol.

Llana-Ruiz-Cabello e colaboradores (2014) realizaram um estudo utilizando células Caco-2, derivadas de carcinoma de colon humano. Carvacrol foi usado na dose de 460 μ M e os resultados mostraram que o uso do carvacrol nessa dosagem provocou dano no DNA, mais especificamente, danos nas bases de purina.

Conhecendo os poucos estudos que avaliam a toxicidade do carvacrol, foi feita uma análise da toxicidade oral aguda conforme o Guia OECD-423/2001. Foram utilizados dois grupos compostos por 3 animais cada: um grupo controle e um grupo que recebeu tratamento oral com carvacrol na dose de 2000 mg/Kg. Uma hora após o tratamento, os animais foram observados durante 5 min na caixa acrílica do campo aberto. Depois, os animais foram observados por 6h seguidas. Os animais foram então observados até o décimo quarto dia, utilizando-se um campo aberto. O peso dos animais também foi aferido diariamente. Todos os animais tratados agudamente com a dose de 2000 mg/Kg apresentaram letargia e um animal veio a óbito no segundo dia após o tratamento. Os demais animais não apresentaram nenhuma outra alteração e sobreviveram até o 14º dia.

No décimo quarto dia os animais foram sacrificados e foram retirados cérebro, rins e fígado para análise histológica, a fim de averiguar possíveis danos aos órgãos internos. Nas preparações das lâminas com os tecidos dos respectivos órgãos estudados (fígado, cérebro e rins) não houve alterações, nem sinais de processo inflamatório ou alterações na ultraestrutura dos órgãos analisados microscopicamente.

Como ocorreu a morte de 1 animal com a dose de 2000 mg/Kg, o protocolo OECD (no. 423) recomenda repetir o experimento com a dose de 300mg/Kg. Os animais foram observados da mesma forma que os grupos anteriores, não apresentaram alterações, nem perda de peso e todos sobreviveram até o 14º dia (TABELAS 8 e 9).

No 14º. dia, foi realizado o mesmo procedimento para preparo dos órgãos do grupo de animais da dose anterior. Semelhantemente aos resultados observados com a

dose de 2000 mg/Kg, não foram encontradas alterações na ultraestrutura dos órgãos analisados microscopicamente.

De acordo com o protocolo OECD 423, a classificação do carvacrol é de categoria 4, apresentando $300 \text{ mg/kg} < \text{DL50} < 2000 \text{ mg/Kg}$.

Embora o nosso estudo não tenha apontado danos aos órgãos internos dos animais, a realização de estudos complementares para avaliar o potencial tóxico do carvacrol é de suma importância, visto que esta substância é utilizada na indústria alimentícia e, mesmo sendo utilizada em doses baixas, o uso crônico pode acarretar efeitos nocivos ainda desconhecidos.

Os experimentos realizados foram compatíveis com os resultados já encontrados em estudos anteriores do carvacrol. A análise dos níveis de monoaminas e aminoácidos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) reforçaram os resultados de experimentos comportamentais realizados anteriormente, que relacionaram a ação antidepressiva do carvacrol com uma ativação do sistema dopaminérgico e a ação ansiolítica com uma ação no sistema gabaérgico. Vários estudos já demonstraram efeitos antioxidantes do carvacrol, porém a ação antioxidante a nível de sistema nervoso central (SNC) ainda era desconhecida. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o carvacrol também apresentou um efeito antioxidante no SNC de camundongos, em especial na área cerebral do hipocampo. O estudo feito para avaliar a toxicidade aguda do carvacrol demonstrou que nas doses estudadas, o carvacrol não alterou a estrutura histológica dos rins, cérebro e fígado, o que é uma evidência de que o carvacrol nas doses terapêuticas não provoca nenhum dano significativo ao organismo. Através deste estudo, ficou evidente uma ação antinociceptiva do carvacrol, assim como em muitos antidepressivos já estudados anteriormente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- ✓ Os animais tratados agudamente com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram um aumento nos níveis de dopamina na área cerebral do corpo estriado, como demonstrado após análise das áreas cerebrais pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- ✓ Os camundongos que receberam tratamento agudo de carvacrol na dose de 50 mg/Kg apresentaram um aumento nos níveis de aspartato, taurina, GABA e glicina na área cerebral do corpo estriado. Já os animais tratados com a dose de 25 mg/Kg tiveram uma diminuição nos níveis de glutamato em análise do corpo estriado através do método do HPLC.
- ✓ Para a análise da atividade antioxidante do carvacrol, os animais que foram pré-tratados com carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg antes de receberem uma injeção de pilocarpina apresentaram uma diminuição dos níveis de malonildialdeído (MDA) nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado.
- ✓ Os grupos de camundongos que foram pré-tratados com carvacrol na dose de 25 mg/Kg antes de receberem uma injeção de pilocarpina apresentaram uma diminuição nos níveis de nitrito-nitrato nas áreas cerebrais do corpo estriado e hipocampo. Já os que foram pré-tratados com a carvacrol na dose de 50 mg/Kg antes de receberem pilocarpina, apresentaram uma diminuição dos níveis de nitrito-nitrato apenas no hipocampo.
- ✓ Os camundongos que receberam tratamento agudo de carvacrol nas doses de 25 e 50 mg/Kg antes de receberem uma injeção de pilocarpina apresentaram uma diminuição nos níveis de catalase na área cerebral do hipocampo.

- ✓ Os animais que receberam tratamento agudo de carvacrol na dose de 50 mg/Kg antes de receberem injeção de pilocarpina apresentaram um aumento nos níveis de GSH nas áreas cerebrais do corpo estriado e hipocampo.
- ✓ Para a avaliação da atividade antinociceptiva do carvacrol foi realizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Neste teste, os animais tratados agudamente com carvacrol nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram uma diminuição no número de contorções.
- ✓ No teste da nocicepção térmica da placa quente, os animais tratados com doses agudas de 50 e 100 mg/Kg de carvacrol apresentaram um aumento no tempo de latência para exibir comportamento nociceptivo no tempo de 60 min.
- ✓ No modelo de nocicepção induzida pela formalina, os animais tratados com carvacrol na dose de 50 mg/Kg apresentaram uma diminuição do tempo de lambadura da pata apenas na primeira fase do teste. Já os animais tratados com carvacrol na dose de 100 mg/Kg apresentaram uma diminuição do tempo de lambadura tanto na primeira quanto na segunda fase de teste.
- ✓ O pré-tratamento dos animais com naloxona ou L-arginina não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo promovido pelo carvacrol na dose de 100 mg/Kg no teste das contorções induzidas por ácido acético.
- ✓ No modelo da nocicepção induzida pela formalina, o pré-tratamento dos camundongos com naloxona ou L-arginina também não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo promovido pelo carvacrol na dose de 100 mg/Kg na primeira e segunda fase do teste.
- ✓ Foi realizado o teste do campo aberto para a avaliação da atividade locomotora dos animais após tratamento agudo com carvacrol na dose de 100 mg/Kg. O carvacrol na dose estudada não alterou a atividade locomotora espontânea nem o rearing, porém diminuiu o número de grooming.

- ✓ Para a avaliação de uma possível ação relaxante muscular, foi realizado o teste do *rota rod* em camundongos tratados com carvacrol na dose de 100 mg/Kg. Carvacrol na dose estudada não alterou o tempo de permanência na barra giratória em nenhuma das rotações analisadas.

- ✓ Para a avaliação da toxicologia aguda do carvacrol, grupos de animais foram tratados com doses de carvacrol de 300 e 2000 mg/Kg. A análise histológica do fígado, rins e cérebro não mostrou nenhuma alteração desses órgãos após o tratamento com carvacrol. De acordo com o protocolo OECD 423, a classificação do carvacrol é a de categoria 4.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Os experimentos realizados reforçam a teoria de que o carvacrol apresenta um efeito ansiolítico provavelmente relacionado com o sistema gabaérgico e um efeito antidepressivo provavelmente relacionado com o sistema dopaminérgico. O carvacrol não apresenta efeito sedativo ou relaxante muscular. Carvacrol também apresentou uma ação antioxidante no sistema nervoso central, principalmente na área do hipocampo. O estudo da toxicidade aguda do carvacrol não mostrou alterações histológicas significativas, o que sugere que o uso clínico do carvacrol é viável. O carvacrol também apresentou uma importante ação antinociceptiva, que não parece estar ligada ao sistema opióide ou ao sistema nitrérgico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABU-LAFI, S. *et al.* Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3914-3918, 2008.
- AESCHBACH, R. *et al.* Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, p. 31-36, 1994.
- AGNOLI L, CARLI M. Synergic interaction of dopamine D₁ and glutamate N-Methyl-D-Aspartate receptors in the rat dorsal striatum controls attention. **Neuroscience** v. 185, p. 39-49, 2011.
- AHMED MAE. Neuroprotective Effects of Idebenone Against Pilocarpine-Induced Seizures: Modulation of Antioxidant Status, DNA Damage and Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Rat Hippocampus. **Neurochem Res** v. 39, p. 394-402, 2014.
- AHMED-FARAG, S. EL D.; AZIZ, N. H.; ATTIA, El S. A. Effect of irradiation on the microbiological status and flavoring materials of selected spices, *Z. Lebensmittel-Untersuchung und Forsch.*, v. 201, p. 283–288, 1995.
- AMARA, S. G.; KUHAR, M. J. Neurotransmitter transporters: Recent progress. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 16, p. 73-93, 1993.
- ANDRADE, L.H.S.G.; VIANA, M.C.; SILVEIRA, C.M. Epidemiologia dos transtornos psiquiátricos na mulher. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, v. 33, p. 43-54, 2006.
- ANDREASEN, J.T. *et al.* Antidepressant-like effects of nicotinic acetylcholine receptor antagonists, but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. **J. Psychopharmacol.**, v. 23, p. 797-804, 2009.
- ANSSEAU, M. *et al.* Objective: remission of depression in primary care: The Oreon Study. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 19, p. 169-176, 2009.
- ARAGÓN C, LÓPEZ-CORCUERA B. Structure, function and regulation of glycine neurotransporters. **Eur J Pharmacol** v. 479, p. 249–262, 2003.

ARAÚJO FLO *et al.* Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol** v.41, p. 337-344, 2009.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205–235, 1973.

ARFA, A. B. *et al.* Coating papers with soy protein isolates as inclusion matrix of carvacrol. **Food Res. Int.**, v. 40, p. 22-32, 2007.

ARORA, D.S.; KAUR, J. **Antimicrobial activity of spices.** *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 12, p. 257-262, 1999.

ARREBOLA, M .L. *et al.* Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 67–72, 1994.

ARSLAN R *et al.* Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 131, p. 28–32, 2010.

AYDIN, S.; BASARAN, A. A.; BASARAN, N. 460 The protective effects of thymol and carvacrol against oxidative DNA damage. **Toxicol. Lett.**, v. 144, p. 124, 2003.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiol.**, v. 21, p. 33-42, 2004.

BAKER, D. D. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BARKIN, R. L., BECKERMAN, M., BLUM, S. L., CLARK, F. M., KOH, E. K., & WU, D. S. Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) be prescribed to the older adult? **Drugs & Aging**, v. 27, p.775–789, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química nova** v. 29, p. 113-123, 2006.

BASSO, A.M. et al. Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, p. 1257-1268, 2005.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer, ***Mol. Aspects Med.***, v. 21, p. 167–223, 2001.

BILICI M., EFE H., KOROGLU A. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. ***Journal of Affective Disorders***. v. 64, p. 43-51, 2001.

BIMCZOK, D. et al. Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells *in vitro*. ***Toxicol. in Vitro***, v. 22, p. 652-658, 2008.

BÖHME GA, BON C, STUTZMANN JM, DOBLE A, BLANCHARD JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. ***Eur J Pharmacol***. v.199, p. 379–381, 1991.

BORGES, K. B. et al. Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid-phase extractions in human plasma. ***Talanta***, v. 78, p. 233-241, 2008.

BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

BURKE R.E.; GREEBAUN D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptorsubtypes in rat brain. ***Journal Neurochemical***. v.49, p. 592-596, 1987.

BURT, A. S. et al. Inhibition of *Salmonella enteric* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. ***Int. J. Food Microbiol.***, v. 119, p. 346-350, 2007.

BURT, S. A. et al. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 73, p. 4484-4490, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. ***Int. J. Food Microbiol.***, v. 942, p. 223-253, 2005.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS M.D *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 114, p.161–168, 2007.

CANBEK, M. *et al.* Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. **Phytomedicine**, v. 15, p. 447-452, 2008.

CARLINI, E. A. *et al.* Pharmacology of lemon-grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorbenzapam. **Rev. Assoc. Bras. Psiquiatr.**, v.1, p. 25-31, 1979.

CASSIDY, J. *et al.* Generalized Anxiety Disorder: Connections With Self-Reported Attachment. **Behav. Ther.**, v. 40, n. 1, p. 23-38, 2009.

CEBALLOS-PICOT, TRIVIER J., NICOLE A., SINET P.M., THEVENIN M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. **Clin. Chem.**, v. 38, p. 66-70, 1992.

CHAIBI, A. *et al.* Inhibition of germin and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. **Food Microbiol.**, v. 14, p. 161-174, 1997.

CHAMI, N. *et al.* Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 217-226, 2004.

CHANCE B.; MAEHLI A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.** v. 2, p. 764-768, 1955.

CHAPMAN CR *et al.* Pain measurement: an overview. **Pain** v. 22, p. 1–3, 1985.

CHAVES, A.V. *et al.* Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 145, p. 396-408, 2008.

CHEN YF *et al.* Antinociceptive activity of Paederosidic Acid Methyl Ester (PAME) from the n-butano fraction of *Paederia scandens* in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 93, p. 97–104, 2009.

CHEN, C. Y.; LIU, C. Y.; LIANG, H. Y. Comparison of patient and caregiver assessments of depressive symptoms in elderly patients with depression. **Psychiatry Res.**, v. 166, p. 69-75, 2009.

CHINDO, B. A. *et al.* Central nervous system activity of the methanol extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **J. Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 131-137, 2003.

CHRISTMAS, D.; HOOD, S.; NUTT, D. Potential novel anxiolytic drugs. **Current Pharm. Design**, v. 14, p. 3534-3546, 2008.

CHU, F.-F., ESWORTHY, R. S., DOROSHOW, J. H., DOAN, K., LIU, X.-F. Expression of glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. **Blood** v. 79, p. 3233-3238, 1992.

COBACHO N., DE LA CALLE JL., GONZALEZ-ESCALADA JR., PAINO CL. Levodopa analgesia in experimental neuropathic pain. **Brain Res Bull.** v. 83, p. 304-309, 2010.

COLLIER, H.O.J.; *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mouse. **Br.J. Phar.** v. 32, p. 295-310, 1968.

CONKLIN, L.R.; STRUNK, D. R.; FAZIO, R.H. Attitude formation in depression: Evidence for deficits in forming positive attitudes. **J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry**, v. 40, p. 120-126, 2009.

COUTO V.M. *et al.* Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **J Ethnopharmacology** v. 134, p. 348–353, 2011.

De VENCENZI, M. *et al.* Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DEMPSEY, J. P. *et al.* Treatment of social anxiety with paroxetine: mediation of changes in anxiety and depression symptoms. **Comprehensive Psychiatry**, v. 50, p. 135-141, 2009.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; MADELEINE, P. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharm. Acta Helvetiae**, v. 69, p. 25-28, 1994.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D₁ and D₂ receptor-deficient mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 125-131, 1999.

DRAPER H.H; HADLEY M. Malonildialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v. 186, p. 421-431, 1990.

DUNBAR, P.R., HILL, J., NEALE, T.J., MELLISOP, G.W. Neopterin measurement provides evidence of altered cell-mediated immunity in patients with depression, but not with schizophrenia. **Psychological Medicine** v. 22, p. 1051–1057, 1992.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T. S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

DUNLOP BW, Nemeroff, CB. The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. **Arch Gen Psychiatry** v. 64, p. 327-337, 2007.

DWYER, J. M. *et al.* Acid sensing ion channel (ASIC) inhibitors exhibit anxiolytic-like activity in preclinical pharmacological models. Psychopharmacology, v. 203, p. 41-52, 2009.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D.J. Synthetic analgesics lidithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. **J Pharmac Exp Ther.** v. 107, p. 385-393, 1953.

ELCHURI S. *et al.* CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. **Oncogene.** v. 24, p. 367-80, 2005.

ERSEK M., CHERRIER M., OVERMAN S., IRVING G. The cognitive effects of opioids. **Pain Manage Nurs.** v. 5, p. 75-93, 2004.

ESMAEILI-MAHANI S. *et al.* Olive (*Olea europaea L.*) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. **Journal of Ethnopharmacology** v. 132, p. 200–205, 2010.

FEREN, S.; KATYAL, A.; WALSH, J.K. Efficacy of Hypnotic Medications and Other Medications Used for Insomnia. **Sleep Med. Clin.**, v. 1, p. 387-397, 2006.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** v. 43, p. 61-8, 1997.

FIELDER E.P.; MARKS M.J.; COLLINS A.C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **Journal Neurochemical**. v.49, p. 983-990, 1987.

FILHO RF, ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras v.46, p. 265-71, 2000.

FOWLER T.O., DURHAM C.O., PLANTON J., EDLUND B.J. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the older adult. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**. v. 26, p. 414-423, 2014.

GALDINO, P. M. *et al.* Antidepressant-like effect of *lafoensia pacari* a. St.-hil. Ethanolic extract and fractions in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 581-585, 2009.

GALECKI, P. *et al.* Relation between functional polymorphism of catalase gene and recurrent depressive disorder. **Neuro Endocrinol. Lett.** v. 30, p. 357-362, 2009.

GALOFRÉ, M.; BABOT, Z.; GARCÍA, D. A.; IRAOLA, S.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; FORSBY, A.; SUÑOL, C. GABA_A receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 32, n. 1, p. 52-61, Jan./Feb 2010.

GARAKANI, A.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **Mt Sinai J. Med.**, v. 73, n. 7, p. 941-949, 2006.

GAZALLE, F. K.; HALLAL, P. C.; LIMA, M. S. Depressão na população idosa: os médicos estão investigando? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 26, p. 145-149, 2004.

GENE RM *et al.* *Heteroteca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effects. **J Ethnopharmacol** v. 60, p. 157-162, 1998.

GIORGIO TRINCHIERI. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 3, p. 133-146.

GÓTH L, RASS P AND MADARASI I. A novel catalase mutation detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, nucleotide sequencing, and western blot analyses is responsible for the type C of Hungarian acatalasemia. **Electrophoresis** v. 22, p. 49-51, 2001.

GREEN L.C.; TANNENBAUM S.R.; GOLDMAN P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. v. 212, p. 56-58, 1981.

GUILLEN, F. *et al.* Improvement of the overall quality of table grapes stored under modified atmosphere packaging in combination with natural antimicrobial compounds. **J. Food Sci.**, v. 72, p. S185–S190, 2007.

GUIMARÃES AG, OLIVEIRA GF, MELO MS *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Bas Clin Pharmacol Toxicol** v. 107, p. 949–957, 2010.

GUMARÃES, J. M. N.; CALDAS, C. P. A influência da atividade física nos quadros depressivos de pessoas idosas: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9, p. 481-492, 2006.

HACHE G., GUIARD BP., NGUYEN TH., *et al.* Antinociceptive activity of the new triple reuptake inhibitor NS18283 in a mouse modelo f chemotherapy-induced neuropathic pain. **Eur J Pain**. doi: 10.1002/ejp.550

HALLMAN H.; SUNDSTRÖM E.; JONSSON G. Effects of the noradrenaline neurotoxin DSP4 on monoamine neurons and their transmitter turnover in rat CNS. **J Neural Transm**. v. 60, p. 89-102, 1984.

HAYES DJ, Greenshaw AJ. 5-HT receptors and reward-related behaviour: A review. **Neurosci Biobehav Rev** v. 35, p. 1419–1449, 2011.

HELLIÓN-IBARROLA, M. C. *et al.* The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p. 400-408, 2006.

HENNINGSEN, K. *et al.* Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. **Behav. Brain Res.**, v. 198, p. 136-141, 2009.

HORROBIN, D.F. Essential fatty acids, psychiatric disorders and neuropathies. In: Horrobin, D.F. (Ed.), *Omega-6-Essential Fatty Acids, Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine*. References Wiley-Liss, New York, pp. 20–53. 1990.

HUNSKAAR S.; *et al.* Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Meth.** v. 14, p. 69-76, 1985.

IPEK, E. *et al.* Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chem.**, v. 93, p. 551-556, 2005.

JASMIN L., WU MV., OHARA PT. GABA puts a stop to pain. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.** v. 3, p. 487-505, 2004.

KALUEFF, A.V. *et al.* Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. **Physiol. Behav.**, v. 82, p. 405-409, 2004.

KAROLEWICZ, B.; PAUL, I.A. Group Housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swimming and tail suspension tests. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 415, p. 197-201, 2001.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KAWAHARA K, HOHJOH H., INAZUMI T, TSUCHIYA S., SUGIMOTO Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochim Biophys Acta** doi: 10.1016/j.bbailip.2014.07.008.

KEELEY, M. L.; STORCH, E.A. Anxiety disorders in youth. **J. Pediatr. Nurs.**, v. 24, p. 26-40, 2009.

KIMBRELL T.A., KETTER T.A., GEORGE M.S. *et al.* Regional cerebral glucose utilization in patients with range of severities of unipolar depression. **Biol Psychiatry**. v. 51, p. 237-252, 2002.

KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol, and piperine. **J. Agri. Food Chem.**, v. 54, p. 3528–3534, 2006.

KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Transtorno de ansiedade em mulheres: gênero influencia o tratamento? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 27, p. 43-50, 2005.

KISKÓ, G.; ROLLER, S. Carvacrol and p-cymene inactive *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 1-9, 2005.

KNOWLES, J.R. *et al.* Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 797-803, 2005.

KONNOPKA, A.; LEICHSENDRING, F.; LEIBING, E.; KÖNIG, H. H. Cost-of-illness studies and cost-effectiveness analyses in anxiety disorders: A systematic review. **J. Affective Disord.**, v. 114, n. 1/3, p. 14-31, 2009.

KOPARAL, A. T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. **Cytotechnology**, v. 43, p. 149-154, 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.**, v.18, p. 412-417, 1959.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, p. 894-902, 2008.

KUBERA, M., HOLAN, V., MATHISON, R., MAES, M. The effect of repeated amitriptyline and desipramine administration on cytokine release in C57BL/6 mice. **Psychoneuroendocrinology**. v. 25, p. 785– 797, 2000.

KUNLE, O. *et al.* Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v. 10, p. 59-61, 2003.

LACROIX, M. *et al.* The influence of atmosphere conditions on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* radiosensitization in irradiated ground beef containing carvacrol and tetrasodium pyrophosphate. **Rad. Physics Chem.**, v. 71, p. 61-64, 2004.

LAGOURI, V., *et al.* Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. **Z. Lebensm-Unters –Forsch**, v. 197, p. 20–23, 1993.

LEAL LKAM; NOBRE JÚNIOR HV; CUNHA GMA *et al.* Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters* v. 388, p. 86-90, 2005.

LEAMAN, T. L. Anxiety disorders. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 26, p.197-210, 1999.

LI Y, HUANG T-T, CARLSON EJ, MELOV S, *et al.* Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat Genet**, v. 11, p. 376 –381, 1995.

LIMA, M.S. Epidemiologia e impacto social. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 21.p. 1-5, 1999.

LIOLIOS, C. C. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chem.**, v. 112, p. 77-83, 2009.

LLANA-RUIZ-CABELLO M; GUTIÉRREZ-PRAENA D; PICHARDO S, *et al.* Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food Chem Toxicol* v. 64, p. 281-90, 2014.

LOONEY J.M; CHILDS H. M. The lactic acid and glutathione content of the blood of the schizophrenic patients. **J Clin Invest**. v. 13, p. 963-968, 1934.

LOPES L.S. *et al.* Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 43, p. 1184-1192, 2010.

LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDAL R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

LYDIARD B. The role of GABA in anxiety disorders. **J Clin Psychiatry** v. 64, p. 21-27, 2003.

LYNCH ME. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. **J Psychiatry Neurosci** v. 26, p. 30-6, 2001.

MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 33, p. 642-650, 2009.

MAEHLY A.C; CHANCE B. The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem Anal.** v. 1, p. 357-359, 1954.

MAES M *et al.* Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defences in that illness. **J Affect Disord** v. 58, p. 241–246, 2000.

MAES M, BOSMANS E, MELTZER HY, SCHARPE S, SUY E. Interleukin-1 β : A putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? **Am J Psychiat** v. 150, p. 1189–1193, 1991.

MAES M, SCHARPE S, MELTZER HY, *et al.* Increased neopterin and interferon- γ secretion and lower availability of L-tryptophan in major depression: Further evidence for an immune response. **Psychiat Res** v. 54, p. 143–160, 1994

MAES M., GALECKI P., CHANG Y.S., BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** v. 35, p. 676-692, 2011.

MAFRA D, ABDALLA DSP, COZZOLINO SMF. Lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. **Rev Nutr Campinas** v. 12, p. 205-212, 1999.

MAIZELS M, MCCARBERG B. Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. **American Family Physician** v. 71, p. 483-490, 2005.

MALONE RA. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In Warner H (org.) *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin: Springer-Verlag, p. 24-53, 1977.

MANJANI D., PAUL D.B., KUNNUMPURATH S., KAYE A.D., VADIVELU N. Availability and Utilization of Opioids for Pain Management: Global Issues. **Ochsner J.** V.14, p. 208-15, 2014.

MARTIN, D.; QUIRINO, J.; MARI, J. Depression among women living in the outskirts of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, p. 591-597, 2007.

MARTÍNEZ-ROMERO, D. *et al.* Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 115, p. 144-148, 2007.

MATOS, F.J.A. *et al.* Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillis* H.B.K. (Verbenaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, p. 666-668, 1999.

MBIANTCHA M *et al.* Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Extracts from the Bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* (Dioscoreaceae) in Mice and Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine doi:10.1155/2011/912935, 2011.

MELLO A.H. *et al.* Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. **Metab Brain Dis.** v. 29, p. 691–699, 2014.

MELO F.H.C et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 24, p. 437-443, 2010.

MELO F.H.C. et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 3, p. 362-367, 2011.

MELO, C.T.V. *et al.* Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 451-454, 2006.

MIAO, H. et al. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathology**, v. 163, p. 137-143, 2007.

MICHIELS, J. et al. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and *trans*-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Sci.**, v. 109, p. 157-160, 2007.

MICÓ JA, ARDID D, BERROCOSO E, ESCHALIER A. Antidepressants and pain. **TRENDS in Pharmacological Sciences** v. 27, p. 344-354, 2006.

MIKA J, ZYCHOWSKA M, MAKUCH W, ROJEWSKA E, PRZEWLOCKA B. Neuronal and immunological basis of action of antidepressants in chronic pain-clinical and experimental studies. **Pharmacological Reports** v. 65, p. 1611-21, 2013.

MIKOVA O, YAKIMOVA R, BOSMANS E, KENIS G, MAES M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 11, p. 203-8, 2001.

MISSALE C., NASH SR., ROBINSON SW., JABER M., CARON MG. Dopamine receptors: From structure to function. **Physiol Rev.** v. 78, p. 189-225, 1998.

MOUNTS, K. O. Screening for Maternal Depression in the Neonatal ICU. **Clin. Perinatol.**, v. 36, p. 137-152, 2009.

MOYLAN S. et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 45, p. 46-62, 2014.

MUCCILLO-BAISCH AL, Parker AG, Cardoso GP, Cezar-Vaz MR, Soares MC. **Evaluation of the analgesic effect of aqueous extract of Brugmansia suaveolens flower in mice: possible mechanism involved.** **Biol Res Nurs.** v. 11, p. 345-50, 2010.

MULDER, R. T. et al. Eighteen months of drug treatment for depression: Predicting relapse and recovery. **J. Affective Dis.**, v. 114, p. 263-270, 2009.

MULINACCI, M. et al. H-NMR NOE and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes. **Int. J. Pharm.**, v. 128, p. 81-88, 1996.

NADERI S, PAKDEL FG, OSALOU MA, CANKURT U. Acute systemic infusion of bupropion decrease formalina induced pain behavior in rat. **Korean J of Pain** v. 27, p. 118-124, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NGHELEFACK TB *et al.* Analgesic and anticonvulsant effects of extract from leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **J Ethnopharmacol** v. 106, p. 70-75, 2006.

NHU-TRANG, T. T.; CASABIANCA, H.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1132, n. ½, p. 219-227, 2006.

OAK JN *et al.* The dopamine D4 receptor: one decade of research. **Eur J Pharmacol** v. 405, p. 303–327, 2000.

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method. <http://www.oecd.org/publications>. Paris: Head of Publications Service.

PARK CH *et al.* Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. **Toxicity letters** v. 115, p. 117-125, 2000.

PATEL AB *et al.* Glutamine is the major precursor for GABA synthesis in rat neocortex in vivo following acute GABA-transaminase inhibition. **Brain Res** v. 919, p. 207–220, 2001.

PATIL CS *et al.* Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antnociception. **Pharmacology** v. 69, p. 183-189, 2003.

PEDERSEN LH, NIELSEN AN, BLACKBURN-MUNRO G. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology** v. 182, p. 551-561, 2005.

PEDERSEN LH., NIELSEN AN., BLACKHUM-MUNRO G. Antinociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 551-561, 2005.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 24, p. 341-50, 2010.

PEREIRA EC *et al.* Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. **Neurosc Lett** v. 454, p. 139–142, 2009.

PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 68, p. 141-148, 2001.

PERIMAL E.K *et al.* Zerumbone-Induced Antinociception: Involvement of the L-Arginine-Nitric Oxide-cGMP -PKC-K⁺ATP Channel Pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** v. 108, p. 155–162, 2011.

POL, I. E.; KROMMER, J.; SMID, E. D. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 3, p. 55-61, 2002.

PYNE NJ *et al.* cGMP signal termination. **Biochem Soc Trans** v. 24, p. 1019-1022, 1996.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect *Nepeta persica* Boiss. in mice. **eCAM**, v. 2, p. 181-186, 2008.

RAJKOVIC, A. *et al.* Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. **Food Microbiol.**, v. 22, p. 189-197, 2005.

RAMANA, R. *et al.* Remission and relapse in major depression: a two-year prospective follow-up study. **Psychol. Med.**, v. 25, p. 1161–1170, 1995.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

REARDON, L. E.; LEEN-FELDNER, E. W.; HAYWARD, C. A critical review of the empirical literature on the relation between anxiety and puberty. **Clin. Psychol. Rev.**, v. 29, p. 1-23, 2009.

RÉUS G. Z. *et al.* Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. **Metab Brain Dis** DOI 10.1007/s11011-014-9602-8

REZIN G.T., AMBONI G., ZUGNO A.I., QUEVEDO J., STRECK E.L. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. **Neurochem. Res.** V. 34, p. 1021-1029, 2009.

ROCHA NF *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** v. 384, p. 525-33, 2011.

ROSEN, J. B. *et al.* Analysis of behavioral constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: A model for animal phobias. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 32, p. 1267-1276, 2008.

ROSENBERG MB, CARROLL FI, NEGUS SS. Effects of monoamine reuptake inhibitors in assays of acute pain-stimulated and pain-depressed behavior in rats. **The Journal of Pain** v. 14, p. 246-259, 2013.

RUSH, A. J. *et al.* Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. **Am. J. Psychiatry**, v. 163 p. 1905–1917, 2006.

SALAWU OA *et al.* Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and antiplasmodial effects of the methanolic extract of *Crocopteryx febrifuga*. **J Medicinal Plants Research** v. 2, p. 213-218, 2008.

SAMUEL D *et al.* Involvement of the glutamatergic metabotropic receptors in the regulation of glutamate uptake and extracellular excitatory amino acids levels in the striatum of chloral hydrate-anesthetized rats. **Brain Res** v. 739, p. 156-162, 1996.

SANDKÜHLER J. **Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia**. *Physiol Rev.* v. 89, p. 707-58, 2009.

SANSONE RA., SANSONE LA. Pain, Pain, Go Away: Antidepressants and Pain Management. **Psychiatry (Edgemont)**, v. 5, p. 16-19, 2008.

SAWYNOK J, REID A. Antinociception by tricyclic antidepressants in the rat formalina test: differential effects on different behaviours following systemic and spinal administration. **Pain** v. 93, p. 51-59, 2001.

SCHMIDT HHHW, WALTER U. NO at work. **Cell** v. 78, p. 919-925, 1994.

SEDLAK J.; LINDSAY R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman reagent. **Anal Biochem.** v. 25, p. 192-205, 1988.

SEIDEL, A., AROLT, V., HUNSTIGER, M., RINK, L., BEHNISCH, A., KIRCHNER, H. Cytokine production and serum proteins in depression. **Scand. J. Immunol.** v. 41, p. 534– 538, 1995.

SEMENCHUK MR, SHERMAN S, DAVIS B. Double-blind, randomized trial of bupropion SR for the treatment of neuropathic pain. **Neurology** v. 57, p. 1583-88, 2001.

SERAFIM, A. P.; FELÍCIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

SHIMODA, K. *et al.* Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2256-2261, 2006.

SILVA, M. I. G. *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 88, p. 141–147, 2007.

SINDRUP SH, OTTO M, FINNERUP NB, JENSEN TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** v. 96, p. 399-409, 2005.

SITGES M *et al.* Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. **Brain Res** v. 854, p. 48-56, 2000.

SLAMENOVA, D. et al. Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H₂O₂. **Neoplasma**, v. 55, p. 394-9, 2008.

SMITH, A.J.; SIMPSON, P.B. Methodological approaches for the study of GABA_A receptor pharmacology and functional responses. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 377, p. 843-851, 2003.

SONAVANE, G. S. et al. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 239-244, 2002.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SUN, Y.; OBERLEY L.W; LI Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin. Chem.** v. 34, p. 497-500, 1988.

SUNTRES ZE; COCCIMIGLIO J; ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 55, p. 304-318, 2015.

SZEBENI A et al. Shortened telomere length in white matter oligodendrocytes in major depression: potential role of oxidative stress International. **Journal of Neuropsychopharmacology**, doi:10.1017/S1461145714000698

SZUSTER-CIESIELSKA A. et al. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v. 32, p. 686-694, 2008.

TIERNEY AJ. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. **Comp Biochem Physiol A Physiol** v. 128, p. 791-804, 2001

TRONGSAKUL S et al. The analgesic, antipyretic and antiinflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **J Ethnopharmacol** v. 85, p. 221–225, 2003.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 64, p. 373-378, 2001.

UMEZU, T.; MORITA, M. Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 91, p. 125–35, 2003.

UYANOGLU-M. *et al.* Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. **Phytomedicine**, v. 15, p. 226-229, 2008.

VALERO, M.; FRANCÉS, E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. **Food Microbiol.**, v. 23, p. 68-73, 2006.

VIÑAS, P.; SOLER-ROMERA, M. J.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection. **Talanta**, v. 69, p. 1063-1067, 2006.

VOUGTAU HO *et al.* Antinociceptive profile of the methanolic extract of neorautanenia mitis root in rats and mice. **J Ethnopharmacol** v. 92, p. 317-324, 2004.

WANG L, NADLER JV. Reduced aspartate release from rat hippocampal synaptosomes loaded with Clostridial toxin light chain by electroporation: Evidence for an exocytotic mechanism. **Neurosc Lett** v. 412, p. 239–242, 2007.

WILHELM EA, JESSE CR, BORTOLATTO CF, NOGUEIRA CW. (E)-2-benzylidene-4-phenyl,3- diselenole has antioxidant and hepatoprotective properties against oxidative damage induced by 2-nitropropane in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol** v.25, p. 80–90, 2011.

WOOD PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert Rev Neurother.** v. 5, p. 781-97, 2008.

WU JY, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. **J Biomed Sci** v. 17, p. 2-6, 2010.

XU TL, GONG N. Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: Diversity, function and regulation. **Prog Neurobiol** v. 91, p. 349–361, 2010.

YAKSH TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. **Acta Anaesthesiol Scand** v. 41, p. 94-111, 1997.

YAMADA, K.; YU, B.; GALLAGHER, J. P. Different Subtypes of GABA_B Receptors Are Present at Pre- and Postsynaptic Sites Within the Rat Dorsolateral Septal Nucleus. **J. Neurophysiol.**, v. 81, p. 2875-2883, 1999.

YANISHLIEVA, N. V. *et al.* Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chem.**, v. 64, p. 59-66, 1999.

ZEYTINOGLU, H.; INCESU, Z.; BASER, K.H.C. Inhibition of DNA synthesis by Carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human *N-RAS* oncogene. **Phytomedicine**, v. 10, p. 292-299, 2005.

ZEYTINOGLU, M. *et al.*, Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats. **Acta Pharm. Turcica**, v. 2, p. 93-98, 1998.

ZHANG H, SULZER D. Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto- and heteroreceptors. **Basal Ganglia** v. 2, p. 5–13, 2012.

APÊNDICE



doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00850.x

 ORIGINAL
ARTICLE

 Antidepressant-like effect of carvacrol
(5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice:
involvement of dopaminergic system

 Francisca Helvira Cavalcante Melo^{a*}, Brinell Arcanjo Moura^a,
Damião Pergentino de Sousa^b, Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos^a,
Danielle Silveira Macedo^a, Marta Maria de França Fonteles^a,
Glauce Socorro de Barros Viana^a, Francisca Cléa Florenço de Sousa^a
^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, Fortaleza, Brazil

^bDepartment of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

Keywords

 antidepressant,
carvacrol,
dopaminergic system,
forced swimming,
tail suspension

 Received 14 January 2010;
revised 14 April 2010;
accepted 28 April 2010

 *Correspondence and reprints:
helvira.melo@gmail.com

ABSTRACT

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpenic phenol present in the essential oil of many plants. It is the major component of the essential oil fraction of oregano and thyme. In this study, the effect of carvacrol was investigated in two behavioral models, the forced swimming and tail suspension tests in mice, to investigate the possible antidepressant effect of this substance. Additionally, the mechanisms involved in the antidepressant-like effect of carvacrol in mice were also assessed. Carvacrol (cvc) was administered orally at single doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg. The acute treatment of cvc decreased the immobility time in the forced swimming and tail suspension tests without accompanying changes in ambulation in the open-field test. The anti-immobility effect of carvacrol (25 mg/kg) was not prevented by pretreatment of mice with p-chlorophenylalanine, prazosin and yohimbine. On the other hand, the pretreatment of mice with SCH23390 or sulpiride completely blocked the antidepressant-like effect of carvacrol (25 mg/kg) in the forced swimming test. These results show that carvacrol presents antidepressant effects in the forced swimming and tail suspension tests; this effect seems to be dependent on its interaction with the dopaminergic system, but not with the serotonergic and noradrenergic systems. **Keywords:** Carvacrol; Antidepressant; Forced swimming; Tail suspension; Dopaminergic system.

INTRODUCTION

Depression is a common, debilitating, life-threatening illness with a high incidence [1,2]. This psychological problem is usually treated with compounds that inhibit monoamine reuptake or monoamine metabolism. The use of tricyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors is associated with many side effects and have limited safety in overdose [3]. The selective serotonin reuptake inhibitors are safer in overdose but are associated with sexual dysfunction and nausea [3].

Many studies have demonstrated that plant-derived essential oils exhibit a variety of centrally active properties [4–7]. From these observations, it is possible that herbal medicine can be used as an alternative treatment to depression with less side effects.

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) (Figure 1) is a monoterpenic phenol present in the essential oil of *Labitae* including *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* and *Corydothymus* [8]. Carvacrol is the major component of the essential oil fraction of oregano and thyme [9].

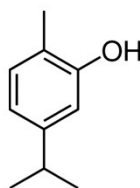


Figure 1 Structure of carvacrol.

Carvacrol has been used on a large scale in the food and cosmetic industries, being a common ingredient of the human diet [10]. It was reported that carvacrol has antibacterial, antifungal, antihelmintic, antioxidant, antimutagenic, antigenotoxic, antihepatotoxic and hepatoprotective activities [11–17].

Recently, our group has made a central nervous system pharmacological screening of carvacrol, which presented anxiolytic effects in mice, when administered orally [18].

Considering the antidepressant potential [1,5,19] of plant-derived essential oils and the importance of natural products as sources of new drugs, the general purpose of this study was to analyze whether the orally administration of carvacrol promotes antidepressant effects in male mice on animal models of depression.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male swiss mice (25–30 g) were used in each experiment. The animals were provided by the Animal House of the Federal University of Ceará (Fortaleza, Ceará, Brazil) and maintained at a controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Drugs and treatment

Carvacrol was obtained by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Its linear formula is $(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)\text{OH}$, with a molecular weight of 150.22. According to Sigma, the degree of purity is $>97\%$.

Carvacrol was emulsified with 0.2% Tween 80 (Sigma, USA) and dissolved in distilled water. Animals were treated with the substance at doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg, orally, 1 h before the experiments. Controls received 0.2% Tween 80 (Sigma, USA) dissolved in distilled water at the same volume as the treated groups

(10 mL/kg). The following drugs were also used: Imipramine (IMP) 10 and 30 mg/kg (Geisy, São Paulo, SP, Brazil), bupropion 30 mg/kg (Geisy), fluoxetine 35 mg/kg (Geisy), prazosin 1 mg/kg (Sigma, USA), yohimbine 1 mg/kg (Sigma, USA), SCH23390 15 mg/kg (Sigma, USA), sulpiride 50 mg/kg (Sigma, USA), p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA) 100 mg/kg (Sigma, USA), all administered by the intraperitoneal (i.p.) route.

To investigate the involvement of the serotonergic system in the anti-immobility effect of carvacrol in the forced swimming test, animals were pretreated with PCPA (100 mg/kg, an inhibitor of serotonin synthesis) or vehicle, once a day, for four consecutive days [20–22]. Then, 24 h after the last PCPA or saline injection, animals were treated orally with carvacrol (25 mg/kg) or vehicle and were tested in the forced swimming test 60 min later.

To assess the possible involvement of the noradrenergic and the dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of carvacrol in the forced swimming test, animals were pretreated with prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p., a dopamine D1 receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D2 receptor antagonist), and after 15 min they received orally carvacrol (25 mg/kg) or vehicle and were tested in the forced swimming test 1 h later.

The administration schedule and the doses of the drugs used were all based in previous studies that confirm the efficacy of the protocols [20–22].

Experimental protocol

The animals were tested during the light period, observed in a closed room with constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and illuminated with normal light. All tests were performed on different days with distinct groups of animals.

Forced swimming test

For this test [23], animals were placed in an acrylic tank that contained 20-cm-high fresh water at 25°C . One hour after the treatment with carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg), they were placed in the tank and left there for 6 min during which their immobility time was observed. A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above the water. The animals were divided into five groups with 10 per group. Each animal was used only once.

Tail suspension test

For the tail suspension test [24], animals were divided into five groups with 7–10 animals per group. One hour after the treatment with carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg), animals were suspended on the edge of a shelf 58 cm above a table top by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The duration of immobility is recorded for a period of 6 min.

Statistical analyses

The results are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls's post hoc test. Results were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Forced swimming test

In this test (Figure 2), groups treated with carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg) and imipramine (10 mg/kg), a well-known antidepressant drug, induced a significant decrease in the immobility time in mice, when compared to control [control: 98.88 ± 4.987 (8); CVC-12.5: 44.50 ± 7.607 (8); CVC-25: 12.70 ± 1.630 (8); CVC-50: 17.74 ± 3.587 (8); IMP-10: 16.08 ± 1.603 (8)].

Tail suspension test

Similar to those results observed in forced swimming test, Figure 3 shows that carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg) and imipramine 30 mg/kg significantly decreased the immobility time in animals when compared to the control group [control: 90.86 ± 8.678 (10); CVC-12.5: 50.64 ± 1.899 (9); CVC-25: 36.21 ± 4.538

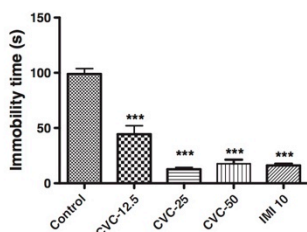


Figure 2 Forced swimming test of groups of mice that received vehicle, carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg) and imipramine (10 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm SEM. Significant difference compared with control (** $p < 0.001$). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

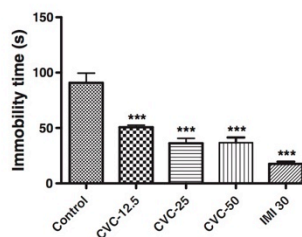


Figure 3 Tail suspension test of groups of mice that received vehicle, carvacrol (12.5, 25 and 50 mg/kg) and imipramine (30 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm SEM. Significant difference compared with control (** $p < 0.001$). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

(8); CVC-50: 36.64 ± 4.786 (7); IMP-30: 17.57 ± 1.948 (7)].

Investigation of possible mechanisms underlying the antidepressant-like effect of carvacrol in the forced swimming test

Since 25 mg/kg was the lowest effective dose, all the next experiments were performed using this dose.

Involvement of the serotonergic system

Figure 4 shows that the pretreatment of mice with the inhibitor of 5-HT synthesis PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day on 4 consecutive days) did not affect the antidepressant-like effect of carvacrol (25 mg/kg, p.o.) but completely blocked the decrease in the immobility time elicited by fluoxetine (35 mg/kg, i.p.), when compared to control group [control: 75.50 ± 5.622 (8); CVC 25: 48.48 ± 3.079 (7); FLU-35: 43.02 ± 3.778 (10); PCPA: 107.1 ± 7.583 (10); CVC-25 + PCPA: 52.57 ± 4.368 (10); FLU-35 + PCPA: 111.7 ± 7.978 (10)].

Involvement of the noradrenergic system

The results in Figure 5 show that pretreatment of mice with the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin (1 mg/kg, i.p) and the α_2 -adrenoceptor antagonist yohimbine (1 mg/kg, i.p.) was not able to reverse the antidepressant-like effect of carvacrol (25 mg/kg, p.o.) in the forced swimming test when compared to control group [control: 98.88 ± 4.987 (8); CVC 25: 12.70 ± 1.630 (8); PRZ-1: 106.3 ± 4.770 (9); YOIM-1: 109.8 ± 4.329 (9); CVC-25 + PRZ-1: 18.53 ± 4.871 (8); CVC25 + YOIM1: 25.83 ± 5.581 (8)].

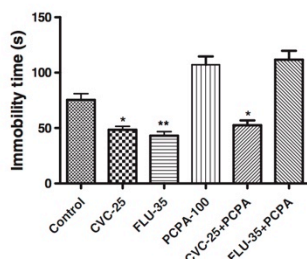


Figure 4 Forced swimming test of groups of mice that received vehicle, carvacrol (25 mg/kg), fluoxetine (35 mg/kg), p-chloro-phenylalanine (PCPA) (100 mg/kg), carvacrol + PCPA and fluoxetine + PCPA. The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (* P < 0.05; ** P < 0.01). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

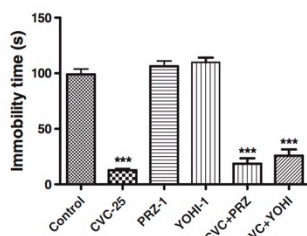


Figure 5 Forced swimming test of groups of mice that received vehicle, carvacrol (25 mg/kg), prazosin (1 mg/kg), yohimbine (1 mg/kg), carvacrol + prazosin and carvacrol + yohimbine. The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (*** P < 0.001). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

Involvement of the dopaminergic system

Figure 6 shows that the pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.), a dopamine D₁ receptor antagonist and sulpiride (50 mg/kg, i.p.), a dopamine D₂ receptor antagonist significantly prevented the antidepressant-like effect of carvacrol (25 mg/kg, p.o.) and bupropion (30 mg/kg, i.p.), when compared to control group [control: 85.24 \pm 10.47 (8); CVC 25: 31.10 \pm 3.657 (7); Sulp-50: 82.95 \pm 11.86 (8); SCH-0.05: 86.06 \pm 12.21 (7); BUP-30: 35.29 \pm 8.294 (7);

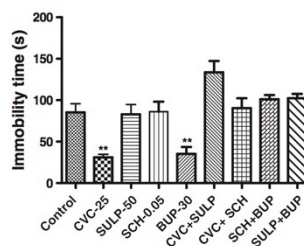


Figure 6 Forced swimming test of groups of mice that received vehicle, carvacrol (25 mg/kg), sulpiride (50 mg/kg), SCH23390 (0.05 mg/kg), bupropion (30 mg/kg), carvacrol + sulpiride, carvacrol + SCH23390, bupropion + SCH23390 and bupropion + sulpiride. The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean \pm S.E.M. Significant difference compared with control (** P < 0.01). ANOVA and Student–Newman–Keuls's as the post hoc test.

CVC-25 + Sulp-50: 133.5 \pm 13.71 (10); CVC-25 + SCH-0.05: 90.49 \pm 11.91 (7); BUP-30 + Sulp-50: 102.4 \pm 5.137 (8); BUP-30 + SCH-0.05: 101.0 \pm 5.220 (8)].

DISCUSSION

The biological properties of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) as an antibacterial, antifungal, antioxidant, antimutagenic, antigenotoxic and hepatoprotective agent are well described in animals [11–17].

Research reports indicated that various monoterpenes exert anxiolytic and antidepressant-like effects in the animal models of anxiety and depression [4,6,25], and a recently study made by our group showed that carvacrol presents anxiolytic-like effect in the animal models of anxiety [18].

In the present work, our aim was to investigate the antidepressant properties of carvacrol, as, as far as we know, there are no studies in the literature involving carvacrol and antidepressant activity.

In this work, the effects of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) were studied in two widely used behavioral assays sensitive to antidepressant-like activity, such as forced swimming and tail suspension tests. We also investigated the involvement of the monoaminergic system on the antidepressant action of carvacrol, using prazosin (1 mg/kg, i.p., an α 1-adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α 2-adrenoceptor antago-

nist), SCH23390 (0.5 mg/kg, i.p., a dopamine D1 receptor antagonist), sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D2 receptor antagonist) and PCPA (100 mg/kg, an inhibitor of serotonin synthesis).

In this study, we demonstrated that acute administration of carvacrol was effective in producing antidepressant effects when assessed in the forced swimming and tail suspension tests. The forced swimming and tail suspension tests are widely used as behavioral tools for screening antidepressant activity of different classes of drugs. In both tests, animals are placed in an inescapable situation and the antidepressant-like activity is expressed by the decrease in immobility duration [23,24,26].

Data in the literature demonstrated that drugs that alter general motor activity may give false positive/negative results in the forced swimming test. We previously studied the effects of carvacrol in the open-field test [18], a classical animal model used to evaluate general activity of animals [27]. Our results showed that carvacrol at same doses used in this work (12.5, 25 or 50 mg/kg) did not alter the locomotor activity (number of crossings) compared to control group. These results associated to those obtained in forced swimming and tail suspension corroborate that the antidepressant effect of carvacrol is independent of alteration on locomotor activity.

The monoamine hypothesis based on the deficiency of one or several monoamines is commonly evoked to explain the physiopathology of depression [28]. This hypothesis has been associated with an impairment of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic neurotransmission [29,30]. Most of the antidepressants currently used today exert their primary biochemical effects by regulating synaptic concentrations of serotonin, noradrenaline and/or dopamine [3,28].

p-chlorophenylalanine, an inhibitor of the enzyme tryptophan hydroxylase, was administered for four consecutive days at a dose of 100 mg/kg. Studies have demonstrated that the administration of PCPA depletes the endogenous stores of serotonin by about 60% in mice [31]. In our study, PCPA pretreatment prior to the acute administration of carvacrol (25 mg/kg) was not effective in causing a blockade of the anti-immobility effect of the substance in the forced swimming test. However, PCPA completely prevented the antidepressant-like effect of fluoxetine (35 mg/kg, i.p.), used as standard drug.

For the evaluation of the noradrenergic system on the antidepressant-like effect of carvacrol, animals were pretreated with α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin (1 mg/kg, i.p.) and the α_2 -adrenoceptor antagonist

yohimbine (1 mg/kg, i.p.). Results showed that prazosin and yohimbine were not able to reverse the antidepressant-like effect of acute administration of carvacrol (25 mg/kg).

To investigate the involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of carvacrol, mice were pretreated with SCH23390 (0.05 mg/kg, i.p.), a dopamine D₁ receptor antagonist and sulpiride (50 mg/kg, i.p.), a dopamine D₂ receptor antagonist. Our findings showed that SCH23390 and sulpiride significantly prevented the antidepressant-like effect of acute administration of carvacrol (25 mg/kg). SCH23390 and sulpiride also blocked the anti-immobility effect of bupropion (30 mg/kg, i.p.), used as standard drug. This result indicates that, like bupropion, the mechanism underlying the anti-immobility effect of carvacrol in the forced swimming test is dependent on the increase in dopamine levels in the synaptic cleft. In support of the role of dopamine in the effect of antidepressants, it has been shown that in different animal models of depression, such as behavioral despair, learned helplessness and chronic mild stress, antidepressants seem to act by increasing dopamine transmission in the limbic system [32–35].

In conclusion, in this study, experimental evidence suggests that the mechanism of action of carvacrol in the forced swimming and tail suspension tests are most likely dependent on an increase in dopamine levels. However, further studies are required to clarify the involvement of other neurotransmitter systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Brazilian National Research Council (CNPq) for the financial support. Also, we express our gratitude to Dr. David Woods, from Otago University, New Zealand, for general review about English language.

REFERENCES

- 1 Helliön-Ibarrola M.C., Ibarrola D.A., Montalbetti Y. et al. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2006) 105 400–408.
- 2 Galdino P.M., Nascimento M.V.M., Sampaio B.L., Ferreira R.N., Paula J.R., Costa E.A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2009) 124 581–585.
- 3 Andreasen J.T., Olsen G.M., Wiborg O., Redrobe J.P. Antidepressant-like effects of nicotinic acetylcholine receptor antago-

- nists, but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. *J. Psychopharmacol.* (2009) **23** 797–804.
- 4 Gurgel do Vale T., Couto Furtado E., Santos J.G. Jr, Viana G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* (2002) **9** 709–714.
 - 5 Sousa F.C.F., Melo C.T., Monterio A.P. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2004) **78** 27–33.
 - 6 Silva M.I.G., Aquino M.R. Nt, Teixeira P.F. Nt et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2007) **88** 141–147.
 - 7 Gomes P.B., Noronha E.C., Melo C.T., et al. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2008) **120** 209–214.
 - 8 Kopal A.T., Zeytinoglu M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology* (2005) **43** 149–154.
 - 9 Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1999) **65** 4606–4610.
 - 10 Ipek E., Tuylu B.A., Zeytinoglu H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology* (2005) **43** 145–148.
 - 11 Aeschbach R., Loliger J., Scott B.C. et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* (1994) **32** 31–36.
 - 12 Ultee A., Smid E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* (2001) **64** 373–378.
 - 13 Aydin S., Basaran A.A., Basaran N. The protective effects of thymol and carvacrol against oxidative DNA damage. *Toxicol. Lett.* (2003) **114** 124.
 - 14 Martínez-Romero D., Guillén F., Valverde J.M. et al. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int. J. Food Microbiol.* (2007) **115** 144–148.
 - 15 Uyanoglu M., Canbek M., Aral E., Baser H.C.K. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine* (2008) **15** 226–229.
 - 16 Canbek M., Uyanoglu M., Bayramoglu G. et al. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* (2008) **15** 447–452.
 - 17 Baser K.H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.* (2008) **14** 3106–3119.
 - 18 Melo F.H.C., Venâncio E.T., de Sousa D.P. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam. Clin. Pharmacol.* doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00788.x
 - 19 Zhang Y.Z., Li Y.F., Yu N.J. et al. Antidepressant-like effects of the ethanolic extract of Xiaobuxin-Tang, a traditional Chinese herbal prescription in animal models of depression. *Chin. Med. J.* (2007) **20** 1792–1796.
 - 20 Rodrigues A.L.S., da Silva G.L., Mateussi A.S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci.* (2002) **70** 1347–1358.
 - 21 Kaster M.P., Raupp I., Binfaré R.W., Andreatini R., Rorigues A.L.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.* (2007) **565** 119–124.
 - 22 Machado D.G., Kaster M.P., Binferá R.W. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2007) **31** 421–428.
 - 23 Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* (1977) **229** 327–336.
 - 24 Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* (1985) **85** 367–370.
 - 25 Sousa F.C.F., Melo C.T.V., Cito M.C.O. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Braz. J. Pharmacog.* (2008) **18** 642–654.
 - 26 Cryan J.F., Markou A., Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* (2002) **23** 238–245.
 - 27 Novas M.L., Wolfman C., Medina J.H., de Robertis E. Proconvulsant and angiogenic effects of n-butyl-h-carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1988) **30** 331–336.
 - 28 Machado D.G., Bettio L.E.B., Cunha M.P. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2009) **33** 642–650.
 - 29 Machado D.G., Bettio L.E., Cunha M.P. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* (2008) **587** 163–168.
 - 30 Posser T., Kaster M.P., Baraúna S.C., Rocha J.B., Rodrigues A.L., Leal R.B. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur. J. Pharmacol.* (2009) **602** 85–91.
 - 31 Redrobe J.P., Bourin M., Colombel M.C., Baker G.B. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* (1998) **138** 1–8.
 - 32 Delini-Stula A., Radeke E., Van Riezen H. Enhanced functional responsiveness of the dopaminergic system – the mechanism of anti-immobility effects of antidepressants in the behavioural despair test in the rat. *Neuropharmacology* (1988) **27** 943–947.
 - 33 Muscat R., Sampson D., Willner P. Dopaminergic mechanism of imipramine action in an animal model of depression. *Biol. Psychiatry* (1990) **28** 223–230.
 - 34 Willner P., Muscat R., Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animals model of depression. *Neurosci. Biobehav.* (1992) **16** 525–534.
 - 35 D'Aquila P.S., Collu M., Gessa G.L., Serra G. et al. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* (2000) **405** 365–373.

Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice

Francisca Helvira Cavalcante Melo^a, Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios^a, Nayrton Flávio Moura Rocha^a, Maria do Carmo de Oliveira Citó^a, Mariana Lima Fernandes^a, Damião Pergentino de Sousa^b, Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos^a and Francisca Cléa Florenço de Sousa^a

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, Fortaleza, ^bDepartment of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

Keywords

antinociception; carvacrol; nitric oxide; opioid system

Correspondence

Francisca Helvira Cavalcante Melo, Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, Fortaleza, Ceará, 60430-270, Brazil.
E-mail: helvira.melo@gmail.com

Received May 12, 2011

Accepted April 15, 2012

doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01552.x

Abstract

Objectives Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpene phenol which is present in the essential oil of oregano and thyme. We have investigated the behavioural effects of carvacrol in animal models of pain, such as acetic acid-induced abdominal constriction, formalin and hot-plate tests in mice. The spontaneous motor activity of animals treated with carvacrol was investigated using open-field and rotarod tests.

Methods Carvacrol was administered orally, at single doses of 50 and 100 mg/kg while indometacin (5 mg/kg), morphine (7.5 mg/kg) and diazepam (2 mg/kg) were used as standard drugs. Naloxone (1 mg/kg) and L-arginine (150 mg/kg) were used to elucidate the possible antinociceptive mechanism of carvacrol on acetic acid-induced abdominal constriction and formalin tests.

Key findings The results showed that carvacrol produced significant inhibitions on nociception in the acetic acid-induced abdominal constriction, formalin and hot-plate tests. In the open-field and rotarod tests carvacrol did not significantly impair the motor performance. The effect of the highest dose of carvacrol in mice in the acetic acid-induced abdominal constriction and formalin tests were not reversed by naloxone or L-arginine.

Conclusions Based on these results, it has been suggested that carvacrol presents antinociceptive activity that may not act through the opioid system nor through inhibition of the nitric oxide pathway.

Introduction

Contemporary analgesics, such as opiates and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have been widely used for treatment of chronic pain. These medications are usually associated with many side effects, including propensity to lead to tolerance (opiates). As a result, the continuing search for other alternatives is necessary.^[1,2]

Since ancient times, natural products have been used as therapeutic agents.^[3] Medicinal plants are known to be a significant source of new chemical substances with potential therapeutic effects.^[4] Essential oils are natural products derived from herbs that have a wide use in medicine as antiseptics, antimicrobials and flavouring in the food industry and in perfumes.^[5,6]

Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) is a monoterpene phenol found in the essential oil of the family Labiatae

including *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus*, and *Corydanthus* species. It is the major component of the essential oil fraction of oregano and thyme and has been used on a large scale in the food and cosmetic industries.^[6-9] It has been reported that carvacrol has antibacterial, antifungal, antihelminthic, analgesic, antioxidant, antimutagenic, antigenotoxic, antispasmodic, anti-inflammatory, angiogenic, and hepatoprotective activity.^[10]

Recently, our group made a central nervous system pharmacological screening for carvacrol, which showed antidepressant and anxiolytic effects in mice, when administered orally.^[11,12]

Previous studies have demonstrated antinociceptive properties of carvacrol in mice when administered intraperitoneally.^[13] This work was undertaken to evaluate the

antinociceptive effect of carvacrol through the oral route by using behavioural models of pain, such as acetic acid-induced abdominal constriction, formalin, and hot-plate thermal tests, to analyse the involvement of peripheral mechanisms (nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway) and central mechanisms (opioid system). We analysed the effects of carvacrol on locomotor activity in animal models using open-field and rotarod tests.

Materials and Methods

Animals

Male Swiss mice (25–30 g) were used in each experiment. The animals were provided by the Animal House of the Federal University of Ceará (Fortaleza, Ceará, Brazil) and maintained at a controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance with the current law and the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The protocol of the experiments were approved in the Ethical Committee on Animal Research number 95/10 at Federal University of Ceara, Brazil.

Drugs and treatment

Carvacrol was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). According to Sigma, the degree of purity is $>97\%$. Carvacrol was emulsified with 0.2% Tween 80 (Sigma, USA.) and dissolved in distilled water. Animals were treated with oral doses of 50 or 100 mg/kg, one hour before the experiments. In the acetic acid-induced abdominal constriction test, animals were also treated with carvacrol at doses of 12.5, 25 and 200 mg/kg. Controls received 0.2% Tween 80 (Sigma, USA) dissolved in distilled water at the same volume as the treated groups (10 ml/kg). The following drugs were used: diazepam (2 mg/kg; União Química, São Paulo, SP, Brazil), formalin (1%) and acetic acid (0.6%); VETEC QUÍMICA FINA LTDA), indometacin (5 mg/kg; i.p.), morphine hydrochloride (7.5 mg/kg; i.p.), naloxone (1 mg/kg; i.p.; opioid receptor antagonist) and L-arginine (150 mg/kg; i.p.; nitric oxide (NO) precursor) from Sigma (USA).

To assess the possible involvement of NO in the acetic acid-induced abdominal constriction test and formalin test, the animals were pretreated with carvacrol (100 mg/kg, p.o.) 30 min before treatment with L-arginine or vehicle. Thirty minutes after the last treatment the groups were submitted to the experiment.

To investigate the involvement of the opioid system in the acetic acid-induced abdominal constriction and formalin tests animals were pretreated with naloxone (1 mg/kg; i.p.), then the groups were treated with carvacrol (100 mg/kg; p.o.) or vehicle 15 min later. The groups were submitted to the experiment one hour after the last treatment.

Experimental protocol

The animals were tested during a lit period, illuminated with normal light, observed in a closed room with constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). All tests were performed on different days with distinct groups of animals.

Acetic acid-induced abdominal constriction

Abdominal constriction, induced by intraperitoneal injection of acetic acid 0.6%, consisted of a contraction of the abdominal muscles together with hind limbs stretching.^[14] The animals were pretreated either intraperitoneally with indometacin (5 mg/kg), used as positive control, or orally with carvacrol (12.5, 25, 50, 100 or 200 mg/kg) one hour before the injection of acetic acid. The control group received the same volume as the treated groups (10 ml/kg; 0.2% Tween 80). After the treatment, pairs of mice were placed in separate boxes, and the abdominal constrictions started to be counted 10 min after acetic acid injection, for 20 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of constrictions i.e. the difference between control animals (0.2% Tween 80 dissolved in saline solution) and animals pretreated with carvacrol or indometacin.

Formalin test in mice

Mice were injected with formalin (20 μl 1% formalin) intraplantarly under the ventral surface of the right hind paw. The amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. The initial nociceptive response peaked 5 min after formalin injection (early phase) and 20–25 min after formalin injection (late phase), representing the tonic and inflammatory pain responses, respectively.^[15] The animals were orally pretreated with carvacrol (50 or 100 mg/kg), one hour before the formalin injection or with morphine (7.5 mg/kg), which was used as positive control, 30 min before the experiment. The control group received the same volume (10 ml/kg) as the treated groups.

Hot-plate test in mice

The hot plate (UGO BASILE, model-DS 37) was used to measure the latencies according to the method described previously.^[16] In the experiments, the hot plate was maintained at $55 \pm 1^\circ\text{C}$. Before beginning the experiments, the basal reaction time response of all animals was taken (mice with baseline latencies of more than 15 s were eliminated from the study). The animals were pretreated with either vehicle (10 ml/kg, p.o.), morphine (10 mg/kg, i.p.), or carvacrol (50 or 100 mg/kg, p.o.), and they were put on the heated surface of the plate 30, 60, 90, and 120 min later. The time needed for the initial response to the painful stimulus (licking the paws

or jumping) was taken as the defining response, and it was termed as reaction time. To minimize damage to the animals' paws, the cut-off time was 45 s.

Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 × 30 × 15 cm) and divided into nine squares of equal area. This apparatus was used to evaluate the exploratory activity of the animals.^[17] The observed parameters were as follows: number of squares crossed (with the four paws) and number of groomings and rearings. The animals were pretreated with vehicle (10 ml/kg, p.o.), diazepam (2 mg/kg, i.p.), or carvacrol (50 or 100 mg/kg, p.o.).

Rotarod test

For the rotarod test, animals were placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor, with the bar turning at 5, 15, or 40 rev/min.^[18] The animals were pretreated with vehicle (10 ml/kg, p.o.), diazepam (2 mg/kg, i.p.), or carvacrol (50 or 100 mg/kg, p.o.). The time of permanence on the bar was measured (2 min for each animal), and different groups were used on all the rotating speeds.

Statistical analysis

Data were analysed by 4.0 Graphpad Prism software (San Diego, CA, USA). Results are shown as mean ± standard error of the mean (SEM). For the statistical analysis one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test were used. *P*-values < 0.05 were considered to be significant.

Results

Acetic acid-induced abdominal constriction in mice

Carvacrol administered orally at doses of 50, 100 and 200 mg/kg significantly decreased the number of constrictions as compared with control (control 31.50 ± 2.976 (8); carvacrol-50 19 ± 2.821 (8); carvacrol-100 18.50 ± 2.318 (7); carvacrol-200 8.714 ± 2.112). Indometacin (10 mg/kg), as expected, decreased the number of constrictions compared with the control group (indometacin 12.08 ± 1.323 (10); Figure 1). Animals treated with carvacrol at 12.5 and 25 mg/kg did not significantly alter the number constrictions.

The results in Figure 2 show that the pretreatment with naloxone (1 mg/kg, i.p.) and L-arginine (150 mg/kg) was not able to reverse the antinociception promoted by carvacrol, with a dose of 100 mg/kg, as compared with the control group (control 27.73 ± 2.566 (10); carvacrol-100

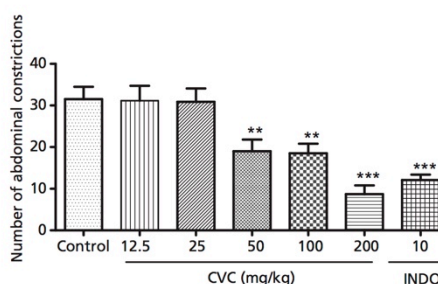


Figure 1 Acetic acid-induced abdominal constriction test of groups of mice which received either vehicle, carvacrol or indometacin. The figure shows number of abdominal constrictions. Carvacrol: (CVC) 12.5; 25, 50, 100 or 200 mg/kg; indometacin (INDO) 5 mg/kg. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

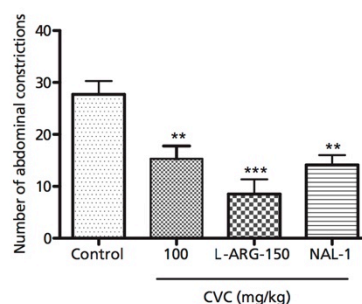


Figure 2 Acetic acid-induced abdominal constriction test of groups of mice which received vehicle, carvacrol, carvacrol + L-arginine or carvacrol + naloxone. The figure shows number of abdominal constrictions. Carvacrol (CVC) 100 mg/kg; L-arginine (L-ARG) 150 mg/kg; naloxone (NAL) 1 mg/kg. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

15.32 ± 2.474 (10); carvacrol + L-arginine 8.500 ± 2.847 (8); carvacrol + naloxone 14.13 ± 1.894 (8)).

Formalin test in mice

In the formalin test, the groups treated with carvacrol 100 mg/kg and morphine 7.5 mg/kg significantly decreased the licking time during the early phase (control 53.53 ± 2.661 (10); carvacrol-100 37.11 ± 3.307 (10); morphine 2.000 ± 0.8660 (8)) and late phase (control 21.88 ± 3.641 (10); carvacrol-100: 0.7207 ± 0.5415 (10); morphine 2.000 ± 0.8660 (8)) as compared with control. However, animals treated with carvacrol 50 mg/kg

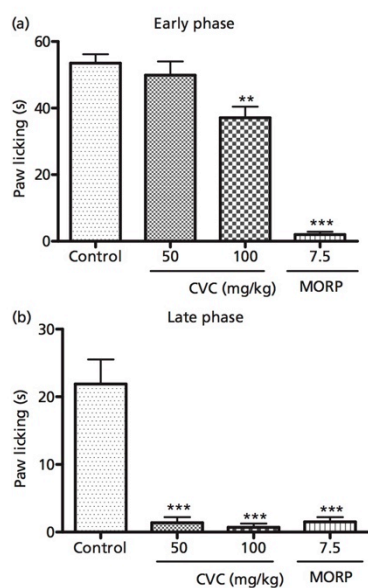


Figure 3 Formalin test of groups of mice which received vehicle, carvacrol or morphine. The figure shows paw licking time (s) at the early and late phases. Carvacrol: (CVC) 50 or 100 mg/kg; morphine (MORP) 7.5 mg/kg. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

significantly decreased the licking time only during the late phase (carvacrol-50 1.381 ± 0.8284 (10)) as compared with control (Figure 3).

Similarly to those results observed in acetic acid-induced abdominal constriction test, Figure 4 shows that pretreatment with naloxone (1 mg/kg; i.p.) or L-arginine (150 mg/kg) was not able to reverse the antinociception promoted by carvacrol with a dose of 100 mg/kg on both early (control 80.47 ± 7.169 (10); carvacrol-100 42.61 ± 4.418 (10); carvacrol + L-arginine 49.39 ± 10.78 (8); carvacrol + naloxone 35.49 ± 4.914 (8)) and late phase (control 15.70 ± 2.317 (10); carvacrol-100 0.1931 ± 0.1931 (10); carvacrol + L-arginine 0.2575 ± 0.2575 (8); carvacrol + naloxone 35.49 ± 4.914 (8)) when compared with the control group.

Hot-plate test in mice

In the hot-plate test (Table 1), carvacrol increased the reaction time (latency time) at 60 min at doses of 50 and 100 mg/kg. In addition, morphine (7.5 mg/kg) caused, as

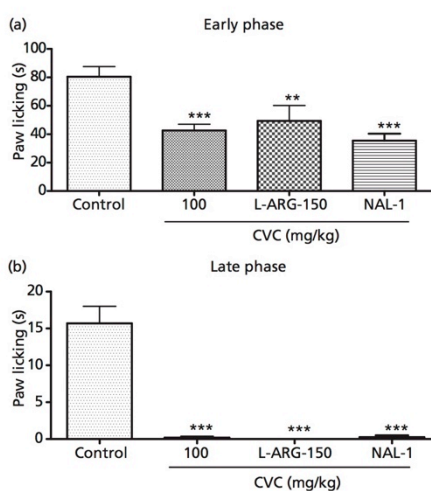


Figure 4 Formalin test of groups of mice which received vehicle, carvacrol, carvacrol + L-arginine or carvacrol + naloxone. The figure shows paw licking time (s) at the early and late phases. Carvacrol (CVC) 100 mg/kg; L-arginine (L-ARG) 150 mg/kg; naloxone (NAL) 1 mg/kg. * $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

expected, a significant increase in the reaction time in the hot-plate test at all temperatures measured.

Open-field test

In the open-field test (Figure 5), at dose of 100 mg/kg, carvacrol did not significantly alter the number of crossings and rearings compared with respective controls, however, it significantly decreased the number of groomings as compared with control. Animals treated with diazepam (2 mg/kg) decreased the number of crossings (control 44.71 ± 3.998 (7); carvacrol-100: 37 ± 5.487 (8); diazepam 27.14 ± 1.280 (7)), groomings (control 2.250 ± 0.25 (7); carvacrol-100 1.125 ± 0.125 (8); diazepam 0.9 ± 0.2769 (7)) and rearings (control 4.375 ± 0.6797 (7); carvacrol-100: 4.875 ± 0.8952 (8); diazepam 2.125 ± 0.5154 (7)) as compared with the control group.

Rotarod test

Carvacrol at doses of 100 mg/kg did not alter the time of permanence on the bar at 5, 15, or 40 rev/min, as compared with the control group. Diazepam (2 mg/kg) decreased these parameters (at 5 rev/min: control 119.2 ± 0.3329 (8); carvacrol-100 119.3 ± 0.5261 (8); diazepam 97 ± 5.041 (8);

Table 1 Hot-plate test basal reaction time (s) after oral administration of vehicle, carvacrol or morphine to mice

Basal reaction time (s)					
Group	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	9.078 ± 1.722 (9)	9.578 ± 1.659 (9)	6.278 ± 1.315 (9)	7.289 ± 1.243 (9)	6.700 ± 1.097 (9)
Carvacrol 50 mg/kg	11.23 ± 1.276 (10)	17.21 ± 3.448 (10)	13.00 ± 2.258 (10)*	9.340 ± 1.274 (10)	9.980 ± 1.613 (10)
Carvacrol 100 mg/kg	8.170 ± 1.412 (10)	18.40 ± 3.727 (10)	12.06 ± 1.278 (9)*	7.600 ± 2.315 (10)	6.760 ± 0.7267 (10)
Morphine 7.5mg/kg	20.30 ± 1.169 (10)***	30.01 ± 4.220 (10)**	19.40 ± 2.267 (10)***	25.70 ± 3.358 (8)***	28.01 ± 2.545 (10)***

The results are given as mean ± SEM. The number in parentheses refer to number of animals tested. Significant differences compared with the control. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$: analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

at 15 rev/min: control 116.8 ± 0.9086 (8); carvacrol-100: 113.6 ± 2.519 (8); diazepam 93 ± 4.166 (8); at 40 rev/min: control 81.89 ± 4.120 (8); carvacrol-100: 72.3 ± 4.637 (8); diazepam 66 ± 1.390 (8)) as compared with the control group (Figure 6).

Discussion

The acetic acid-induced abdominal constriction method is one of the most well-described and utilized models used in studying antinociceptive activity.^[1,19,20] The abdominal constriction response induced by acetic acid is a sensitive procedure to evaluate peripheral and central acting analgesics. It has previously been reported that reduction in the amount of constriction induced by acetic acid may be associated with several drugs by acting through different mechanisms, then being considered a nonselective antinociceptive test.^[21] In general, acetic acid causes pain through the release of endogenous substances such as serotonin, histamine, prostaglandins (PGs), bradykinins and substance P.^[2,19] The method has been associated with the production and release of arachidonic acid metabolites via cyclooxygenase and prostaglandin biosynthesis, increasing levels of PGE₂, PGF_{2α} and PGI₂ in peritoneal fluids, as well as lipoxygenase products.^[22]

Our results indicated that carvacrol at doses of 50, 100 and 200 mg/kg was able to reduce the number of constrictions in mice, showing for the first time its antinociceptive effect; doses lower than 50 mg/kg did not show antinociceptive activity. To assess a possible antinociceptive mechanism, we examined the effect of naloxone (a nonselective opioid receptor antagonist) in the acetic acid-induced abdominal constriction test. The dose of naloxone (1 mg/kg, i.p.) used in the experiments was high enough to block opiate receptors, as demonstrated previously in the pain-induced functional impairment model.^[23] However, in this study, naloxone was not able to reverse antinociception caused by carvacrol (100 mg/kg), which suggested that the activation of opioid receptors might not have been involved in the antinociceptive effect of carvacrol.

To investigate the possible peripheral mechanisms in the antinociceptive action of carvacrol, the involvement of the NO pathway was analysed. It is well known that NO and cyclic

guanosine monophosphate (cGMP) are involved in antinociception.^[24] NO is an endogenous activator of guanylyl cyclase and causes intracellular cGMP accumulation.^[25] NO is found to be involved in all three levels of the pain pathway, at the peripheral, the dorsal horn and the cerebral cortex.^[26] However, researchers have reported that NO plays both nociceptive and antinociceptive roles in the L-arginine/NO/cGMP pathway in peripheral tissues.^[27–30] Our group has shown that L-arginine increased nociceptive-related behaviour in the second phase of the formalin test and reversed the antinociceptive effect of drugs acting under the NO-pathway.^[31] This fact suggested that NO had a pronociceptive effect in this test. In our research, antinociception of carvacrol in the acetic acid constriction test was not reversed when used in combination with L-arginine, a precursor of NO synthesis.

The formalin model of nociception is a well-described method that discriminates pain in its central and/or peripheral components. It has been reported that formalin-induced persistent pain in mice paws produced a distinct biphasic nociception.^[28,32] The early phase (0–5 min after formalin injection), characterized by intense neurogenic pain, starts immediately after the injection and is probably a direct result of stimulation of nociceptors in the paw and reflects centrally mediated pain. The late phase of moderate pain (20–40 min) seems to be caused by a release of serotonin, histamine, bradykinin, and prostaglandins and at least to some degree, the sensitization of central nociceptive neurons.^[22,33,34]

Central analgesics, such as narcotics, inhibit both phases, while peripherally-acting drugs, such as steroids (hydrocortisone, dexamethasone) and NSAIDs suppress mainly the late phase.^[35] In this test, carvacrol at 100 mg/kg significantly reduced the duration of the paw licking (s) in both first and second phase of the formalin test. However, at 50 mg/kg carvacrol was only able to reduce paw licking (s) in the second phase. For the evaluation of the possible antinociceptive mechanism on formalin test, animals were pretreated with naloxone (1 mg/kg) or L-arginine (150 mg/kg). Results showed that, similar to previous results shown in the acetic acid abdominal constriction test, naloxone and L-arginine were not able to reverse the antinociceptive effect of carvacrol (100 mg/kg).

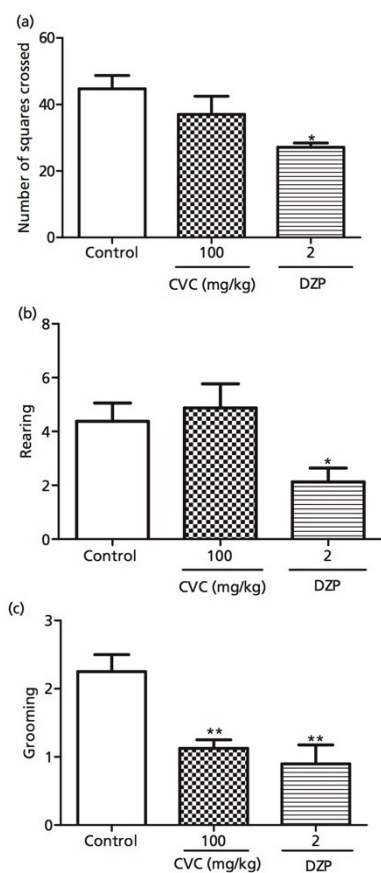


Figure 5 Open-field test of groups of mice which received vehicle, carvacrol or diazepam. (a) Number of squares crossed. (b) Rearing. (c) Grooming. Carvacrol (CVC) 100 mg/kg; diazepam (DZP) 2 mg/kg. The results are presented as mean \pm SEM. Significant difference compared with control (* P < 0.05; ** P < 0.01). Analysis of variance and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

The hot-plate test is a central antinociceptive test that produces, at constant temperature, two kinds of behavioural response, which are paw-licking and jumping. Both of these behaviours are considered to be supraspinally integrated responses.^[36-38] The present data showed that carvacrol at both doses (50 and 100 mg/kg) increased the reaction time in the hot-plate test only at 60 min.

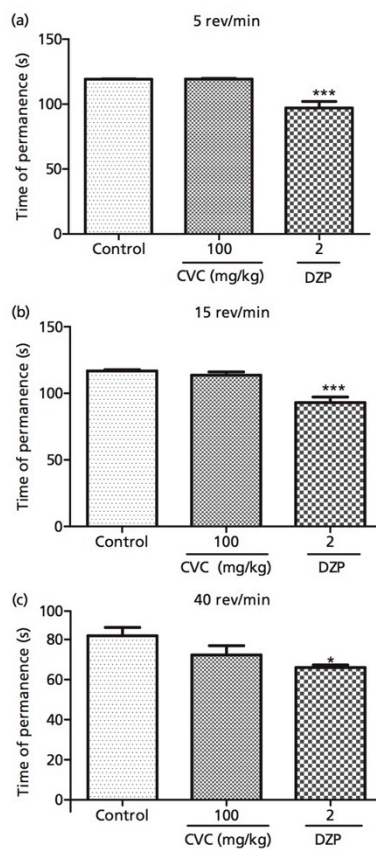


Figure 6 Rotarod test of groups of mice which received vehicle, carvacrol, or diazepam. The figure shows time of permanence (s). Carvacrol (CVC) 100 mg/kg; diazepam (DZP) 2 mg/kg. The results are presented as mean \pm SEM. Significant difference compared with control (* P < 0.05; *** P < 0.001). Analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.

These results suggested a central involvement in the antinociceptive effect of carvacrol, however the opioid receptor probably was not related to this action as well as NO.

Data in the literature demonstrated that drugs such as muscle relaxants, sedatives and psychomimetics may show activity in the acetic acid abdominal constriction and hot-plate tests. Our group previously studied the effects of oral administration of 50 mg/kg carvacrol in the open-field and

rotarod tests.^[11] Carvacrol at 100 mg/kg, similar to our previous findings, had no significant effect on the open-field and rotarod tests, suggesting that carvacrol did not present sedative and myorelaxant activity.

Conclusions

The main goal of this work was to demonstrate for the first time the antinociceptive activity of carvacrol in chemical and thermal-induced nociception models. The central effects of carvacrol were not clear once naloxone failed to revert the action of carvacrol in the acetic acid abdominal constriction and formalin tests, showing the lack of participation of the opioid system in antinociceptive effects of carvacrol. In addition, L-arginine failed in reverting the effect of carvacrol

in both tests, probably signifying no NO involvement in this action. Therefore, further studies are required to clarify the mechanisms involved in the antinociception effect of carvacrol.

Declarations

Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

Funding

The authors are grateful to the Brazilian National Research Council (CNPq) for the financial support.

References

- Vongtau HO *et al.* Antinociceptive profile of the methanolic extract of *Neorautanenia mitis* root in rats and mice. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 317–324.
- Nguelefack TB *et al.* Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). *J Ethnopharmacol* 2006; 106: 70–75.
- Baker DD. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 1225–1244.
- Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 131–134.
- Matos FJA *et al.* Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillia* H.B.K. (Verbenaceae). *J Essent Oil Res* 1999; 11: 666–668.
- Ipek E *et al.* Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem* 2005; 93: 551–556.
- Arrebola ML *et al.* Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. *Phytochemistry* 1994; 36: 67–72.
- Mulinacci M *et al.* H-NMR NOE and molecular modelling to characterize thymol and carvacrol β -cyclodextrin complexes. *Int J Pharm* 1996; 128: 81–88.
- Bimczok D *et al.* Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 652–658.
- Baser KHC. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3106–3120.
- Melo FHC *et al.* Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundam Clin Pharmacol* 2010; 24: 437–443.
- Melo FHC *et al.* Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 362–367.
- Guimarães AG *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 107: 949–957.
- Koster R *et al.* Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959; 18: 412–418.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103–114.
- Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953; 107: 385–393.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim Behav* 1973; 21: 205–235.
- Silva MI *et al.* Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmac Biochem Behav* 2007; 88: 141–147.
- Gene RM *et al.* *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effects. *J Ethnopharmacol* 1998; 60: 157–162.
- Salawu OA *et al.* Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and antiparasmodial effects of the methanolic extract of *Crossopteryx febrifuga*. *J Med Plants Res* 2008; 2: 213–218.
- Rocha NF *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2011; 384: 525–533.
- Araújo FLO *et al.* Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2009; 380: 337–344.
- Yaksh TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 94–111.
- Patil CS *et al.* Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antinociception. *Pharmacology* 2003; 69: 183–189.
- Pyne NJ *et al.* cGMP signal termination. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1019–1022.

26. Perimal EK *et al.* Zerumbone-induced antinociception: involvement of the L-arginine-nitric oxide-cGMP-PKC-K⁺ATP channel pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108: 155–162.
27. Campos MD *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *J Ethnopharmacol* 2007; 114: 161–168.
28. Chen YF *et al.* Antinociceptive activity of paederosidic acid methyl ester (PAME) from the n-butano fraction of *Paederia scandens* in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 93: 97–104.
29. Muccillo-Baisch AL *et al.* Evaluation of the analgesic effect of aqueous extract of *Brugmansia suaveolens* flower in mice: possible mechanism involved. *Biol Res Nurs* 2010; 11: 345–350.
30. Nguetefack TB *et al.* Antinociceptive activities of the methanol extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* in mice is dependent of NO-cGMP-ATP-sensitive-K⁺ channel activation. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 567–574.
31. Araújo FLO *et al.* Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 380: 337–344.
32. Lopes LS *et al.* Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 1184–1192.
33. Mbiantcha M *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of extracts from the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* (Dioscoreaceae) in mice and rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; doi:10.1155/2011/912935.
34. Couto VM *et al.* Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 2011; 134: 348–353.
35. Trongsakul S *et al.* The analgesic, antipyretic and antiinflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *J Ethnopharmacol* 2003; 85: 221–225.
36. Chapman CR *et al.* Pain measurement: an overview. *Pain* 1985; 22: 1–3.
37. Esmaili-Mahani S *et al.* Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J Ethnopharmacol* 2010; 132: 200–205.
38. Arslan R *et al.* Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *J Ethnopharmacol* 2010; 131: 28–32.